

令和 4 年 6 月 26 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H02659

研究課題名(和文)常在ナイセリア属菌の耐性遺伝子プールに着目した淋菌の耐性遺伝子の起源に関する研究

研究課題名(英文)Origin of drug resistant gene of Neisseria gonorrhoeae.

研究代表者

大西 真(Ohnishi, Makoto)

国立感染症研究所・副所長・副所長

研究者番号：10233214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：淋菌の薬剤耐性遺伝子の起源を明らかにするために、セフトリアキソン耐性非病原性ナイセリア属菌を12株分離しゲノム配列を明らかにした。その耐性遺伝子の性状解析を行った。これらの耐性遺伝子は、いずれも感受性淋菌を耐性に変化させることが可能であることを示した。N. subflavaは直接淋菌を耐性に変化させることはできなかったが、他の菌を経由することで淋菌を耐性に変化させることが可能であることが示された。これらの結果は、N. polysaccharrea, N. lactamica, N. cinereaおよびN. subflavaが淋菌の耐性遺伝子を保有する耐性遺伝子プールを形成していることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

淋菌の薬剤耐性化に非病原性ナイセリア属細菌が大きく影響を及ぼしている可能性を示した。淋菌を含むナイセリア属は遺伝子の共有化が可能であり、属としての共存進化の形の一端を示した意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：To clarify the origin of drug resistance genes in Neisseria gonorrhoeae, we isolated 12 strains of ceftriaxone-resistant nonpathogenic Neisseria spp.(N. polysaccharrea, N. lactamica, N. cinerea and N. subflava). We revealed their genome sequence and characterized resistance genes. All of these ceftriaxone resistant genes were shown to be capable of transforming ceftriaxone susceptible Neisseria gonorrhoeae into resistant by natural transformation using genome DNA of donors. Ceftriaxone resistant N. subflava, which could not directly transform N. gonorrhoeae into resistant, but could transform N. gonorrhoeae into resistant via other bacteria. These results indicated that N. polysaccharrea, N. lactamica, N. cinerea and N. subflava formed a resistance gene pool harboring resistance genes of N. gonorrhoeae.

研究分野：細菌学

キーワード：淋菌 形質転換 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

1928年のGriffithの実験で示された自然形質転換は、その後の研究により細菌が細胞外のDNAを獲得し、相同組換によってゲノムに取り入れることで起こる現象であることが示されている。自然形質転換による病原細菌の抗原性変化や薬剤耐性化といった表現系の変化が起こる数多くの例が報告されている。ヒト病原細菌に対する予防・治療方法が発展してきた現代では、予防・治療方法が与える「選択圧」とヒト病原細菌の菌種内進化の過程を観察する機会がある。その機会を捉えて自然形質転換が細菌の進化に与える影響を検証することは興味深い。

自然形質転換による外来DNAの取り込み能力の進化は遺伝情報としてのDNAの取得が受容菌の利益であったためと考えられる。自然形質転換によって創出される新規のgenotypeは、受容菌にとっては有益—中立—有害のいずれの可能性もあるが、受容菌ゲノムへの新規DNA配列の挿入が相同組換に依存しているため、受容菌のフィットネス低下につながる遺伝的関連の低いDNAは獲得されにくい。これが受容菌にとっての有害事象を抑制する力になっている可能性がある。加えて、自然形質転換に選択性を持たせる2つの方策があり、一つはクオラムセンシングによるDNA取り込み能力を制御する方法であり、他方は特異的DNA配列タグによる取込みDNAの選別である。

特異的DNA配列タグによる選別はナイセリア科とパスツレラ科の細菌に見られるユニークな「自己DNA」認識機能である。淋菌で見出されたDNA取り込み認識配列(DNA uptake sequence, DUS)は12塩基からなるタグで、2Mb程度の淋菌ゲノム上に1000箇所程度出現する。この配列をもつDNAを淋菌は効率よく取り込むと考えられている。興味深いことに、このDUSは近縁種においても共有されている。つまり、「自己DNA」の「自己」は必ずしも菌種単位で形成されていない。なで、このような同属(あるいは科)の細菌種によって、DNA認識タグが共有されているのであろうか。DNA認識タグの存在から、近縁菌種のいずれかで創出された共通の利益となりうる遺伝子が近縁菌種のなかで共有され広く存在するようになった可能性について、本研究で検証する。

