

Citrobacter freundii と *Klebsiella pneumoniae* に見出した メタロ- β -ラクタマーゼ KHM-1 に関する分子遺伝学的研究

森田 耕司*[§] 渡辺 登*

〔Key Words〕カルバペネム耐性腸内細菌科細菌、メタロ- β -ラクタマーゼ、プラスミド

はじめに

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (carbapenem-resistant Enterobacteriaceae, CRE) 感染症は、グラム陰性細菌感染症の治療で最も重要な抗菌薬であるメロペネム (MEPM) などのカルバペネム系薬 (CPs) と広域 β -ラクタム系薬に耐性を示す腸内細菌科細菌による感染症の総称である。CRE は主に易感性宿主や外科手術後の患者、抗菌薬の長期投与患者などに呼吸器感染症、尿路感染症、手術部位感染症、医療器具関連血流感染症、敗血症、髄膜炎などの感染症を起こすことが多く、健康者への感染・発症例も認められる¹⁾。

海外諸国では腸内細菌科細菌の CPs 耐性率が増加傾向にあり、2006 年から 2007 年の米国のサーベイランスでは、デバイス関連感染の症例で分離された *Klebsiella pneumoniae* の CPs 耐性率が 10.4%、*Escherichia coli* の CPs 耐性率が 4% と報告している^{2,3)}。このようなことから、WHO は各国が取り組むべき重要課題の一つとして、「耐性菌サーベイランスの強化」をあげている⁴⁾。そして、平成 26 年 9 月 9 日、わが国では「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律

(感染症法)」の施行規則(省令)が改正され、「カルバペネム耐性腸内細菌科細菌感染症」が五類全数報告感染症に指定された⁵⁾。

CPs 耐性の主たる要因はカルバペネマーゼの産生であり、その代表的な酵素が臨床で使用されるほとんどすべての β -ラクタム系薬を加水分解するメタロ- β -ラクタマーゼ (MBL) である。MBL 産生菌を駆逐する手段として高親和性の酵素阻害剤の開発が望まれるが、臨床的に有効な阻害剤は未だに実用化されていない^{6,7)}。そのため、MBL 産生菌は医療環境から排除されずに世界レベルでの拡散を続けており、これらの耐性菌による医療関連感染の発生・増加が社会的な問題にまで発展している⁸⁻¹⁰⁾。

筆者らは尿路感染症由来の *Citrobacter freundii* KHM243 株にプラスミド性の新規 MBL の存在を見出し、それを KHM-1 (Kyorin Health Sciences MBL 1, EMBL/GenBank/DBJ 登録番号 AB443628)、その遺伝子 *bla*_{KHM-1} をもつプラスミドを pCF243 と命名した¹¹⁾。その後、慢性気道感染症由来の *K. pneumoniae* KPM01 株にも *bla*_{KHM-1} をもつプラスミドの保有を認め、そのプラスミドを pKPM01 と命名した。

*杏林大学保健学部臨床検査技術学科 [§]moritako@ks.kyorin-u.ac.jp

本稿では、KHM-1 の酵素学的解析、pCF243 と pKPM01 の分子遺伝学的解析を中心に進めている研究の概要を紹介する。

I. KHM-1 と他の MBL との系統関係

KHM-1 をコードする *bla*_{KHM-1} のオープンリーディングフレームは 837bp でコードされる蛋白は 241 アミノ酸である。EMBL/GenBank/DDBJ データベースを利用した検索・解析の結果、KHM-1 とその他の主要な MBL のアミノ酸一次配列との一致が、IMP-1 と SIM-1 では 59%、GIM-1 では 50%、SPM-1 では 46%、VIM-1 では 38% であることがわかった。また、これらを含め

た 15 種類の MBL との系統関係は図 1 のデンドログラムの通りで、KHM-1 は国内外で高頻度に検出される *Serratia marcescens* 由来の IMP-1 や *Acinetobacter baumannii* 由来の SIM-1 と同一のクラスターを形成することがわかった¹¹⁾。なお、MBL はアミノ酸一次配列をもとにした分類でクラス B に分類され、その活性中心領域に 2 ヶ所の亜鉛 (Zn) 結合部位 (Zn1 サイト、Zn2 サイト) が存在する^{7,12)}。また、クラス B の酵素は、Zn リガンドのアミノ酸配列 (HXHXD) によってサブクラス B1 から B3 に分類され、デンドログラムで同一のクラスターに位置付けられる KHM-1 と IMP-1 はサブクラス B1 に属する^{7,13)}。

