

令和 3 年 4 月 27 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05825

研究課題名(和文) 魚類レンサ球菌のABC輸送体の遺伝子変異により誘導される薬剤耐性に関する研究

研究課題名(英文) The induction of drug resistance due to the mutation of ABC transporter gene in fish pathogenic *Lactococcus garvieae*

研究代表者

吉田 照豊 (Yoshida, Terutoyo)

宮崎大学・農学部・教授

研究者番号：20240294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：魚類レンサ球菌の原因細菌である*Lactococcus garvieae*の血清型IおよびII型のリンコマイシン耐性(LCM)機構について研究した。新しく見つけたIsa(D)遺伝子がLCM耐性遺伝子であることを証明した。また、この遺伝子はゲノム上に存在しており、LCM耐性菌と感受性菌のIsa(D)の比較で1塩基の変異が認められた。その結果、I型では1アミノ酸の変異、II型菌では終止コドンに変異していた。さらにこのIsa(D)は、他系統の薬剤であるチアムリンやバージニアマイシンに対しても耐性を与えることを示した。本研究は、魚類レンサ球菌のリンコマイシン耐性機構を明らかにした研究である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

養殖場では、魚類レンサ球菌の原因細菌である*Lactococcus garvieae*の治療薬には多くの薬剤を使用している、リンコマイシン(LCM)も選択薬として使用されているが、養殖場に蔓延して耐性菌となった。現在ではあまり使用されていないにもかかわらず、養殖場から分離される菌はかなりの確率で耐性を示している。長らくLCM耐性機構が不明のままであった。本研究において、新しく発見したIsa(D)が、LCM耐性に寄与することを証明した。また、他系統の薬剤であるチアムリンやバージニアマイシンに対しても耐性を与えることを示した。本研究は、魚類レンサ球菌のリンコマイシン耐性機構を明らかにした研究である。

研究成果の概要(英文)：Fish pathogenic *Lactococcus garvieae* serotype I and II have been isolated from cultured fish species in Japan. This study aimed to investigate the molecular mechanisms of lincomycin (LCM)-resistant *L. garvieae* serotype I and II, and assess the molecular basis for lincosamide-streptogramins A-pleuromutilins (LSAP)-resistant phenotype. We identified a novel Isa(D) gene, ATP-binding cassette F (ABC-F) protein in the LSAP-resistant strains in *L. garvieae* I and II serotypes. Amino acid identities of 40-54% were obtained between the deduced amino acids from Isa(D) and other Lsa-type ABC-F proteins. Furthermore, comparative analysis revealed that the allele of Isa(D) with single point mutation in LSAP-sensitive strains in serotype I and II. The minimum inhibitory concentrations of antimicrobials against the Isa(D) complementary strain and Isa(D)-disrupted mutant confirmed that Isa(D) conferred the LSAP-resistant phenotype.

研究分野：魚類病原微生物学

キーワード：薬剤耐性 レンサ球菌 リンコマイシン Isa(D) *Lactococcus garvieae* 血清型 ABC-F

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ブリ類の病原体である *L. garvieae* は、抗菌剤の長年の使用により多剤耐性化した。しかしながら、長年の研究の成果からワクチンが開発されその被害は減少した。ワクチンの普及により養殖場での抗菌剤使用が減り、耐性株の出現率も一旦は減少した。しかし出荷直前の養殖魚では感染防御に必要な抗体が低下しており、大型の魚にレンサ球菌症が発生している。ワクチンの無い養殖対象魚種では、レンサ球菌症が大きな問題となっており、抗菌剤による治療が不可欠である。特にマグロ養殖では、レンサ球菌の治療には抗菌剤の投与のみで、多くの被害がみとめられている。現状では、多剤耐性株が減少したにもかかわらず、養殖場において、いまだにほとんどのレンサ球菌が LCM 耐性化している。

