

総 説 (特集)

腸球菌の高頻度接合伝達性プラスミド

Enterococcal Highly Conjugative Plasmids

富田 治芳^{1,2*}, 谷本 弘一², 平川 秀忠¹, 久留島 潤¹, 橋本 祐輔¹, 野村 隆浩¹
HARUYOSHI TOMITA^{1,2*}, KOICHI TANIMOTO², HIDETADA HIRAKAWA¹,
JUN KURUSHIMA¹, YUSUKE HASHIMOTO¹, TAKAHIRO NOMURA¹

¹ 群馬大学・大学院医学系研究科、細菌学 〒371-8511 群馬県前橋市昭和町3-39-22

² 群馬大学・大学院医学系研究科、薬剤耐性菌実験施設 〒371-8511 群馬県前橋市昭和町3-39-22

* TEL: 027-220-7990 FAX: 027-220-7996

* E-mail: tomitaha@gunma-u.ac.jp

¹ Department of Bacteriology, Gunma University Graduate School of Medicine, Maebashi 371-8511, Japan

² Laboratory of Bacterial Drug Resistance, Gunma University Graduate School of Medicine, Maebashi 371-8511, Japan

キーワード：バンコマイシン耐性腸球菌、遺伝子伝達機構、接合伝達、多剤耐性、線状プラスミド

Key words: vancomycin-resistant enterococci (VRE), genetic exchange, conjugation, multidrug resistance, linear plasmid

(原稿受付 2020年2月27日／原稿受理 2020年4月23日)

1. はじめに

腸球菌 *Enterococcus* はグラム陽性菌として D 群レンサ球菌属に分類され、約 20 菌種が報告されている。主にヒトを含め動物の腸管内の常在菌であるが、自然環境中にも存在する（糞尿による土壤や河川等の汚染）。医療においては尿路感染症や心内膜炎、胆道感染症等の起因菌となるが、病原性は低く、一般的には日和見感染菌とされている¹。臨床から分離される主な腸球菌は *E. faecalis* と *E. faecium* である。それら臨床分離株の多くは、薬剤耐性、β溶血素 (cytolysin) 産生、バクテリオシン産生、生体組織への付着性等の形質を持つ²。これらの形質は伝達性プラスミドや伝達性トランスポゾンなどの可動因子 (mobile elements) によって担われていることが多く、薬剤耐性や病原性関連因子の拡散に重要な役割を果たしている³。

私達の研究室では、腸球菌の高頻度接合伝達性プラスミドを研究テーマの一つとして、その伝達調節機構とプラスミドがコードする各種遺伝形質の分子遺伝学的解析を行っている。ここでは *E. faecalis* のフェロモン反応性伝達性プラスミド、および私達が発見した *E. faecium* の非フェロモン反応性 pMG1 型伝達性プラスミドと pELF1 型伝達性線状プラスミドについての研究成果を中心に紹介する。

2. 腸球菌の多剤耐性化と接合伝達

近年、高度先進医療環境における易感染者の増加に伴い、多剤耐性化した常在菌や環境菌による感染症が問題となってきた。特に抗 MRSA (Methicillin-resistant

Staphylococcus aureus) 薬であるバンコマイシンに対して高度耐性を示す、バンコマイシン耐性腸球菌 VRE (vancomycin-resistant enterococci) の医療や環境（家畜、畜産物）への広がりとそれに伴う院内感染症の増加が欧米諸国において深刻である⁴。薬剤耐性菌が出現し、広がる要因として、環境因子では抗生物質の使用による選択圧が、細菌側の因子では遺伝子伝達機構 (genetic exchange) が重要である³。一般的に、遺伝子伝達機構によって外来性遺伝子を獲得した薬剤耐性は突然変異による薬剤耐性より安定で高度の耐性形質を示すことが多い。そのため耐性遺伝子をコードする伝達性プラスミドやトランスポゾンによる耐性獲得が腸球菌の耐性化において重要な役割を担っていると考えられる。特に複数の耐性遺伝子が集約された多剤耐性伝達性プラスミドや高頻度接合伝達性プラスミドの存在は、菌の効率的な耐性化に寄与しており、急速な多剤耐性化を招きやすい。臨床で深刻な問題となっている VRE は複数の耐性遺伝子を獲得した多剤耐性菌でもあり、高度バンコマイシン耐性遺伝子の多くもトランスポゾンやプラスミド上にコードされている (Table 1)。これらの耐性はバンコマイシン产生放線菌や環境菌が持つ遺伝子に由来し、細菌間の遺伝子伝達機構によって獲得されたと考えられている (Fig. 1)⁷。

3. グラム陽性菌の伝達性プラスミド

グラム陽性菌において自己伝達が可能な接合伝達性プラスミドは大きく 2 種類に分けられる^{3,8}。一つは固形培地上でのみ接合伝達が可能な伝達性プラスミドと、他の一つは液体培地中での接合伝達が可能な、いわゆる高

