

テトラサイクリン耐性因子 TetX とそのバリエーションの比較解析

安川 洋生*

(2020年2月21日受理)

Hiro YASUKAWA

Comparative Analysis of the Tetracycline Resistance Determinant TetX and its Variants

要 旨

データベース解析により TetX のバリエーションをトリの病原菌である *Riemerella anatipestifer* から 5 種見いだした。それらをコードするプラスミドを作成し大腸菌 JM109 に導入してアッセイしたところ、TetX 発現菌はチゲサイクリン (TGC) に感性を示したが、TetX バリエーション発現菌はいずれも耐性を示した。バリエーションのうち TetX 5 は TetX と 20ヶ所のアミノ酸が異なり、この 20 残基のいずれかが高 TGC 耐性に関与していると推察された。そこで TetX 5 をベースに、これらのアミノ酸を 1 残基ずつ TetX 型に置換した部位特異的変異体を作成しアッセイしたところ、E⁹⁴、A²¹⁷、K²⁶⁶、S²⁸² のいずれかを置換した変異体は TetX 5 より有意に耐性度が低下した ($p < 0.05$, $n = 8$)。次に、TetX をベースに、これら 4 残基を TetX 5 型に置換した部位特異的変異体を作成しアッセイしたところ TGC 耐性を示し、その耐性度は TetX 5 による耐性度と有意差が認められなかった。即ち、TetX は 4 残基を置換することで TetX 5 と同程度の高 TGC 耐性を獲得することが明らかとなった。

1 緒言

チゲサイクリン (TGC) は、テトラサイクリン (TC) 系抗菌薬の一つであるミノサイクリン (MINO) の誘導体であり、グリシルサイクリン系抗菌薬と呼ばれる新たなカテゴリーの抗菌薬である。従来の TC 系抗菌薬は長きにわたり各国で使用されてきたが、耐性菌が広くみとめられるようになり、临床上の必要性から耐性機構 (薬剤排出やリボソームの保護) を回避して機能する TGC が開発された。TGC の作用機序は、既存の TC 系抗菌薬と同様に細菌のリボソーム 30S サブユニットに結合することによるタンパク質合成阻害であるが、TGC の分子構造の特徴であるグリシルアミド基により TC 系抗菌薬とは結合様式が

異なると考えられている (Bauer *et al.*, 2004; Olson *et al.*, 2006; Peterson, 2008; Seputiene *et al.*, 2010)。

TGC は緑膿菌を除くさまざまな病原菌に抗菌活性を示し、EMBL 産生グラム陰性菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE)、多剤耐性アシネトバクター (MDRA) 等の多剤耐性菌に対しても有効とされる临床上重要な抗菌薬の一つである。しかしながら、同薬剤は TetX (388 アミノ酸残基からなるフラビン含有モノオキシゲナーゼ) によって修飾され不活化されることが報告されており (Moore, *et al.*, 2005)、より効率よく TGC を不活化する TetX バリエーションの出現と拡散が懸念される。

TetX は 1988 年に *Bacteriodes fragilis* が有する酸

* 岩手大学教授

素要求性の TC 耐性因子として報告され (Speer & Salyers, 1988), 1991年に遺伝子の塩基配列とタンパク質のアミノ酸配列が報告された (Speer, *et al.*, 1991)。それ以降, TetX は環境試料等から検出されるも, その頻度は他の TC 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), 今日では更に多くの臨床分離株が TetX を保有している可能性がある。医療機関以外の TetX 発現菌の検出頻度については, 例えばアヒル飼育場の調査結果が2018年に報告されており, それによると検査した *Riemerella anatipestifer* のうち80.2%が TetX をコードしていたとのことである (Zhu *et al.*, 2018)。

TetX 発現菌の菌種, 及び菌数が増加するに伴いそれらの中から高 TGC 耐性度を示す TetX バリエーションが出現することは十分に考えられ, すでにそのような状況に移行していると思われる。TetX バリエーションを発現する *R. anatipestifer* CH 3 株は, TGC の MIC が $12 \mu\text{g/mL}$ であることが報告されている (Li *et al.*, 2017)。また, 養鶏場から分離された TetX バリエーションをコードする *Aeromonas caviae* は TGC の MIC が $8 \mu\text{g/mL}$ であったと報告されている (Chen *et al.*, 2019)。さらに近年, プラスミドコードの TetX バリエーションを保持し TGC 耐性を示す分離株が相次いで報告されており, その中には TGC の MIC が $32 \mu\text{g/mL}$, あるいは $64 \mu\text{g/mL}$ という高いレベルの耐性を示す細菌も含まれる (He *et al.*, 2019; Sun *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2019; Zeng *et al.*, 2019)。このような状況から, TGC を効率よく不活化する TetX バリエーションはすでに拡散しつつあると考えるべきかもしれない (ただし現時点ではタンパク質自体の変異による耐性度上昇と, 発現量の上昇等による耐性度上昇とを明確に区分して論じるための情報は多くはない)。

