

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590751

研究課題名(和文) MRSA の新規 SCCmec - ACME 複合体の遺伝子構造解析と分子疫学調査への応用

研究課題名(英文) Characterization of novel ACME-SCCmec composite Islands in Japanese MRSA isolates: determination of genome structure and application to epidemiological studies.

研究代表者

漆原 範子 (Urushibara, Noriko)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：80396308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：The arginine catabolic mobile element (ACME) は、ブドウ球菌ゲノムに見いだされた可動性エレメントである。北海道内の医療機関で分離された MRSA を対象とし、ACME 保有率、ACME 保有菌株の遺伝子的特徴、ACME が挿入されたゲノム周辺の配列を解析した。ACME 保有率は研究対象期間では有意な上昇傾向にあった。ACME ならびに周辺領域の配列を決定し、新たなバリエーションを発見した。さらに北米での代表的な MRSA クローンと同様の遺伝子型を持つ MRSA の増加を確認した。さらにコアグラーゼ陰性臨床分離株でも同様の解析を行った。

研究成果の概要(英文)：The Arginine catabolic mobile element (ACME), a genomic island identified in the Staphylococci genome, is characteristically found in strain USA300, which is the predominant MRSA clone in the USA and is spreading globally. In the present study, the prevalence of ACME and the genetic diversity of ACME (+) MRSA were investigated for clinical isolates collected in Hokkaido. The percentage of ACME carriage against the all MRSA isolates significantly increased in the course of study. Increased number of MRSA with the identical genotype as USA300 was observed, which suggests its potential spread in northern Japan. We focused on the ACME (+) MRSA with type II SCCmec (MRSA-II) because MRSA-II is the predominant genotype in Japanese MRSA. The genetic structures of ACME and its flanking region in MRSA-II were determined and novel genetic variants were identified. The similar analysis was carried out on coagulase-negative staphylococci clinical isolates obtained in Hokkaido.

研究分野：衛生学

キーワード：ブドウ球菌 MRSA ACME アルギニン代謝

1. 研究開始当初の背景

アルギニン代謝系可動性遺伝子要素 (arginine catabolic mobile element: ACME) は菌の宿主組織への定着を高め、低 pH 耐性を高めるなど生物学的に優位な形質を菌体に付与する遺伝子群を持つ。代表的な市中感染型 MRSA のクローン、USA300 (遺伝子型 ST8-MRSA-IV) のゲノムに見出されたことから、北米を中心とした USA 300 の蔓延に寄与したと考えられている。

ACME はアルギニン代謝系 (arginine deiminase pathway: ADI) 酵素をコードする *arc* 遺伝子群 (*arcCBDAR*) と、オリゴペプチドの膜輸送に關与する *opp* 遺伝子オペロン (*opp-3ABCD*) の二つの特徴的な遺伝子群を持つ。ADI はアルギニンをオルニチン、二酸化炭素、アンモニア、そして ATP へと変換し、宿主細菌の低 pH 下での増殖を可能にする。ACME の両端には、ブドウ球菌属に共通の可動性遺伝子要素 staphylococcal cassette chromosome (SCC) に共通の直接反復配列 (direct repeat: DR) を持ち、その配列を SCC にコードされている組み換え酵素が認識し、挿入・切り出しを行うことから可動性となる。ブドウ球菌臨床分離株で検出される ACME は主として次に記す三種類であり、各々、USA300 株で発見された ACME I 型 (*arc* (+), *opp*(+)), コアグラウゼ陰性ブドウ球菌 (CoNS) に多く見られる ACME II 型 (*arc* (+), *opp*(-)), さらに ACME II 型の周辺配列が大きく欠損している ACME II' 型 (*arc* (+), *opp*(-)) である。いずれもブドウ球菌ゲノムのメチシリン耐性を担う可動性遺伝子要素 (staphylococcal cassette chromosome *mec*: *SCCmec*) 近傍に挿入され、ACME-*SCCmec* 複合体を形成する (ACME-*SCCmec* composite island: ACME-*SCCmec* CI)。コアグラウゼ陰性のブドウ球菌 (CoNS)、特に表皮ブドウ球菌 *S. haemolyticus* に高い確率で検出されることから、起源は CoNS であり、それが USA300 をはじめとした黄色ブドウ球菌に水平伝播したものと推測されている。