LCM は残留期間が短く出荷前の大型魚の治療に、重要な第一選択薬剤である。しかしながら耐性菌が増加し、LCM 投薬による治療が難しくなっている。そのため、残留期間の長いマクロライド系抗生剤に頼らざるおえない状況にある。これら残留期間の長い抗生剤を使用した場合、長期に出荷できず、餌料費等の経費が経営を圧迫している。今後、薬剤の使用増加による多剤耐性が懸念される。さらに悪いことに、2012 年に従来と異なる血清型 II 型に分類される新型 *L. garvieae* が突然出現した。現在では、この新型レンサ球菌症が養殖場において猛威を振っている。この菌株は、従来のワクチンでは予防できない抗原変異型の菌株であった。この血清型 II 型による感染症も、2015 年には LCM 単剤耐性菌株が出現し、治療がますます困難となった。高度薬剤耐性に関与する耐性遺伝子の中で、LCM 単剤の耐性化機構は長らく不明であった。また、多くの薬剤に対する中等度の耐性機構についても、未解明のままである。現在分離される血清型 I および II 型 *L. garvieae* 菌株の 70% 以上が、LCM 高度単剤耐性化しており問題となっている。*L. garvieae* 菌株の LCM 耐性株と感受性株のゲノム解析を行った、その結果、ABC 輸送体タンパク質(*lsa* ホモログ)において、耐性株と感受性株において 1 塩基の置換が認められた。

2. 研究の目的

ブリ類レンサ球菌の高度薬剤耐性に関与する耐性遺伝子の中で、LCM 単剤の耐性化機構は長らく不明であった。また、多くの薬剤に対する中等度の耐性機構についても、未解明のままである。現在分離される血清型 I および II 型 *L. garvieae* 菌株の 70% 以上が、LCM 高度単剤耐性化しており問題となっている。*L. garvieae* 菌株の LCM 耐性株と感受性株のゲノム解析を行った、その結果、ABC 輸送体タンパク質(*lsa* ホモログ)において、耐性株と感受性株において 1 塩基の置換が認められた。本研究では、ABC 輸送体タンパク質をコードする *lsa* ホモログの変異により、誘導される LCM 耐性および他薬剤の感受性低下の機構を解明することが目的である。

3. 研究の方法

薬剤感受性試験による薬剤耐性菌の疫学調査

薬剤感受性試験および耐性遺伝子の検出 ; *L. garvieae* 血清型 I および II 型菌株の薬剤感受性試験を行う。血清型 I 型については、研究室保存の株を用いる。II 型に関しては、初発の 2012 年以降の菌株を用いる。養殖場で現在使用されている薬剤 (LCM, EMC, ABPC, OTC, FF) の薬剤感受性試験を行い、レンサ球菌の耐性頻度を明らかにする。耐性菌においては、既知の耐性を誘導する耐性遺伝子をそれぞれ PCR で検出する。

疫学調査；新興レンサ球菌症の原因細菌である血清型II型は、2012年に始めて疾病が確認された。また、2014年にLCM耐性株が初めて分離された。2014年～2017年において分離されたLCM耐性株、および2018、2019年において分離されるLCM耐性株をパルスフィールド電気泳動解析し、細菌株のゲノム型を分析することで、耐性株がどのように養殖場で拡散・伝播したかを明らかにする。

L. garvieae I 型および II 型株のリンコマイシン耐性株と感受性株の完全ゲノム解析

ゲノム解析；*L. garvieae* 血清型 I および II 型株の LCM 単剤耐性株および感受性株の完全長のゲノム配列を得る（既に数株は、その完全長の解析が終了している）。ABC 輸送体タンパク質をコードしている遺伝子の比較を行うことで、変異箇所を明らかにする。また、耐性株と感受性株の ABC 輸送体のアミノ酸レベルでの変異を明らかにする。

系統解析；哺乳動物由来の病原細菌である、*Enterococcus faecium* 等の薬剤耐性に関与する ABC 輸送体コード遺伝子との比較を行う。*L. garvieae* 血清型 I および II 型の LCM 耐性に関与する *lsa* 遺伝子と近い ABC 輸送体遺伝子を明らかにすることで、魚類レンサ球菌の *lsa* 遺伝子の系統解析を行う。

人工耐性株の作製と ABC 輸送タンパク質コード遺伝子の変異

人工耐性株の作製；*L. garvieae* 血清型 I および II 型の LCM 感受性株を、低濃度 LCM 添加培地で人為的に継代・培養し、人工耐性株（野生耐性株と同等の耐性株）を作製する。得られた人工耐性株の ABC 輸送体コード遺伝子の変異箇所を特定する。また、野生耐性株（養殖場分離株）との比較を行い、変異の普遍性を明らかにする。

人工耐性株の最少発育阻止濃度(MIC)を測定；人工耐性株の他薬剤に対する薬剤感受性試験を行い、交差耐性を調査する。特に、養殖現場でレンサ球菌症の治療薬（5種）と LCM 系薬剤について調査する。また、畜産動物や人に用いられる LCM 系薬剤であるクリンダマイシンに対しても MIC 値の変動を明らかにし、交差耐性を証明する。