筆者は, TetX とゲノムデータベース KEGG に登録されている TetX バリエーションについて, 同一の培養条件にて大腸菌で発現させた場合の TGC 耐性度を比較し, 次に部位特異的変異体を構築し

てどのアミノ酸の変化が高 TGC 耐性に寄与しているのかを解析したので報告する。

2 材料と方法

2-1 DNA と大腸菌

TetX, TetX バリエーション, 及び TetX の部位特異的変異体をコードする塩基配列を合成し, pUC18 の *Bam*HI-*Sa*II 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を含む塩基配列 (5'-TAACTAACTAACCGAGCCATTGTTATGGGCCATTTTTGA) を配置し, 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 JM109 株を用いた。

2-2 TGC 感受性試験

構築したプラスミドを定法に従って JM109 に導入し, 得られた形質転換体を用いてディスク拡散法にて感受性を試験した。形質転換体を釣菌して生理食塩水に懸濁し (0.5 McFarland), これを綿棒にて Mueller-Hinton 寒天培地 (直径 9 cm) 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°C 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=8)。判定は, メーカーの添付文書に記載の腸内細菌科細菌の基準を適用し, 阻止円の直径が 14mm 以下の場合を耐性, 15-18mm の場合を中間, 19mm 以上の場合を感性, とした。Mueller-Hinton 寒天培地は 1 枚あたり 25mL とした。TGC 感受性試験では寒天培地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), 本試験では Mueller-Hinton 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。

2-3 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 TetX バリエーションの比較

KEGG を検索したところ 4 種の *R.anatipestifer* がコードする 5 種の TetX バリエーションが登録されていた。本項ではそれらを TetX 4, TetX 5, TetX 6, TetX 7, TetX 8 とした (Table 1)。

バリエーションの一部については構成するアミノ酸数が 386 残基と表示されていたが、登録されてい

た塩基配列を確認したところ更に上流に翻訳可能な配列が続いていたため、構成するアミノ酸数を 388 残基と判断した。これらのタンパク質のアミノ酸配列を比較したところ相互に相同性が高いことが示された (Fig.1)。

TetX, 及び TetX バリエーションを発現するプラスミドを構築し、大腸菌 JM109 に導入して TGC 感受性を試験した。その結果、TetX を発現する大腸菌は TGC 感受性と判断され、*R.anatipestifer* に由来するバリエーションを発現する大腸菌はいずれも TGC 耐性と判断された (Table 2)。特に TetX 4, TetX 5, TetX 6, 及び TetX 7 については、大腸菌に高い TGC 耐性を付与することが分かった。なお、これらの 4 種のバリエーションを発現する大腸菌の阻止円サイズには 7.7mm から 7.9mm まで幅があるが、検定の結果、有意差は認められなかった。

Table 1. TetX and its variants.

| Variant | Source | Accession No. |
|---------|--------------------------------|---------------|
| TetX | <i>B.fragilis</i> | AAA27471 |
| TetX4 | <i>R.anatipestifer</i> CH3 | M949_0459 |
| | <i>R.anatipestifer</i> RA-CH-2 | G148_1767 |
| | <i>R.anatipestifer</i> RA-CH-2 | G148_1777 |
| TetX5 | <i>R.anatipestifer</i> RA-CH-1 | B739_0030 |
| TetX6 | <i>R.anatipestifer</i> RA-CH-1 | B739_0035 |
| TetX7 | <i>R.anatipestifer</i> RA-GD | RIA_0365 |
| TetX8 | <i>R.anatipestifer</i> RA-GD | RIA_0369 |

Table 2. TGC sensitivity of the test cells.

| Test cell | Inhibition zone (mm) |
|-----------------|----------------------|
| JM109 (TetX) | 20.7 ± 1.19 |
| JM109 (TetX4) | 7.8 ± 0.11 |
| JM109 (TetX5) | 7.7 ± 0.31 |
| JM109 (TetX6) | 7.7 ± 0.25 |
| JM109 (TetX7) | 7.9 ± 0.36 |
| JM109 (TetX8) | 12.0 ± 0.89 |
| JM109 (TetX113) | 8.0 ± 0.19 |

Results represent the mean ± SD.

3-2 部位特異的変異体の解析

TetX のバリエーションのうち TetX 5 は最も TetX との相同性がみとめられ、388 残基のアミノ酸のうち異なるのは 20 残基である。従って、この 20 残基のいずれかが高 TGC 耐性に関与している可能性がある。そこで、TetX 5 をベースに、これらのアミノ酸を 1 残基ずつ TetX タイプに置換した部位



Fig.1. Alignment of TetX variants. Amino acids conserved in the proteins are indicated by asterisks.