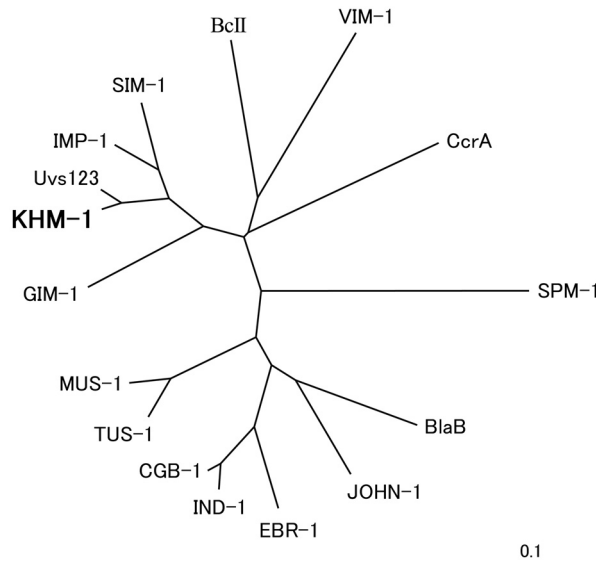


図 1 KHM-1 とさまざまな細菌で見出された他のメタロ-β-ラクタマーゼとの類似性を表すデンドログラム

デンドログラムは ClustalW program により作成した。分枝長は、比較の対象としたメタロ-β-ラクタマーゼ (GenBank 登録番号、由来微生物名)、BcII (P04190、*Bacillus cereus*)、BlaB (CAA65601、*Elizabethkingia meningoseptica*)、CcrA (P25910、*Bacteroides fragilis*)、CGB-1 (AAL55263、*Chryseobacterium gleum*)、EBR-1 (AAN32638、*Empedobacter brevis*)、GIM-1 (CAF05908、*Pseudomonas aeruginosa*)、IMP-1 (AAB30289、*Serratia marcescens*)、IND-1 (AAD20273、*C. indologenes*)、JOHN-1 (AAK38324、*Flavobacterium johnsoniae*)、MUS-1 (AAN63647、*Myroides odoratimimus*)、SIM-1 (AAX76774、*Acinetobacter baumannii*)、SPM-1 (CAD37801、*Pseudomonas aeruginosa*)、TUS-1 (AAN63648、*M. odoratus*)、Uvs123 (AAP70377、uncultured bacterium)、VIM-1 (CAB46686、from *Pseudomonas aeruginosa*) に対する置換アミノ酸の数に相当する。

II. pCF243 上の bla_{KHM-1} のサブクローニング

pCF243 の bla_{KHM-1} を含む EcoR I 切断断片をベクタープラスミド pHSG396 にサブクローニングして pKHM-1 を作成した。さらに、このプラスミドで *E. coli* JM109 の形質転換を行い、KHM-1 を産生するトランスフォーマント *E. coli* JM109TT (pKHM-1) を得た。

III. KHM-1 の酵素学的性状

E. coli JM109TT (pKHM-1) で発現させた KHM-1 を飽和硫酸分画、カラムクロマトグラフィーによって分離・精製し、これを酵素試料として各種 β -ラクタム系薬に対する加水分解活性を測定した。主要な薬剤を基質とした場合の KHM-1 のカイネティックパラメータ、および Laraki らによる *Pseudomonas aeruginosa* 由来の IMP-1 の解析データ¹⁴⁾ をまとめて表 1 に示した。KHM-1 と IMP-1 のモノラクタム剤 (Aztreonam) に対する加水分解活性はいずれも検出限界以下であり、クラス B の酵素特有の性質が認められた。一方、 k_{cat}/K_m 比、 K_m 値、 k_{cat} 値には KHM-1 と IMP-1 との間で相違が認められ、セフェム剤 (Cephaloridine、

Cefotaxime、Ceftazidime)、セファマイシン剤 (Cefoxitin)、オキサセフェム剤 (Latamoxef) に対する KHM-1 の k_{cat}/K_m 比が IMP-1 の k_{cat}/K_m 比の 10~1000 倍高いこと、すなわち、同じサブクラス B1 に属する IMP-1 に比べて、KHM-1 はセフェム剤、セファマイシン剤、オキサセフェム剤に対する加水分解活性が極めて高いことがわかった。このことは、KHM-1 の活性中心の構造が IMP-1 に比べて広がっていることを示唆する。

