

新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌のサーベイランスに関する研究

分担研究課題：新型のグラム陰性多剤耐性菌等の分子機構の解明 腸内細菌科細菌におけるアミノグリコシド耐性機構の解析

研究分担者 荒川 宜親（名古屋大学大学院医学系研究科・分子病原細菌学／耐性菌制御学・教授）
研究協力者 金 万春（同・技術職員）
研究協力者 和知野 純一（同・助教）

研究要旨：本研究では、腸内細菌科細菌におけるアミノグリコシド耐性機構を分子レベルで解明することを目的とした。以前の調査・研究から、アミカシンの MIC が $>256 \mu\text{g}/\text{mL}$ となる腸内細菌科細菌は、16S rRNA methyltransferase を産生している場合が多いことがわかった。一方、アミカシンの MIC が $64\text{--}256 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるような菌株については、その耐性機構について不明な点が多く残されている。そこで、研究室保存菌株の中から、アミカシンの MIC が $\geq 64 \mu\text{g}/\text{mL}$ となる腸内細菌科細菌 14 株を選び出し、それらの耐性機構を精査した。14 株のうち、9 株については *aac(6')-Ib* などの既知アミカシン耐性遺伝子の保有が確認された。また、*Serratia marcescens* 1 株においては、新規の *aac(6')* 遺伝子 [*aac(6')-Ian*] の保有が確認された。この遺伝子は 169,829-bp の接合性プラスミド上に存在した。このプラスミド上には、広域セファロスポリン耐性を付与する基質拡張型 β -ラクタマーゼ遺伝子 (*bla*_{TLA-3}) も存在した。

A. 研究目的

腸内細菌科細菌においては、セファロスポリン、カルバペネム、ニューキノロン等に対する薬剤耐性化が進んでいる。その結果、腸内細菌科細菌による感染症の治療に使用可能な抗菌薬が限られつつある。アミカシンやアルベカシンといったアミノグリコシドは、副作用の問題はあるものの、腸内細菌科細菌における耐性率は低く、今後、治療に重用される可能性がある。

一方、腸内細菌科細菌は 16S rRNA MTase など、これまでにない新しいアミノグリコシド耐性機構を獲得しつつある。そこで本研究では、本邦で分離された腸内細菌科細菌のアミノグリコシド耐性機構の詳細をあきらかにすることを目的とした。

B. 研究方法

菌株：研究室保存菌株を用いた。

薬剤感受性試験：寒天平板希釈法により、各種アミノグリコシドの最小発育阻止濃度（MIC）を測定した。

PCR：アミカシン耐性遺伝子 [*aac(6')-Ia* 及び *aac(6')-Ib*] の有無を調べた。

遺伝子クローニング：DNA を制限酵素処理後、クローニングベクターに連結した。大腸菌に形質転換し、アミカシン含有培地で選択を行った。

プラスミド解析：HiSeq2000 を用いて解析を行った。

タンパク発現系の構築及び精製：目的遺伝子を pET ベクターに連結し、*E. coli* BL21 に導入した。目的タンパクをイオン交換カラム等により精製した。

タンパク機能解析：HPLC 及び TLC にて解析を行った。

倫理面への配慮

該当なし

C. 研究結果と考察

研究室に保存されていた臨床分離腸内細菌科細菌を対象に、アミカシンの MIC を測定したところ、14 株が耐性（MIC, $\geq 64 \mu\text{g}/\text{mL}$ ）と判定された（Table 1）。この 14 株について、既知のアミカシン耐性遺伝子の有無を調べた。その結果、*aac(6')-Ia* の保有が 3 株、*aac(6')-Ib* の保有が 6 株において、それぞれ確認された（Table 1）。

