

多剤耐性 *Salmonella* Typhimurium PFGE VII 型菌が保有する 薬剤耐性病原性プラスミドの構造解析

玉村雪乃¹⁾, 内田郁夫¹⁾

Characterization of virulence-resistance plasmids carried by emerging multidrug resistant *Salmonella* Typhimurium isolated from cattle in Hokkaido, Japan

Yukino TAMAMURA¹⁾ & Ikuo UCHIDA¹⁾

背景と目的

牛サルモネラ症は *Salmonella* に起因する感染症であり、下痢、肺炎等を主徴とし、重症例では敗血症を呈し死亡する。原因となる血清型は様々であるが、*S. Typhimurium* によるものが最も多い。以前は子牛を中心に発生が認められていたが、近年では成牛における発生が増加し、酪農現場で問題となっている。我々は成牛のサルモネラ症増加の原因究明を目的とし、1977～2009年の間に北海道内の牛から分離された *Salmonella* Typhimurium 計 545 株をパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) で解析し、サルモネラ症原因菌の遺伝学的性状を調べた。その結果、545 株は PFGE I～IX 型に分類され、1992 年に PFGE I 型菌の分離数が増加し、さらに 2000 年以降は多剤耐性を示す PFGE VII 型菌が増加したことが明らかとなった¹⁾。VII 型に分類された 165 株のうち 162 株がアンピシリン耐性であり、これらの耐性菌では病原性遺伝子 *spvC* とともにアンピシリン耐性遺伝子 *bla*_{TEM-1} が乗った、薬剤耐性病原性プラスミドが認められた¹⁾。さらに、VII 型菌のうち 26 株は第 1 世代セファロスポリンであるセファゾリンに耐性を示し、このうち 22 株は染色体上の薬剤耐性領域 GI-VII-6 上にセファロスポリン耐性遺伝子 *bla*_{CMY-2} が存在するが²⁾、1 株は第 3 世代セファロスポリンであるセフォタキシムに耐性を示し、*bla*_{CMY-2} を乗せたプラスミドを保有していた¹⁾。

そこで本研究では、2000 年以降増加した PFGE VII 型菌の遺伝学的性状を明らかにすることを目的とし、VII 型菌が保有する薬剤耐性病原性プラスミドおよび *bla*_{CMY-2} プラスミドの塩基配列を決定し、構造および機能を解析した。

材料と方法

VII 型菌のうち、薬剤耐性病原性プラスミドを保有する代表株 2 株、およびセフォタキシム耐性株 1 株からプラスミドを抽出し、全塩基配列を次世代シーケンサーにより決定した。配列の決定については北海道システムサイエンス社に依頼した。遺伝子の比較・解析は blast プログラムを用いて実施した。

研究の概要

1. 薬剤耐性病原性プラスミドの塩基配列の解析

薬剤耐性病原性プラスミド pYT1 (110 kb) および pYT2 (130 kb) の全塩基配列を決定し、国際的なデータベース (DDBJ: DNA Data Bank of Japan) に登録した (accession number, AB576781, AB605179)。

pYT1 および pYT2 は *S. Typhimurium* が共通に保有する血清型特異病原性プラスミド pSLT に、薬剤耐性遺伝子を含む配列が挿入された構造を成していた (図 1)。pYT1 および pYT2 には、約 32 kb の薬剤耐性領域 (right region) が共通に挿入されており、カナマイシン、テトラサイクリン、サルファ剤、ストレプトマイシン、アンピシリン耐性遺伝子 (*aph* (3')-I, *tetA*(A), *sul1*, *aadA1*, *bla*_{TEM-1}) が In2-like クラス 1 インテグロンとともに含まれていた (図 1)。pYT2 ではさらに上流に、プラスミドの複製に関する遺伝子 *IncFIB/repA2* を含む領域 (left region) が挿入されていた (図 1)。Left region はサルモネラ由来の薬剤耐性プラスミド pU302L (accession number, NC006816) および *S. Dublin* 由来の薬剤耐性プラスミド pSD88 (accession number, JF267652) と高い相同性を示し、right region は pSD88 と高い相同性を示した。以上のことから、これらのプラスミドが挿入された領域の由来となっている可能性

