

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10457

研究課題名（和文）カルバペナーゼ保有プラスミド遺伝子保有パターンによる系統推定及び拡散状態の評価

研究課題名（英文）Dissemination and phylogeny of carbapenemase harboring plasmids based on their gene contents.

研究代表者

鈴木 匡弘（Suzuki, Masahiro）

藤田医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70446649

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）：腸内細菌目細菌における主要な薬剤耐性菌における -ラクタマーゼはIncFプラスミド上に存在することが多い。臨床分離株のゲノム解析とゲノムデータの機械学習から薬剤耐性プラスミドと染色体との組み合わせが薬剤耐性遺伝子の保持に関与することが示唆された。染色体の遺伝的な性質とプラスミドの系統の総合的な解析により、優勢となる薬剤耐性菌の解明につながると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、プラスミドの系統解析が進み、薬剤耐性遺伝子は特定の系統に分類されるプラスミド上に多いことが明らかとなった。また、ゲノムデータの機械学習手法による解析に道筋を付けることに成功し、染色体の性質によって薬剤耐性プラスミドの保有頻度が決まることがゲノムデータから見いだされた。細菌のゲノム解析ではプラスミドと染色体の系統に着目することで、薬剤耐性菌として流行する潜在能力を推定するための基礎的知見が得られ、感染制御の一助となると期待される。

研究成果の概要（英文）： -lactamases in the major drug-resistant strains of Enterobacterales are often located on IncF plasmids. Genomic analysis of clinical isolates and machine learning of genomic data suggest that the combination of drug resistance plasmids and chromosomes is involved in the retention of drug resistance genes. Comprehensive analysis of the genetic properties of the chromosomes and the plasmid phylogeny is expected to help elucidate the predominant drug-resistant bacteria.

研究分野：薬剤耐性菌

キーワード：プラスミド 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

カルバペネマーゼ産生腸内細菌科細菌 (CPE) は、カルバペネマーゼを保有するプラスミドの獲得によって生じる。したがって CPE の分子疫学的特徴は薬剤耐性プラスミドの不和合性 (Inc 型) と宿主となる菌の遺伝子型によって説明されることが多い。しかしながら、プラスミドは染色体と異なりコアとなる保存的構造を欠いていることから系統的な解析が困難で、同一 Inc 型内におけるカルバペネマーゼ保有プラスミドの遺伝子型系統などの位置づけができていない。薬剤耐性プラスミドを系統的に整理するためには、薬剤耐性遺伝子を保有するプラスミドの系統解析、および同一 Inc 型内での薬剤耐性プラスミドの多様性の把握により、薬剤耐性遺伝子拡散に関する理解を深めることが必要である。

上記したプラスミドの解析を進めるには、まずプラスミドの塩基配列データが必要となる。近年はシーケンス技術が進み、全ゲノムが解析された腸内細菌科細菌のデータがデータベースから入手できる。海外で多い NDM 型や KPC 型カルバペネマーゼについては、世界中でゲノム解析された分離株の情報が利用可能で、プラスミドとの関係を解析するための塩基配列データも多い。ところが、日本国内で主に検出される IMP 型カルバペネマーゼは海外での検出頻度が低く、NCBI データベース上のゲノムデータにも登録数は少ない。そのため IMP 型カルバペネマーゼ保有プラスミドの情報がきわめて少ない。したがって、IMP 型カルバペネマーゼおよびそのプラスミド情報は、独自に解析して発信していくことで、主要なカルバペネマーゼに関連するプラスミド情報が補完されることになる。

次に、得られたプラスミド塩基配列情報から、系統解析を行う必要があるが、現在の主要な分子疫学解析をプラスミドに応用しようとする際に最大の障壁となるのが、同一 Inc 型プラスミドが共通に保有するコア配列が無い、あるいは非常に少ないため、プラスミド間の比較や系統解析が困難という問題である。そこで、プラスミドを分子疫学解析するにはプラスミド構造をモデル化する新たな視点が必要となる。プラスミド疫学解析の問題を解決するため、プラスミド構造のモデル化手法として、プラスミドを ORF の集合体と見なし、解析したいプラスミド群を構成する ORF の構造を基盤とした系統ネットワーク解析を行うことで、コア配列に依存しない分子疫学解析が可能であることを見だし、ORF-based Binarized Structure Network Analysis of Plasmids (OSNAp) として発表した¹。OSNAp 解析を行うことで、プラスミドの近縁関係を視覚的に捉えることができる。OSNAp 解析によれば、NDM 型などを保有するプラスミドは特定の系統に集中する傾向が見られる。OSNAp 解析を元に、プラスミド間の距離情報の利用や塩基配列を加味することなどで、より詳細なプラスミド解析へ進めることが期待される。

