

平成 28 年度 学内学術奨励金 成果報告

転写制御因子 KdrAB による多剤排出ポンプ遺伝子 *kexD* の制御メカニズムについての研究

免疫薬品学分野 小川和加野

Control mechanism of multidrug efflux gene *kexD* by a putative two-component regulatory system KdrAB

Wakano Ogawa

*Laboratory of Microbiology and Biochemistry, Daiichi University of Pharmacy
22-1 Tamagawa-cho, Minami-ku Fukuoka 815-8511 Japan*

要約

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の問題が、近年、世界的に急浮上している。肺炎桿菌は腸内細菌科に属する細菌である。カルバペネム耐性に関わらず、本菌の抗菌薬多剤耐性化は従来から問題となっている。一般的に抗菌薬耐性化機構には抗菌薬分解酵素の獲得やターゲット分子の変化(変異)による例が多い。これらは各系統の抗菌薬に対する耐性を順次獲得してゆく必要がある。これに対し、多剤排出ポンプは一度に複数の抗菌薬に対する耐性を獲得することができる仕組みである。筆者は肺炎桿菌の通常は発現していない、しかし強力な多剤排出ポンプである *KexD* に注目し、その発現制御機構を明らかにすることを目的として研究を行った。これまでに *KexD* の発現制御には 2 成分転写制御系 *KdrAB* が関与していることを示唆する結果が得られている。本報告では、高度多剤耐性株 Em16-1 のゲノム上の *kdrB* 遺伝子を破壊し、*KexD* 発現制御機構をより詳細に調べた。

緒言

肺炎桿菌はヒト腸管や環境中に存在する細菌であり、日和見感染の原因菌の一つである。本菌はアルコール中毒、糖尿病などの基礎疾患を持つ患者において壊死性の大葉性肺炎を起こすほか、尿路感染症や菌血症の原因となる。本菌による感染症に対しては、通常はセフェム系やキノロン系の抗菌薬を用いた治

療が行われる。しかし、近年では耐性菌の問題が深刻化している¹⁾³⁾。

肺炎桿菌の抗菌薬耐性化メカニズムには抗菌薬分解酵素の獲得、ターゲットの変化、抗菌薬の膜透過性の低下、抗菌薬の能動的排出などが知られている。抗菌薬能動的排出に分類される耐性系のひとつに多剤排出ポンプがあるが、これは細菌が多剤耐性化する重要な要因のひとつである。多剤排出ポンプは抗菌薬を含む様々な化学物質を細胞外に排出することで細菌細胞内における抗菌薬の濃度を低下させ、その作用を無効化する性質を持つ。さらに、多剤排出ポンプは基質特性が低く、構造や作用点の異なる様々な化合物を基質として認識することが出来る。そのため、多剤排出ポンプの発現上昇は多剤耐性化に直結している。

申請者はこれまでに肺炎桿菌を抗菌薬に暴露し高度多剤耐性変異株を12株分離している。この12株をさらに調べたところ、8株が *kexD* 遺伝子の発現上昇株であった⁴⁾。KexDはRND型多剤排出ポンプのひとつである⁴⁾。RND型多剤排出ポンプの多くは広い基質特異性と強い排出活性を持ち、大腸菌や緑膿菌といったグラム陰性菌の基本的な抗菌薬耐性に最も重要なシステムであることが知られている。

肺炎桿菌において、1種類の抗菌薬に肺炎桿菌を暴露したのみでKexDの発現上昇株による多剤耐性株が分離されたという事実は、実際に臨床現場で抗菌薬を投与された患者からKexDが発現上昇した耐性菌が分離される可能性を意味している。このような高度多剤耐性化現象を回避するためにはそのリスク要因とそのメカニズムを知る必要があると考え、まず、分離された多剤耐性変異株ゲノム上の変異部位の同定を目指した。その結果、これまでに2成分転写制御系の遺伝子 *kdrB* 上に変異を同定した。

