

研究ノート

大腸菌におけるゲノム重複を介した多剤耐性化

本山 志織, ワナシリ・ワナラット, 稲岡 隆史*

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所
〒305-8642 茨城県つくば市観音台2-1-12**Multidrug tolerance mediated by genomic segmental amplification
in *Escherichia coli***

Shiori Motoyama, Wannasiri Wannarat, Takashi Inaoka*

National Food Research Institute, NARO, 2-1-12 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki, 305-8642, Japan

Abstract

A multidrug efflux pump, AcrAB-TolC, contributes to multiple antibiotic resistance (Mar) phenotype in *Escherichia coli*. In this study, we investigated multidrug tolerance mediated by genomic segmental duplication of *acrAB* locus in *E. coli*. In a strain K-12 W3110, 3.8% (8 of 208) of ampicillin-resistant colonies carried the multiplied copy of *acrA* gene, thereby exhibiting multidrug-resistance phenotype. In contrast, in a strain O157:H7 MY-29, we could not isolate such mutant. All isolated Mar strains were found to carry the same 416 kb-genomic amplicon. Sequencing analysis showed that the amplified regions were bordered by insertion sequence (IS), IS5. These results suggest that *E. coli* gene amplification occurs largely between directly oriented homologous IS elements. Thus, our results suggest that the genomic amplification-mediated Mar phenotype depends on the genetic background.

Keywords: genomic amplification, multidrug tolerance, *Escherichia coli***緒言**

多剤排出ポンプは化学構造の異なる多種多様な薬剤を細胞外へと排出するトランスポーターであり, 多剤耐性を引き起こす要因の一つである¹⁾²⁾. AcrAB-TolC システムは大腸菌において最も良く研究された多剤

排出ポンプであり, 多剤耐性大腸菌の多くは AcrAB-TolC を過剰生産していることが知られている³⁾.

AcrAB-TolC システムは3つのタンパク質によって構成されている. AcrB は内膜に局在する基質認識部位であり⁴⁾, TolC は外膜チャネルとして機能している⁵⁾. ペリプラズムに存在する AcrA は AcrB タンパク質と複合体を形成し, AcrB と TolC チャネルを連結す

* 連絡先 (Corresponding author), tina2672@affrc.go.jp

る役割を担っている。TolCは他の排出ポンプの外膜チャネルとしても機能しており、必要に応じてAcrAB複合体と結合すると考えられている⁶⁾。これら3つのタンパク質は*acrAB*と*tolC-ygiAB*という2つの異なるオペロンにコードされており、これら遺伝子の発現はMarAやSoxS、Rob等の転写因子により制御されている⁷⁾⁸⁾。これまでに同定された大腸菌の多剤耐性変異の多くは、*acrAB*や*tolC-ygiAB*の発現を増大させるものである。

細菌が薬剤耐性を獲得する遺伝的要因には、突然変異のほか、耐性遺伝子を含むゲノム領域の多コピー化(ゲノム重複)がある。このゲノム重複は、最初の2コピー化ステップとその後の多コピー化ステップの2段階のステップによって進行すると考えられている⁹⁾。最初の2コピー化ステップはRecAに依存した相同組換え又はRecAに依存しない非相同組換えのいずれかによって進行するが、多コピー化ステップでは2コピー化ステップにより生じた相同配列間でRecAに依存した相同組換えにより進行すると考えられている。このようなゲノム重複を介した薬剤耐性化においては、環境中の選択圧により生存に適したコピー数の耐性遺伝子を有する細胞が選抜されるため、ゲノム中の遺伝子コピー数は環境変化に応じて増減することになる。