2. 研究の目的

「自己DNA」のタグを同一科細菌が共有する利点をこの研究で明らかにし、その生物学的意味に関して考察することを目的とする。本研究では表現系を明確に観察できる抗菌薬耐性を指標に研究を展開する。「自己DNA」認識機能の属(あるいは科)内共有が可能としている効率の良い自然形質転換による遺伝子伝播が、同属(科)菌種の生存性を高めている可能性を検証する。非病原細菌の薬剤耐性については、未開拓な研究領域であるが、耐性遺伝子はヒト常在の非病原細菌にとっても有益な遺伝子となる。本研究で非病原細菌における耐性遺伝子プールの存在を確認し、耐性遺伝子プールから病原細菌への流入が見える可能性がある。抗菌薬耐性を指標に研究を展開することで、同属(科)菌株の「見かけ上の協調的な進化」の一端が見える可能性がある。

3. 研究の方法

非病原性ナイセリア属菌の性状解析: 咽頭スワブ(約202検体)から360株のグラム陰性球菌を収集した。セフトリアキソン(CRO)に対する感受性試験を実施し、CRO低感受性株を分離した。これらの株についてはIllumina MiSeqによるドラフトゲノム配列を取得し、ribosomal-MLSTによる菌種同定確認、CRO耐性遺伝子*penA*とその上下流にある遺伝子の配列を決定した。参照として感受性株についても、ドラフトゲノム配列を取得した。*penA*遺伝子を含むコンティグに関しては、特異的DNA配列タグ(DNA uptake sequenc)を検索し、その位置を明確にした。

CRO低感受性非病原性ナイセリア属菌(MIC値が0.5mg/L以上とした)のゲノムDNAを用いたCRO感受性淋菌(HI-001)の自然形質転換実験を行った。1% IsoVitaleXを添加したGC寒天培地にレシピエント株を接種し、5%炭酸ガス環境下、37°Cで20-24時間培養後、1% IsoVitaleX、10µM MgCl₂を添加したGC液体培地に分離されたコロニーを懸濁し、OD_{600nm}での吸光度OD₆₀₀=0.1に菌液を調整した。この菌液500µlとドナーの10µgゲノムDNA(Wizard Genomic DNA Purification Kit(Promega)で精製した)のエタノール沈殿物を混合後、5%炭酸ガス環境下、37°Cで6時間培養した。培養液をレシピエントのCROのMIC値の4倍濃度のCROを含有したGC寒天培地に菌液を塗付後、5%炭酸ガス環境下、24-48時間37°C培養で得られたコロニーをCRO非含有GC培地で単離し、形質転換体采取了。また、菌の混合培養での形質転換も実施した。混合培養液より淋菌株のみを得るためにVancomycin、Colistin、Nystatin、Trimethoprim lactate(VCNT)を加えた。

得られた形質転換体の薬剤感受性試験を行った。CRO, CFMの最小発育阻止濃度(MIC)を寒天平板希釈法にて確認した。MIC値の上昇が確認された形質転換体について、Illumina MiSeqによるドラフトゲノム配列を取得し、*penA*遺伝子領域のゲノム配列を決定した。ドナー、レシピエントそれぞれの配列と比較し、50bpごとの不一致数をグラフ化することで組換え領域を推定した。

耐性遺伝子の水平伝播の再現: 上記の実験で得られた感受性株と耐性株を用いて混合培養を行い、耐性遺伝子の水平伝播を再現する。遺伝子伝播の有無と頻度について検証する。CRO感受性

4. 研究成果

総計 202 名からの咽頭拭い検体から、360 株のグラム陰性球菌を分離した。そのうち、16 株の CRO 低感受性の非病原性ナイセリア属菌の分離に成功した。このうち 5 株は同一検体由来であることから、重複と判断して 11 株を以後の実験に供した。加えて、愛知医大三鴨教授から分与された、CRO 低感受性の *N. cinerea* AM1601 も対象株に加え、12 株について解析した。

Table 1 Ceftriaxone (CRO)/Cefixime (CFM) non-susceptible commensal *Neisseria* spp.