IV. pCF243 と pKPM01 の伝達性

K. pneumoniae KPM01 株および *C. freundii* KHM243 株が保有するプラスミドをアルカリ-SDS 法で抽出し、アガロースゲル (0.7%) 電気泳動で分離した結果を図 2 に示した。*K. pneumoniae* KPM01 株は 250kb と 200kb、*C. freundii* KHM243 株は 200 kb の大型プラスミドを保有しているが、先に述べたように bla_{KHM-1} は両株が保有する 200kb プラスミド pKPM01、pCF243 上に存在することが明らかになっている。pKPM01 と pCF243 の分子サイズがともに 200kb と等しいことから、当初は両プラスミドが同一のレプリコンであると考えていた。ところが、親株である

表 1 各種 β -ラクタム系薬に対するメタロ- β -ラクタマーゼ KHM-1 と IMP-1 のカイネティックパラメータ

基質 (β -ラクタム系薬)	KHM-1			IMP-1 ^a		
	K_m (μM) ^b	k_{cat} (s^{-1}) ^b	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)
Penicillin G	1,340 \pm 56	23 \pm 0.9	1.7×10^4	520 \pm 30	320 \pm 30	6.2×10^5
Ampicillin	978 \pm 111	19 \pm 2	1.9×10^4	200 \pm 25	950 \pm 50	4.8×10^6
Cephaloridine	4.4 \pm 0.95	686 \pm 12	1.6×10^8	22 \pm 2	53 \pm 2	2.4×10^6
Cefoxitin	81 \pm 4	1,178 \pm 164	1.4×10^7	8 \pm 1	16 \pm 1	2.0×10^6
Cefotaxime	13 \pm 1.5	2,181 \pm 208	1.7×10^8	4 \pm 0.5	1.3 \pm 0.5	3.5×10^5
Ceftazidime	8 \pm 0.4	118 \pm 3	1.5×10^7	44 \pm 3	8 \pm 1	1.8×10^5
Latamoxef	71 \pm 8	2,794 \pm 260	3.9×10^7	10 \pm 2	88 \pm 10	8.8×10^6
Aztoreonam	— ^c	—	—	>1.000	>0.01	< 1.0×10^2
Imipenem	268 \pm 53	5 \pm 3	3.3×10^4	39 \pm 4	46 \pm 3	1.2×10^6
Meropenem	12 \pm 3	0.4 \pm 0.015	5.6×10^4	10 \pm 2	50 \pm 5	1.2×10^5

^a: IMP-1 のカイネティックパラメータは文献¹³⁾ から引用した。

^b: K_m 値と k_{cat} 値は、3 回の独立した実験の測定値平均 \pm 標準偏差として示した。

^c: — は、基質濃度 1mM までと酵素濃度 840nM までの条件下で分解が認められなかったことを意味する。

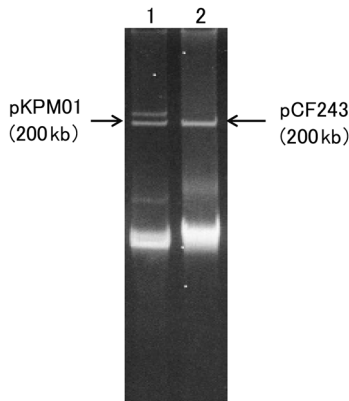


図2 *bla*_{KHM-1}をもつ2種類のRプラスミド
pKPM01は *Klebsiella pneumoniae* KPM01株
(レーン1)、pCF243は *Citrobacter freundii*
HM243株(レーン2)が保有する分子サイズ約
200kbの接合伝達性Rプラスミドであり、
KHM-1遺伝子(*bla*_{KHM-1})をもつ。

K. pneumoniae KPM01株と *C. freundii* KHM243株をドナー、*E. coli* W1895株をレシピエントとしてプロスメイティング法による接合伝達実験を行うと、pKM01の伝達頻度は平均 $3.2 \sim 6.5 \times 10^{-9}$ 、pCF243の伝達頻度は平均 $2.8 \sim 3.9 \times 10^{-7}$ であり、pCF243の伝達頻度がpKM01の100倍高いことが確認された。このことから、pKPM01とpCF243は由来・起源が異なるレプリコンである可能性が考えられた。

V. pCF243とpKPM01のレプリコンタイプ

プラスミドはFIA, FIB, FIC, HI1, HI2, II-I γ , L/M, N, P, W, T, A/C, K, B/O, X, Y, F, FIIAの不和合性群(レプリコンタイプ)に分類され、PCRによる型別が可能である¹⁵⁾。接合伝達頻度の相違から、pCF243とpKPM01は異なるレプリコンであることが示唆されたため、inc/rep PCRによるレプリコンタイプング(不和合性群別)¹⁵⁾を行った。

その結果、異なることが予想されたpCF243とpKPM01のレプリコンタイプは、ともに *P. aeruginosa*由来のプラスミドで見出されたinc A/Cに一致することがわかった。