細菌の薬剤耐性変異に関する膨大な研究例と比較して、ゲノム重複を介した薬剤耐性に関する研究は少なく、その知見は極めて乏しい。そこで我々は、ゲノム重複を介した細菌の薬剤耐性機構について調査してきた。その結果、グラム陽性菌の枯草菌では、2コピー化ステップのほとんどが非相同組換えによりランダムに起こるのに対し、グラム陰性菌のサルモネラ菌においては2コピー化ステップのほとんどが挿入配列(IS)間での相同組換えにより起こることが判明した¹⁰⁾¹¹⁾。大腸菌においては、これまでに報告されているゲノム重複の多くが相同なISで挟まれた領域で起こっていることから、サルモネラ菌と同様に最初の2コピー化ステップのほとんどが相同組換えにより起こると考えられる。大腸菌K-12 W3110株ゲノムでは、*acrAB*領域に多数のISが存在しており、*acrAB*領域がゲノム重複により多コピー化し易い可能性がある。一方、O157:H7 Sakai株ゲノムでは、*acrAB*領域にISはわずかしか存在せず、W3110株と比較して*acrAB*領域のゲノム重複頻度は低いと予想できる。本研究では、W3110株および毒素非生産性O157:H7 MY-29株を用いて、大腸菌における*acrAB*領域のゲノム重複を介した多剤耐性獲得について検討を行なった。

実験材料および方法

1. 使用菌株

大腸菌K-12 W3110株および毒素非生産性O157:H7 MY-29株を用いた。

アンピシリン耐性株は、薬剤を含まないLB液体培地で3-4時間培養後、適当な濃度のアンピシリンを含むLB寒天培地上に適量塗布することによって取得した。出現した耐性菌は同じ濃度のアンピシリンを含むLB寒天培地上に継代培養した。

2. 抗生物質耐性度の測定

大腸菌*acrAB*重複株を様々な濃度の抗生物質を含むLB寒天培地上に塗布し、抗生物質を含まない培地での生育と比較して増殖阻害が起こる最低濃度を最小発育阻止濃度(MIC)とした。抗生物質にはアンピシリンのほかクロラムフェニコール、テトラサイクリン、エリスロマイシン、カナマイシン、ノボビオシン、セフトキサシム、およびリファンピシンを用いた。

3. ゲノムDNA調製

ゲノムDNAの調製には、実験に応じて2通りの調製法を用いた。コロニーから直接ゲノムDNAを調製する場合には、ゲノムDNA調製試薬インスタジーン(バイオラッド社)を用いて調製した。培養液からゲノムDNAを調製する場合には、スクリーニングに使用した濃度のアンピシリンを含むLB培地で一晚培養した培養液を遠心し、上清を除去後、一般的なゲノムDNA調製法であるフェノール/クロロホルム抽出法により調製した。

4. 定量PCRによるコピー数定量

遺伝子コピー数の定量にはアプライド・バイオシステムズ社のリアルタイムPCR装置7300を使用した。PCR反応は、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix(東洋紡)を使用し、20 μL反応液に各プライマーを終濃度300 nMになるよう添加して行なった。コントロール遺伝子としてリボソームタンパク質S10をコードする*rpsJ*遺伝子を用いた。使用したプライマーは表1に示した。