1) 農研機構 動物衛生研究所 寒地酪農衛生研究領域

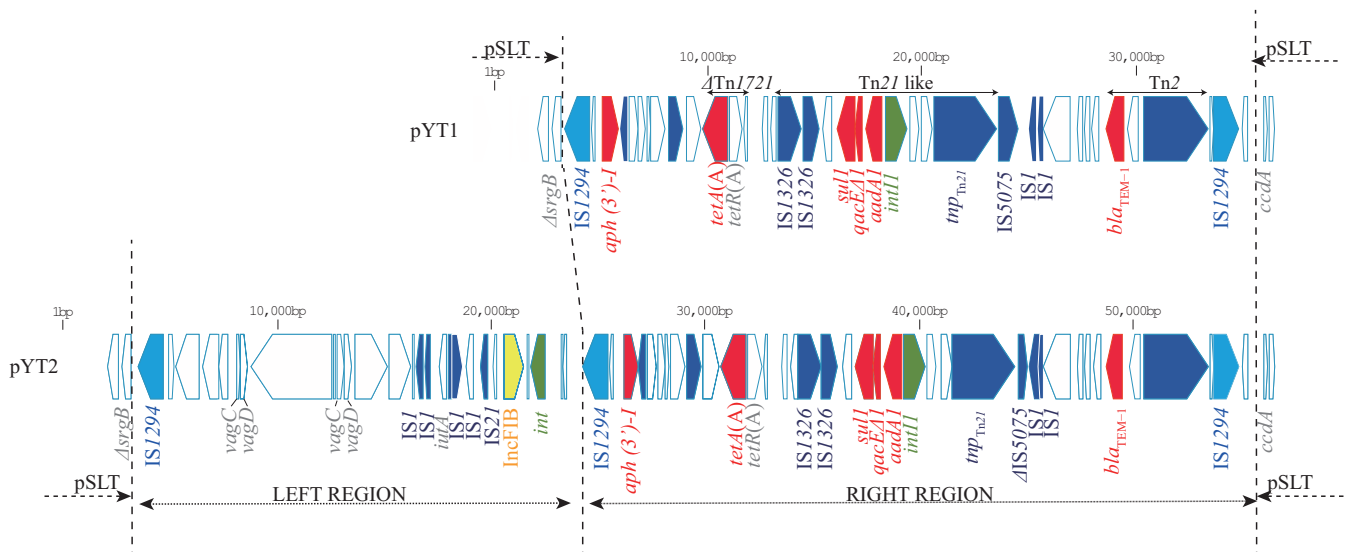


図1. pYT1 および pYT2 に挿入された遺伝子領域のマップ

薬剤耐性遺伝子を赤, IS1294 トランスポザーゼを水色, その他のトランスポザーゼを紺色, プラスミド複製遺伝子を黄色, インテグラーゼを緑色で示した。

が示唆された。pYT1 および pYT2 は海外の研究者によって DDBJ に登録されたプラスミド pSal6919a (accession number, JF274991), および pSal8934b (accession number, JF274992) と高い相同性を示し, 海外においても pYT1 および pYT2 と同様の薬剤耐性病原性プラスミドが存在する可能性が示された。S. Typhimurium の薬剤耐性病原性プラスミドに関しては, いくつか報告がある。既に報告されているプラスミド pSTMDT12-L³⁾ および pSLT-BT⁴⁾ では, 薬剤耐性遺伝子を含む複合トランスポゾンが IS26 を介し pSLT に挿入されている。pYT1 および pYT2 もこれらと同様に, pSLT が IS1294 を介して薬剤耐性遺伝子を獲得し, 生じたものと考えられる。

病原性プラスミド pSLT は接合伝達能を有するが, pYT1 および pYT2 では伝達性関連遺伝子である *traD* の一部が欠損しており, 接合伝達能は認められなかった。

2. *bla*_{CMY-2} プラスミドの塩基配列の解析

セフトキシム耐性株では 120 kb および 110 kb の 2 種類のプラスミドが認められた。110 kb のプラスミドは *bla*_{TEM-1} とともに *spvC* を乗せた pYT1 類似の薬剤耐性病原性プラスミドであった (pYT4, accession number, AB723628)。120 kb のプラスミドは *bla*_{CMY-2} プラスミドであり (pYT3, accession number, AB591424), *bla*_{CMY-2} 以外にクロラムフェニコール, テトラサイクリン, ストレプトマイシン, サルファ剤の 4 剤に対する耐性遺伝子 (*floR*, *tetA* (A), *strA*, *strB*, *sul2*) が含まれていた (図 2)。pYT3 の大部分は大腸菌由来の IncA/C プラスミド pAR060302,

およびセファゾリン耐性 VII 型菌が染色体上に保有する薬剤耐性領域 GI-VII-6 と高い相同性を示したが, プラスミド複製に関わる遺伝子 IncFIB/*repA2* を含む領域は, 薬剤耐性病原性プラスミド pYT2 の left region と高い相同性を示した (図 2)。pYT3 には IncFIB/*repA2* 以外の複製関連遺伝子は存在せず, IncA/C の複製関連遺伝子を含む領域が, IncFIB/*repA2* を含む領域に置き換わったと考えられる。以上の結果から, pYT3 は pAR060302 と, pYT2 様プラスミドの IncFIB/*repA2* を含む領域の IS1294 を介したリコンビネーションによって生じたものであり, GI-VII-6 と pYT3 はともに pAR060302 を由来とすることが示された。pYT3 の大部分が接合伝達能を有する pAR060302 と高い相同性を示すが, pYT3 においては複数の伝達性関連遺伝子が欠損しており, 接合伝達能は認められなかった。