2成分転写制御系は、細菌に特徴的な転写制御因子である⁵⁾⁷⁾。細胞膜に存在する Sensor kinase と細胞質の Response regulator から構成されており、Sensor kinase が Response regulator をリン酸化⇔脱リン酸化することにより、遺伝子の転写制御を行う系である(図1)。*kdrB* 遺伝子は2成分転写制御系の Sensor kinase をコードしている。*kdrB* 遺伝子のすぐ上流に存在する *kdrA* は *kdrB* とオペロンを形成していた。2成分転写制御因子の一般的性質から、KdrB タンパク質は Response regulator である KdrA タンパク質とともに機能していると推定される。*kdrB* 遺伝子に点変異が同定されたことから、

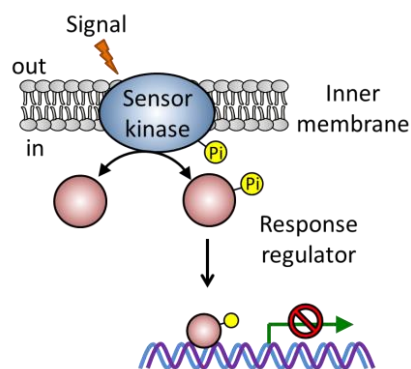


図1 2成分転写制御系の模式図
外界からのシグナルに応じて、Sensor kinaseがResponse regulatorをリン酸化あるいは脱リン酸化する。リン酸化、あるいは脱リン酸化を受けたresponse regulatorは遺伝子の転写を促進させたり抑制したりする。本図ではリン酸化体が遺伝子発現を抑制している場合を例示している。

KdrAB系が *kexD* 遺伝子の発現を制御する転写制御因子であることが予想される。しかし、KdrAB系と多剤排出ポンプ KexD の発現制御の関連は、実験的に示されていない。そこで、*kdrB* 遺伝子欠損株を作成しその性質を調べた。

方法

1. 菌株と培養条件

本研究で用いた菌株と plasmid を表 1 に示す。大腸菌及び肺炎桿菌の培養には L 培地 (1.0 % polypepton, 0.5 % yeast extract, 0.5 % NaCl, pH 7.0) 及び L 寒天培地 (1.0 % polypepton, 0.5 % yeast extract, 0.5 % NaCl, 1.5 % agar, pH 7.0) を用いた。目的に応じて、抗菌薬を含む培地で培養した。菌株の培養は通常は 37 °C で好氣的に行った。

表 1 使用した菌株及びプラスミド

Strains and Plasmids		Reference
<i>K. pneumoniae</i>		
ATCC10031	ATCC collection, parental strain	
Em16-1	multidrug resistant mutant from ATCC10031	4)
Plasmids		
pSTV28	vector	
pCP20T	pCP20 derivative, Ap ^R gene was replaced with Tet ^R gene	4)
pKD46T	pKD46 derivative, Ap ^R gene was replaced with Tet ^R gene	4)
pKD4	FRT cassette and <i>aph</i>	8)

1) 肺炎桿菌の *kdrB* 遺伝子破壊

肺炎桿菌の遺伝子破壊は、大腸菌の遺伝子組み換えに使用される λ recombination method を肺炎桿菌用に改変した方法で行った^{4), 8)}。使用したプライマーは表 2 に示す。

表 2 使用したプライマー

Primers	Sequences
kdrB 1	GCATGTTGTCATCAGCACTG
kdrB 2	GAAGCAGCTCCAGCCTACACCCGAGTATTGCAATGGCAAT
kdrB 3	CTAAGGAGGATATTCATATGTTTAACACCAGAAAATGGCTC
kdrB 4	CCGAGAATGGCAGTATAAAAAC
kdrB FRT Re	GAGCCATTTTCTGGTGTAAACATATGAATATCCTCCTTAG
kdrB FRT Fw	ATTGCCATTGCAATACTCGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC

2) MIC (最小生育阻止濃度) 測定

日本化学療法学会標準法の微量液体希釈法に準じて最小生育阻止濃度(MIC)を測定した⁹⁾。培地として Mueller-Hinton (MH) 培地 (3 % 肉抽出液、1.5 % カザミノ酸、1.5 % デンプン) を用いた。マイクロプレートは、96 穴の U 字型ウェルプレートを用いた。MH 培地で菌体を中期対数増殖期(O.D.650=0.7)まで培養し、希釈後、 10^5 cells/ml となるよう接種した。37 °C で 24 時間静置培養後、菌の生育が目視により確認できない最も低い濃度を MIC とした。