Table 1. High-level glycopeptide-resistances found in enterococci

Type	DD-ligase gene	End of peptidoglycan-precursor (target for glycopeptides)	MIC (mg/L)		Induction of resistance	Mobility	Mobile genetic element	Localization	Main species
			Vancomycin	Teicoplanin					
VanA	<i>vanA</i>	D-Ala-D-Lac	64 – ≥ 1000	16 – 512	○	○	Tn1546	Plasmid Chromosome	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>
VanB	<i>vanB</i>	D-Ala-D-Lac	4 – ≥ 1000	0.5 – 1	○	○	Tn1549 Tn5382	Plasmid Chromosome	<i>E. faecalis</i> <i>E. faecium</i>
VanD	<i>vanD</i>	D-Ala-D-Lac	16 – 128	1 – 64	×	×	*	Chromosome*	<i>E. faecium</i> <i>E. faecalis</i> <i>E. raffinosus</i>
VanM	<i>vanM</i>	D-Ala-D-Lac	≥ 256	≥ 64	○	○		Plasmid Chromosome	<i>E. faecium</i>

*As an exceptional, a *vanD* gene cluster encoded on the pMG1-like conjugative plasmid was founded in a Japanese VRE isolate. (our unpublished data)

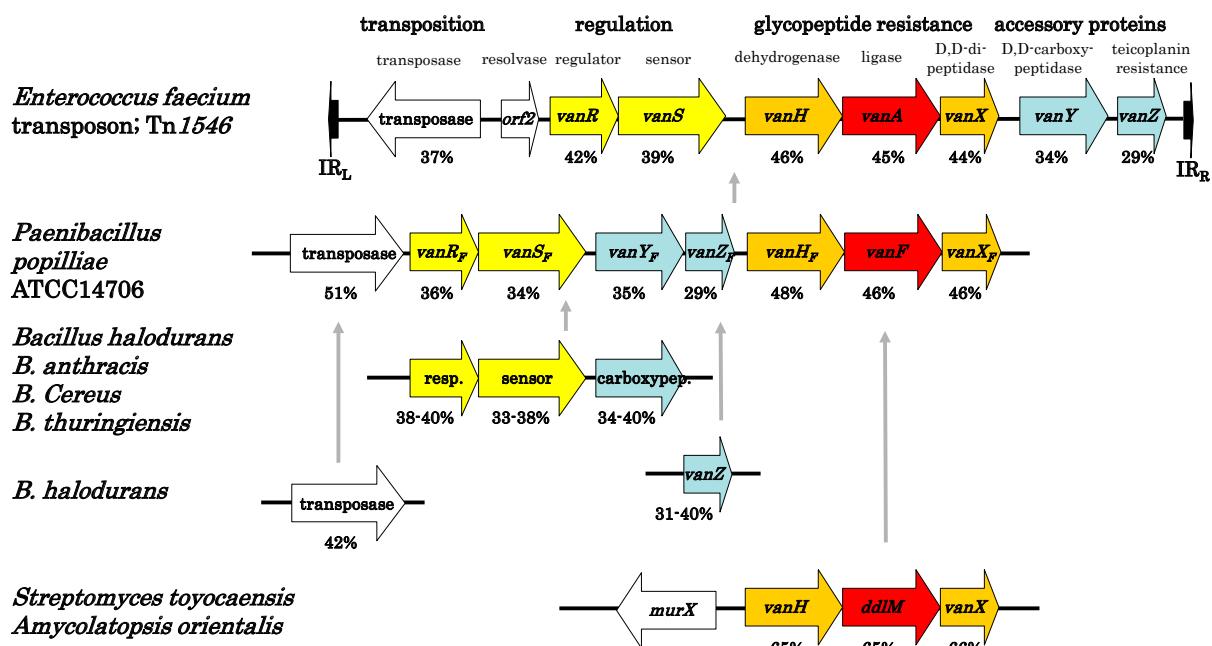


Fig. 1. Schematic diagram of VanA-type vancomycin-resistance gene cluster encoded on Tn1546 in *E. faecalis* V583 and their putative origins. VanA 耐性遺伝子をコードするトランスポゾン Tn1546 (10,851 bp) の基本構造を示す。遺伝子名の下に GC 含量 (%) を示す。主要な耐性遺伝子の他に付帯遺伝子、調節遺伝子（二成分制御系）、転移遺伝子が存在し、臨床分離株は変異、消失、IS (insertion sequence) の挿入などの多様性を認めることが多い。腸球菌 *E. faecalis* V583 株の染色体 DNA の GC 含量 37.5% に対し、耐性遺伝子の GC 含量が高いことから、耐性遺伝子は他の菌種に起源しており、腸球菌が外来性遺伝子として獲得したと考えられている。それらの遺伝子の由来として、GC 含量及び配列の相同性から、Fig. 1 下にリストされたグラム陽性の環境菌や土壤細菌、抗生素質産生放線菌からそれぞれ獲得したと推定されており⁷⁾、灰色の矢印にてルートを示す。

