

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460520

研究課題名(和文)新規カルバペネム耐性因子(バクテロイデス・フラジリス由来)の網羅的同定と機能解明

研究課題名(英文) Genome wide identification and characterization of a novel carbapenem-resistance factor in *Bacteroides fragilis*

研究代表者

後藤 隆次 (GOTO, Takatsugu)

岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・助教

研究者番号：80326355

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：*Bacteroides fragilis* のカルバペネム耐性は時に治療を困難にさせる。本研究では *B. fragilis* GAI92214 株のゲノム DNA ライブラリーを作製し、新規カルバペネム中等度耐性因子の同定を試みた。結果、メロペネム耐性に僅かに寄与する可能性のある major facilitator superfamily transporter の構造を明らかにした。しかし、本 transporter 単独では耐性機構を十分に説明できない可能性が高かったため、当該株の全ゲノム解析に着手した。現時点でゲノム配列の約 99% (約 4723 個の ORF をコード) を決定している。

研究成果の概要(英文)：Carbapenem-resistant *Bacteroides fragilis* often makes treatment difficult. We aimed to identify a novel carbapenem-intermediate resistance factor using a genomic DNA library of the *B. fragilis* GAI92214 strain. We identified a major facilitator superfamily transporter that may contribute slightly to meropenem resistance in the GAI92214 strain. However, we could not fully explain carbapenem-intermediate resistance mechanism from this transporter alone. Thus, we started complete genome sequencing project of the GAI92214 strain. To date, we determined approximately 99% of the genomic sequence encoding about 4723 ORFs.

研究分野：細菌学

キーワード：*Bacteroides fragilis* カルバペネム耐性菌 中等度耐性株 ゲノム DNA ライブラリー MFS トランスポーター 薬剤耐性機構 全ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

嫌気性菌 *Bacteroides fragilis* は腹腔内感染症等の起炎菌の一つであるが、国内外で多剤耐性傾向にある。既に殆どの *B. fragilis* 臨床分離株は、多くの β -ラクタム系薬に耐性を示し、カルバペネム系薬にすら耐性を示す株が、国内で約 2% 存在する。カルバペネム耐性株の約 20% は、カルバペネム分解酵素 CfiA を産生する高度耐性株 [最小発育阻止濃度 (MIC): 25~200 $\mu\text{g}/\text{ml}$] である。残る約 80% は、CfiA 非産生性の中等度耐性株 (MIC: 6.25~25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) である。このような中等度耐性株の耐性機構は国内外で殆ど研究されていない。

B. fragilis が多剤耐性化する中、数少ない治療薬の一つであるカルバペネム系薬に対して中等度でも耐性を示す株 (高度耐性株の約 4 倍の頻度) は、時に治療の障壁となる為、その耐性機構解明と対応が急がれる。

2. 研究の目的

本研究では、カルバペネム中等度耐性を示す *B. fragilis* GAI92214 株 (CfiA 非産生性) を用いて、新規カルバペネム中等度耐性因子を同定し、その構造と機能を解明する事で化学療法に貢献する事を目指す。具体的には、GAI92214 株のゲノム DNA ライブラリーを作製後、新規薬剤排出ポンプや薬剤分解酵素等の耐性因子の同定と機能解明を目指す。

本方法が難航した場合や、上述のポンプや酵素以外の要因が耐性に関与すると推察された場合は、GAI92214 株の全ゲノム配列の解析に着手し、当該耐性機構の網羅的解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株、MIC 測定

使用菌株として、*B. fragilis* GAI92214 株 (1990 年、臨床分離株) を用いた。本菌株に対するカルバペネム系薬の感受性 (Etest 使用時の MIC 値) は、イミペネムは 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、メロペネムは 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であり、カルバペネム中等度耐性を呈した (Etest の精度管理株には、*B. fragilis* ATCC 25285 株を使用した)。GAI92214 株は、*cfiA* ならびにそのプロモーターを含む insertion sequence を保有していない事を PCR により確認した。GAI92214 株がプラスミドを保有しない事も電気泳動により確認した。