結果

1. *acrAB* 遺伝子領域のコピー数変動

大腸菌K-12 W3110株のアンピシリンに対するMIC

表 1. 本研究で使用したプライマー

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
<i>acrA</i>	AGCGGTCGCATTGGTAAG	TTTCAGGCGCAGGAAGTC
<i>ampC</i>	CGCCTCTTGCTCCACATT	GTGTGACGGGCTGCTTTT
<i>ampG</i>	GGTGAAGTAGGCGTGGTT	TCGACAGCAGCCAGTAAC
<i>argF</i>	AGTTCCTGCACTGTCTGC	CGACTCAAACACCTCGTC
<i>cysS</i>	GGGATGGTGATGGTTGAC	GCCTGCTTCAGGTTCTCT
<i>glfI</i>	GTGGGTTACTCGCAGGAT	CGACGTTGTTGGTGGTAG
<i>lnt</i>	CGATAATGGGCGTGAAG	TCTCCGGTTGTGGGGTAA
<i>mmuP</i>	GCTGGGTTTCAGCTTTAC	ACCAGCGAGAACCAGAAC
<i>ompT</i>	GAGGCCGAAAAGTCAGTC	CATCCAGTCTGATCGAC
<i>ribD</i>	CCACATGCCGAAGTACAC	CTGCGGGTTAGGATCTTG
<i>rpsJ</i>	TCCGTATCCGCTGAAAAG	CGCGTCTTTGTTGACGTG
<i>sbcC</i>	CGACACGTCAGCAAGAAG	GCTGCTGGCTGTGTAATG
<i>tauA</i>	AGACGGCAAGGTGTTGAC	CTGTTTCAGCCACACGTC
<i>yahD</i>	CAACCATGTAGGCTGGAC	CCTGCGGCAATCAGTAAC
<i>ybbJ</i>	GAGTGCAAGGGTAATG	GTTGACCAGCGGAGATTCT
<i>ybdM</i>	GACCTGTCTGGAAGGTACG	CTGTCCATCCCAGCTCT
<i>ykfC</i>	AAGGCACAAAGCACAGG	CACTCGCATCTCGCCATA

は 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり, 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアンピシリンを含む LB 培地上では耐性株が約 10^{-6} – 10^{-5} の頻度で出現する. 大腸菌は β -ラクタマーゼおよび多剤排出システム AcrAB-TolC を有しており, これら遺伝子のいずれかの重複はアンピシリン耐性を付与すると考えられる. そこで大腸菌 W3110 株を用いてアンピシリン 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を含む LB 培地上で耐性株を選抜し, β -ラクタマーゼをコードする *ampC* 遺伝子および *acrA* 遺伝子コピー数を定量した. アンピシリン感受性の野生株 36 株を用いた対照実験では *acrA* 遺伝子のコピー数は 0.95 ± 0.1 , *ampC* 遺伝子のコピー数は 1.0 ± 0.10 であった. また, それらの分布は, *acrA* 遺伝子が 0.77–1.2, *ampC* 遺伝子が 0.89–1.2 の範囲内であった (図 1, 白棒グラフ). これに対して, 調査したアンピシリン耐性株 94 株中 *acrA* 遺伝子では 27 株 (31%), *ampC* 遺伝子では 4 株 (4.3%) においてコピー数が 1.5 以上となっていた (図 1, 黒棒グラフ). これらの結果は, アンピシリン耐性株において, *acrA* 遺伝子領域のコピー数が *ampC* 遺伝子領域よりも変動し易いことを示唆している. 多剤排出システム AcrAB-TolC の増加は, 他の抗生物質や界面活性剤, 有機溶剤等の抵抗性を増大させる為, アンピシリンによる選択圧は大腸菌の多剤耐性化の要因と成り得る.

2. *acrAB* 遺伝子重複株の分離

大腸菌 K-12 W3110 株を新たにアンピシリン 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$