頻度接合伝達性プラスミドである。2つの違いは液体培地中でも安定な接合対を形成する機構の有無であり、接合対形成後のプラスミド伝達機構については類似していると考えられる¹⁹⁾。一般的に高頻度接合伝達性プラスミドのサイズは他の伝達性プラスミドと比べ数十 kbp 以上と大きく、その宿主域は比較的狭い。種々のグラム陽性菌において固体培地上でのみ伝達可能なプラスミドは多数報告されているが、高頻度接合伝達性プラスミドについては腸球菌と一部の *Bacillus* 属菌にのみ報告例があり、一般的ではない⁸⁾。腸球菌の高頻度接合伝達性プ

ラスミドとして、フェロモン反応性のプラスミドとフェロモン非反応性の pMG1 型プラスミドの二種類がこれまでに報告されている^{4,13)}。

4. *E. faecalis* のフェロモン反応性高頻度接合伝達性プラスミド

フェロモン反応性高頻度接合伝達性プラスミドは 1970 年代後半に米国ミシガン大学の D.B. Clewell 博士らが発見した⁴⁾。腸球菌の中でも *E. faecalis* に特異的に

Table 2. Transfer-related genes and regulatory factors encoded on the pheromone-responsive plasmids

Gene or factor (pAD1/pCF10)	Product or structure (pAD1/pCF10)	Regulation	Function
<i>repA/prgW</i>	RepA/PrgW	Positive	Plasmid replication and transfer-regulation
<i>traA/prgX</i>	TraA/PrgX	Negative	Receptor for sex pheromone and DNA binding (regulate transcription)
<i>traB/prgY</i>	TraB/PrgY	Negative	Suppress the internal pheromone
<i>traC/prgZ</i>	TraC/PrgZ	Positive	Uptake the external pheromone
<i>iad/prgQ</i>	iAD1/iCF10	Negative	Inhibitor (anti-pheromone)
mD/Qa	Small RNA	Negative	Terminate the transcript of positive regulator
t1, t2/IRS1, IRS2	Inverted repeat sequences	Negative	Transcription termination signal for positive regulator
<i>traE1</i> , E region (pAD1)	TraE1 or RNA? (pAD1)	Positive	Main key regulator(s) for downstream transfer genes
<i>prgR, prgS</i> (pCF10)	RNA molecule (pCF10)	Positive	Main key regulators for downstream transfer genes
<i>orfY/prgT</i>	Unknown	Positive	Regulator for downstream transfer genes
<i>sea1/prgA</i>	Sea1/PrgA		Surface exclusion on donor cell
<i>asa1/prgB</i>	Asa1/PrgB		Form the mating aggregates