特異的変異体を発現するプラスミド（計20種類）を構築し、大腸菌 JM109に導入して TGC 感受性を試験した。その結果、4種類の部位特異的変異体（E94K 変異体, A217S 変異体, K266E 変異体, 及び S282L 変異体）については、そのどれを発現する大腸菌も TetX 5 発現菌より阻止円のサイズが有意に大きくなることが分かり ($p < 0.05$, $n = 8$), TetX 5 におけるこれら4残基 (E⁹⁴, A²¹⁷, K²⁶⁶, 及び S²⁸²) が高 TGC 耐性に関与していると考えられた (data not shown)。

次に、TetX をベースに4残基 (K⁹⁴, S²¹⁷, E²⁶⁶, 及び L²⁸²) を TetX 5 タイプ (E⁹⁴, A²¹⁷, K²⁶⁶, 及び S²⁸²) に置換した部位特異的変異体 (TetX113) を発現するプラスミドを構築し試験した。その結果、TetX113発現菌が形成する阻止円のサイズと TetX 5 発現菌が形成する阻止円のサイズには有意差がなく ($n = 8$), これらの試験菌の TGC 耐性が同程度であることが示された。

4 結言

本研究により、TetX は構成する388残基のアミノ酸のうち4残基を置換することで TetX 5 のような高 TGC 耐性となることが初めて示された。今後は、酵素活性の変化を明らかにするために、それぞれのタンパク質を精製し、比活性や Km 値を測定する等の生化学的解析が必要である。また、耐性度上昇の機構を明らかにするために、X線結晶構造解析等によるタンパク質の立体構造の解析が必要である。

謝辞

本稿に記載した実験の一部は、岩手大学技術部の熊谷聡子氏、田沼萌氏、吹上菜穂氏、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

Bauer,G., *et al.* (2004) *J.Antimicrob Chemother.*, 53, 592-599.

Bradford,P.A., *et al.* (2005) *Antimicrob.Agents*

Chemother., 49, 3903-3909.

Chen,C. *et al.* (2019) *J. Antimicrob. Chemother.*, dkz387.

He,T. *et al.* (2019) *Nature Microbiol.*, 4, 1450-1456.

Leski,T.A., *et al.* (2013) *Int. J. Antimicrob. Agents*, 42, 83-86.

Li,T., *et al.* (2017) *Oncotarget*, 8, 96615-96626.

Moore,I.F., *et al.* (2005) *Biochem.*, 44, 11829-11835.

Olson,M.W., *et al.* (2006) *Antimicrob.Agents Chemother.*, 50, 2156-2166.

Peterson,L.R. (2008) *Int.J.Antimicrob.Agents*, 32, S215-S222.

Seputiene,V., *et al.* (2010) *Medicina (Kaunas)*, 46, 240-248.

Speer,B.S. & Salyers,A.A. (1988) *J. Bacteriol.*, 170, 1423-1429.

Speer,B.S., *et al.* (1991) *J. Bacteriol*, 173, 176-183.

Sun,J. *et al.* (2019) *Nature Microbiol.*, 4, 1457-1464.

Wang,L. *et al.* (2019) *Antimicrob. Agents Chemother.*, 64, e01326-19.

Zeng,Y. *et al.* (2019) *J. Antimicrob. Chemother.*, dkz489.

Zhu,D-K. *et al.* (2018) *Front. Microbiol.*,9, 585.

Summary

Five variants of TetX were found from the avian pathogen *Riemerella anatipestifer* by database analysis and were named TetX4, TetX5, TetX6, TetX7 and TetX8. Plasmids encoding the genes for TetX variants were constructed and introduced into *Escherichia coli* JM109 cells, and the transformants were subjected to tigeicycline (TGC) sensitivity assays. The disc diffusion assays showed that TetX-expressing cells were sensitive to TGC, but all TetX variant-expressing cells were resistant. Among the variants, TetX5 has the highest homology with TetX. The number of the amino acid residues different between the proteins was 20, speculating that any of these 20 residues was involved in TGC resistance. Twenty site-directed mutants of TetX5 were constructed and subjected to TGC sensitivity assays. The results obtained from the assays suggested that 4 residues in TetX5, E⁹⁴, A²¹⁷, K²⁶⁶ and S²⁸², were important for TGC resistance. The site-directed mutant of TetX, TetX113, in which K⁹⁴, S²¹⁷, E²⁶⁶ and L²⁸² were changed to E⁹⁴, A²¹⁷, K²⁶⁶ and S²⁸², conferred TGC resistance to *E.coli* cells as did TetX5.