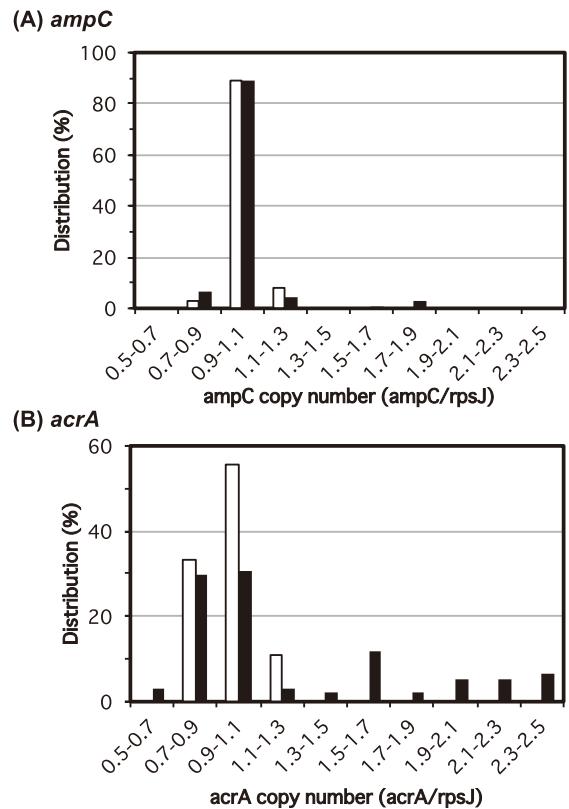


図 1. アンピシリン耐性株における *ampC* および *acrA* 遺伝子コピー数の変動

アンピシリン耐性株の *ampC* (A) および *acrA* (B) 遺伝子のコピー数の分布 (黒色棒グラフ). 白色棒グラフは野生株におけるそれぞれのコピー数の分布を示す.

を含むLB培地上に塗布し、合計208株のアンピシリン耐性株を取得した。一方、毒素非生産性大腸菌O157:H7 MY-29はアンピシリンに対する感受性がW3110株よりわずかに高く、3 µg/mLのアンピシリンを含む培地上でアンピシリン耐性株を選抜可能である。そこで、大腸菌O157:H7 MY-29株からも合計205株のアンピシリン耐性株を取得した。得られた耐性株の *acrA* 遺伝子のコピー数を定量したところ、W3110株由来のアンピシリン耐性株208株のうち8株(3.8%)において *acrA* 遺伝子コピー数が2.0-2.5コピーとなっていた。しかしながら、O157:H7 MY-29株由来のアンピシリン耐性株205株の中には、*acrA* 遺伝子重複株は含まれていなかった。そこで、W3110株由来の *acrAB* 重複株8株 (No. 5, 21, 39, 47, 48, 51, 54, 58) について、さらなる解析を行なった。

3. *acrAB* 重複領域の同定

得られた8株の遺伝子重複領域を同定するため、*acrAB* 遺伝子領域の周辺遺伝子のコピー数を定量した(図2)。その結果、8株全てにおいて重複領域の両末端にIS5が存在しており、396遺伝子を含む約416kbの領域が重複していることが判明した。また、この重

複領域の左側末端部分では、中心部分よりもコピー数が高くなる傾向があった(図2)。これについては、原因は明らかではないが、この領域には4つのIS1が同方向に並んでおり、末端部分でさらなる遺伝子重複を起こしている可能性も考えられる。これらの結果から、大腸菌における遺伝子重複の2コピー化ステップの多くは、サルモネラ菌と同様にIS等の相同配列を介して生じると考えられる。枯草菌においては、非同組換えが主要な2コピー化ステップであり、ゲノム重複がランダムに生じるのに対し、大腸菌やサルモネラ菌においては、ゲノム重複の多くが相同配列で挟まれた特定の領域で生じやすくなっているものと推察できる。すなわち、大腸菌やサルモネラ菌においては、ゲノム重複を介した薬剤耐性株の出現頻度がゲノム構造に大きく依存していると考えられる。

4. *acrAB* 重複株の抗生物質耐性

8株の *acrAB* 重複株の抗生物質耐性を調べた結果、アンピシリンの他、クロラムフェニコールやテトラサイクリン、エリスロマイシン、セフトキシム、リファンピシンに対する抵抗性が増大し、多剤耐性を獲得していた(表2)。興味深いことに、得られた