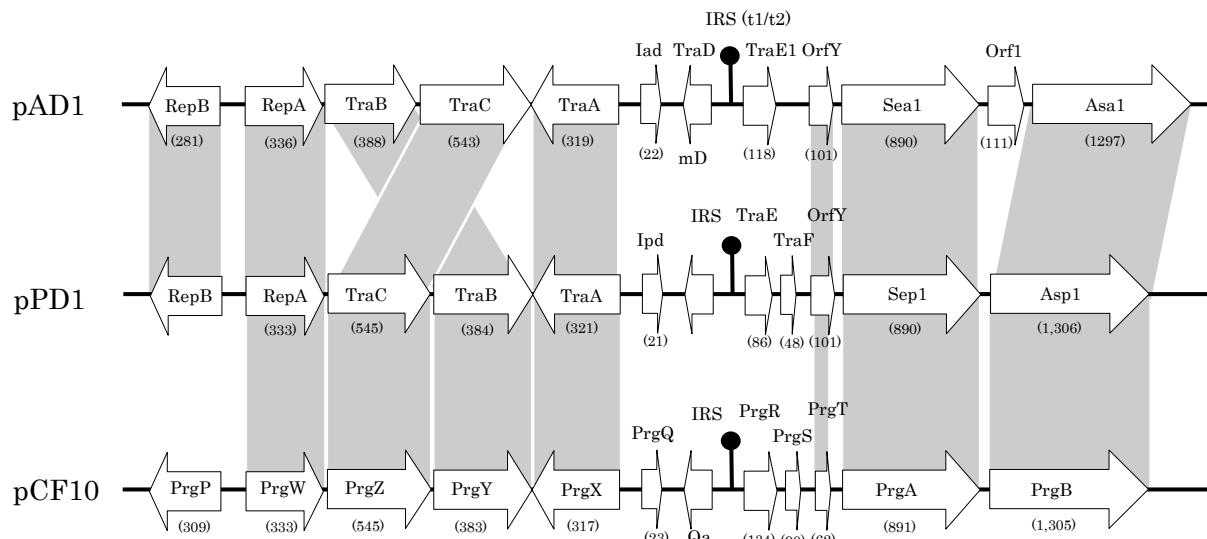


Fig. 2. Transfer-related genes encoded on the pheromone-responsive plasmids

代表的な3つのフェロモン反応性プラスミドの伝達調節領域の構造と比較を示す。本図のスケールは正確ではなく、またpPD1のsep1内のIS挿入は除いている。括弧内の数字は推定されるアミノ酸数を示す。pAD1 (59.3 kbp; cytolsin), pPD1 (58.9 kbp; バクテリオシンBac21/AS-48), pCF10 (67.7 kbp; テトラサイクリン耐性Tn925)はそれぞれ*E. faecalis*の分泌するsex pheromoneのcAD1 (LFSLVLAG), cPD1 (FLVMFLSG), cCF10 (LVTLVFV)に反応する。各プラスミドの調節領域内には内因性および外因性フェロモンの拮抗阻害物質であるinhibitor (anti-pheromone)をコードするiad (iAD1; LFVVTLVG), ipd (iPD1; ALILTLVS), prgQ (iCF10; AITLIFI)遺伝子が存在し、これによりプラスミド獲得後のフェロモン応答がシャットダウンされる。IRS: inverted repeat sequences

存在する（宿主域は*E. faecalis*のみに限定される）非常にユニークな伝達性プラスミドであり、低分子ペプチド（フェロモン）によって高頻度接合伝達能が誘導される。これは細菌における機能的なフェロモンの最初の発見例となった²¹⁾。*E. faecalis*の受容菌は培地中に7~8個のアミノ酸から成る疎水性の複数種類のペプチドフェロモンを分泌する。フェロモン反応性プラスミドを保持する供与菌は、それぞれのプラスミドに特異的な外来性的フェロモンに誘導され、菌表面に凝集物質を発現する。供与菌はこの凝集物質により受容菌と安定な接合凝集塊を形成し、プラスミドを高頻度に接合伝達する。

フェロモン反応性プラスミドは複数種類が存在しており、対応する複数のフェロモンが*E. faecalis*の染色体上にコードされ、それぞれが特異的に作用する。フェロモンに誘導される一連の接合伝達関連遺伝子とその調節遺伝子群はプラスミド上にコードされ、極めて複雑な発現調節が行われている（Table 2）^{2,3,5,25)}。pAD1 (59.3 kbp, cytolsin产生), pPD1 (58.9 kbp, バクテリオシンBac21产生), pCF10 (67.7 kbp, テトラサイクリン耐性Tn925挿入)が詳しく解析され、これらのプラスミドは類似した伝達調節機構を持つことが明らかとなっている（Fig. 2）^{3,6)}。現在、フェロモン反応性高頻度接合伝達性

に関する研究は G.M. Dunny 博士らが pCF10 を用いて継続しており、その詳細な解析結果を報告している⁷⁾。

臨床分離 *E. faecalis* の多くがフェロモン反応性プラスミドを保持しており、それらがコードする cytolysin (β溶血毒素／バクテリオシン), バクテリオシン, 薬剤耐性、および紫外線耐性について解析がされている^{2,3,15,16,20,26,27,30,34)}。私達は国内外のヒト及び環境 (家畜) から分離された VRE である *E. faecalis* 株の疫学的研究から、多剤耐性フェロモン反応性プラスミドが環境 (家畜) からヒトへの薬剤耐性遺伝子の伝播と拡散に関与していることを示してきた^{12,17)}。

5. *E. faecium* のフェロモン非反応性 pMG1型

高頻度接合伝達性プラスミド

VRE として数多く分離される *E. faecium* 株について、1990 年代前半までは高頻度接合伝達性プラスミドの存在は知られていなかった。私達は *E. faecium* の各種薬剤耐性とその伝達性を調べる過程で、液体培地中でも伝達可能なゲンタマイシン耐性高頻度接合伝達性プラスミド pMG1 (65.1 kbp; Maebashi, Gunma) を発見し、このプラスミドについて詳細な解析を行っている¹³⁾。pMG1 の特徴は①フェロモン反応性プラスミドや既知の接合伝達性プラスミドと DNA レベルで相同性がない、②受容菌のフェロモン (培養上清) による凝集性や伝達性の誘導を認めない (非フェロモン反応性)、③ *E. faecium* 以外の *E. faecalis*, *E. hirae* にも接合伝達が可能で宿主域が比較的広い、などである。この pMG1 を保持する供与菌を受容菌と混和培養すると、顕微鏡下でのみ観察可