LCM耐性遺伝子ノックアウト（欠失）株の作製；ABC輸送体コード遺伝子を、ノックアウトベクター（pSET4S; sp^r）にクローニングする。耐性株に *lsa* ホモログをクローニングしたノックアウトベクターを導入し、相同組替えを行う。その後、ABC輸送体コード遺伝子が欠失した株を選択する。ノックアウトした菌株の LCM および他薬剤に対する薬剤感受性を測定することで、ABC輸送体コード遺伝子が LCM 耐性化の本質であることを証明する。

相補株の作製(耐性の回復株の作成)；発現ベクター（pMAX）に *lsa* ホモログをクローニングし、ノックアウト株（上記ノックアウト株）にクローニングしたベクターを戻す。ABC輸送体遺伝子 *lsa* ホモログを欠失株にもどすことで、LCM耐性を回復させる（相補株）。相補株の LCM 耐性の回復により、ABC輸送体の LCM 耐性関与を完全に証明する。これら相補株の薬剤感受性試験を行い、他薬剤の MIC 値の変動をも調査する。

リンコマイシン耐性株の迅速遺伝子診断技術の開発

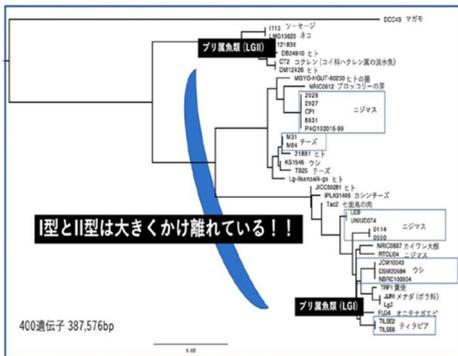
LCM耐性株を迅速に検出できる遺伝子診断技術の開発；ABC輸送体タンパク質をコー

ドする *lsa* 遺伝子の発現を、検出できる手法の確立をめざす。RT-PCR法および定量PCRにより *lsa* の mRNA レベルでの転写を測定し、LCM 耐性株の迅速検出法を確立する。

4. 研究成果

薬剤感受性試験による薬剤耐性菌の疫学調査

L. garvieae において、I 型および II 型ともに、リンコマイシン耐性の割合が高くなっていった。特に、II 型菌では 2015 年に初めてリンコマイシン耐性が認められた。また、エリスロマイシン耐性菌が初めて 2020 年に確認された。I 型および II 型ともにエリスロマイシン耐性は、プラスミド上に *ermB* がコードされていた。I および II 型菌は、2012 年の発生当初より、BSFGE 解析により同じ遺伝型を示していることが判明した。その結果、養殖場と同じ遺伝型の菌が拡散していったと考えられた。



L. garvieae I 型および II 型株のリンコマイシン耐性株と感受性株の完全ゲノム解析

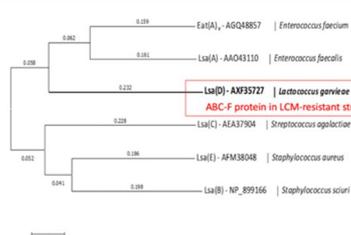
ゲノム解析による MLSA を行った場合 I 型菌と II 型菌は、かなり離れた細菌群であることがわかり、II 型菌は I 型菌の変異株という仮説は否定された。ゲノム解析より、II 型菌はネコなどの哺乳動物由来菌株に近い系統に分類された。

人工耐性株の作製と ABC 輸送タンパク質コード遺伝子の変異

リンコマイシン耐性 (LCM 耐性) および LCM 感受性の菌株の ABC 輸送タンパク質をコードする遺伝子 (*lsa*) の塩基配列を決定した。その結果、I 型および II 型株ともの 1 塩基の変異が確認された。I 型株では 1 アミノ酸の変異となっていた。II 型では、LCM 感受性菌では、終止コドンとなっており、成熟したタンパク質として発現していないと推察された。また、RT-PCR から正常なタンパク質の発現ではないことが判明した。

Lsa 遺伝子欠失株と相補株の作製

Relatedness between ABC-F protein in *Lactococcus garvieae* serotype II and other *Lsa* homologous proteins