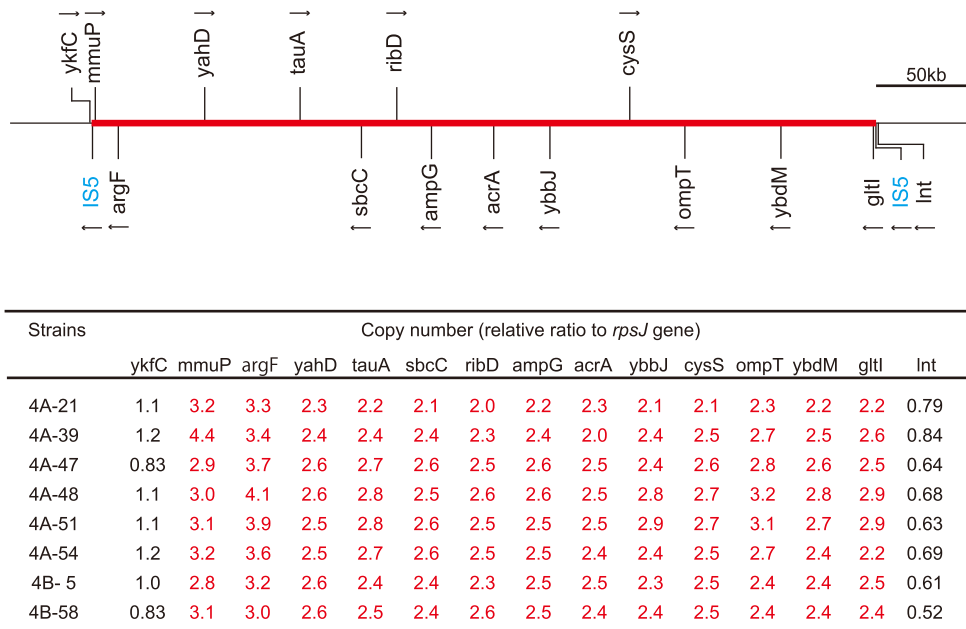


図2. *acrA* 遺伝子重複株の重複領域の同定

上段は *acrA* 遺伝子周辺の大腸菌W3110株ゲノムを表す。ゲノム重複を起こした領域を赤線、重複領域末端の挿入配列(IS5)は青字で示した。矢印は遺伝子の方向を表す。下段の表は、*acrA* 遺伝子重複株における *acrA* 遺伝子周辺の各遺伝子コピー数。赤字は、コピー数が2以上のものを示す。

acrAB 遺伝子重複株の重複領域は同一であるにもかかわらず、薬剤感受性はそれぞれわずかに異なることがわかった。例えば、カナマイシンに対してはNo.39だけが耐性を示し、ノボピオシンに対しては8株中6株で感受性が高くなっていた。これらの原因については不明であるが、ゲノム中に突然変異等が生じている可能性もある。

考 察

本研究では、アンピシリンによる選択圧により大腸菌が *acrAB* 領域のゲノム重複を介して多剤耐性化し得ることを明らかにした。大腸菌 K-12 W3110株および O157:H7 MY-29株を用いて、*acrAB* 遺伝子重複による多剤耐性化頻度を比較した結果、W3110株では208株中8株 (3.8%) において *acrAB* 遺伝子重複が生じていたが、O157:H7 MY-29株では分離した205株中に *acrAB* 遺伝子重複を見出すことはできなかった。この結果は、大腸菌の遺伝子重複がIS等の相同配列に大きく依存しており、ゲノム構造によって遺伝子重複の出現頻度が異なることを示唆するものである。

図3に示すように、大腸菌 K-12 W3110株のゲノムでは *acrAB* 領域に20個のISが存在している。これらISのうち、IS間での相同組換えを介したゲノム重複により *acrAB* のコピー数を増加させ得る組み合わせは3通り存在し、予想されるアンプリコンの大きさは252 kb (アンプリコン1) および302 kb (アンプリコン2)、416 kb (アンプリコン3) である (図3A)。本研究で取得した *acrAB* 遺伝子重複株は全てアンプリコン3

が2~3コピーに重複したものであったが、Nicoloffらは大腸菌 K-12株由来の多剤耐性株においてアンプリコン1を2コピー有する株を分離し、報告している¹²⁾。また、彼らは *acrAB* 近傍にある *lon* 遺伝子にトランスポゾンの標的配列が存在しており、*lon* 遺伝子内に新たにISが挿入された後、*lon::IS*とIS186間 (約149 kb) でゲノム重複を引き起こした株についても報告している¹³⁾。我々の実験では、*lon* 遺伝子内に新たにISが挿入された株を見出すことはできなかったが、IS挿入を介した遺伝子重複頻度は、既存のIS間で起こる遺伝子重複の頻度と比較して低いものと考えられる。