VI. pCF243とpKPM01の構造

同一レプリコンタイプであることが確認されたpCF243とpKPM01の構造を比較するために、以下の方法でプラスミドの制限酵素切断分析を行った。すなわち、培養菌のクリアードライゼートを調整し、エチジウムブロマイド-塩化セシウム密度勾配平衡遠心によって分離・精製したプラスミドを制限酵素 *Dra* Iおよび *Hinc* IIで切断し、アガロースゲル(1.5%)電気泳動を行って制限酵素切断パターンを比較した。その結果pCF243とpKPM01の構造は同一ではなく、同一の領域と構造の異なる領域の存在が示唆された(図3)。このことから、先に示したpCF243とpKM01の伝達頻度の差は、「両プラスミドの構造の異なる領域に、それぞれ由来の異なる伝達関連遺伝子群(*tra* オペロン)が存在していることによる」と考えられるが、現段階では類推の域を脱し得ない。伝達頻度にかかわる要因を明確にするためには、当該領域の塩基配列分析や *tra* オペロンの機能解析が必要である。

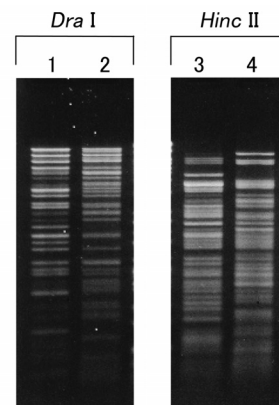


図3 プラスミドpCF243、pKPM01の制限酵素切断パターン

レーン1と2は *Dra* I、レーン3と4は *Hinc* IIで切断した精製プラスミドをアガロースゲル電気泳動で分離したものである。レーン1と3はpCF243、レーン2と4はpKPM01、の切断パターンである。

プラスミドには外来性のトランスポゾン (Tn) やインサーションシーケンス (IS) が複数の領域に挿入されている例や、欠失領域に大きな DNA 分子が挿入される例があり、筆者らも、散发性下痢症患者から分離された志賀毒素産生大腸菌 O26:H11 株に、「レプリコンタイプ incF プラスミド NR1 の約 3 分の 1 の領域が、耐性遺伝子を含む外来性 DNA に置き換わったキメラプラスミド」の保有を見出した経験がある^{16,17)}。レプリコンタイプ inc A/C のプラスミド pCF243 と pKPM01 における部分的な構造の相違も、同様の現象によって生じた可能性がある。

VII. 国内、海外における *bla*_{KHM-1} 保有菌の検出状況

筆者らが KHM-1 産生菌の存在を報告して以降、東京都内 4 ヶ所の医療機関で腸内細菌科主要菌種を対象とした *bla*_{KHM-1} の検出を試みているが、現在までに保有菌は検出されていない。海外においても、腸内細菌科細菌からは未だに *bla*_{KHM-1} が検出されていないようであるが、*P. aeruginosa* では *bla*_{KHM-1} の保有株が散見され始めている¹⁸⁾。

先に示したように、pCF243 と pKPM01 のレプリコンタイプは *P. aeruginosa* 由来のプラスミドで見出された inc A/C である。また、プラスミドの宿主域には、その由来・レプリコンタイプによって制限がかかる場合があることから、医療環境では「*P. aeruginosa* 菌株間における *bla*_{KHM-1} の伝達は起こり易く、腸内細菌科菌種間における *bla*_{KHM-1} の伝達は起こり難い」と考えて良いのかもしれない。

VIII. 研究における課題と展望

薬剤耐性が細菌に伝達する現象が明らかにされたのは今から 55 年前、R 因子 (R プラスミド) の接合伝達現象が明らかにされたのは 49 年前のことである^{19,20)}。以来、特定のプラスミドに関して伝達に必要な遺伝子群の同定や分子メカニズムの解明、遺伝子組換え用ベクターの開発など、さまざまな研究が行われてきた。しかし、接合伝達の促進・抑制因子、プラスミドの宿主域・伝達効率

の決定因子などに関しては未だ不明な点が多く、プラスミドの伝達開始に関与するシグナルや、受容菌の存在を認識する機構といった接合伝達の根本にかかわる機序を理解するために必要な知見はほとんど得られていないのが現状である。今後は、プラスミドが有する支配因子の解析とともに、宿主側の受容菌因子と接合伝達制御機構、環境因子が伝達に与える影響などを視野に入れた研究にも取り組んでいきたい。