能な微細な凝集塊が形成され、接合凝集と考えられた。pMG1 による接合伝達開始直後に転写量が一過性に増加する遺伝子 *traA* (TraA; 286 a.a.) が同定された²³⁾。*traA* の変異株は微細な凝集塊の形成と液体培地中での伝達性が失われたことから、接合凝集塊の形成に関与する遺伝子と考えられた。その後、pMG1 の全塩基配列の決定と複製領域、接合伝達関連領域の同定が行われた²⁴⁾。pMG1 はゲンタマイシン耐性トランスポゾン Tn4001 が挿入された伝達性プラスミドであった。また pMG1 の DNA 分子の GC 含量は 31.6% であり、*E. faecium* の染色体 DNA の GC 含量 (38–39%) と比較して低かった。

一方で、国内の病院で分離された複数の VRE 株 (VanA 型 *E. faecium*, *E. avium*) からバンコマイシン耐性高頻度接合伝達性プラスミド pHT α , β , γ を分離した (Fig. 3)³²⁾。これらは全て pMG1 と DNA レベルで高い相同性 (90%以上) を示すと同時に、pMG1 との不和合性を示す、いわゆる pMG1 型バンコマイシン耐性プラスミドであった。全ての pHT プラスミドには VanA 型バンコマイシン耐性トランスポゾン Tn1546 が同一の場所に挿入されており、 β がプロトタイプ (Tn1546 のみの挿入) で、 α は IS232 が、 γ は group II イントロンがそれぞれ挿入された構造であった。pHT β は Tn1546 の挿入領域を除き 52,890 bp のサイズのプラスミドで、61 個の *orf* (open reading frame) をコードすると推測された²⁸⁾。これらのうち複製遺伝子 *rep* を含め、22 個の *orf* は炭疽菌の病原性夾膜プラスミド pXO2 (96.2 kbp) にコードされる *orf* と相同性を示したが、そのほとんどは機能未知であった。pHT β のトランスポゾン Tn917-

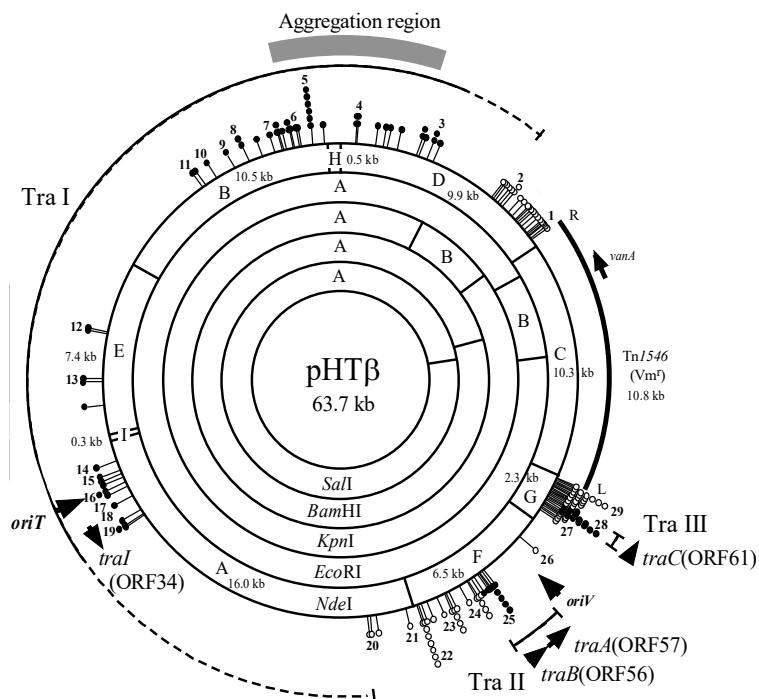


Fig. 3. Structure of pHT β , a VanA-type vancomycin-resistant pMG1-like plasmid

pMG1 型プラスミドであるバンコマイシン耐性 pHT β の制限酵素地図と接合伝達領域を示す。VanA 型バンコマイシン耐性は Tn1546 挿入による獲得である。3 つの接合伝達領域 (Tra I, Tra II, Tra III) はトランスポゾン Tn917-lac 挿入変異体の分離と解析により同定された (黒丸は伝達頻度が低下した挿入部位)。図には複製開始領域 *oriV*, 伝達開始領域 *oriT*, DNA nickase 遺伝子 *traI*, 伝達性調節遺伝子 *traA*, *traB* を示す。

