

論文の内容の要旨

論文題目 *Proteus mirabilis* 臨床分離株に認められた *ampC* 遺伝子を

保有する可動性遺伝因子の解析

指導教員 四柳 宏准教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 18 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

原田 壮平

Integrating conjugative element (ICE) は宿主の染色体から自己を切り出し環状中間体を形成し、接合伝達により他の細胞へと移動し、新たな宿主細胞の染色体へと組み込まれる機能を有した可動性遺伝因子であるが、プラスミドとは異なり自律性に複製する機能は有さず、宿主の染色体に組み込まれることで維持される。SXT^{MO10} はそれまで流行していた血清型 O1 に変わって 1992 年にインドで流行し始めた *Vibrio cholerae* O139 の分離株である MO10 に最初に見出された ICE であるが、現在ではアジアのほとんどの *V. cholerae* は O1 株、O139 株ともに SXT^{MO10} あるいは類縁の ICE を保有するに至り、他地域で分離された *V. cholerae* や他の *Vibrio* spp. でもその保有が報告されている。SXT^{MO10} は宿主菌にクロラムフェニコール、サルファメトキサゾール、トリメトプリム、ストレプトマイシンに対する

耐性を付与する。1967年に南アフリカで分離されたカナマイシン耐性、水銀耐性を示す *Providencia rettgeri* 臨床分離株から発見された ICE である R391 は、構造的、機能的に SXT^{MO10} と高い関連性を有しており、これらは他の類縁の ICE とともに SXT/R391-related ICE と総称されている。SXT/R391-related ICE は高度に保存された中核遺伝子群を共通に有しており、この中には ICE の組み込み、切り出し、接合伝達に関連する遺伝子である *int*, *xis*, *tra* などが含まれている。さらに、それぞれの SXT/R391-related ICE はこれらの中核遺伝子群に加えて、抗菌薬耐性などその ICE を特徴付ける形質を付与する遺伝子を保有している。これらの各 ICE に固有の遺伝子はほとんどの場合 4 箇所の“Hotspots”と呼ばれる部位および ICE の *attL* から *traI* 遺伝子の間の部位に存在する。これまでに 25 種類以上の SXT/R391-related ICE が報告されているが広域セファロスポリンに対する耐性を付与する SXT/R391-related ICE はこれまでには報告されていない。

今回、広域セファロスポリンに対して耐性を呈する *Proteus mirabilis* 臨床分離株 TUM4660 を分離したためこの耐性機序を解析した。PCR とその増幅産物の塩基配列決定により *P. mirabilis* TUM4660 が通常は *P. mirabilis* の染色体には存在しない AmpC ベータラクタマーゼをコードする遺伝子である *bla_{CMY-2}* を保有していることを確認した。AmpC ベータラクタマーゼはセフトジジム、セフトキシムなどのオキシイミノセファロスポリン、セフトキシチン、セフトetanなどのセファマイシンなど幅広いベータラクタム系抗菌薬に対する分解活性を有する酵素であり、これらの抗菌薬はグラム陰性桿菌感染症の治療における主要な薬剤であるため、その産生による耐性化の臨床的意義は大きい。*P. mirabilis* TUM4660 の *bla_{CMY-2}* を保有している遺伝因子は *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella*

enterica serover Typhimurium, *Citrobacter koseri* へと実験的に接合伝達が可能であった。一般に、グラム陰性桿菌における外来性の抗菌薬耐性遺伝子の獲得は接合性プラスミドの伝達を介するが、*P. mirabilis* TUM4660 および接合完了体 *E. coli* TUM4670 からのプラスミド抽出および *bla*_{CMY-2} 特異的 DNA プローブを用いたサザンハイブリダイゼーションの結果から、*P. mirabilis* TUM4660 における *bla*_{CMY-2} を含んだプラスミドの保有は否定的であった。さらにパルスフィールドゲル電気泳動で分離した *P. mirabilis* TUM4660 および *E. coli* TUM4670 のゲノム DNA の *I-CeuI* 切断断片と *bla*_{CMY-2} 特異的 DNA プローブおよび 23S rRNA 遺伝子特異的 DNA プローブのサザンハイブリダイゼーションの結果から、*bla*_{CMY-2} は *P. mirabilis* TUM4660 および *E. coli* TUM4670 の染色体上に存在していることが示された。