B. fragilis GAI92214 株のゲノム DNA ライブラリーの宿主には、多剤高度感受性の *Escherichia coli* KAM3 *tolC* 株 (Morita Y, et al., Microbiology, 2012) を使用した。KAM3 *tolC* 株のメロペネム MIC 値は 0.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ であった。ゲノム DNA ライブラリー作製により得られた組換え大腸菌 (サブクローン含む) のメロペネム (和光純薬工業社) の MIC 測定には、以下の 2 通りの培地を使用した: LB 液体培地 (20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ クロラムフェニコール、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ X-gal、25

$\mu\text{g}/\text{ml}$ IPTG を含む) Mueller-Hinton 寒天培地 (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IPTG を含む以外は、米国 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 標準法に準じた。各薬剤濃度につき測定を 4 回行った)。組換え大腸菌の MIC 測定の精度管理株には、*E. coli* ATCC 25922 株を使用した。

(2) ゲノム DNA ライブラリーの作製

B. fragilis GAI92214 株より抽出したゲノム DNA を物理的切断・平滑末端化後、精製した約 3~5 kb 分画の DNA 断片を高コピープラスミドベクター pHS398 (TaKaRa 社) (*Sma*I 消化、平滑末端化、脱リン酸化済) へ挿入し、組換えプラスミドライブラリーを得た。この一部を *E. coli* KAM3 *tolC* 株へエレクトロポレーションにて導入し (本株への pHS398 単独の導入効率は $4.15 \times 10^8/\mu\text{g}$)、約 92 万種の組換え大腸菌を得た (DNA 挿入率は約 82%)。約 92 万種の組換え体のうち、約 4 万種をメロペネム耐性クローン選出用に使用した。スクリーニングには、LB 寒天培地 (0.04 $\mu\text{g}/\text{ml}$ メロペネム、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ クロラムフェニコール、40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ X-gal、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ IPTG を含む) を使用した。

(3) GAI92214 株の全ゲノム配列決定

対数増殖期初期まで嫌気培養した *B. fragilis* GAI92214 株の菌体を 0.6 mg/ml proteinase K 処理、0.5% SDS による溶菌後、除タンパク、RNase 処理等を行い、高精製度・高分子のゲノム DNA を抽出した。精製ゲノム DNA を断片化後、20 kb 付近の断片を回収し、SMRTbell アダプターを付加したライブラリーを構築後、2 SMRT Cell 分のサンプルを PacBio RS II シークエンサー (Pacific Biosciences 社) にかけて塩基配列のデータを獲得した。データを FALCON を用いて *de novo* アセンブル後、contig 間のギャップを閉鎖した (本研究期間内に閉鎖可能な領域分のみ)。その後、MetaGeneAnnotator により ORF 抽出を行った (原則としてアミノ酸 100 個以上を ORF とした)。抽出された全 ORF について、NCBI の NR データベースに対する BLASTX 検索を行い、各遺伝子にて相同性の高い上位 1~30 番の遺伝子情報 (E-value $1e-10$ 以下の条件を満たす) を入手した。相同性率、長さ一致率等、様々な情報に基づき、各遺伝子を目視で命名した。BLAST を用いた rRNA 領域の推定、ならびに tRNAscan-SE による tRNA 抽出も行った。

4. 研究成果

(1) Major facilitator superfamily transporter の構造解析

数十個のメロペネム耐性クローン候補の中から、組換えプラスミド内の挿入断片サイズが長いものを選出した。さらに、これらの各組換えプラスミドを抽出し、宿主 (KAM3

tolC 株) に再トランスフォームした時に、確かに耐性を示すクローンのみを選出した(宿主の染色体変異等により偶発的に耐性を示すクローンを削除するため)。その結果、最終的に 1 個のメロペネム耐性クローン(#1271)が選出された。