*lac*挿入変異体の解析から、3つの接合伝達関連領域（Tra I, II, III）を同定した（Fig. 3）。この領域の変異体は野生型と比較し、伝達頻度が低下あるいは伝達性が失われていた。Tra I 領域には接合伝達関連遺伝子（*virB11*, *traG*, *virB4*）のアミノ酸配列に相同性を示す *orf* が存在し、この領域は接合伝達の DNA 分泌機構に関する遺伝子群が存在すると考えられた¹⁹⁾。Tra I 領域内の接合伝達に必須の nickase 遺伝子 *traI* と伝達開始領域 *oriT* を同定した²⁸⁾。TraI 蛋白（506 a.a.）は N 末端領域に活性に重要なモチーフが存在し、この領域の欠失変異体は接合伝達を完全に失った。また pHTβ 伝達開始領域 *oriT* の検索を行い、*orf31* と *orf32* の間の non-coding 領域の 192 bp が機能的な *oriT* として作用することが明らかになった。pHTβ の解析過程で、このプラスミドを保持する供与菌（*E. faecalis*）は弱い自己凝集能を持つことを発見し、凝集性には Tra I 上流域の *orf9*～*orf13* の 5 個の *orf* が関与することを示した（Fig. 4）²⁹⁾。*orf9* 上流には強い転写活性を持つプロモーターが存在し、これらの *orf* はオペロンを構成することがわかった。このうち ORF10 蛋白（1,209 a.a.）はその一部にグラム陽性菌の付着因子の一部分との相同性が存在したことから、凝集形成に直接関与する表面蛋白であることが推察された。Tra II 領域の *traA* 上流に存在する *orf56* は *traA* とオペロンを構成しており、その欠失変異体の解析から、伝達性と凝集性に必須な遺伝子であったことから *traB* と命名した（Fig. 3, Fig. 4）²⁹⁾。*traB* 変異体では凝集領域の転写活性が低下しており、*traB* のトランス位の相補によ

って転写活性が回復したことから、*traB* は *orf9* 以下の転写を正に調節する遺伝子であることが示された。さらに *orf9* の欠失変異体は伝達性を完全に失うことから (*traD* と命名)，これは接合伝達の最重要的鍵となる遺伝子と考えている（未発表）。これまでの解析で Tra I 領域内にコードされる負の調節因子 TraF 蛋白が *traD* プロモーター領域に結合することで転写抑制を行っていることを明らかにし、また Tra III 領域内の伝達関連遺伝子 *traC* を同定している（Fig. 4, 未発表）。これまでのところ pMG1 型プラスミドにおける接合伝達開始シグナルの有無は不明である。

米国のミシガン大学附属病院で分離した VanA 型 VRE の *E. faecium* 約 600 株を解析したところ、pMG1 と DNA レベルで高い相同意を持った、いわゆる pMG1 型ゲンタマイシン耐性プラスミドを VRE の約 4 割が保持していた³¹⁾。この他にもスペインや台湾でアウトブレイクした VRE の *E. faecium* 株に pMG1 とほぼ同一のプラスミドが存在していることを明らかにしている（未発表）。それら各国で分離された VRE が保持する pMG1 型ゲンタマイシン耐性プラスミドの Tn や IS (insertion sequence) の插入領域を除いた基本のコア構造は pMG1 と同一であり、塩基配列も十数塩基対の違いのみであった。また私達は中国で臨床分離された VanA 型 VRE (*E. faecium*) 株の解析からバンコマイシン耐性高頻度接合伝達性プラスミド pZB18 を分離した³³⁾。pZB18 の塩基配列は pMG1 との相同意はやや低く（50～80%），遺伝的には離れているものの、プラスミド全体の構造の類似