1. Suzuki M et al. *Plasmid*. 2020 Mar;108:102477. doi: 10.1016/j.plasmid.2019.102477.

2. 研究の目的

臨床分離株のゲノム解析による、我が国における IMP 保有株の情報発信。先に述べたように、海外のカルバペネマーゼ保有プラスミド情報に比べ、日本に多い IMP 型カルバペネマーゼとプラスミド並びに分離株に関する情報はきわめて限られる。そこで、臨床分離株のゲノム解析を進めることで、IMP 型カルバペネマーゼとプラスミドの関係を解明し、その情報を発信する。これによって欧米に多く、すでにある程度の情報が得られる KPC 型や NDM 型カルバペネマーゼに加え、IMP 型カルバペネマーゼについてもプラスミド情報が充実し、カルバペネマーゼ間のプラスミド系統の相互比較を可能とする。

IMP 保有プラスミドの Inc 型の決定、及び同一 Inc 型内での系統解析。独自解析したプラスミドは Inc 型の決定を行う。さらに、独自に得られたプラスミド塩基配列及び NCBI データベース上のプラスミドデータを用いて OSNAp 解析することで、IMP 型カルバペネマーゼ保有プラスミドの系統的な特徴が明らかにする。

OSNAp 解析による近縁プラスミドの系統樹解析による進化推定。系統ネットワーク上で近縁な位置に来るプラスミドは ORF 構成が似ていることを意味している。したがって近縁なプラスミドに限定した場合、共通配列を利用した系統樹解析が可能と期待される。塩基配列に依存した解析が可能となった場合、SNPs による系統樹解析など、実績ある手法による系統の評価が可能である。近縁プラスミドに限定されるが、プラスミドの進化という視点から、IMP 型をはじめとしたカルバペネマーゼの拡散に関する知見を得る。

さらに、機械学習によるゲノムデータの処理を行うことで薬剤耐性クローンの染色体の特徴を捉えると共に、プラスミドとの関係を明らかにする。

3. 研究の方法

臨床分離された CPE のプラスミド構造を解明するために、ゲノム解析手法として illumina MiSeq または NextSeq によるショートリード解析、及び Oxford Nanopore MinION によるロングリード解析解析を行い、unicyler による Hybrid assembly を行うことで、プラスミドの完全長解析を行った。

OSNAp では類似した ORF 構成のプラスミドを解析可能であるため、Inc 型毎に解析することになる。そこで、得られたプラスミドデータおよび NCBI データベース上のプラスミドデータのプラスミドグループを Blast 検索によって決定する。IMP 保有プラスミドはデータベース上の同一 Inc 型プラスミドと共に OSNAp による系統解析を行った。

構成 ORF の約半数程度を共有するような、近縁なプラスミドの系統樹解析には、染色体の系統樹解析で多用される一塩基多型 (SNPs) を用いた系統樹解析をおこなう。SNPs の同定には Snippy を用いる。また、多様性指標を利用したプラスミドの拡散状態推定を行う。この解析は共通配列が十分に見つかる集団内での解析となる。

本研究におけるゲノム解析及び公開ゲノムデータから、薬剤耐性遺伝子と IncF の強い関連性が示されているため、IncF プラスミドの解析を進めた。contig グレードの大腸菌ゲノム配列を、染色体上かつコア領域以外に存在すると推定される 2679 個の whole-genome MLST locus の有無によるバイナリーシーケンスに変換した。ラベルとして全ゲノムデータ中に獲得性の薬剤耐性遺伝子を保有する場合を薬剤耐性株とした。薬剤耐性及び感受性クローンをを用いて学習、関連遺伝子を絞り込んだ。機械学習で薬剤耐性クローンと判定された株が保有するプラスミドの調査を行った。