一方、O157:H7 Sakaiのゲノムでは、*acrAB* 領域には5個しかISが存在しておらず、ゲノム重複により *acrAB* のコピー数を増加させ得る組み合わせは543 kbのアンプリコン1のみである (図3B)。今回使用したMY-29株のゲノム配列は不明であるが、Sakai株と類似していると考えられることから、ゲノム構造の違いが *acrAB* 遺伝子重複株の出現頻度に影響しているものと推察できる。

大腸菌 O157:H7 Sakai株はゲノム中の異なる位置に2つの毒素遺伝子 (*stx1* および *stx2*) を有している。これら毒素遺伝子の周辺では *acrAB* 領域とは異なり、多くのISが存在していることから、O157:H7 Sakai株においては、*acrAB* 領域よりも毒素遺伝子周辺領域が遺伝子重複を起こしやすい可能性がある。毒素遺伝子の多コピー化と食中毒との関連は不明ではあるが、今後検討する必要があるだろう。

表2. 大腸菌 W3110由来 *acrA* 重複株の抗生物質感受性

Strain	<i>acrA</i> copy number	MIC (μg/mL)							
		AMP	CP	TC	EM	KM	NV	CTX	RIF
W3110	1	2	4	1.5	60	1	200	<0.03	10
5	2.5	4	10	2	80	1	125	0.03	17
21	2.3	4	10	2	70	1	200	0.05	18
39	2	4	10	2	70	3	150	0.05	20
47	2.5	4	10	2	70	1	125	0.03	19
48	2.5	4	10	2	70	1	125	0.03	20
51	2.5	4	10	2	70	1	150	0.03	18
54	2.4	4	10	2	70	1	200	0.03	20
58	2.4	4	10	2	80	1	125	0.05	18

AMP: アンピシリン, CP: クロラムフェニコール, TC: テトラサイクリン, EM: エリスロマイシン, KM: カナマイシン, NV: ノボピオシン, CTX: セフトキシム, RIF: リファンピシン