Species	Strain name	CRO MIC (mg/L)	CFM MIC (mg/L)
<i>N. lactamica</i>	NLA-1	1	2
<i>N. subflava</i>	NSU-51	1	1
<i>N. cinerea</i>	SH43-3	2	4
<i>N. polysaccharea</i>	SH43-1	0.5	2
<i>N. polysaccharea</i>	SI28-1	1	1
<i>N. cinerea</i>	SI57-1	2	1
<i>N. cinerea</i>	SI48	1	2
<i>N. lactamica</i>	SI60-1	2	4
<i>N. lactamica</i>	SI68-3	0.5	0.5
<i>N. lactamica</i>	SI77-2	2	16
<i>N. subflava</i>	SI94-3	2	16
<i>N. cinerea</i>	AM1601	2	2

Illumina MiSeq によって、上記 12 株のドラフトゲノムを取得した。また、比較対象として CRO 感受性株 86 株についても、ドラフトゲノムを取得した。ドラフトゲノム配列情報を用いて、全 98 株の ribosomal-MLST による菌種同定確認、CRO 耐性遺伝子 *penA* とその上下流にある遺伝子の配列を決定した。

CRO 低感受性の非病原性ナイセリア属菌 12 株のゲノム DNA を精製し、CRO 感受性淋菌 (*N. gonorrhoeae* HI001) の形質転換を行なった。その結果、*N. lactamica* 4 株、*N. cinerea* 4 株、*N. polysaccharea* 2 株のゲノム DNA によって、CRO 耐性を示す *N. gonorrhoeae* HI001 の形質転換体が得られた。得られた形質転換体のドラフトゲノム配列を取得し、*penA* 遺伝子の上下流各々 2 kb を含む約 5.7 kb (*penA* 遺伝子は 2001-3749) の DNA 配列を、ドナーおよびレシピエントの同一領域と比較することで、形質転換体における組換え領域を推定した (Figures 1-3)。形質転換体によって、その組換え領域が異なることが示された。

Fig. 1. Recombination of DNA including *penA* sequence between *N. polysaccharea* SH43-1 and SI28-1, and *N. gonorrhoeae* HI001

