

論 文 内 容 要 旨

Complete nucleotide sequence of pKOI-34, an
IncL/M plasmid carrying *bla*_{IMP-34} in *Klebsiella*
oxytoca isolated in Japan

(近畿地区で検出された *bla*_{IMP-34} を保有する
プラスミド pKOI-34 の解析)

Antimicrobial Agents and Chemotherapy, in press

主指導教員 末田 泰二郎 教授

(応用生命科学部門 外科学)

副指導教員：茶山 一彰 教授

(応用生命科学部門 消化器・代謝内科学)

副指導教員：村上 義昭 准教授

(応用生命科学部門 外科学)

嶋田 徳光

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

現在、世界中の医療施設ではカルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)が問題となっている。また広島県ではイミペネムには感受性を示すが、メロペネムには耐性を示す腸内細菌科細菌が確認され、イミペネムでは検出できないという意味を込めてステルスタイプ CRE と名付けられた。ステルスタイプを示す原因としてメタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)遺伝子 *bla*_{IMP-6} が関与していることが判明した。その後、近畿地区で分離されたステルスタイプを示す腸内細菌科細菌を調査し新規 MBL である IMP-34 を見出し、それをコードする遺伝子 *bla*_{IMP-34} はプラスミド上に存在することを明らかにした。そこで *bla*_{IMP-34} を保有プラスミド pKOI-34 の塩基配列の決定および解析を目的とした。

2004年から2010年に近畿地区で分離された *bla*_{IMP-34} 保有する *K. oxytoca* 2株 (MS5279・MS5280) , *K. pneumoniae* 3株 (MS5284・MS5285・MS5286) を実験に用いた。各菌株と大腸菌 BL-21 株を接合伝達して得られた transconjugant から得られたプラスミドを用いた。配列決定は MS5279 株由来のプラスミド pKOI-34 を使用し、次世代シーケンサーで得られたドラフト配列を PCR-based gap close 法で連結し、環状プラスミドの全配列を得た。得られた遺伝子配列より Open Reading Frame (ORF)解析後に、各アミノ酸配列に対して Blastp Program を用いた解析を行った。他の4株のプラスミドは pKOI34 の遺伝子配列から 22 種類のプライマーセットを作成した後に PCR scanning 法にて比較解析した。

pKOI-34 は 87,343bp (GC content 53%, 104 ORFs)のプラスミドであった。複製に関する蛋白 RepA のアミノ酸配列より IncL/M プラスミドに属することが判明した。薬剤耐性遺伝子や Mobile element を持たないことから IncL/M プラスミドの祖先と考えられている pEL60 (60,145bp)との比較解析を行った。pKOI-34 は、この pEL60 に類似した基本骨格に 2 個の Mobile elements (8.8kb, 19.5kb)を有した構造であった。

8.8kb の Mobile element はトランスポゼース遺伝子 *tnpA*, *tnpR* と砒素耐性遺伝子群を含む遺伝子群であり、後者の 19.5kb Mobile element はトランスポゾン Tn21 に類似した構造に加え、その両端に挿入配列 IS4321R を含んでいた。トランスポゾン Tn21 はトランスポゼース遺伝子 Tn21 *tnp* と水銀耐性遺伝子群 *mer* より構成され、様々な薬剤耐性遺伝子の伝達に関連する可動性遺伝子群として知られている。この Tn21 に類似した構造に様々な薬剤耐性遺伝子を出し入れするインテグロン構造 (In808) が組みこまれ、それを構成するインテグロンカセットとして *bla*_{IMP34} が存在していた。

他の4株 (MS5280, MS5284, MS5285, MS5286) に対して PCR scanning を行った結果、増幅しなかった部位は塩基配列解析の結果 8.8kb の Mobile element が欠落していたことが判明した。Multi Locus Sequence Typing (MLST) 法による解析では *K. oxytoca* MS5279・MS5280 は ST177 に属し、*K. pneumoniae* MS5284・MS5285・MS5286 は ST334 に属していた。

IncL/M プラスミドは世界中で報告されており、これらは同様の基本骨格を持っていることが分かった。pKOI-34 は接合伝達能を持つ IncL/M プラスミドの新しいメンバーであり、本邦で初の報告となった。