I 型および II 型の LCM 耐性株から *lsa* 遺伝子の欠失株をそれぞれ作成し、LCM に対する耐性を調べた。その結果、*lsa* 遺伝子の欠失株では LCM 感受性株に変異していた。また、この欠失株に *lsa* 遺伝子を組み込んだ発現ベクターを形質導入させた株では、LCM 耐性が回復したため、*lsa* 遺伝子が LCM 耐性遺伝子であることを証明した。また、正常な *lsa* 遺伝子を保有する細菌は、LCM および クリンドマイシンにも耐性を示した。さらに、チアムリン および バージニアマイシンにも耐性を示した。さらに、LCM 感受性株を LCM が低濃度含んだ培地上で変異株を作成させた。その結果、野生の LCM 耐性株と同じく *lsa* 遺伝子の同じ部位に変異が起きていた。魚類レンサ球菌から発見した LCM 耐性遺伝子は過去の類似の *lsa* タンパク質と大きくアミノ酸配列が異なり、*lsa*(D) 遺伝子として登録し認められた。

LCM 耐性株を迅速に検出できる遺伝子診断技術の開発

LCM 耐性株と感受性株を識別できる RT-PCR 法の開発を行った。II 型菌では両者を識別できるプライマーが設計でき、容易に識別できるようになったために、薬剤感受性試験を行わずとも RT-PCR で耐性を識別できるようになった。

まとめ

血清型 I および II 型の LCM 単剤耐性菌と感受性菌株の完全長のゲノムを解析した。LCM 耐性菌において、ABC 輸送体タンパク質群の 1 つをコードする遺伝子 *lsa* ホモログに、塩基置換の変異を発見した。ABC 輸送体は、生物体が保有し構造的特徴を共有する膜タンパク質ファミリーである。ガン細胞の多剤耐性に関与する ABC 輸送体については、その構造および耐性機構が詳しく研究されているものの、魚類の病原細菌の ABC 輸送体と薬剤耐性の関連性については研究されていない。*L. garvieae* 血清型 I 型において、*lsa* ホモログ遺伝子の塩基置換によりアミノ酸変異が生じ、LCM に高度耐性化することを発見した。II 型においては、ABC 輸送体遺伝子に 1 塩基置換があることを見いだした。LCM 感受性菌株では、*lsa* ホモログ中に終止コドンがあり、ABC 輸送体の発現が認められなかった。耐性菌では、1 塩基置換により完全長の ABC 輸送体の発現が確認された。また、人為的に耐性化させた LCM 人工耐性菌株においても、野生株と同じ部位に変異が生じていた。この変異により、LCM のみならず他薬剤への感受性低下が認められた。これらの耐性菌は、ヒトや畜産動物で使用されるクリンダマイシンにも交差耐性を示した。疫学調査から、同じ耐性機構を持つレンサ球菌が養殖場に拡散・伝播していた。魚類レンサ球菌から発見した LCM 耐性遺伝子は過去の類似の *lsa* タンパク質と大きくアミノ酸配列が異なっていた。このタンパク質をコードする遺伝子を *lsa(D)* として登録し認められた。

掲載論文

1) Yin-Ze Shi, Issei Nishiki, Soetsu Yanagi and Terutoyo Yoshida (2019); Epidemiological Study on Newly Emerging *Lactococcus garvieae* Serotype II Isolated from Marine Fish Species in Japan. *Fish Pathology*, 54(3), 51-57.

2) Yin-Ze Shi, Terutoyo Yoshida, Atushi Fujiwara and Issei Nishiki (2021); Characterization of *lsa(D)*, a Novel Gene Responsible for Resistance to Lincosamides, Streptogramins A, and Pleuromutilins in Fish Pathogenic *Lactococcus garvieae* Serotype II. *Microbial Drug Resistance*, 27(3) DOI: 10.1089/mdr.2020.0218

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yin-Ze Shi, Terutoyo Yoshida, Atushi Fujiwara and Issei Nishiki	4. 巻 27
2. 論文標題 Characterization of Isa(D), a Novel Gene Responsible for Resistance to Lincosamides, Streptogramins A, and Pleuromutilins in Fish Pathogenic <i>Lactococcus garvieae</i> Serotype II	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbial Drug Resistance	6. 最初と最後の頁 301-310
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/mdr.2020.0218	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 Yin-Ze Shi, Issei Nishiki, Soetsu Yanagi and Terutoyo Yoshida	4. 巻 54(3)
2. 論文標題 Epidemiological study on newly emerging <i>Lactococcus garvieae</i> serotype II isolated from marine fish species in Japan	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Fish Pathology	6. 最初と最後の頁 51-57
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yin-Ze Shi, Terutoyo Yoshida and Issei Nishiki
2. 発表標題 <i>Lactococcus garvieae</i> serotype I Isa homologous gene may influence susceptibility to lincomycin
3. 学会等名 魚病学会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------