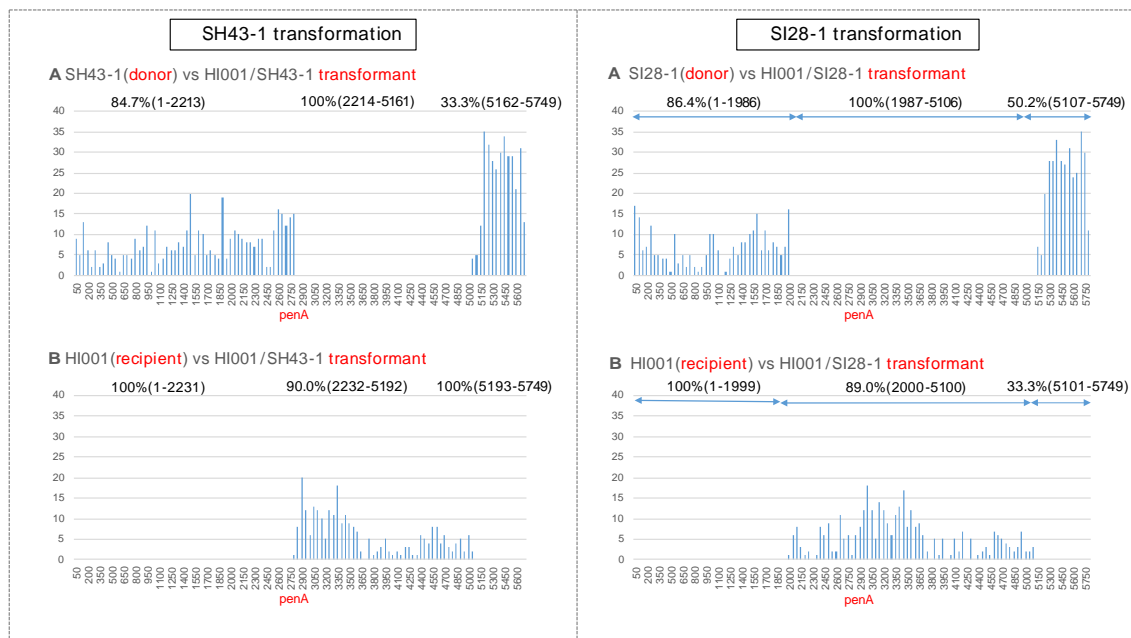


Fig. 2. Recombination of DNA including *penA* sequence between *N. lactamica* SI60-1 and SI68-3, and *N. gonorrhoeae* HI001

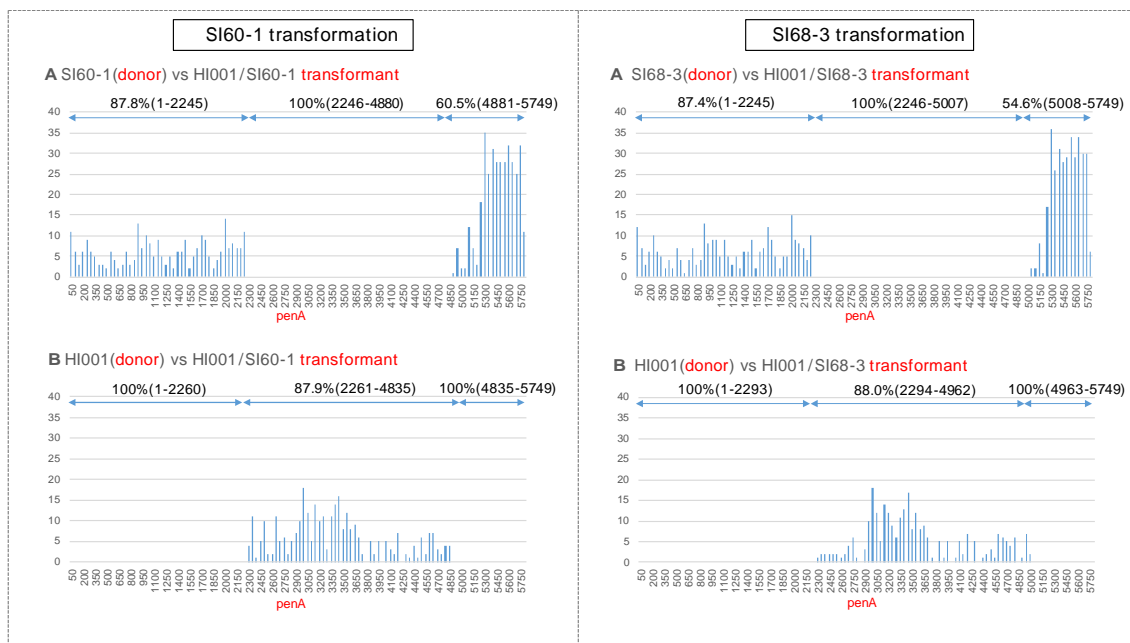
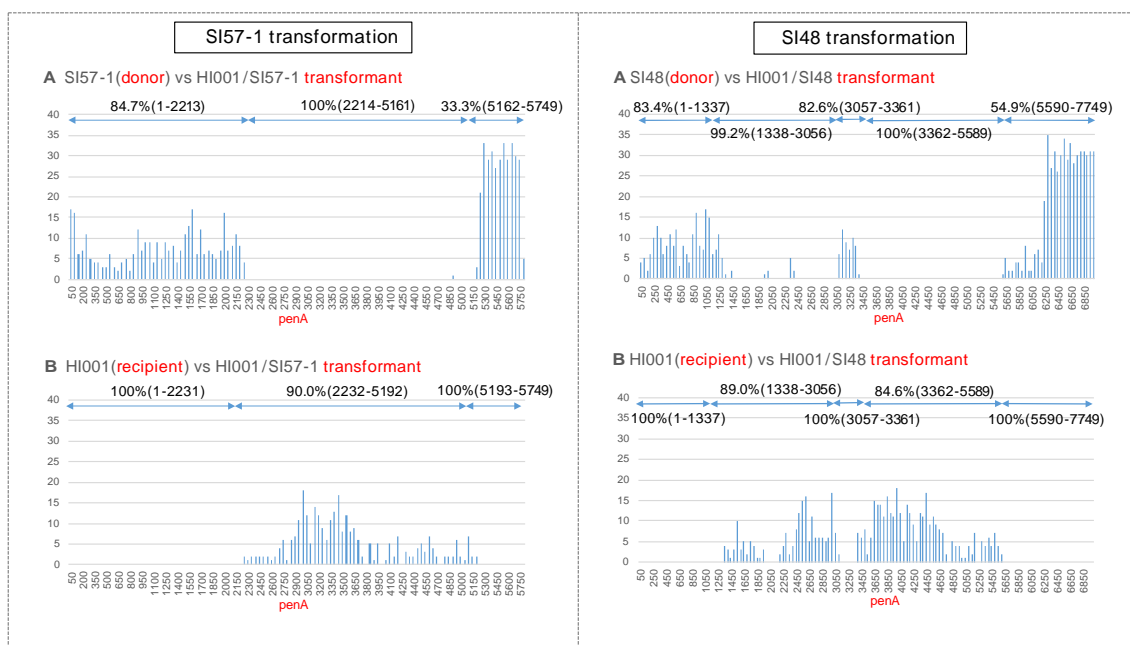