P. mirabilis およびその近縁種が SXT/R391-related ICE を保有していた報告がみられたことから、*P. mirabilis* TUM4660 において SXT/R391-related ICE が *bla*_{CMY-2} の遺伝子水平移動に関与している可能性を考え、これを検証した。SXT/R391-related ICE の両端に存在する相同配列である *attL* と *attR*、SXT/R391-related ICE の環状中間体が存在すると形成される *attP* を増幅するプライマーペアを用いた PCR により、*P. mirabilis* TUM4660 および *E. coli* TUM4670 に SXT/R391-related ICE が存在していることを確認し、これを ICE*PmiJpn1* と命名した。細胞内における ICE*PmiJpn1* の環状中間体の形成の頻度を Real-time quantitative PCR により評価し、*P. mirabilis* TUM4660 においては *E. coli* TUM4670 における頻度の 4.63×10^{-2} であり、両菌株を供与菌としたときの接合伝達の頻度と正の相関がみられた。

SXT/R391-related ICE の間で保存されている塩基配列を基に構築したプライマーを用いた PCR およびその産物の塩基配列決定により ICE*PmiJpn1* の遺伝子構造を解析した。

ICE*PmiJpn1* の塩基配列は SXT/R391-related ICE の原型的な ICE である R391 の塩基配列と高い相同性を有していたが、IS10 による混成トランスポゾンの転位を介して ICE 上に *bla*_{CMY-2} を保有していた。この混成トランスポゾンの 2 コピーの IS10 の間の塩基配列はこれまでの研究で米国のヒトや動物から分離された広域セファロスポリン耐性の *E. coli* や *Salmonella enterica* が保有している *bla*_{CMY-2} を含んだプラスミドに多く認められてきた 13-kb type I 構造と高い相同性を有していた。また、ICE*PmiJpn1* において 4 箇所の“Hotspots”の塩基配列のうち、2 箇所は R391 と類似し、1 箇所は SXT^{MO10} と類似し、1 箇所は他の SXT/R391-related ICE では認められていない ICE*PmiJpn1* に特有の塩基配列であり、*P. mirabilis* の全ゲノム塩基配列解析株である ATCC 29906 に認められた 2 つの open reading frame と相同性の高い open reading frame を有していた。

P. mirabilis における SXT/R391-related ICE の保有の頻度は不明である。これまでの報告は 1970 年代にインドで分離された株に存在した R997、2008 年に全ゲノム解析が行なわれた HI4320 株に偶然に発見された ICE の 2 例のみである。しかしながらある菌株が ICE を保有していてもその ICE の存在が抗菌薬耐性などの特有の形質を付与しない限りはその存在は見落とされうる上に、例え抗菌薬耐性を付与するとしても接合伝達が可能であることにより詳細な耐性遺伝子の所在の検討が行われない限りはその遺伝子は接合性プラスミド上に存在していると誤認される恐れがある。SXT/R391-related ICE の宿主染色体上の組み込み配列である *attB* は *prfC* 遺伝子の 5' 端に存在しているが、この遺伝子は多くの γ -proteobacteria の間で保存されている。実際に今回、ICE*PmiJpn1* は *E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. Typhimurium*, *C. koseri* への接合伝達が可能であり、過去の報告において R391 も *E. coli*, *S. Typhimurium*,

Enterobacter cloacae, *Serratia marcescens* への接合伝達が可能なことが示されている。このことから SXT/R391-related ICE は *Vibrio* spp.においてすでに世界的にみられているのと同様に、臨床的意義の高い腸内細菌科の細菌における耐性遺伝子の伝播に重要な役割を果たす可能性があり、抗菌薬耐性菌における ICE の存在頻度やその役割に関するさらなる研究が必要である。