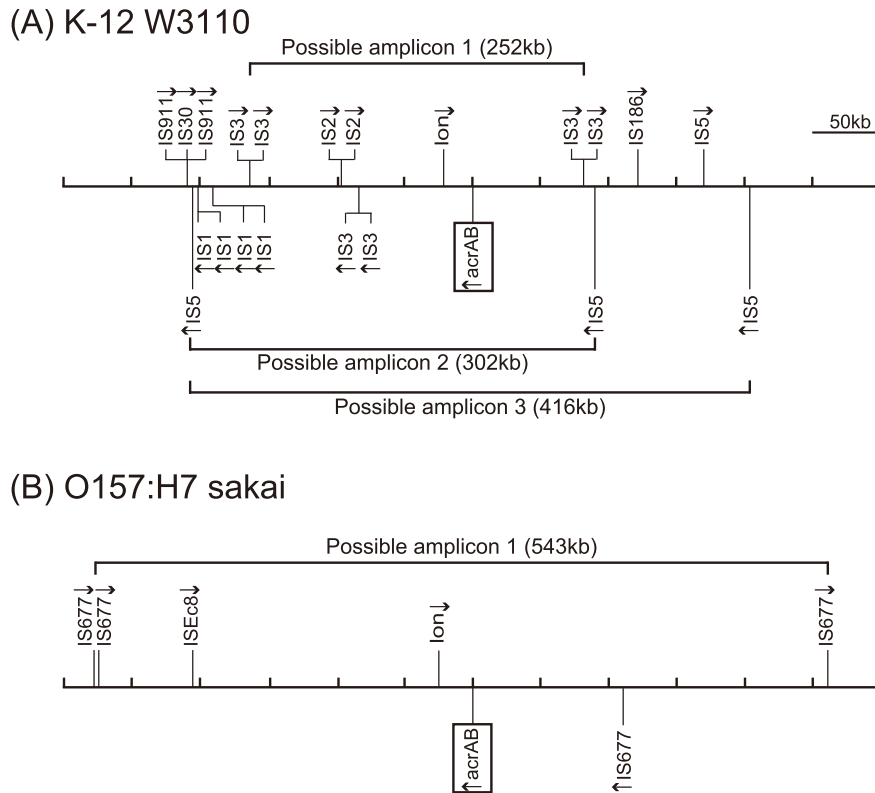


図3. *acrAB*領域の比較と予想される重複領域

大腸菌K-12 W3110 (A) 及びO157:H7 Sakai (B) における*acrAB*領域のISと予想される重複領域. 矢印は遺伝子の方向を表す.

参考文献

- 1) Nikaido, H. Antibiotic resistance caused by Gram-negative multidrug efflux pumps. *Clin Inf Dis* **27**, S32-41 (1998)
- 2) Li, X. Z., Plésiat, P., and Nikaido, H. The challenge of efflux-mediated antibiotic resistance in Gram-negative bacteria. *Clin Microbiol Rev* **28**, 337-418 (2015)
- 3) Okusu, H., Ma, D., and Nikaido, H. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (Mar) mutants. *J Bacteriol* **178**, 306-308 (1996)
- 4) Murakami, S., Nakashima, R., Yamashita, E. and Yamaguchi, A. Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* **419**, 587-593 (2002)
- 5) Koronakis, V., Eswaran, J., and Hughes, C. Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu Rev Biochem* **73**, 467-489 (2004)
- 6) Touzé, T., Eswaran, J., Bokma, E., Koronakis, E., Hughes, C. and Koronakis, V. Interaction underlying assembly of the *Escherichia coli* AcrAB-TolC multidrug efflux system. *Mol Microbiol* **53**, 697-706 (2004)
- 7) Martin, R. G., Gillette, W. K. Rhee, S. and Rosner, J. L. Structural requirements for mar box function in transcriptional activation of *mar/sox/rob* regulon promoters in *Escherichia coli*: sequence, orientation and spatial relationship to the core promoter. *Mol Microbiol* **34**, 431-441 (1999)
- 8) White, D. G., Goldman, J. D. Demple, B. and Levy, S. B. Role of the *acrB* locus in organic solvent tolerance mediated by expression of *marA*, *soxS*, or *robA* in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**, 6122-6126 (1997)
- 9) Sandegren, L., and Andersson, D. I., Bacterial gene amplification: implications for the evolution of antibiotic resistance, *Nat. Rev. Microbiol.* **7**(8), 578-588 (2009)

- 10) Wannarat, W., Motoyama, S., Masuda, K., Kawamura, F. and Inaoka, T. Tetracycline tolerance mediated by gene amplification in *Bacillus subtilis*. *Microbiol* **160**, 2474-2480 (2014)
- 11) Lee, K., Kusumoto, M., Sekizuka, T., Kuroda, M., Uchida, I., Iwata, T., Okamoto, S., Yabe, K., Inaoka, T. and Akiba, M. Extensive amplification of GI-VII-6, a multidrug resistance genomic island of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, increases resistance to extended-spectrum cephalosporins. *Front Microbiol* **6**, 78 (2015)
- 12) Nicoloff, H., Perreten, V. and Levy, S. B. Increased genome instability in *Escherichia coli lon* mutants: Relation to emergence of multiple-antibiotic-resistant (Mar) mutants caused by insertion sequence elements and large tandem genomic amplifications. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 1293-1303 (2007)
- 13) Nicoloff, H., Perreten, V., McMurry, L. M. and Levy, S. B. Role for tandem duplication and Lon protease in AcrAB-TolC-dependent multiple antibiotic resistance (Mar) in an *Escherichia coli* mutant without mutations in *marRAB* or *acrRAB*. *J Bacteriol* **188**, 4413-4423 (2006)

