

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460553

研究課題名(和文) サルモネラの新規薬剤耐性アイランドの多コピー化に基づく耐性増強機構の解析

研究課題名(英文) Amplification of a novel chromosomal resistance island of Salmonella Typhimurium confers increased resistance to antimicrobials

研究代表者

秋庭 正人 (AKIBA, Masato)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門・細菌・寄生虫研究領域・ユニット長

研究者番号：60355211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：Salmonella Typhimuriumの染色体上に存在する新規薬剤耐性アイランド(GI)がタンデムに多コピー化することにより薬剤耐性が増強することを見出した。コピー数は最大85まで増加しており、転写の上昇を伴っていた。増幅部位はオリジナルの部位だけでなく、挿入配列の関与により転移した部位でもGIの一部が多コピー化する場合があった。DNAマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析ではSOS応答に関連する遺伝子の発現上昇が認められた。

研究成果の概要(英文)：We found that antimicrobial resistance of Salmonella Typhimurium increased by gene amplification of a novel chromosomal resistance island (GI). Copy number of GI increased up to 85 and the elevation was accompanied by increased amount of transcription. The amplification occurred at the original position. In some cases, the transposition of part of GI occurred after insertion of IS26 or IS1, leading to the amplification of GI at different position. Elevation of transcription of SOS response related genes was observed in a comprehensive gene expression analysis.

研究分野：細菌学

キーワード：Salmonella Typhimurium 薬剤耐性 ゲノミックアイランド 多コピー化 blaCMY-2

1. 研究開始当初の背景

Salmonella enterica serovar Typhimurium (ST) は、食中毒事例からの分離頻度が高いばかりでなく、牛サルモネラ症の原因血清型としても重要である。我々はこれまで、牛由来サルモネラの遺伝子型と薬剤感受性を継続的にモニタリングしてきた。それまで優勢であった I 型菌に代わって、2002 年頃から、それ以前には認められなかった型菌の分離頻度が上昇した(引用文献)。従来、牛由来サルモネラでは小児サルモネラ症に対する唯一の治療薬である広域スペクトラムセファロスポリン(ESC)に対する耐性菌は認められなかったが、2004 年以降、型菌の中に CMY-2 β-ラクタマーゼの産生に基づく ESC 耐性株が出現し、公衆衛生上、憂慮すべき事態となっている。我々は、これらの株が一部を除いてパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)により識別不能で、CMY-2 β-ラクタマーゼ遺伝子(*bla*_{CMY-2})が染色体上の新規薬剤耐性アイランド GI-VI-6 (GI)上に存在することを明らかにしてきた(引用文献)。GI は全長 125 kb で合計 11 の薬剤耐性遺伝子を含む(図 1)。塩基配列の 99%は大腸

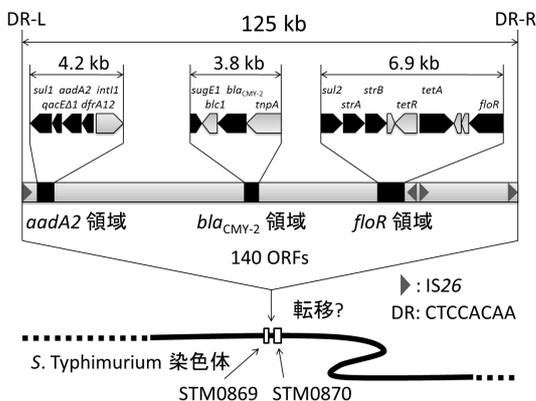


図 1. 薬剤耐性アイランド GI-VII-6 (GI) の構造

菌プラスミドと相同であり、その両端には挿入配列が同じ向きで存在していた。GI 保有菌の ESC に対する最小発育阻止濃度(MIC)は、いわゆる基質特異性拡張型セファロスポリン産生菌と比べて低く、ESC 耐性への寄与は大きくない。すなわち、これら菌株における GI 保有のメリットは不明であった。

2. 研究の目的

GI 両端に存在する挿入配列、IS26 はダイレクトリピート(DR)を構成するが、DR に挟まれた領域は gene duplicatin and amplification (GDA)の機構によりタンデムに多コピー化する場合のあることが報告されている。我々の予備的検討でも GI の多コピー化に基づく耐性増強株が取得できた。そこで本研究では GI の多コピー化が、宿主の ESC 高度耐性化等に果たす役割とその機構を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 参照株の全ゲノム塩基配列決定

GI 保有参照株として L-3553 株の完全長ゲノム塩基配列を決定した。イルミナ MiSeq で得られた配列をもとに De Novo アッセンブルを行い、PCR 増幅産物のサンガー法による塩基配列解析によりギャップクローリングを行った。

(2) 耐性増強株の取得と性状解析

L-3553 株の MIC (8 μg/ml) より高い、12.5、25、50、100 μg/ml のセフトキシム (CTX) を含む寒天平板培地上で同株を培養することで、耐性増強株を得た。各濃度で 20 株まで分離し、GI の存在が耐性発現に寄与する複数抗菌剤に対する MIC を測定した。また、全ての菌株について、選択に用いた濃度の CTX を含む液体培地で培養後の *bla*_{CMY-2} コピー数を定量的リアルタイム PCR で調べた。