結果

1) 遺伝子破壊

以前に報告した方法で実施した⁴⁾。肺炎桿菌 ATCC10031 のゲノムを鋳型として、*kdrB* の上流域 0.84 kbp、下流域 0.55 kbp を PCR で増幅した。また、FRT cassette と kanamycin (Km) marker が挿入されている pKD4 を鋳型とし、FRT cassette と Km^r の領域を PCR 法で増幅した。各 fragment を精製後、KOD plus DNA polymerase (TOYOBO) を用いてこれらを繋げ、Fusion fragment (2.88 kbp)を得た。pKD46T で形質転換させた ATCC10031、Em16-1 を、0.2% arabinose を添加した

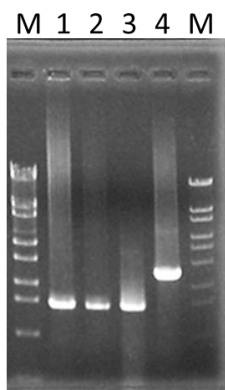


図 2 遺伝子破壊株の確認

*kdrB*1プライマーおよび*kdrB*4プライマーを使用。ExTaq (Takara Co.)を利用し、95°C 30秒、55°C 30秒、72°C 3分30秒、40サイクルで反応を行った。

Lane 1 EKB4, Lane 2 AKB6, Lane 3 AKB8, Lane 4 ATCC10031

SOB 培地で中期対数増殖期 (O.D.₆₅₀=0.7)まで培養し electroporation 用の細胞を調製した。この細胞に fusion fragment を約 100 ng 加え、2.5 kV で electroporation を行った。electroporation 後、0.2% arabinose 及び 40 µg/ml Km を含む L 寒天培地で 30°C、24 時間培養した。生育してきた候補株のゲノム上の *kdrB* に FRT::Km^r が挿入されていることを PCR で確認した後、42 °C で培養して pKD46T を除去した。次にこの株を pCP20T で形質転換した。形質転換株の選択は 10 µg/ml tetracycline (Tc) を含む L 寒天培地で行った。その後、抗菌薬を含まない L 寒天培地で 42 °C で培養し、Km と Tc に感受性になった株を選択した。これらの株について PCR 法で *kdrB* 遺伝子が破壊されているかどうかと抗菌薬耐性マーカーが除去されたかどうかを *kdrB* 1 プライマーと *kdrB* 4 プライマーを使用して確認した (図 2)。ATCC10031 のゲノムを template とした場合、理論上、約 2.3 kbp(計算値 2277 bp)のバンドが出現し、最終的に FRT が除去され遺伝子破壊が生じた場合には約 1.37 kbp(計算値 1371 bp)のバンドが出現すると予測された。図 2 の結果から、Lane 1、2、3 では遺伝子破壊が生じたと考えられる結果が得られた。これらの株をそれぞれ、AKB4 (ATCC10031 由来の *kdrB* 破壊株)、EKB6、EKB8 (ともに Em16-1 由来の *kdrB* 破壊株)とした。

2) 遺伝子破壊株の薬剤感受性

得られた肺炎桿菌 *kdrB* 破壊株 AKB4、EKB6、EKB8 について、各種抗菌薬の最小生育阻止濃度を測定した (表 3)。erythromycin、norfloxacin、ethidium Br、TPP Cl は KexD のよい基質であることが明らかにされている⁴⁾。ATCC10031 と比較し多剤耐性変異株 Em16-1 ではこれらの MIC が顕著に上昇している。そして、Em16-1 から *kdrB* を破壊した EKB4 では Em16-1 で上昇したこれらの抗菌薬の耐性が ATCC10031 と同じレベルまで低下した。colistin は多剤耐性緑膿菌や多剤耐性腸内細菌科細菌による感染症に対する治療薬として位置づけられている。これはペプチド系抗菌薬であり、多剤排出ポンプが得意とする基質ではないと予想されるが、本結果から実際に KexD の基質とはならないことが示唆された。ATCC10031 株では *kexD* 遺伝子は通常は発現していないため、*kdrB* が破壊されても、抗菌薬耐性は変化しないと予想された。実際に MIC 測定の結果は予想通りとなり、これまでの結果と合致した。この結果から、*kdrB* が肺炎桿菌の多剤耐性化に役割を果たしていることが示された。