近年、USA300 とは異なる遺伝子系統に属する MRSA から II' 型 ACME の報告が相次い

ており、申請者らも、北海道内での臨床分離株から ACME II' を保有する ST5-MRSA-II を検出している。シンガポール、オーストラリアでは、これら二国内において最も優勢な遺伝子型である ST239-MRSA-III における ACME-II' 保有株の検出率が経時的に増加しているとの報告があり、我が国においても ACME を保有するクローンの拡大が予測された。

2. 研究の目的

分布拡大が予測されるクローンを特定し、その動態を明らかにすることは、感染コントロールの上で重要である。我が国では ACME に関する継続的な分子疫学研究は少なく、特に本邦における主要な遺伝子型であるタイプ II 型の *SCCmec* を持つ MRSA (MRSA-II) における ACME の分布の状況や性状を精査した研究は、世界的に見てもいまだ報告がない。本申請課題では、北海道の医療機関で得られた臨床分離株を対象とし、ACME の分布状況と遺伝子構造の多様性を明らかにすることを目的とした。特に MRSA-II に着目し、ゲノム中の ACME-*SCCmec* CI の遺伝子構造を詳細に解析した。得られたデータは MRSA における ACME の伝播・分布の状況、ならびに遺伝子再編の可能性を明らかにし、MRSA 感染の予防対策に資するものと考ええる。

3. 研究の方法

本研究では以下の 3 つの菌体集団 () を解析した。申請期間前の 2008-2011 年に収集・保管された 1,212 の MRSA 臨床分離株、2013-2014 年に新たに収集した 624 の MRSA 臨床分離株、そして 2012 年に収集した 271 の CoNS 臨床分離株である。全菌株を対象に、定法に従い ACME の有無、MRSA のメチシリン耐性を担う *mecA* 遺伝子型別を決定した (Zhang K. et al. *J Clin Microbiol.* 46:1118, 2008 ならびに Kondo Y. et al. *Antimicrob Agents Chemother.* 51:264, 2007)。ACME 保有株については、その型別を PCR にて決定した。菌株の系統解析は Sequence type (ST) の決定、*dru* 領域の型判別の結果を用いて行った。MRSA について

はコアグラエゼ遺伝子の型判別, *spa* 解析も併用した。

MRSA-II おける ACME-SCC*mec* CI の解析は, 菌体集団 で検出された MRSA-II (この菌体集団中で遺伝子型 ST5-MRSA-II と ST764-MRSA-II と同定できたもの) を対象として行った。既報の配列を基に long reacting PCR (LR-PCR) と部分配列の決定を行い, 各々の ACME-SCC*mec* CI を構成している遺伝子要素を決定した。新たな亜型については全遺伝子列を決定し, DNA データバンクに登録して, データの共有を可能にした。

4. 研究成果

(1) ACME 保有率とその推移

全 MRSA に対する ACME 保有率は では 2.6% (31 株/1,212 株), では 7.2% (45 株/624 株) と, ACME 保有株の比率の上昇が示された。ACME の型別は, で ACME I が 7 株, ACME II' が 24 株, では ACME I が 9 株, ACME II' が 36 株であった。他の型は検出されなかった。ACME I が検出された MRSA は全て USA300 に極めて近い遺伝子型であった (後述)。他方, ACME II' が検出された MRSA の SCC*mec* 型の内訳は, SCC*mec* II (53 株), SCC*mec* V (6 株), 未同定 (1 株) と ACME I に比して多様であった。

CoNS すなわち菌体集団 を用いた解析では, *S. epidermidis* での ACME 検出率が高く, 全 190 株中 ~70% で ACME が検出された。CoNS における ACME については (4) に詳しく記す。