文 献

- 1) CDC. Action needed now to halt spread of deadly bacteria. CDC internet publication on March 5th 2013 at <http://www.cdc.gov/media/releases/2013/p0305deadlybacteria.html> (Accessed June 2015).
- 2) Hidron AI, Edwards JR, Patel J, Horan TC, Sievert DM, Pollock DA, et al. NHSN annual update: antimicrobial-resistant pathogens associated with health-care-associated infections: annual summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2006-2007. *Infect Control Hosp Epidemiol* 2008; 29: 996-1011.
- 3) Jacob JT, Klein E, Laxminarayan R, Beldavs Z, Lynfield R, Kallen AJ, et al. Vital Signs: carbapenem-resistant Enterobacteriaceae. *MMWR* 2013; 62: 165-70.
- 4) WHO. Antimicrobial resistance: global report on surveillance 2014. <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillance-report/en/> (Accessed June 2015).
- 5) 厚生労働省健康局結核感染症課長：感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律第 12 条第 1 項及び第 14 条第 2 項に基づく届出の基準等について(一部改正)。健感発 0909 第 2 号。平成 26 年 9 月 9 日。
- 6) Queenan AM, Bush K. Carbapenemases: the versatile β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2007; 20: 440-58.
- 7) Bush K, Jacoby GA. Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 969-76.
- 8) Yong D, Toleman MA, Giske CG, Cho HS, Sundman K, Lee K, et al. Characterization of a new metallo- β -

- lactamase gene, *bla*_{NDM-1}, and a novel erythromycin esterase gene carried on a unique genetic structure in *Klebsiella pneumoniae* sequence type 14 from India. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53: 5046-54.
- 9) Limbago B, Kallen A. Detection of *Enterobacteriaceae* isolates carrying metallo- β -lactamase – United States, 2010. *MMWR* 2010; 59: 750.
 - 10) Deshpande P, Rodrigues C, Shetty A, Kapadua F, Hedge A, Soman R. New Delhi Metallo- β -lactamase (NDM-1) in *Enterobacteriaceae*: treatment options with carbapenems compromised. *J Assoc Pyhsic India* 2010; 58: 147-9.
 - 11) Sekiguchi J, Morita K, Kitao T, Watanabe N, Okazaki M, Miyoshi-Akiyama, et al. KHM-1, a novel plasmid-mediated metallo- β -lactamase from *Citrobacter freundii* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 4194-97.
 - 12) Ambler RP. The structure of β -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond* 1980; B289: 321-31.
 - 13) Jeon JH, Lee JH, Lee JJ, Park KS, Karim AM, Lee C-R, et al. Structural basis for carbapenem-hydrolysing mechanisms of carbapenemases conferring antibiotic resistance. *Int J MolSci* 2015; 16: 9654-92.
 - 14) Laraki N, Franceschini N, Rossolini GM, Santucci P, Meunier C, de Pauw E, et al. Biochemical characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* 101/1477 metallo- β -lactamase IMP-1 produced by *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 902-6.
 - 15) Carattoli A, Bertini A, Villa L, Falbo V, Hopkins KL, Threlfall EJ. Identification of plasmids by PCR-based replicon typing. *J Microbiol Methods* 2005; 63: 219-28.
 - 16) 森田耕司, 渡辺 登, 岩崎友美, 金森政人, 関口純一郎, 切替照雄, その他. 志賀毒素産生大腸菌 O26:H11 株に保有を認めた第三世代セフェム, ホスホマイシン耐性プラスミド pSTEC3060 の構造について(抄). 第 10 回腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム抄録集. 東京: 腸管出血性大腸菌感染症シンポジウム事務局 2006 : 28.
 - 17) 森田耕司, 渡辺 登, 金森政人, 近真理奈, 倉園貴至, 山口正則, その他. 志賀毒素産生大腸菌 O26:H11 株が保有する高頻度伝達性プラスミドに認めた新規ホスホマイシン耐性遺伝子(抄). 第 81 回日本感染症学会総会抄録集. 京都: 第 81 回日本感染症学会総会事務局 2007 : 82.
 - 18) PostamPour S, Gorzin AA, MotamediGh. Frequency of *bla*_{KHM-1}, *bla*_{IMP1, 2}, and *bla*_{SPM-1} genes in clinical isolates of metallo- β -lactamase producing *Pseudomonas aeruginosa* in hospitalized burned patients in Ghotbeddin Shirazi Hospital. *J Qazvin Univ MedSci (JQUMS)* 2015; 19: 21-9.
 - 19) Nakaya R, Nakamura A, Murata U. Resistance transfer agents in *Shigella*. *Biochem Biophys Res Commun* 1960; 3: 654-59.
 - 20) Rownd R, Nakaya R, Nakamura A. Molecular nature of the drug-resistance factors of *Enterobacteriaceae*. *J Mol Biol* 1966; 17: 376-93.