

東邦大学学術リポジトリ

Toho University Academic Repository

タイトル	Analysis of the stepwise acquisition of blaCTX M 2 and subsequent acquisition of either blaIMP 1 or blaIMP 6 in highly conserved IncN pST5 plasmids
別タイトル	高度に保存されたIncN pST5 プラスミドにおけるblaCTX M 2に続くblaIMP 1またはblaIMP 6の段階的獲得の解析
作成者（著者）	池ヶ谷, 佳寿子
公開者	東邦大学
発行日	2024.03.13
掲載情報	東邦大学大学院医学研究科 博士論文 内容の要旨及び審査結果の要旨.
資料種別	学位論文
内容記述	主査：赤羽悟美 / タイトル：Analysis of the stepwise acquisition of blaCTX M 2 and subsequent acquisition of either blaIMP 1 or blaIMP 6 in highly conserved IncN pST5 plasmids / 著者：Kazuko Ikegaya, Kotaro Aoki, Kohji Komori, Yoshikazu Ishii, Kazuhiro Tateda / 掲載誌：JAC Antimicrobial Resistance / 巻号・発行年等：5(5): dlad106, 2023
著者版フラグ	none
報告番号	32661甲第1099号
学位記番号	甲第760号
学位授与年月日	2024.03.13
学位授与機関	東邦大学
メタデータのURL	https://mylibrary.toho.u.ac.jp/webopac/TD59883013

博士學位論文

論文内容の要旨

および

論文審査の結果の要旨

東邦大学

池ヶ谷佳寿子より学位申請のため提出した論文の要旨

学位番号甲第 760 号

学位申請者 : 池ヶ谷 佳寿子

学位論文 : Analysis of the stepwise acquisition of *bla*_{CTX-M-2} and subsequent acquisition of either *bla*_{IMP-1} or *bla*_{IMP-6} in highly conserved IncN-pST5 plasmids

(高度に保存された IncN-pST5 プラスミドにおける *bla*_{CTX-M-2} に続く *bla*_{IMP-1} または *bla*_{IMP-6} の段階的獲得の解析)

著者 : Kazuko Ikegaya, Kotaro Aoki, Kohji Komori, Yoshikazu Ishii, Kazuhiro Tateda

公表誌 : JAC-Antimicrobial Resistance 5(5): dlad106, 2023

DOI: 10.1093/jacamr/dlad106

論文内容の要旨 :

背景・目的 : 基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (extended spectrum β -lactamase ; ESBL) およびカルバペネマーゼをコードする遺伝子は、いずれも腸内細菌目細菌 (Enterobacterales) の複数の菌種において、プラスミドを介して伝播・拡散する。また、それらの遺伝子は挿入配列 (insertion sequence ; IS) や薬剤耐性遺伝子を集積するインテグロン、トランスポゾンなどの可動性遺伝因子によって遺伝子座を移動する。本邦では、過去に CTX-M-2 型 ESBL 遺伝子 (*bla*_{CTX-M-2}) および IMP-1 または IMP-6 型カルバペネマーゼ遺伝子 (*bla*_{IMP-1} または *bla*_{IMP-6}) を同時に保有する複数菌種の腸内細菌目細菌による院内感染事例が報告された。これらの菌株は、プラスミドシークエンスタイプ 5 に属する Incompatibility type N プラスミド (IncN-pST5) を保有していた。都内の院内感染事例で分離された菌株も IncN-pST5 上に *bla*_{CTX-M-2} と *bla*_{IMP-1} を搭載し、大阪の院内感染事例で分離された菌株は IncN-pST5 上に *bla*_{CTX-M-2} と *bla*_{IMP-6} を搭載していた。一方で、これら 2 種類の IncN-pST5 の成立過程は不明だった。本研究では、① *bla*_{IMP-1} から生じた点突然変異により *bla*_{IMP-6} へ変異した、② 2 種類の IncN-pST5 は共通の祖先がそれぞれ異なる水平伝播イベントにより *bla*_{IMP-1} または *bla*_{IMP-6} を獲得した、という仮説を立て、それを検証することを目的に、東邦大学医学部微生物・感染症学講座の保存株をレトロスペクティブに全ゲノム解析 (whole genome sequencing ; WGS) を実施した。

対象・方法 : 供試菌株は、MiSeq あるいは NovaSeq6000 (いずれもイルミナ) によりドラフト WGS されていた保存株のうち *bla*_{CTX-M}

または *bla*_{IMP} 陽性の腸内細菌目細菌 281 株とした。これらの中から、IncN-pST5 陽性、*bla*_{CTX-M2} 陽性かつ sequence type (ST) が重複しない *Escherichia coli* を 11 株選抜した。この条件に加えて *bla*_{IMP-1} あるいは *bla*_{IMP-6} を保有する菌株をそれぞれ 6 株および 2 株抽出した。これらについてロングリードシーケンサーの MinION (Oxford Nanopore Technologies) によりプラスミドゲノムを含む完全長 WGS を行った。

