

薬剤耐性因子の変異と耐性度の上昇-TetX の解析

永須 千尋*, 安川 洋生**
(2019年2月15日受理)

Chihiro EISU, Hiro YASUKAWA

Mutants of the Antimicrobial Resistance Determinant *tetX* Conferring Increased Resistance to Bacterial Cells

要旨

TetX (抗菌薬の一種であるテトラサイクリンを不活化する酵素であり, 同薬剤に耐性を示す細菌から見いだされた) の変異体を作成し, それらを導入した大腸菌のチゲサイクリン (多剤耐性菌に有効な抗菌薬) に対する感受性を調べた。作成した変異体のうち TetX の N 末端から266番目のアミノ酸であるグルタミン酸をリジンに置換し, 359番目のアミノ酸であるメチオニンをイソロイシンに置換した変異体について, これを導入した大腸菌はチゲサイクリンに対する感受性が低下し, より高濃度のチゲサイクリン存在下でも発育した。ゲノムデータベースを検索したところ *Riemerella anatipestifer* (アヒルやカモに感染する致死性の細菌) がコードする5種の TetX 相同タンパク質が見つかり, その内の4種は266番目のアミノ酸がリジンであり, 359番目のアミノ酸はイソロイシンであった。この4種の相同タンパク質の1種についてはチゲサイクリン耐性を示すことが報告されている。

1. はじめに

テトラサイクリン系抗菌薬は細菌のタンパク質の合成を阻害する薬剤であり, ヒトの感染症治療に使用されるだけでなく, 養鶏場や養魚場でも多く使用されている。しかし臨床においては耐性菌が広くみとめられることもあり, 耐性機構 (薬剤排出やリボソーム保護) を回避するチゲサイクリンが開発された。チゲサイクリンはグラム陰性菌感染症に優れた臨床効果を示し, いくつかの多剤耐性菌に対しても有効であることが示されている。しかし同薬剤は TetX によって修飾され不活化されることが報告され (Moore, *et al.*, 2005), これをコードする遺伝子, 及びその変異体の拡散が懸念される。

TetX は FAD を結合するモノオキシゲナーゼで

あり, テトラサイクリン系抗菌薬を修飾しその抗菌活性を失わせることにより細菌に耐性を付与する (Yang, *et al.*, 2004)。1988年に *Bacteroides fragilis* (ヒトの口腔から腸の細菌叢を構成する菌種の一つ) のテトラサイクリン耐性因子として報告され, 1991年に塩基配列と推定されるタンパク質の一次構造が報告された (Speer & Salyers, 1988; Speer, *et al.*, 1991)。それ以降, TetX, 及びその相同タンパク質 (構造がよく似ており同様の機能を持つタンパク質) は環境試料等から検出されるも, その頻度は他のテトラサイクリン耐性因子に比べて高くはなかった。しかし2013年には, 調査した一医療機関の分離株の21%がTetXをコードしていたとの報告もあり (Leski, *et al.*, 2013), 今日では相当程度の臨床株が有している可能性が

* 岩手大学教育学部, ** 岩手大学教授

ある。

また、突然変異により TetX の活性が上昇しチゲサイクリンを容易に不活化できるようになると、それは憂慮すべき事態となり得る。変異により活性が上昇する可能性については、分子内の1ヶ所のアミノ酸の変化でもそれが起こることが既に示されている。Walkiewicz 等は、*B.thetaiotaomicron* の TetX2 (TetX とアミノ酸配列が99.8%一致する相同タンパク質) のランダム変異体ライブラリーを作成し解析したところ、N 末から280番目のアミノ酸であるトレオニン (T²⁸⁰) がアラニン (A) に置換した変異体や、371番目のアミノ酸であるアスパラギン (N³⁷¹) がイソロイシン (I) に置換した変異体は耐性度が上昇したと報告している (Walkiewicz, *et al.*, 2012)。ただしこれらの変異体のチゲサイクリン耐性度に関する報告はない。TetX2と同様に TetX においても280番目のアミノ酸はTであり、371番目のアミノ酸はNである。そこで筆者らは、これらのアミノ酸を置換した変異体 (TetX の T²⁸⁰ を A に置換した変異体と、N³⁷¹ を I に置換した変異体) を作出してチゲサイクリンに対する感受性を確かめたところ、これらはいずれも活性の上昇がみとめられた。