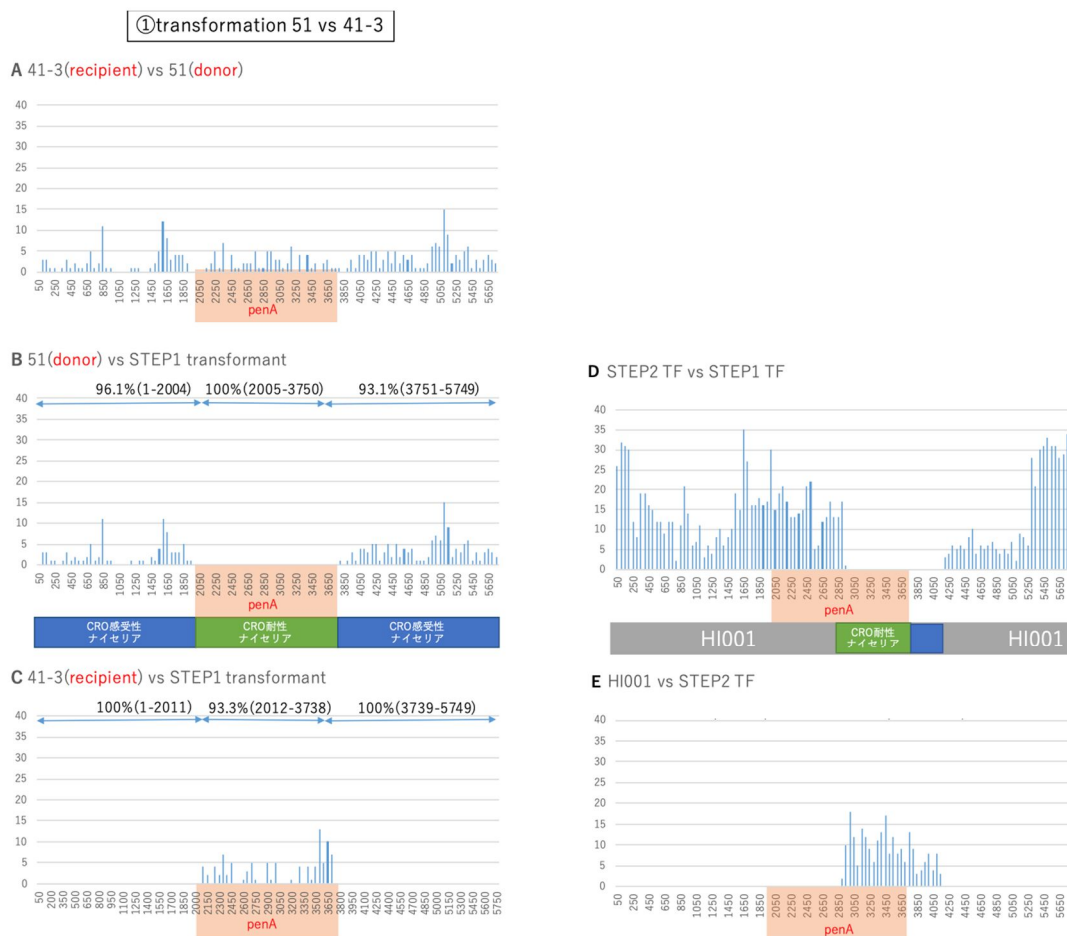
Fig. 3. Recombination of DNA including *penA* sequence between *N. cinerea* SI57-1 and SI48, and *N. gonorrhoeae* HI001