次に、当該クローン由来プラスミド(pHS1271 と命名)の挿入断片サイズは、約 3.3 kb である事が示された。本挿入断片の塩基配列を決定した結果、Major facilitator superfamily (MFS) transporter の部分配列が明白となった。当該配列が部分配列であったのは、MFS transporter が、N 末の約 3 分の 1 を欠落した状態で、*SmaI* クローニングサイト直下に挿入されていたためである(挿入方向はベクターの *lacZ* プロモーターとは逆向き)。N 末配列の欠落がメロペネム耐性に影響する可能性があるため、本 MFS transporter の完全配列を決定した。具体的には、染色体を鋳型にした直接シーケンシング等により、MFS transporter 全長およびその上下流領域の配列を決定した。次に、当該 MFS transporter の構造解析の結果を図 1 に示す(後藤ら、日本細菌性感染症学会雑誌、2016)。明らかになった MFS transporter 全長には、12 個の膜貫通領域が存在していた(HMMTOP 2.1 ソフトを使用)(図 1a)。本 MFS transporter の塩基配列を、DNA データベース(NCBI NR)に対して相同性解析(megaBLAST を使用)を行った結果、本 transporter 塩基配列は、既知の *B. fragilis* 株(全ゲノム配列が公開された数株等)の MFS transporter 塩基配列と 99% 一致した(長さ一致率: 100%)(図 1b)。

a 膜貫通領域の推定 (HMMTOP 2.1 software を使用)



b 既知遺伝子との相同性解析 (BLASTN (megaBLAST) を使用)

既知 *B. fragilis* 全ゲノム株(数株)の当該遺伝子

- Major facilitator superfamily protein (*B. fragilis* BFBE1.1 株)
- Major facilitator transporter (*B. fragilis* BOB25 株)
- Putative transport-related membrane protein (*B. fragilis* NCTC 9343 株)
- Putative transport-related membrane protein (*B. fragilis* 638R 株)
- Putative sugar transporter (*B. fragilis* YCH46 株)

→ 配列一致率 99%、長さ一致率 100%

図 1 MFS transporter の構造解析

(2) MFS transporter をコードした組換え大腸菌のメロペネム MIC 値の測定

組換え大腸菌のメロペネム MIC 値 ($\mu\text{g/ml}$) を表 1 に示す(後藤ら、日本細菌性感染症学会雑誌、2016)。具体的には、各組換えプラスミドを持つ大腸菌サブクローンならびに陰性コントロール株のメロペ

ネム MIC 値(合計 7 通り)を測定した: 当該 MFS transporter 全長と N 末上流の promoter、下流の terminator、pHSG398 領域を含む組換えプラスミド(#2)、promoter を含まない以外は #2 と同様の組換えプラスミド(#34)、MFS transporter の N 末 3 分の 1 領域を欠く以外は #34 と同一の組換えプラスミド(#85)、#85 と比べて transporter が逆向きの組換えプラスミド(#78)、pHSG398 ベクターのみ(MFS transporter を含まない)を持つ Blue colony、宿主(*E. coli* KAM3 *tolC* 株)のみ、*E. coli* ATCC 25922 株(基準株)。

結果、陰性コントロール(Blue colony、宿主)と比べて、MIC 値に大差ある組換え大腸菌は認められなかった(表 1)。LB 液体培地(スクリーニング用寒天培地とはほぼ同一成分)使用時は、陰性コントロールと比べてやや耐性を示す組換え体もあったが、Mueller-Hinton 寒天培地を用いた寒天平板希釈法(CLSI 標準法を基本とする 4 重測定)により、より正確に測定した場合は、MIC 値に大差ある組換え体は認められなかった。

表 1 組換え大腸菌のメロペネム MIC 値 ($\mu\text{g/ml}$)

	大腸菌のメロペネム MIC 値 ($\mu\text{g/ml}$)	
	LB 液体培地 【濃縮希釈法】	Mueller-Hinton 寒天培地 【希釈平板希釈法】
#2 	0.060	0.024
#34 	0.080	0.016
#85 	0.080	0.024
#78 	0.080	0.024
Blue colony (control) 【MFS transporter を含まない】 	0.060	0.024
宿主のみ (<i>E. coli</i> KAM3 ΔtolC 株)	Not done	0.024
標準管理株 (<i>E. coli</i> ATCC 25922 株)	Not done	0.012