Walkiewicz 等による TetX2のランダム変異体の解析とは独立に、筆者らは TetX のランダム変異体を作成し、その中から酵素特性の変化した変異体を選択し解析を進めてきた。本稿では、これらの内、活性が上昇した変異体である TetXPS112について報告する。また、ゲノムデータベースの遺伝情報を検索した結果も考察し報告する。

2. 材料と方法

2.1. DNA と大腸菌

TetX、及びその変異体をコードする塩基配列を合成し、汎用のプラスミドベクターである pUC18 の *Bam*HI-*Sal*I に挿入した。*LacZα* との融合タンパク質が作られないように、*Bam*HI の下流に終始コドン配置し、更にその下流から目的のタンパク質の翻訳が開始されるように設計した。大腸

菌は HB101株を用いた。本稿に記載の実験は微生物を取り扱う遺伝子組換え実験であり、関連する法令・規則を遵守して行った。その上で更に安全性を担保するために、作出した遺伝子組換え体が抗菌薬に対して高度耐性を示さないように実験系を検討し実施した。例えば、TetX をコードする遺伝子、及び TetX の変異体をコードする遺伝子は *lacZ* プロモーターの支配下に配置して発現量を低く制御できるようにし、宿主には、遺伝子組換え実験で汎用される大腸菌株の内、当研究室における経験からテトラサイクリン系抗菌薬に比較的感受性が高いと思われる株を用いる等の安全対策を執った。

2.2. 発育阻止円の測定

構築したプラスミドを定法に従って HB101 に導入し、得られた形質転換体の懸濁液 (0.5 McFarland) を Mueller-Hinton 寒天培地に塗布し、KB ディスク TGC (栄研化学) を配置した。これを終夜37℃で培養し、ディスクの周囲に形成された発育阻止円の直径を測定した (n = 4)。チゲサイクリン感受性試験では、寒天培地を調製してから使用するまでの保存時間が試験結果に影響を及ぼすことが知られているため (Bradford, *et al.*, 2005)、寒天培地は調製してから12時間以内 (試験結果に影響を及ぼさない範囲) に使用した。細菌の抗菌薬に対する耐性度は、寒天培地上で抗菌薬により細菌の発育が阻止される領域の大きさを測定し解析する方法や、抗菌薬ごとに細菌の発育を阻止できる最小濃度 (最小発育阻止濃度) を決定し解析する方法などを用いて評価する。筆者の所属する研究室では、これらの試験をともに複数回実施して解析することを常としているが、本稿では、前者の方法にて得た結果について記載する。この方法では、試験菌を寒天培地に塗布し、その中央に所定濃度の抗菌薬を含むペーパーディスクを配置し、この状態で培養する。培養後には、ディスクの周囲に試験菌が発育しない円形の領域 (発育阻止円) がみとめられる。試験菌の耐性度が高い場合は発育阻止円は小さく、耐性度が低い場合

は発育阻止円の大きくなるため、発育阻止円の直径を測定することで試験菌の耐性度を評価できる。評価の基準は、それぞれの抗菌薬について菌種別に定められており、測定した数値をそれに照らして「耐性」「中間的」あるいは「感性」と判断する。一般に学術論文等では耐性か否かを判定するために測定した発育阻止円の直径を記載するが、本稿では試験菌が高度耐性を示さないようにデザインした実験系である故に、直径ではなく、直径の相対値を記載する。

2.3. データベースとソフトウェア

遺伝情報の検索には Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) を用いた。検索により得られた情報の解析には多重整列プログラム ClustalW を用いた。

2.4. 機関承認

本研究は、岩手大学遺伝子組換え生物等安全管理委員会にて審査され了承された「フラビン含有モノオキシゲナーゼの構造解析及び機能解析（機関承認番号201701）」の一部であり、関連法令や規則を遵守して行った。

3. 結果と考察

3.1. E²⁶⁶とM³⁵⁹の変異

構築したプラスミドを HB101 に導入して発育阻止円の直径を測定し、TetX を導入した HB101 の発育阻止円の直径を 1 として、他の試験菌の発育阻止円の直径の相対値を求めた。