(2) USA300 クローンと同一の遺伝子型を持つ MRSA の分布

USA は北米の代表的な MRSA クローンであり, 近年ではヨーロッパ, アジアでも検出されているが, 本邦ではその検出率はまだ低い。USA300 のゲノムの特徴は, ACME I に加え, 白血球破壊毒素の一つ Panton-Valentine leukocidin (*pvI*) をコードする遺伝子を持つことである。本研究において見出された ACME I 保有株はいずれも, USA300 と同じ遺伝子系統, すなわち ST8-MRSA-IV に属し,

pvI と ACME I の塩基配列は USA300 におけるそれらと一致していた。さらに発現調節遺伝子 (*agr*) 型, ならびにコアグラエゼ (*coa*) 型も USA300 同じく *agr*-I/*coa*-IIIa であった。以上のことから, 北海道内においても, USA300 に極めて近い遺伝子の特徴を持つクローンが存在しているものと考えられた。

(3) MRSA-II における ACME とその遺伝子構造の多様性

本申請課題では, 2008 年から 2011 年の間に分離された 1,212 株の MRSA のうち, 本邦における主要な遺伝子型をもつ MRSA-II に着目し, 系統解析ならびに ACME-SCC*mec* CI の遺伝子構造の多様性を解析した。1,103 株の MRSA-II のうち, 22 の菌体が II' 型 ACME を保有していた。ACME-SCC*mec* CI の遺伝子構造を解析したところ, 本研究で対象とした菌体ゲノム中の ACME-SCC*mec* CI は, 構成している SCC の数から A (ACME II と SCC*mec* を含む 3 つの SCC から構成される) と B (ACME II と SCC*mec* の 2 つの SCC から構成される) に大別され, さらに SCC*mec* の J3 領域の相違から, 合計 5 つのバリエーション (A-1, A-2, A-3, B-1, B-2) に類別された。いずれも新規の構造であった。最も検出頻度の高かったバリエーションは A-2 であり (9 株/22 株), 次に頻度が高かったバリエーションは B-1 (5 株/22 株) であった。A-2 は ST5/*spa*-t002/*dru*-6I, ST5/*spa*-t067/*dru*-6I, ST764/*spa*-t002/*dru*-7s の 3 つの遺伝子型を持つ MRSA-II から検出された。B-2 は ST5/*spa*-t071/*dru*-6I, ST764/*spa*-t002/*dru*-7s, ST764/*spa*-t002/*dru*-6I の遺伝子型を持つ MRSA-II から検出された。これらの結果から, ACME II' は (2) で述べた ACME I に比べ, 異なる遺伝子型の MRSA 間で頻繁に伝播されている, あるいはその過程で遺伝子学的多様性が生じているものと推測された。

年ごとの全 MRSA-II における ACME II' 保有率は, 2008 年では 0.86% (1/116), 2009 年は 0.90% (3/333), 2010 年は 1.4% (4/278), そして 2011 年は 4.5% (14/313) と, 有意な上昇傾向にあった ($p = 0.0021$)。ACME II' が増殖や伝播に有意に働き, ACME II' 保有株の検出率が高くなっているものと考えら

れた。一方，ACME-SCC*mec* CI の遺伝子長と分離時期には有意な負の相関がみられ ($r = -0.5028$, $P = 0.0235$)，短いバリエーションの方が選択的に有利であると推測された。これらについては fitness cost 等の要因が挙げられると考えている。

以上のことから，本邦における MRSA の主要な遺伝子型である MRSA-II において，ACME II' 保有株の分布が広がりがつつあり，中でも fitness cost が低いと考えられる短い ACME-SCC*mec* CI バリエーションを保有する株が優勢になっていくことが予測された。2013-2014 年に分離された菌体集団 における MRSA-II を用いた調査では，6.9% の菌体 (31/452) で ACME II' が検出され MRSA-II における ACME II' 保有株の拡大が継続していることが示された。 における ACME-SCC*mec* CI の詳細な遺伝子構造の解析等は今後の課題である。