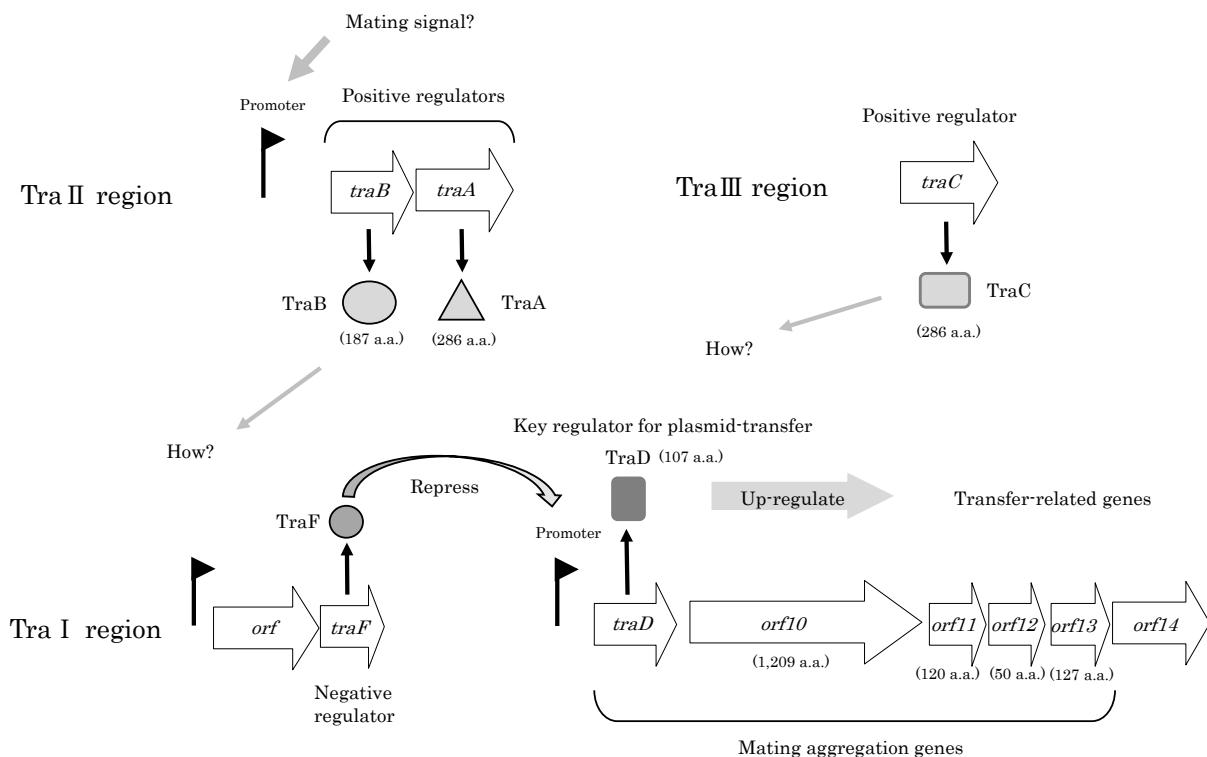


Fig. 4. Regulation of transfer of pMG1-like plasmid pHTβ

これまでに明らかになっている pHTβ の接合伝達性の制御機構を示す。接合伝達性のシグナルについてはその有無も含め、不明である。また Tra II 領域内の正の調節因子 *traB*（および *traA*）と Tra III 領域の *traC* の分子機構の詳細は不明である。Tra I 上流域の負の調節因子 *traF* の遺伝子産物 TraF 蛋白は *traD* 上流のプロモーター領域に結合し、転写活性を抑制する。*traD* (TraD 蛋白) は下流の接合伝達関連遺伝子群の発現を正に制御するマスター因子であると考えられる。

性と伝達関連遺伝子群 (*traA*, *traB*, *traD*, *traF*, *traI* 等の pMG1 に特異的な遺伝子) の保存性から、派生型プラスミドと考えられた（未発表）。

6. 広宿主域伝達性の線状プラスミド pELF1

一般的にプラスミドは環状構造をしており、線状構造のプラスミドは希である。線状プラスミドは、*Streptomyces* 属、*Borrelia* 属などの限られた菌種で見出されているものの腸球菌では知られていなかった¹¹⁾。近年、私達は国内外で分離された VRE 株の解析過程において、腸球菌としては初めての接合伝達可能な線状型プラスミドを発見した^{10,18)}。現在、この新規の線状プラスミド pELF1 の解析を進めている。

pELF1 (143.3 kbp) は VanA 型と VanM 型の 2 つ耐性遺伝子群を同時に持つプラスミドで、国内で臨床分離された VRE である *E. faecium* AA708 株が保持していた。VanM 型耐性遺伝子群は中国から報告された新規の高度耐性遺伝子で、これを持つ VRE は主に中国で分離されており、これまで日本国内での報告はなかった。AA708 株の解析で、①パルスフィールド電気泳動法 (PFGE) で DNA 切断処理（直鎖化）をしなくとも明確な一本の DNA バンドが確認される、② PFGE の泳動条件を変えてもその大きさ（約 143 kbp）は常に一定である、③全

ゲノム配列 (WGS) の解析で得られた染色体と 5 つのプラスミドの配列のうち、パンコマイシン耐性遺伝子群を含む 143 kbp のプラスミド配列のみ環状構造にならない、④そのプラスミド DNA の制限酵素切断パターンが直鎖状として作成した制限酵素地図と一致する (Fig. 5)，⑤その配列には既知のファージ遺伝子が存在しない、ことから腸球菌のパンコマイシン耐性線状プラスミド pELF1 (Enterococcal Linear-Formed plasmid) とした¹⁰⁾。

線状プラスミドは末端の構造から 2 つに分類されている¹¹⁾。一つは一本鎖 DNA が末端で折れ曲がったループ構造を持つ hairpin 型であり、*Borrelia* 属菌のプラスミドや線状ファージに多く見られる。もう一つは、末端領域に複数の palindrome 配列から成る高次構造をとり、5' 末端に terminal protein (TP) が結合することで保護されている invertron 型であり、*Streptomyces* 属菌や *Rhodococcus* 属菌等の線状プラスミドに認められる¹⁾。pELF1 の WGS 解析において、一方の末端（左端）側の約 5 kbp の逆向き繰り返しの領域として得られる配列データ量が他の領域と比較して約半分であった。これは、この領域が折り返された hairpin 構造を持つことを示しており、そのループ部分の配列は 5'-TATA-3' であった。他方の末端（右端）には大小 10 個の palindrome 配列を認めたことから invertron 型が推測された。プラスミド DNA の gel retardation assay を行ったところ