チゲサイクリンによる発育阻止円の直径の相対値は、TetXPS112 を導入した HB101 では 0.838 ± 0.179 であり、TetX よりも有意に小さい値であった ($p < 0.01$)。この結果は、TetXPS112 を導入した HB101 の方が TetX を導入した HB101 よりチゲサイクリンに対して抵抗性があるということを示しており、TetXPS112 の方が TetX より耐性因子としての活性が高いことを示している。先述の通り、本稿に記載の実験は耐性因子の活性が低いレベルを維持するようにデザインされている。そうしな

い場合、例えば TetXPS112 を別の宿主に導入した場合はチゲサイクリンに対して明確に耐性を示すことが、当研究室の別の実験により分かっている。

TetXPS112 は、266 番目のグルタミン酸 (E²⁶⁶) と 359 番目のメチオニン (M³⁵⁹) がそれぞれリジン (K) とイソロイシン (I) に置換している。これらの 2 つのアミノ酸のうちいずれか一方が活性の上昇に寄与しているのか、あるいは両方とも変異していることが上昇に必要なのかを確かめるために、アミノ酸を 1 つずつ置換した変異体 (TetX の E²⁶⁶ を K に置換した変異体、及び TetX の M³⁵⁹ を I に置換した変異体) を構築した。構築したプラスミドをそれぞれ HB101 に導入してチゲサイクリンの発育阻止円の直径を測定したところその相対値は、E²⁶⁶ を K に置換した変異体では 0.868 ± 0.204 であり、M³⁵⁹ を I に置換した変異体では 0.936 ± 0.115 であった。従って、TetXPS112 の活性の上昇は、E²⁶⁶ が K に置換したことによる貢献の方が大きいものの、2 つのアミノ酸置換のいずれか一方のみによるのではなく、ともに置換していることによると判断した。

3.2. アミノ酸の互換性

生物のタンパク質を構成するアミノ酸の種類は、基本的には 20 種である。これらの中には生化学的な性質が互いに似たアミノ酸もあり、そのようなアミノ酸はタンパク質内で置換してもタンパク質の機能に大きな影響を与えないことがある。筆者らは、リジンをそれと似たアルギニン (R) に置換した場合の影響と、イソロイシンをそれと似たロイシン (L) に置換した場合の影響を調べるためにプラスミドを構築してアッセイした。

その結果、R²⁶⁶ と I³⁵⁹ を有する変異体、K²⁶⁶ と L³⁵⁹ を有する変異体、R²⁶⁶ と L³⁵⁹ を有する変異体ではそれぞれ 0.803 ± 0.362 , 0.866 ± 0.267 , 0.850 ± 0.308 であった。これらの変異体の間では有意な違いはみとめられないものの、K²⁶⁶ と I³⁵⁹、または、R²⁶⁶ と I³⁵⁹、という組み合わせが活性上昇に寄与するようであり、生化学的な性質が似たアミノ酸と互換性があるとは単純には判断できない。

3.3. 相同タンパク質の検索

KEGG を用いて TetX に相同なタンパク質を検索し、それらの266番目のアミノ酸と359番目のアミノ酸について比較した。グラム陰性菌である *Myroides odoratimimus*, *Chryseobacterium taklimakanense*, 及び *Parabacteroides* 属の1種がコードする TetX 相同タンパク質は、いずれも266番目のアミノ酸がEで、359番目がIであった。これらについてのチゲサイクリン感受性の報告は見出せなかった。

また、アヒルやカモの感染症の起因菌である *Riemerella anatipestifer* がコードする TetX 相同タンパク質は5種類が登録されており（いずれも TetX のアミノ酸配列と90%以上一致）、その内の4種では266番目のアミノ酸はKであり、359番目はIである。その一つを発現する *R.anatipestifer* CH3株は、チゲサイクリンの最小発育阻止濃度が12 μ g/mLであり、当該タンパク質の遺伝子の変異株ではチゲサイクリンの最小発育阻止濃度が2 μ g/mLに低下することが報告されている（Li *et al.*, 2017）。すなわち、*R.anatipestifer* CH3株が示す高いチゲサイクリン耐性は、K²⁶⁶とI³⁵⁹を有する TetX 相同タンパク質によりもたらされていると判断できる。ただし、このタンパク質の分子内には他にも TetX と異なるアミノ酸があり、K²⁶⁶とI³⁵⁹のみがチゲサイクリン耐性に寄与しているとは限らない。なお、他の *R.anatipestifer* TetX 相同タンパク質については報告されていないが、いずれも耐性度が上昇していることが推測される。このように、新たに検出される TetX 相同タンパク質は耐性度が上昇する方向に変異している。チゲサイクリンに高い耐性を示す TetX 相同タンパク質の増加と拡散が懸念されるため、モニタリングが必要であると思われる。