次に、既知アミカシン耐性遺伝子の保有が確認されなかった 5 株について、それらのアミカシン耐性機構をあきらかにすることとした。まず、最も高いアミカシンの MIC を示した *Serratia marcescens* NUBL-11663 株について、アミカシン耐性因子の特定を試みた。*S.*

marcescens NUBL-11663 株のアミカシン耐性は、接合により大腸菌に移った。したがって、本菌株のアミカシン耐性因子は接合性プラスミドにあるものと考えられた。そこで、プラスミドからアミカシン耐性因子の単離を行ったところ、1つの ORF(573-bp)がクローン化された。データベースによる照合の結果、本遺伝子にコードされるタンパク質は、アミノグリコシドをアセチル化する機能を有すると考えられ、本遺伝子名を *aac(6')-Ian* と命名した。*aac(6')-Ian* の導入により、アミカシン、アルベカシン、トブラマイシン、イセパマイシンなど多種多様なアミノグリコシド耐性が付与されることがわかった (Table 2)。

次に、HiSeq2000 を用いてプラスミドの全塩基配列の決定を行った。本プラスミドは 169,829-bp であり、Inc は A/C2 であった。本プラスミド上に存在する薬剤耐性遺伝子としては、*aac(6')-Ian* の他に、広域セファロスポリン耐性を付与する *bla_{TLA-3}* やカルベニシリンナーゼである *bla_{SCO-1}* 等が存在した (Fig. 1A)。*aac(6')-Ian* の前後領域には Insertion sequence (IS) が存在した (Fig. 1B)。

ヒスチジンタグを付加した AAC(6')-Ian を大量精製し、機能解析を行った。TLC や HPLC による解析の結果、AAC(6')-Ian はアセチル CoA 存在下でアルベカシンやアミカシンなど多様なアミノグリコシドを修飾、不活化することがわかった (Fig. 2)。その修飾部位は 6'位のアミノ基であることも判明した。

D. 結論

本邦で分離されたアミカシン耐性腸内細菌科細菌の耐性機構を分子レベルであきらかにした。アミカシンの MIC が ≥ 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となる菌株の主たる耐性機構としては、16S rRNA MTase や AAC(6')に分類されるアミノグリコシドアセチル化酵素が関与していることがわかった。

E. 研究発表

1. 論文(雑誌)発表

1) Jin W, Wachino J, Kimura K, Yamada K,

Arakawa Y.

New plasmid-mediated aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase, AAC(6')-Ian, and ESBL, TLA-3, from a *Serratia marcescens* clinical isolate.

Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2015, in press.

2. 学会発表

1) 金万春, 和知野純一, 木村幸司, 山田景子,

荒川宣親.

Serratia marcescens より発見された新規プラスミド媒介性アミノ配当体アセチル化酵素の解析. 第 51 回日本細菌学会中部支部総会. 金沢. 2014.

2) 金万春, 和知野純一, 木村幸司, 山田景子, **荒川宣親.**

New plasmid-mediated aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase, AAC(6')-Ian, and ESBL, TLA-3, from a *Serratia marcescens* clinical isolate.

第 88 回日本細菌学会総会. 岐阜. 2015.

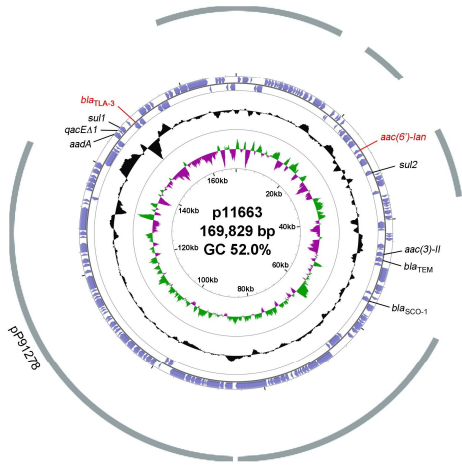
F. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得:なし
2. 実用新案登録:なし
3. その他:なし