(3) 菌の増殖に伴う *bla*_{CMY-2} コピー数と mRNA 量の経時変化

(2)と同様に培養したときの *bla*_{CMY-2} コピー数と mRNA 量の経時変化を定量的リアルタイム PCR で調べた。また、CTX 不含培地で耐性増強株を培養したときの *bla*_{CMY-2} コピー数の経時変化も調べた。

(4) 多コピー化した領域の特定

(3)の耐性増強株についてイルミナ MiSeq による全ゲノム塩基配列解析を行った。得られたショートリードを L-3553 株の完全長ゲノム塩基配列に対して mapping することで、多コピー化した領域を特定した。

(5) 耐性増強株の網羅的遺伝子発現解析

多コピー化株に特有な遺伝子発現の変化を明らかにする目的で DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を実施した。

4. 研究成果

(1) L-3553 株のゲノムの特徴

L-3553 株の染色体のサイズは 5.1 Mb、プラスミドのサイズは 133 kb であった。本株が染色体上に保有する 9 個の薬剤耐性遺伝子は全て GI 中に含まれていた。挿入配列 (IS) は GI 上に 6 種 9 個、それ以外の部位に 4 種 10 個存在した。多コピー化の起点となることが予想される IS26 は GI 上に 4 コピー存在していた。プラスミド上の薬剤耐性遺伝子は 5 個で IS は 4 種 8 個存在した。IS1 はプラスミド上に 3 コピー、染色体上に 1 コピー存在していた。GI もプラスミドに由来することを考えると、プラスミドは IS の供給源として、菌の進化に重要な役割を果たす可能性が示唆された。一方、L-3553 株は他のサルモネラが保有しない溶原ファージを 3 種有しており、これら溶原ファージが菌の性状に及ぼす影響については今後の検討課題である。

(2) 耐性増強株の取得と性状

選択培地中に含まれる CTX 濃度 12.5 μg/ml で 10⁻⁶、25 μg/ml で 10⁻⁸ の頻度で耐性コロニーが出現したため、それぞれ 20 株を分離、凍結保存した。50 μg/ml 以上の濃度では耐性

コロニーは出現しなかった。これら派生株の CTX、セフォキシチン、クロラムフェニコール、オキシテトラサイクリンに対する MIC は親株のそれぞれ、4~16 倍、8~32 倍、1~4 倍、1~2 倍高い値を示した。菌の増殖に伴う親株の *bla*_{CMY-2} コピー数は 1 であったのに対し、耐性増強株ではゲノムあたり最大 85 コピーまで増加していた。

(3) 菌の増殖に伴う *bla*_{CMY-2} コピー数と mRNA 量の経時変化

(2)で選択した耐性増強株のうち 6 株：12.5 μg/ml で選択した 12-1、12-14、12-19 株及び 25 μg/ml で選択した 25-6、25-11、25-17 株、を用いて *bla*_{CMY-2} コピー数と mRNA 量の経時変化を調べたところ、*bla*_{CMY-2} コピー数の増加は mRNA 量の増加を伴うことが明らかとなった (図 2)。