4. 終わりに

本研究で示した変異体はいずれもチゲサイクリンの最小発育阻止濃度の上昇がみとめられた。テトラサイクリン系抗菌薬が流出している環境中では TetX の突然変異によってチゲサイクリン耐性

度の上昇が起こると考えられる。このような事態はテトラサイクリン系抗菌薬を使用している養鶏場や養魚場、その周辺の水域で起こり得ることであり、身近な問題としてとらえなければならない。

筆者が所属する研究室は教育学部の中にありながら耐性菌についての研究をしており、日々、耐性因子の分子生物学的知見を集積するための遺伝子組換え実験を行っている。現在、世界規模で耐性菌が増加しており、感染症の治療が困難になり死亡者が増加することが懸念されている。被害を拡大させないためには生命科学分野や医療分野での基礎研究や臨床研究だけでなく、教育分野での対応も必要である。筆者を含む本学部の卒業生の多くは学校教員として生徒の指導にあたる。生徒たちに耐性菌に関する知識と、耐性菌を増やさないことの重要性を伝えることも、教員の役割であると考え。生徒たちに耐性菌の増加が身近な問題であるという意識づけを行い、耐性菌対策に対する関心を高めることを目的として教育指導したいと考えている。

謝辞

本稿に記載した実験の一部は、岩手大学大学院総合科学研究科理工学専攻の伊澤佑香氏、岩手大学技術部の高橋美和氏、田沼萌氏、藤崎聡美氏、星勝徳氏、水戸部祐子氏の協力により行われた。

参考文献

Bradford, P.A., Petersen, P.J., Young, M., Jones, C.H., Tischler, M., O'Connell, J. (2005) Tigecycline MIC testing by broth dilution requires use of fresh medium or addition of the biocatalytic oxygen-reducing reagent oxyrase to standardize the test method, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49, 3903-3909.

Leski, T.A., Bangura, U., Jimmy, D.H., Ansumana, R., Lizewski, S.E., Stenger, D.A. (2013) Multidrug-resistant *tet(X)*-containing hospital isolates in Sierra Leone, *Int.J.Antimicrob.Agents*, 42, 83-86.

Li, T., Shan, M., He, J., Wang, X., Wang, S., Tian, M., Qi, J., Luo, T., Shi, Y., Ding, C., Yu, S. (2017) *Riemerella anatipestifer* M949_0459 gene is responsible for the bacterial resistance to tigecycline, *Oncotarget*, 8, 96615–96626.

Moore, I.F., Hughes, D.W., Wright, G.D. (2005) Tigecycline is modified by the flavin-dependent monooxygenase TetX, *Biochem.*, 44, 11829–11835.

Speer, B.S., Salyers, A.A. (1988) Characterization of a novel tetracycline resistance that functions only in aerobically grown *Escherichia coli*, *J.Bacteriol.*, 170, 1423–1429.

Speer, B.S., Bedzyk, L., Salyers, A.A. (1991) Evidence that a novel tetracycline resistance gene found on two *Bacteroides* transposons encodes an NADP-requiring oxidoreductase, *J.Bacteriol.*, 173, 176–183.

Walkiewicz, K., Benitez Cardenas, A.S., Sun, C., Bacorn, C., Saxer, G., Shamoo, Y. (2012) Small changes in enzyme function can lead to surprisingly large fitness effects during adaptive evolution of antibiotic resistance, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.*, 109, 21408–21413.

Yang, W., Moore, I.F., Koteva, K.P., Bareich, D.C., Hughes, D.W., Wright, G.D. (2004) TetX is a flavin-dependent monooxygenase conferring resistance to tetracycline antibiotics, *J.Biol.Chem.*, 279, 52346–52352.