

論 文 内 容 要 旨

Identification and characterization of a novel *aac(6')-Iag* associated with the *bla_{IMP-1}*-integron in a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*

(多剤耐性緑膿菌の *bla_{IMP-1}* インテグロンに存在する新規アミノグリコシドアセチルトランスフェラーゼ AAC(6')-Iag の同定と解析)

PLoS ONE, Vol.8 no.8:page e70557, 2013.

主指導教員：松原 昭郎 教授
(統合健康科学部門 腎泌尿器科学)

副指導教員：菅井 基行 教授
(基礎生命科学部門 細菌学)

副指導教員：秀 道広 教授
(統合健康科学部門 皮膚科学)

小林 加直

(医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻)

多剤耐性緑膿菌は、院内感染の重要な原因菌の1つである。中でも近年メタロ-β-ラクタマーゼ産生多剤耐性緑膿菌の分離率が増加しつつある。2006年12月から2008年4月にかけて広島大学病院の同一病棟入院患者4名から多剤耐性緑膿菌が検出された。その4名の患者より分離された緑膿菌9株の染色体DNAを、制限酵素 SpeI で切断後、パルスフィールドゲル電気泳動を行った結果、9株全ての電気泳動パターンが一致した。従って、本事例が単一クローンによる院内感染事例であることが示唆された。この多発感染事例の起因となった株 NK0009 は、*bla*_{IMP-1}陽性で、アミノグリコシド、β-ラクタム、フルオロキノロンなどの各種抗菌薬に耐性であった。

甲田らは、広島県内における多剤耐性緑膿菌の分子疫学研究において、多剤耐性緑膿菌が保有する *bla*_{IMP-1} を含むクラス1インテグロンが6種類 (A~F) あることを報告している。それぞれのインテグロンを検出するプライマーセットを用いてPCR法によるインテグロンマッピングを行った結果、NK0009株は、Aタイプのパターンに類似した新規のクラス1インテグロンを保有していることがわかり、それを *In*124 と名付けた。*In*124 の塩基配列の決定を行い、耐性遺伝子カセットの中に、新規のアミノグリコシドアセチル化酵素遺伝子を見出し、それを *aac*(6')-*Iag* と名付けた。*In*124 には、メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子 *bla*_{IMP-1}、*aac*(6')-*Iag*、各々一部欠失した Δ *bla*_{IMP-1} と Δ *aac*(6')-*Iag* をコードする合計4つの遺伝子カセットを保有していた。しかし、 Δ *bla*_{IMP-1} と Δ *aac*(6')-*Iag* はそれぞれ *bla*_{IMP-1} と *aac*(6')-*Iag* の5'末端の8塩基が欠失しフレームシフトをおこしていた。*aac*(6')-*Iag* は、167個のアミノ酸をコードし、アミノグリコシドアセチル化酵素 AAC(6')-Iz と42%の相同性を示した。

薄層クロマトグラフィー及び、質量分析を用いて、組換え体 AAC(6')-*Iag* による各種アミノグリコシドのアセチル化を確認した。さらに、ESI-MS/MS解析により、アミノグリコシドの6'位のアミノ基 (N-6') がアセチル化される事を、また6'位が第2級アミンのゲンタマイシン C₁ は基質とならない事を明らかにした。

aac(6')-*Iag* 遺伝子を発現させた大腸菌は、アミノグリコシド系抗菌薬のうちゲンタマイシンを除き、アミカシン、アルベカシン、ジベカシン、イセパマイシン、カナマイシン、シソマイシン、トブラマイシンに対する感受性を低下させた。ゲンタマイシンの感受性が低下しなかった理由としては、ゲンタマイシンが3種類の化合物 (C₁, C₂ 及び C_{1a}) であり、そのうちの1種類の化合物、C₁

が、アセチル化されずに活性が残ったためではないかと考えられた。接合伝達実験および *bla*_{IMP-1} と *aac(6′)-Iag* の部分配列をプローブに用いたサザンハイブリダイゼーションの結果、*In124* はプラスミド上にあると考えられた。

AAC(6′)-Iag 酵素の速度論的パラメータを求め評価したところ、すべてのアミノグリコシドで分子活性 (k_{cat}) に大きな差異は存在しなかったが、ミカエリス・メンテン定数 (K_m) は、3.03~209 μ M と幅があり、反応速度定数 (k_{cat}/K_m) が、アミノグリコシドの中で 2 桁差 (160 倍まで変化) を示した。 k_{cat}/K_m を指標とした酵素の代謝能から、アミノグリコシドは 3 群に分類された。 k_{cat}/K_m の低い群は、アミカシンとイセパマイシンで、高い群がシソマイシン、アルベカシン、中間の群がカナマイシンとゲンタマイシンであった。よって、シソマイシンとアルベカシンは効率の良い基質であり、アミカシンとイセパマイシンは効率の悪い基質と考えられた。これまで AAC(6′)-I 群に属するアセチル化酵素はアルベカシン耐性に寄与しない (感受性) と報告されているのに対し、新規に見出した AAC(6′)-Iag はアルベカシンにも低感受性 (耐性) を示した。AAC(6′)-Iag の速度論的解析から、アルベカシンに対し高い代謝能を有する AAC(6′)-Iag の働きが、アルベカシン低感受性の性状をもたらしたものと推測された。

今回、多発感染事例の多剤耐性緑膿菌から見出された新規のクラス 1 インテグロン *In124* 中に新規のアミノグリコシドアセチル化酵素遺伝子 *aac(6′)-Iag* を同定し、その基質特異性について明らかにした。