結果：解読された IncN-pST5 は以下の 4 種類だった：Type A (*bla*_{CTX-M2} および *bla*_{IMP-1} 搭載、n=6)、Type B (*bla*_{CTX-M2} および *bla*_{IMP-6} 搭載、n=2)、Type C (*bla*_{CTX-M2} 搭載、n=10)、および Type D (*bla*_{CTX-M14} 陽性株から検出されたが、β-ラクタマーゼ遺伝子を搭載していない、n=1)。すべてのタイプの IncN-pST5 の基本構造は高度に保存されていた。Type A、Type B、および Type C は同じ位置に *ISEcpI*-*bla*_{CTX-M2} のエレメントを保有していた。それぞれのプラスミドは、異なる番号に属するクラス 1 インテグロンを保有していた (Type A: In798、Type B: In1690、Type C: In127、Type D: In207)。Type A の In798 は *bla*_{IMP-1} を、Type B の In1690 は *bla*_{IMP-6} を搭載していたが、周辺の遺伝子カセットは異なっていたことから、IncN-pST5 上での点突然変異による *bla*_{IMP-1} から *bla*_{IMP-6} が生じたとは考えられなかった。IncN-pST5 Type A、B、および C の代表的なプラスミドの接合伝達頻度は 1.3×10^{-1} から 2.5×10^{-2} であり、接合伝達が高頻度に行き起こることが確認された。

考察：本研究の結果から、IncN-pST5 は異なるイベントで *bla*_{IMP-1} あるいは *bla*_{IMP-6} を獲得したと考えられ、さらに既報でも *bla*_{IMP-6} は全て IncN プラスミドに搭載されていることから、*bla*_{IMP-1} から *bla*_{IMP-6} への点突然変異による進化は否定的であることが支持される。また、IncN-pST5 が元来保有するクラス 1 インテグロンが、*ISEcpI* による *bla*_{CTX-M2} の獲得に続く *bla*_{IMP} 獲得の素因として重要だったと考えられた。IncN-pST5 のようにクラス 1 インテグロンを保有し、かつ接合伝達頻度の高いプラスミドは、*bla*_{IMP} のようなクラス 1 インテグロンと親和性の高い薬剤耐性遺伝子の拡散に寄与することから、注視すべき可動性遺伝因子の 1 つであると考えられた。

1. 学位審査の要旨および担当者

学位番号甲第 760 号	氏 名	池ヶ谷 佳寿子
学位審査担当者	主 査	赤 羽 悟 美
	副 査	中 野 裕 康
	副 査	内 藤 篤 彦
	副 査	村 上 義 孝
	副 査	近 藤 元 就
<p>学位論文の審査結果の要旨：</p> <p>本研究の成果は JAC-Antimicrobial Resistance 誌（2023 年）に公表された。基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼとカルバペネマーゼは腸内細菌目細菌に多剤耐性を付与する。申請者は、本邦における過去の院内感染事例として報告された Incompatibility type N プラスミド (IncN-pST5) 上に CTX-M-2 型基質特異性拡張型 β-ラクタマーゼ ($bla_{CTX-M-2}$) および IMP-1 または IMP-6 型カルバペネマーゼ遺伝子 (bla_{IMP-1} または bla_{IMP-6}) を同時に保有する腸内細菌目細菌に注目し、その耐性遺伝子獲得過程の解明を目的として本研究を遂行した。東邦大学医学部微生物・感染症学講座に保存されていた bla_{CTX-M} または bla_{IMP} 陽性の腸内細菌目細菌 281 株から、IncN-pST5 陽性、$bla_{CTX-M-2}$ 陽性かつ sequence type (ST) が重複しない Escherichia coli を 11 株、bla_{IMP-1} 保有菌株を 6 株、bla_{IMP-6} 保有菌株 2 株を抽出し、プラスミドゲノムを含む完全長の全ゲノム解析 (WGS) を行った。その結果、Type A ($bla_{CTX-M-2}$ および bla_{IMP-1} 搭載、n=6)、Type B ($bla_{CTX-M-2}$ および bla_{IMP-6} 搭載、n=2)、Type C ($bla_{CTX-M-2}$ 搭載、n=10)、Type D (β-ラクタマーゼ遺伝子を搭載しない $bla_{CTX-M-14}$ 陽性株、n=1) に分類され、それぞれ異なるクラス 1 インテグロンを保有していた。申請者の Type A の bla_{IMP-1} と Type B の bla_{IMP-6} が IncN-pST5 上での点突然変異により生じたという仮説は、遺伝子カセットを比較検討した結果、否定された。一方、詳細な WGS 解析により、Type D の IncN-pST5 pMIY2805_IncN を IncN-pST5 の共通の祖先として同定し、IncN-pST5 が保有するクラス 1 インテグロンが、ISEcp1 による $bla_{CTX-M-2}$ の獲得 (Type C) に続く bla_{IMP} の獲得 (Type A, Type B) をもたらしたという耐性獲得過程を推定した。以上より、IncN-pST5 のようにクラス 1 インテグロンを保有し接合伝達頻度の高いプラスミドは、薬剤耐性遺伝子の拡散に寄与することを明らかにした。</p> <p>学位審査会は 2023 年 12 月 25 日に審査委員全員出席のもと行われた。申請者による明快なプレゼンテーションの後、審査委員から、薬剤耐性遺伝子が伝播する場所、細菌が獲得した耐性遺伝子を喪失する可能性、異なる菌種間での薬剤耐性遺伝子の伝播の機序、WGS 解析結果から薬剤耐性遺伝子の獲得・伝播の過程を推定するアルゴリズムなどについて活発な質問があり、申請者は、個々の質問に対して自身のデータに基づき文献情報を交えて的確に回答した。以上より、本研究は多剤耐性遺伝子の拡散過程の解明と拡散防止に向けて重要な知見をもたらすものであり、審査委員全員一致の下、学位に値する論文であると結論した。</p>		