表 3 遺伝子破壊株における抗菌物質の最小生育阻止濃度

	Minimum inhibitory concentration (μg/ml)				
	ATCC10031	AKB6	AKB8	Em16-1	EKB4
erythromycin	8	4	8	256	8
norfloxacin	0.03	0.03	0.03	0.13	0.06
cloxacillin	8	8	8	16	4
gentamicin	0.25	0.13	0.25	0.25	0.5
tetracycline	1	2	1	8	2
colistin	4	4	4	4	4
novobiocin	0.5	0.5	0.5	1	0.5
acriflavine	8	8	8	16	8
ethidium Br	64	64	64	256	64
rhodamine 6G	16	16	16	16	16
benzalkonium Cl	4	4	4	4	4
SDS	128	128	256	256	128
TPP Cl	64	32	32	512	32

TPP Cl: tetraphenylphosphonium chloride

考察及び展望

これまでの研究から、高度多剤耐性変異株 Em16-1 の *kdrB* 遺伝子に点変異が存在すること、そして、変異型 *kdrB* 遺伝子をクローニングし、ATCC10031 株に導入すると、抗菌薬耐性が上昇し *kexD* の mRNA 発現が上昇することを明らかにしている。今回、遺伝子破壊株を作成し、Em16-1 の抗菌薬耐性が低下したことから、*kdrB* による抗菌薬多剤耐性への関与はより確実なものとなった。一方、以前に *kexD* 遺伝子をプラスミドにクローニングして基質特異性について調べた結果と変異株 Em16-1 で上昇した抗菌薬耐性パターンが完全には一致していないという問題がある。これは遺伝子破壊株において、tetracycline などの MIC が完全に ATCC10031 と同じレベルにまでは低下していない点などにも反映されている。現時点では 2 成分転写制御系が別の抗菌薬耐性遺伝子の転写制御も行っている可能性があるかと推定している。

EKB4 で gentamicin 耐性がわずかに上昇傾向にある。これは遺伝子破壊の過

程で **kanamycin** を使用した影響ではないかと予測している。しかし、遺伝子破壊の過程で **kanamycin** に晒された際に生じるアミノグリコシド耐性はリボソーム RNA の変異である。しかし、今回得られた **EKB4** の耐性化の程度は一般的にリボソーム RNA に変異が導入された時と比べると、耐性の上昇の程度が低い。緑膿菌ではアミノグリコシドには馴化 (**Adaptive resistance**) という現象も報告されているため、このような現象が生じている可能性があるのかもしれない^{10), 11)}。

今後の課題として、これまでの研究結果から、**kdrB** 遺伝子破壊株では多剤排出ポンプ **kexD** の発現が低下していると予想されるため、この点を確認するために、**kdrB** 遺伝子破壊株における **kexD** の発現を調べる必要があると考えている。また、**kdrB** 遺伝子をプラスミドで相補し、破壊株の抗菌薬耐性が変化するかどうかを調べる必要がある。本研究は多剤排出ポンプ転写制御システムについての研究の端緒である。今後、肺炎桿菌の **KexD** と **KdrAB** との関連性を分子レベルで解明し、将来的には多剤耐性を生み出すトリガーを作動させないような物質の探索系の構築につなげてゆきたい。

謝辞

本研究の遂行にあたり、本学学生 世良希央氏に感謝申し上げます。

参考文献

- 1) J Prev Med Hyg. 2016; 57(3): E149–E156.
- 2) Braz J Microbiol. 2016; 47 (Suppl 1): 31–37.
- 3) Int J Antimicrob Agents. 2016; 48(1): 11-18.
- 4) Gene. 2012; 498 : 177–182
- 5) Mol Oral Microbiol. 2016; 31(5):379-397.
- 6) Microbiol Mol Biol Rev. 2015; 79(2):193-224.
- 7) FEMS Microbiol Lett. 2012; 326(1): 2-11.
- 8) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2000; 97: 6640–6645.
- 9) Japan Society of Chemotherapy, Tokyo. 1990; 38: 13-105.
- 10) J Med Microbiol. 1989; 29(1): 41-50.
- 11) Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(4): 1371-1375.