今後の展望

成牛のサルモネラ症の原因菌として, 2002 年以降増加した VII 型菌の遺伝学的特徴を解析し, 本菌が薬剤耐性病原性プラスミドを共通に保有することを明らかにした。一方で, 1992 年から増加した I 型菌も, 依然としてサルモネラ症発症牛から分離されている。I 型菌に関しては, 百日咳毒素様蛋白をコードする *artA/artB* 遺伝子を保有し, マイトマイシン C や H₂O₂ によりその生成が誘導されることが, 明らかにされている^{5) 6)}。今後は ArtA/ArtB の生物活性やサルモネラにおける本遺伝子の保有状況を解析し, ArtA/ArtB の病原因子としての意義を明らかにしていく。

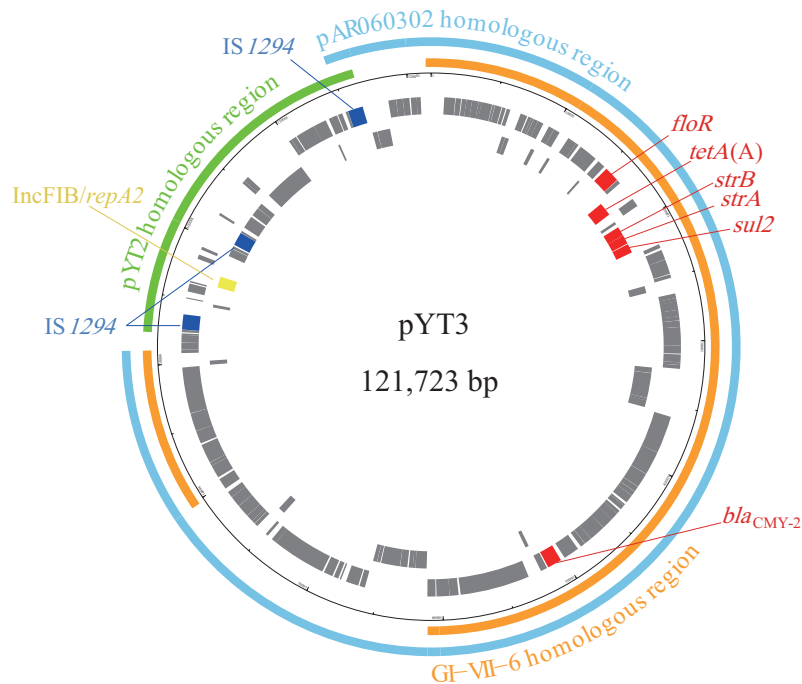


図2. pYT3のマップ

内側の円はコーディング領域を示す。薬剤耐性遺伝子を赤、IS1294 トランスポザーゼを青色、プラスミド複製遺伝子を黄色で示した。外側の円は pAR060302, GI-VII-6, および pYT2 と相同な領域を示す。

謝 辞

本研究は平成 23 ~ 24 年度動物衛生研究所重点強化研究課題として実施し、成績の一部は下記の論文に公表した。

Tamamura, Y., Tanaka, K., Akiba, M., Kanno, T., Hatama, S., Ishihara, R. and Uchida, I.: Complete nucleotide sequences of virulence-resistance plasmids carried by emerging multidrug-resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from cattle in Hokkaido, Japan. PLoS One. 8(10), e77644 (2013).

引用文献

- 1) Tamamura, Y., Uchida, I., Tanaka, K., et al.: Molecular epidemiology of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates from cattle in Hokkaido, Japan: evidence of clonal replacement and characterization of the disseminated clone. Appl. Environ. Microbiol. 77, 1739-1750 (2011).
- 2) Shahada, F., Sekizuka, T., Kuroda, M., et al.: Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolates harboring a chromosomally encoded CMY-2 beta-lactamase gene located on a multidrug resistance genomic island. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 4114-4121 (2011).
- 3) Izumiya, H., Sekizuka, T., Nakaya, H., et al.: Whole-genome analysis of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium T000240 reveals the acquisition of a genomic island involved in multidrug resistance via IS1 derivatives on the chromosome. Antimicrob. Agents Chemother. 55, 623-630 (2011).
- 4) Kingsley, R.A., Msefula, C.L., Thomson, N.R., et al.: Epidemic multiple drug resistant *Salmonella* Typhimurium causing invasive disease in sub-Saharan Africa have a distinct genotype. Genome Res. 19, 2279-2287 (2009).
- 5) Saitoh, M., Tanaka, K., Nishimori, K., et al.: The artAB genes encode a putative ADP-ribosyltransferase toxin homologue associated with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. Microbiology. 151, 3089-3096 (2005).
- 6) Uchida, I., Ishihara, R., Tanaka, K., et al.: *Salmonella enterica* serotype Typhimurium DT104 ArtA-dependent modification of pertussis toxin-sensitive G proteins in the presence of [32P]NAD. Microbiology. 155, 3710-3718 (2009).