CRO 低感受性の非病原性ナイセリア属菌のうち、*N. subflava* の 2 株 (51 および SI94-3) のゲノム DNA を用いた形質転換では、耐性を示す形質転換体は得られなかった。ドナーDNA として *penA* 遺伝子領域の PCR 産物に変更することでドナーDNA の *penA* 遺伝子コピー数を増加させて形質転換実験を実施しても、形質転換体は得られなかった。ドナーとレシピエント間の DNA 相同性の低いことから形質転換効率が低い可能性が考えられた。そこで、*N. subflava* のうち CRO 感受性の株をレシピエントに形質転換実験を実施した。その結果、*N. subflava* 41-3 をレシピエントにして、*N. subflava* 51 および *N. subflava* SI94-3 のゲノム DNA を用いて形質転換することで CRO 耐性を示す形質転換体 (STEP 1 Transformant) が得られた。それぞれの STEP1 transformant のゲノム DNA を抽出し、*N. gonorrhoeae* HI001 をレシピエントに形質転換実験を行うことで、CRO 耐性を示す *N. gonorrhoeae* HI001 (STEP2 transformant) が得られた。*N. subflava* 51 (CRO 低感受性) のゲノム DNA をドナーに用いた実験で得られた形質転換体 (STEP 1 および STEP2) の DNA の由来を塩基配列比較で検討した結果を Fig.4 に示した。Fig.4A に *N. subflava* 51 (CRO 低感受性) と *N. subflava* 41-3 (CRO 感受性) の *penA* 領域の DNA の相同性を示した。*penA* とその上下流領域で、全体的に 90%程度の DNA 相同性を示した。上記の形

質転換で得られた STEP 1 Transformant とそのドナー (*N. subflava* 51) とレシピエント (*N. subflava* 41-3) との配列比較から (Fig. 4 BC)、*N. subflava* 51 の *penA* 領域のほぼ全長が *N. subflava* 41-3 に組換えで挿入されていることが示唆された。また STEP2 transformant とドナー (STEP1 transformant) とレシピエント (*N. gonorrhoeae* HI001) との配列比較から (Fig. 4 DE) *N. gonorrhoeae* HI001 に、STEP 1 transformant の *penA* 遺伝子の 3' 側の半分と、その下流域を含んだ形で組換えで挿入されていることが示唆された。結果として、2 段階の形質転換で *N. gonorrhoeae* は、*N. subflava* 51 の *penA* 遺伝子の 3' 末端半分と *N. subflava* 41-3 の *penA* 下流域を獲得した形であった (Fig.4D)。