(4) CoNS における ACME と，新規 ACME I 亜型

2012 年に分離された CoNS 271 株について解析を行った。菌種は *S. epidermidis* が 190 株と最も多かった。*S. epidermidis* 87 株，*S. capitis* 2 株，*S. simulans* 1 株で ACME が検出された。*S. epidermidis* の ACME 保有率は 45.8% で，*mecA* 陽性株では 40.0% (58/145)，*mecA* 陰性株では 64.4% (29/45) であり，これらは海外での調査と同様の結果であった。黄色ブドウ球菌では，*arc* cluster と *opp* cluster を持つ ACME I 型，*arc* cluster のみを持つ ACME II 型，さらに *arc* cluster の周辺配列が短い ACME II' 型の 3 タイプが報告されているが，本調査で新たに *arc* と *opp* cluster 間の短い亜型 ACME I を見だし，その遺伝子構造を明らかにした。

(5) 結語

臨床分離株において ACME の分布が拡大していることが本調査により示された。MRSA-II における ACME-SCC*mec* CI の遺伝子構造の多様性，ならびに *S. epidermidis* で見出された短い ACME I 亜型は，本遺伝子エレメントの再編がまだ細菌ゲノムで行われ

ていることを示唆している。先にも述べた通り MRSA-II は本邦で主要な遺伝子型であるので，それらにおける ACME の動態を知ることが重要であり，調査の継続が必要と感じられた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計9件)

Urushibara N, Kawaguchiya M, Kobayashi N, Two novel arginine catabolic mobile elements and staphylococcal chromosome cassette *mec* composite islands in community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* genotypes ST5-MRSA-V and ST5-MRSA-II., J Antimicrob Chemother, 査読有, 67 巻, 2012, 1828-1834.

DOI: 10.1093/jac/dks157

Kawaguchiya M, Urushibara N, Ghosh S, Kuwahara O, Morimoto S, Ito M, Kudo K, Kobayashi N, Genetic diversity of emerging Panton-Valentine leukocidine/arginine catabolic mobile element (ACME)-positive ST8 SCC*mec*-IVa methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains and ACME-positive CC5 (ST5/ST764) MRSA strains in northern Japan., J Med Microbiol, 査読有, 62 巻, 2013, 1852-1863.

DOI: 10.1099/jmm.0.062125-0

Kawaguchiya M, Urushibara N, Yamamoto D, Yamashita T, Shinagawa M, Watanabe N, Kobayashi N, Characterization of PVL/ACME-positive methicillin-resistant

Staphylococcus aureus (genotypes ST8-MRSA-IV and ST5-MRSA-II) isolated from a university hospital in Japan., *Microb Drug Resist*, 査読有, 19 巻, 2013, 48-56.
DOI: 10.1089/mdr.2012.0089

Onishi M, Urushibara N, Kawaguchiya M, Ghosh S, Shinagawa M, Watanabe N, Kobayashi N, Prevalence and genetic diversity of arginine catabolic mobile element (ACME) in clinical isolates of coagulase-negative staphylococci: Identification of ACME type I variants in *Staphylococcus epidermidis*., *Infect Genet Evol*, 査読有, 20 巻, 2013, 381-388.
DOI:10.1016/j.meegid.2013.09.018

Wan MT, Lauderdale TL, Kobayashi N, Urushibara N, Chou CC, Population deviation of piggery-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* based on *mec*-associated direct repeat unit analysis., *Infect Genet Evol*, 査読有, 16 巻, 2013, 349-354.
DOI:10.1016/j.meegid.2013.03.030

Paul SK, Ghosh S, Kawaguchiya M, Urushibara N, Hossain MA, Ahmed S, Mahmud C, Jilani MS, Haq JA, Ahmed AA, Kobayashi N, Detection and genetic characterization of PVL-positive ST8-MRSA-IVa and exfoliative toxin D-positive European CA-MRSA-Like ST1931 (CC80) MRSA-IVa strains in Bangladesh., *Microb Drug Resist*, 査読有, 20 巻, 2014, 325-336.
DOI: 10.1089/mdr.2013.0153