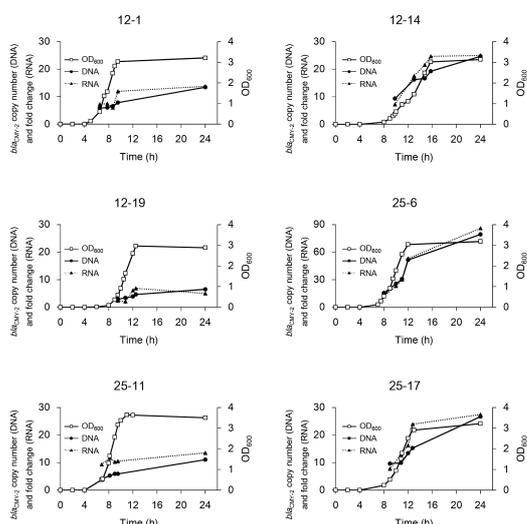


図 2 耐性増強株の増殖に伴う *bla*_{CMY-2} コピー数と mRNA 量の経時変化

また、耐性増強株を CTX 不含培地で培養すると、*bla*_{CMY-2} コピー数は速やかに減少した (図 3)。

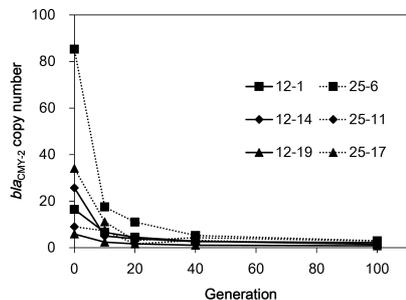


図 3. CTX 不含培地中での *bla*_{CMY-2} コピー数の変化

以上の成績は GI の多コピー化に基づく耐性増強機構が一定量以下の抗菌剤存在下において、菌が速やかに環境に適応するための可逆的手段であることを示唆している。

(4) 多コピー化した領域の特定

(3)で用いた 6 株の全ゲノム塩基配列を取得し、L-3553 株の完全長ゲノム塩基配列に mapping したときの、GI 周辺のカバレッジの

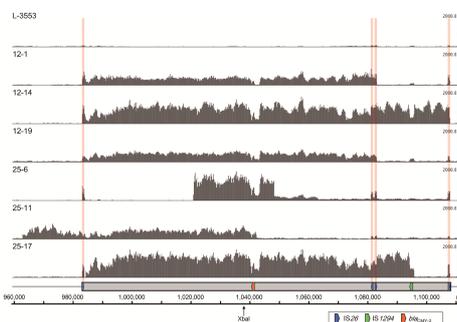


図 4. 耐性増強 6 株における GI 周辺領域のショートリードのカバレッジ

変化を図 4 に示した。12.5 μg/ml で選択した 3 株ではカバレッジの高い領域の両端に、GI 中の IS26 が存在しており、これらの IS26 に挟まれた領域が GDA の機構により多コピー化した可能性が示唆された。25 μg/ml で選択した 3 株ではカバレッジの高い領域の両端に IS26 が存在していなかった。このうち 25-11 株のカバレッジが高い領域の両端の塩基配列を調べたところ、IS1 の存在が確認された。この株では多コピー化に先立って IS1 が 2 コピー挿入され、その間の領域が GDA の機構により増幅されたものと推察された。一方、25-6 株では重複する 3 つの領域でカバレッジが段階的に高くなっていった。3 領域の両端の塩基配列を確認したところ、いずれも IS26 が存在していたことから、少なくとも 2 領域では IS の挿入後、転移が起こり、そこで多コピー化した可能性が示唆された。このように 12.5 μg/ml で選択した株では予想通りの多コピー化が観察されたが、25 μg/ml で選択した株では IS の挿入や転移が多コピー化に先立つことが示され、細菌の適応進化に関わる IS の重要性が示唆された。

(5) 耐性増強株の網羅的遺伝子発現解析

耐性増強株では多コピー化した領域に存在する遺伝子のほか、鞭毛発現、走化性、及び SOS 応答に関連する遺伝子の発現が上昇し、細胞内侵入に関わる遺伝子の発現は抑制されていることが明らかとなった。SOS 応答の亢進が多コピー化を促す可能性が示唆された。

< 引用文献 >

玉村 雪乃、内田 郁夫、田中 聖、他 14 名、応用環境微生物学、77、1739-1750、2011

フランス シャハダ、関塚 剛史、黒田 誠、他 11 名、抗菌薬と化学療法、55、4114-4121、2011

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

李 謙一 (1 番目)、黒田 誠 (4 番目)、秋庭 正人 (10 番目)、他 7 名、薬剤耐性ゲノミックアイランド、GI-VII-6 の高度増幅により *Salmonella* Typhimurium の

広域セファロスポリン耐性は増強される、
最先端微生物学、査読有、6、78、2015
DOI: 10.3389/fmicb.2015.00078

研究者番号：80317411

関塚 剛史(1番目)、黒田 誠(3番目)、
秋庭 正人(9番目)、他6名、CMY-2ベ
ータラクタマーゼ産生性 *Salmonella*
Typhimurium L-3553株の全ゲノム塩基配
列、ゲノム告知、査読有、2、e00711-14、
2014
DOI: 10.1128/genomeA.00711-14

〔学会発表〕(計5件)

関塚 剛史(1番目)、黒田 誠(3番目)、
秋庭 正人(9番目)、他6名、多剤耐性
Salmonella Typhimurium のゲノム生物学
的特徴、第157回日本獣医学会学術集会、
2014年9月9日、北海道大学(北海道・
札幌市)

李 謙一(1番目)、黒田 誠(3番目)、
秋庭 正人(10番目)、他7名、サルモ
ネラ薬剤耐性アイランド多コピー化の様
式解明、第157回日本獣医学会学術集会、
2014年9月9日、北海道大学(北海道・
札幌市)

秋庭 正人、*Salmonella Typhimurium* の薬
剤耐性アイランドの増幅、第87回日本細
菌学会総会、2014年3月26日、タワー
ホール船掘(東京都・江戸川区)

李 謙一(1番目)、稲岡 隆史(2番目)、
秋庭 正人(8番目)、他5名、サルモネ
ラ薬剤耐性アイランドの多コピー化に基
づく耐性増強、第96回日本細菌学会関東
支部会総会、2013年11月1日、東京ド
ームホテル(東京都・文京区)

李 謙一(1番目)、稲岡 隆史(2番目)、
秋庭 正人(8番目)、他5名、サルモネ
ラ薬剤耐性アイランドの多コピー化に基
づく耐性増強、第156回日本獣医学会学
術集会、2013年9月20日、岐阜大学(岐
阜県・岐阜市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

秋庭 正人 (AKIBA, Masato)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・動物衛生研究部門・細菌・寄生
虫研究領域・ユニット長
研究者番号：60355211

(2)連携研究者

黒田 誠 (KURODA, Makoto)
国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究
センター・センター長