Fig. 4 Recombination of DNA including *penA* sequence between *N. subflava* 51 and 41-3, and the transformant of *N. subflava* (STEP 1 transformant) and *N. gonorrhoeae* HI001



N. subflava 51 および SI94-3 と *N. gonorrhoeae* HI001 の *penA* 遺伝子下流 1 kb の範囲の DNA 相同性は 46%と低い。一方、*N. subflava* 41-3 と *N. gonorrhoeae* HI001 との当該領域は 88%と相同性が比較的高いことが今回の解析で示された。*N. gonorrhoeae* の CRO 耐性には *penA* 遺伝子の 3' 側の約半分が重要であることが知られている。3' 末端領域を含むことが必須かどうかは分かっていないが、もし、必須であるならば *penA* 遺伝子の下流域の相同性が低いことが組換え効率を低下させたことが、*N. subflava* の 2 株 (51 および SI94-3) のゲノム DNA では *N. gonorrhoeae* HI001 の CRO 耐性形質転換体を得ることが出来なかった原因の可能性が示唆された。

ドナー菌株とレシピエント菌株とを混合して CRO 非存在下にて培養し、耐性遺伝子の水平伝播を検証した。CRO 感受性淋菌 (HI001)1 菌株と CRO 低感受性非病原性ナイセリア属菌の 6 菌株 (*N. cinerea* 2 株と *N. polysaccharea* 2 株、*N. subflava* 2 株) による実験を行った。その結果、*N. cinerea*、*N. polysaccharea* を使用した実験において形質転換体を得られた。DNase 存在化ではこれら形質転換体は得られなかった。形質転換体の一部について MIC を測定した結果、レシピエント株である *N. gonorrhoeae* HI001 の CRO の MIC 値 (0.016) と比較して 31.3 ~ 62.5 倍上昇した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Sanchez-Buso; L, Golparian D, Corander J, Grad YH, Ohnishi M, Flemming R, Parkhill J, Bentley SD, Unemo M, Harris SR.	4. 巻 4
2. 論文標題 The impact of antimicrobials on gonococcal evolution.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nat Microbiol.	6. 最初と最後の頁 1941-1950
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41564-019-0501-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Shimuta K, Nakayama SI, Takahashi H, Ohnishi M.	4. 巻 64
2. 論文標題 A Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay Targeting Neisseria gonorrhoeae penA-60.001.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antimicrob Agents Chemother.	6. 最初と最後の頁 e01663-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AAC.01663-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimuta K, Igawa G, Yasuda M, Deguchi T, Nakayama SI, Ohnishi M.	4. 巻 19
2. 論文標題 A real-time PCR assay for detecting a penA mutation associated with ceftriaxone resistance in Neisseria gonorrhoeae.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Glob Antimicrob Resist.	6. 最初と最後の頁 46-49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jgar.2019.02.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Lee K, Nakayama SI, Osawa K, Yoshida H, Arakawa S, Furubayashi KI, Kameoka H, Shimuta K, Kawahata T, Unemo M, Ohnishi M	4. 巻 74
2. 論文標題 Clonal expansion and spread of the ceftriaxone-resistant Neisseria gonorrhoeae strain FC428, identified in Japan in 2015, and closely related isolates.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Antimicrob Chemother.	6. 最初と最後の頁 1812-1819
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jac/dkz129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Golparian D, Rose L, Lynam A, Mohamed A, Bercot B, Ohnishi M, Crowley B, Unemo M.	4. 巻 23
2. 論文標題 Multidrug-resistant <i>Neisseria gonorrhoeae</i> isolate, belonging to the internationally spreading Japanese FC428 clone, with ceftriaxone resistance and intermediate resistance to azithromycin, Ireland, August 2018.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Euro Surveill	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2807/1560-7917	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yahara K, Nakayama SI, Shimuta K, Lee KI, Morita M, Kawahata T, Kuroki T, Watanabe Y, Ohya H, Yasuda M, Deguchi T, Didelot X, Ohnishi M.	4. 巻 4