本組換え体のメロペネム耐性度が僅かだった事から、本 transporter 単独では大腸菌内で十分な薬剤排出能を有さない可能性がある。具体的には、本 transporter 以外に別途 TolC や膜融合タンパクが必要な可能性や、菌種による翻訳後修飾の違いからタンパク立体構造に差が出た可能性、遺伝子発現量が低い可能性などが考えられる。

(3) GAI92214 株の全ゲノム配列決定

前述の通り、同定した MFS transporter のみでは本菌株の耐性機構を十分に説明できない。そこで、他の耐性要因(他の薬剤排出ポンプや薬剤分解酵素の存在、ポーリン変異

等)も含めて多面的に耐性機構を解明するために、GAI92214 株の全ゲノム解析に着手した。2 SMRT Cell のサンプルを PacBio RS II シークエンサーにかけた結果、約 10 万本(平均 Read 長:5,588 bp、N50:7,897 bp)のシークエンスデータを得た。これは、既知の *B. fragilis* NCTC 9343 株の全ゲノムの約 114 倍長のデータ量に相当する。アセンブルの結果、17 本の contig を獲得した。続いて、Long PCR などにより contig 間のギャップ領域の閉鎖と配列決定を行い、現時点でゲノム配列の約 99 % に相当する領域の塩基配列決定に成功した(約 10 kb の未決定領域 1 箇所は今後に配列決定予定)。また、現時点で、染色体にコードされた約 4723 個の ORF の遺伝子産物名を命名した。また 6 つの rRNA オペロン(16S-23S-5S)と 76 個の tRNA も命名した。

今後は、残る 10 kb 領域の配列を決定後、当該全ゲノム配列とカルバペネム感受性株の全ゲノム配列との間で比較ゲノム解析を行う事により耐性因子の候補を選出する。さらに、RNA Seq 等を用いたトランスクリプトーム解析等にて、GAI92214 株の中等度耐性に寄与する因子をゲノムワイドに同定する。同定された主要耐性因子については、分子生物学的・生化学的手法により、詳細な遺伝子機能解明を行う予定である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1 件)

後藤隆次、森田雄二、林将大、田中香お里、メロペネム中等度耐性 *Bacteroides fragilis* GAI92214 株ゲノムライブラリーを用いた新規メロペネム耐性因子の同定、日本嫌気性菌感染症学会雑誌、査読有、46 巻、2016、68 - 74
<http://ci.nii.ac.jp/naid/40021064697>

[学会発表](計 5 件)

後藤隆次、体に住みつく細菌の功罪、平成 28 年度岐阜大学公開講座、2016 年 11 月 20 日、岐阜市

後藤隆次、森田雄二、林将大、田中香お里、嫌気性菌 *Bacteroides fragilis* のカルバペネム耐性機構の解明、第 28 回微生物シンポジウム、2016 年 9 月 2~3 日、名古屋市

Takatsugu Goto, Yuji Morita, Masahiro Hayashi, Kaori Tanaka, Identification of a novel meropenem-intermediate resistance factor using a genomic DNA library of *Bacteroides fragilis* GAI92214 strain, ASM microbe 2016, 2016.6.16 - 20, Boston.

後藤隆次、森田雄二、林将大、田中香お

里、*Bacteroides fragilis* の新規メロペネム中等度耐性因子の同定、第 89 回日本細菌学会総会、2016 年 3 月 23~25 日、大阪市

後藤隆次、森田雄二、林将大、田中香お里、メロペネム中等度耐性 *Bacteroides fragilis* GAI92214 株ゲノムライブラリーを用いた新規メロペネム耐性因子の同定、第 46 回日本嫌気性菌感染症学会学術集会、2016 年 3 月 4~5 日、長崎市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 隆次 (GOTO, Takatsugu)
岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・助教
研究者番号: 80326355

(2) 研究分担者

田中 香お里 (TANAKA, Kaori)
岐阜大学・生命科学総合研究支援センター・教授
研究者番号: 20242729

(3) 連携研究者

森田 雄二 (MORITA, Yuji)
愛知学院大学・薬学部・准教授
研究者番号: 00454322