Table 1. Profiles of bacterial strains used in this study

	AMK MIC (mg/L)	<i>aac(6')-Ia</i>	<i>aac(6')-Ib</i>
<i>E. coli</i> NUBL-11655	64		
<i>E. coli</i> NUBL-11656	128		+
<i>E. coli</i> NUBL-11657	>256	+	
<i>K. pneumoniae</i> NUBL-11658	64		+
<i>K. pneumoniae</i> NUBL-1533	64		+
<i>K. pneumoniae</i> NUBL-4605	64		+
<i>K. pneumoniae</i> NUBL-4622	64		+
<i>P. mirabilis</i> NUBL-11659	64	+	
<i>P. mirabilis</i> NUBL-11660	128		
<i>S. marcescens</i> NUBL-2	64		
<i>S. marcescens</i> NUBL-11661	64	+	
<i>S. marcescens</i> NUBL-11662	64		
<i>S. marcescens</i> NUBL-11663	128		
<i>S. marcescens</i> NUBL-11664	>256		+

A



B

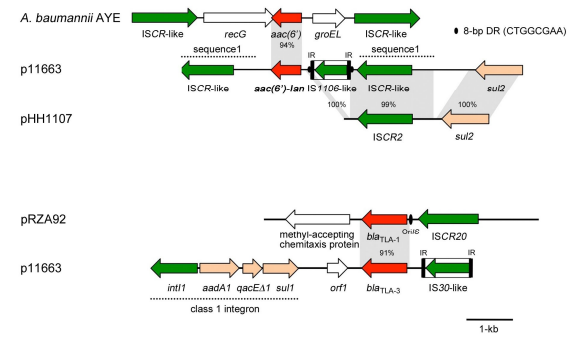


Fig. 1.

Table 2. Susceptibility testing

Bacterial strains	Aminoglycosides													β-lactams						
	APR	ABK	AMK	TOB	KAN	GEN	ISP	SIS	NET	RSM	NEO	HGM	SPT	STR	CAZ	CAZ+CLA ^a	CTX	FEP	CMZ	MEM
<i>S. marcescens</i> NUBL-11663 (p11663)	4	32	128	128	>256	>256	128	256	128	>256	8	16	>256	4	128	2	32	8	128	0.25
<i>E. coli</i> DH108 (p11663)	2	32	64	128	>256	256	128	128	128	>256	4	16	256	4	256	1	4	0.5	1	0.031
<i>E. coli</i> DH108 ^b	1	0.5	0.25	0.5	0.5	0.5	1	0.5	0.5	>256	8	8	16	2	0.5	0.25	0.063	0.031	1	<0.016
<i>E. coli</i> DH5a (pBC-amk)	2	8	32	16	128	0.25	32	8	32	1	16	4	8	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>E. coli</i> DH5a (pBC-TLA-3)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	32	0.25	1	0.125	1	<0.016
<i>E. coli</i> DH5a (pBC-SK+)	1	0.25	0.5	0.25	0.5	0.5	0.25	0.5	0.25	1	8	8	8	1	0.125	0.125	<0.016	<0.016	1	<0.016

APR, apramycin; ABK, arbekacin; AMK, amikacin; TOB, tobramycin; KAN, kanamycin; GEN, gentamicin; ISP, isepamicin; SIS, sisomicin; NET, netilmicin; STR, streptomycin; SPT, spectinomycin; HGM, hygromycin B; NEO, neomycin; RSM, ribostamycin; PRM, paromomycin; CAZ, ceftazidime; CLA, clavulanic acid; CTX, cefotaxime; FEP, cefepime; CMZ, cefmetazole; MEM, meropenem; ND, not determined.
^aThe concentration of clavulanic acid was fixed at 4 mg/L.
^b*E. coli* DH108 naturally shows resistance to streptomycin.

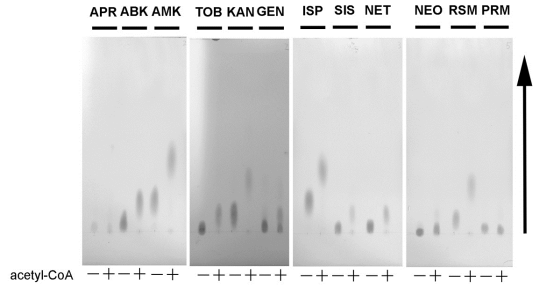


Fig. 2