2. 論文標題 Genomic surveillance of <i>Neisseria gonorrhoeae</i> to investigate the distribution and evolution of antimicrobial-resistance determinants and lineages.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microb Genom	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/mgen.0.000205	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Shimuta K, Lee K, Yasuda M, Furubayashi K, Uchida C, Nakayama SI, Takahashi H, Ohnishi M.	4. 巻 48
2. 論文標題 Characterization of 2 <i>Neisseria gonorrhoeae</i> Strains With High-Level Azithromycin Resistance Isolated in 2015 and 2018 in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sex Transm Dis	6. 最初と最後の頁 e85-e87
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/OLQ.0000000000001303.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yahara K, Ma KC, Mortimer TD, Shimuta K, Nakayama SI, Hirabayashi A, Suzuki M, Jinnai M, Ohya H, Kuroki T, Watanabe Y, Yasuda M, Deguchi T, Eldholm V, Harrison OB, Maiden MCJ, Grad YH, Ohnishi M.	4. 巻 13
2. 論文標題 Emergence and evolution of antimicrobial resistance genes and mutations in <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genome Med	6. 最初と最後の頁 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13073-021-00860-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hanao M, Aoki K, Ishii Y, Shimuta K, Ohnishi M, Tateda K.	4. 巻 76
2. 論文標題 Molecular characterization of <i>Neisseria gonorrhoeae</i> isolates collected through a national surveillance programme in Japan, 2013: evidence of the emergence of a ceftriaxone-resistant strain from a ceftriaxone-susceptible lineage	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Antimicrobial Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 1769-1775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jac/dkab104	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 7件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大西真
2. 発表標題 未来の淋菌感染症対策
3. 学会等名 第67回日本化学療法学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 樽本憲人、前崎繁文、前田拓哉、中山周一、大西真、早川 智、井戸田一朗
2. 発表標題 PNA-LAMP法を用いたマクロライド耐性梅毒トレポネーマの検出に関する検討
3. 学会等名 日本性感染症学会第32回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 志牟田 健、中山周一、高橋英之、大西真
2. 発表標題 淋菌penA 60.001遺伝子のLAMP法による検出
3. 学会等名 日本性感染症学会第32回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西 真
2. 発表標題 梅毒および薬剤耐性淋菌感染症の動向
3. 学会等名 第71回日本細菌学会中国・四国支部総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Makoto Ohnishi
2. 発表標題 Surveillance for antimicrobial resistant Neisseria gonorrhoeae in Japan - disseminating of a ceftriaxone resistant clone
3. 学会等名 IUSTI Asia Pacific, 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大西 真
2. 発表標題 淋菌感染症の迅速診断 いま必要とされていること
3. 学会等名 第31回日本性感染症学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Makoto Ohnishi
2. 発表標題 The surveillance of bacterial infectious diseases and the study of genomics epidemiology in Japan
3. 学会等名 広東省CDC講習会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大西 真
2. 発表標題 淋菌感染症の疫学・病原性と検査法
3. 学会等名 第30回日本臨床微生物学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大西 真
2. 発表標題 淋菌感染症 最近のトピックス
3. 学会等名 第34回 日本性感染症学術大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大西 真
2. 発表標題 薬剤耐性淋菌感染症の現況
3. 学会等名 第95回日本感染症学会学術講演会 第69回日本化学療法学会総会 合同学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	志牟田 健 (Shimuta Ken) (40370960)	国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官 (82603)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	中山 周一 (Nakayama Shuichi) (80280767)	国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官 (82603)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関