4. 研究成果

日本国内で臨床分離されたカルバペネマーゼ産生菌を含む 232 株の腸内細菌科細菌 (*Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli*) についてゲノム解析した。232 株のうち、205 株はプラスミド上にカルバペネマーゼを保有し、177 株の Inc 型を決定できた。カルバペネマーゼである IMP-1 遺伝子は *K. pneumoniae*, *K. oxytoca* においては IncF プラスミド、*E. cloacae* においては IncHI2 プラスミド上に見つかり、それぞれ優位を占めていた。IMP-1 の伝達・保有には IncF と IncHI2 型プラスミドが重要な役割を担っていた。解析が終了したゲノムデータの約半数を GenBank に登録した^{2, 3, 4}。

IMP 型カルバペネマーゼや同一亜型の CTX-M 型基質特異性拡張型 - ラクタマーゼ保有プラスミドは同一 - ラクタマーゼ保有プラスミド内で近縁な傾向が見られた。しかし、共通配列が十分に見つかるプラスミド集団内では十分な SNP が存在せず、SNP による系統樹解析はできなかった。また、分離株におけるプラスミドの多様性判定においては、時系列に沿った多様性の増加は確認できなかった。

そこで、染色体とプラスミドの関係を探索するため、利用可能なゲノムデータの多い *E. coli* を対象とした。wgMLST の Locus の有無によって 2 値化した大腸菌染色体データを用い、検出頻度が低い IMP に代え、CTX-M 遺伝子をマーカーとして、機械学習の一つである決定木 (Decision-Tree) による解析を行った。その結果、薬剤耐性傾向の強いクローンでは IncF への CTX-M 遺伝子の組み込みが多い傾向が見られた。薬剤耐性傾向のクローンは 45 個の locus の保有パターンによって判別可能で、IncF プラスミドへの CTX-M 遺伝子組み込みや、薬剤耐性プラスミド獲得・維持には染色体の特性が関与する可能性が示された。プラスミドの進化を解明するには染色体との相互作用に注目する必要があることが明らかとなった⁵。

2. Suzuki M et al., J Infect Chemother. 2022 Apr;28(4):473-479. doi: 10.1016/j.jiac.2021.12.003.
3. Hayashi K, ..., Suzuki M, J Appl Microbiol. 2022 Dec;133(6):3699-3707. doi: 10.1111/jam.15807.
4. Nakamura K, ..., Suzuki M, ..., J Infect Chemother. 2021 Oct;27(10):1508-1512. doi: 10.1016/j.jiac.2021.05.011.
5. 鈴木匡弘, 機械学習を利用した薬剤耐性大腸菌ゲノムの特徴探索, 日本細菌学会 2023年3月16日 姫路

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suzuki Masahiro, Norizuki Chihiro, Wachino Jun-ichi, Kawamura Kumiko, Nagano Noriyuki, Nagano Yukiko, Hayashi Wataru, Kimura Kouji, Doi Yohei, Arakawa Yoshichika	4. 巻 28
2. 論文標題 Dissecting the clonality of I1 plasmids using ORF-based binarized structure network analysis of plasmids (OSNAp)	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 473 ~ 479
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2021.12.003	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 Nakamura Keiji, Nomoto Hidetoshi, Harada Sohei, Suzuki Masahiro, Yomono Keina, Yokochi Ritsuko, Hagino Noboru, Nakamoto Takato, Moriyama Yuki, Yamamoto Kei, Kutsuna Satoshi, Ohmagari Norio	4. 巻 27
2. 論文標題 Infection with capsular genotype K1-ST23 hypervirulent Klebsiella pneumoniae isolates in Japan after a stay in East Asia: Two cases and a literature review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 1508 ~ 1512
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2021.05.011	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 Nakamura Keiji, Nomoto Hidetoshi, Harada Sohei, Suzuki Masahiro, Yomono Keina, Yokochi Ritsuko, Hagino Noboru, Nakamoto Takato, Moriyama Yuki, Yamamoto Kei, Kutsuna Satoshi, Ohmagari Norio	4. 巻 27
2. 論文標題 Infection with capsular genotype K1-ST23 hypervirulent Klebsiella pneumoniae isolates in Japan after a stay in East Asia: Two cases and a literature review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 1508 ~ 1512
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2021.05.011	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木匡弘、土井洋平
2. 発表標題 IncF プラスミドPOT 法開発のための検出ORF 候補検索の検討
3. 学会等名 第 50 回薬剤耐性菌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鈴木匡弘、土井洋平
2. 発表標題 CTX-M 遺伝子保有 11 プラスミドの POT 法による分類
3. 学会等名 第 49 回薬剤耐性菌研究会
4. 発表年 2020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
---------	---------