Ahmed S, Kawaguchiya M, Ghosh S, Paul SK, Urushibara N, Mahmud C, Nahar K, Hossain MA, Kobayashi N, Drug resistance and molecular epidemiology of aerobic bacteria isolated from puerperal infections in Bangladesh., *Microb Drug Resist*, 査読有, 21 巻, 2015, 297-306.
DOI: 10.1089/mdr.2014.0219

Urushibara N, Kawaguchiya M, Onishi M, Mise K, Aung MS, Kobayashi N, Novel Structures and Temporal Changes of Arginine Catabolic Mobile Elements in Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Genotypes ST5-MRSA-II and ST764-MRSA-II in Japan., *Antimicrob Agents Chemother*, 査読有, 60 巻, 2016, 3119-3122.
DOI: 10.1128/AAC.02356-15

Aung MS, Zi H, New KM, Maw WW, Aung MT, Min WW, Nyein N, Kawaguchiya M, Urushibara N, Sumi A, Kobayashi N, Drug resistance and genetic characteristics of clinical isolates of staphylococci in Myanmar: high prevalence of PVL among methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* belonging to various sequence types., *New Microbes New Infect*, 査読有, 10 巻, 2016, 58-65.
DOI:10.1016/j.nmni.2015.12.007

〔学会発表〕(計9件)

Urushibara N, Kawaguchiya M, Kobayashi N, Genetic diversities in ACME-SCC*mec* composite islands in MRSA isolates collected in Hokkaido, the

northern main island of Japan. The 15th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections., Lyon(France), 2012-08-29.

Kobayashi N, Kawaguchiya M, Urushibara N, Ghosh S, Ito M, Kuwahara S, Quiñones D, Characteristics and genetic diversity of PVL/ACME-positive MRSA strains isolated in Hokkaido, the northern main island of Japan. The 28th International Congress of Chemotherapy and Infection., Yokohama, 2013-06-06.

Onishi M, Urushibara N, Shinagawa M, Watanabe N, Kobayashi N, Prevalence and genetic characterization of SCC*mec* and ACME in coagulase-negative staphylococci. The 28th International Congress of Chemotherapy and Infection., Yokohama, 2013-06-06.

Urushibara N, Kawaguchiya M, Kobayashi N, Genetic diversities in ACME-SCC*mec* composite islands in MRSA carrying SCC*mec* type II collected in Hokkaido, Japan. The 28th International Congress of Chemotherapy and Infection., Yokohama, 2013-06-06.

Urushibara N, Kawaguchiya M, Paul SK, Kobayashi N, Two Novel Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* Elements Containing Two Copies of *mecA* genes Identified in Bangladeshi Clinical Isolates of *Staphylococcus haemolyticus*. 1st International Interscience Conference on Infection and Chemotherapy., Seoul(Korea), 2013-11-08.

Aung M, Kawaguchiya M, Urushibara N, Kobayashi N, Genetic characterization of MRSA isolates harbouring PVL genes and/or ACME in Hokkaido. 第 88 回日本細菌学会総会, 岐阜, 2015-03-28.

Kobayashi N, Ahmed S, Kawaguchiya M, Urushibara N, Aung M, Molecular epidemiology of *E. coli* and *S. aureus* isolated from puerperal infections in Bangladesh. 第 88 回日本細菌学会総会, 岐阜, 2015-03-28.

Urushibara N, Onishi M, Kawaguchiya M, Paul SK, Kobayashi N, Novel SCC*mec* Composite Elements Containing Two *mecA* Genes Identified in *Staphylococcus haemolyticus*. 第 88 回日本細菌学会総会, 岐阜, 2015-03-28.

Aung M, Kawaguchiya M, Urushibara N, Kobayashi N, Drug resistance and genetic characteristics of hospital-acquired staphylococcal isolates in Myanmar. 第 89 回日本細菌学会総会, 大阪, 2016-03-24.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

漆原 範子 (URUSHIBARA, Noriko)

札幌医科大学医学部・講師

研究者番号：80396308

(2) 研究分担者

小林 宣道 (KOBAYASHI, Nobumichi)

札幌医科大学医学部・教授

研究者番号：80186759