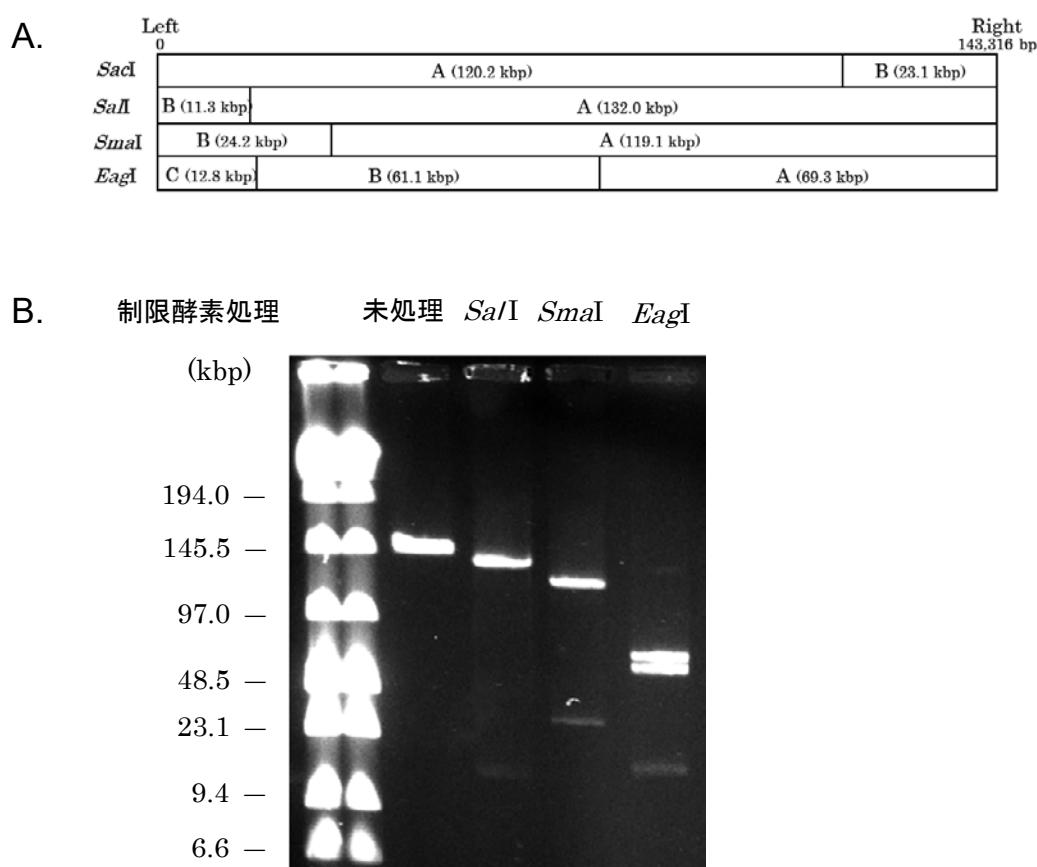


Fig. 5. Electrophoresis of restriction enzyme-digested pELF1

腸球菌の新規の線状プラスミド pELF1 の制限酵素地図 (A) とパルスフィールド電気泳動 (PFGE) による pELF1 の制限酵素消化 (切断) パターン (B) を示す。制限酵素で未処理の DNA は約 143 kbp の大きさを示し、制限酵素で消化した断片は直鎖状 DNA と考えた制限酵素地図で予想される断片が確認される。（文献 10 を改変）

る、予想通りに蛋白分解酵素で未処理の右端側 DNA 断片は電気泳動されず、TP の結合が示唆された (Fig. 6)。pELF1 は左端が hairpin 型、右端は invertron 型の構造を持つ、これまでに報告がない、いわゆるハイブリッド型の直鎖状プラスミドであった。pELF1 の左端側には VanA 型耐性遺伝子群が、また中央部分には VanM 型耐性遺伝子群が存在し、それぞれ外来性に獲得、挿入されたことが推定された。さらに右端側には、アミノグリコシド耐性遺伝子 (*aadE*, *aphA-3*) とエリスロマイシン耐

性遺伝子 (*ermB*) がクラスターとして存在しており、これらも外来性に獲得されたことが推定された (Fig. 7)。多剤耐性 pELF1 は複数の腸球菌種へ伝達可能であり、固体培地上での伝達実験で、pELF1 は *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. hirae*, *E. casseliflavus* にそれぞれ供与菌あたり $10^{-8} \sim 10^{-3}$ の頻度で伝達し、それぞれの受容菌に多剤耐性を付与した。pELF1 には既知の伝達関連遺伝子 *ftsK* を含む複数の複製関連遺伝子が存在したが、多くの遺伝子は機能未知であった。pELF1 の複製機構、接合

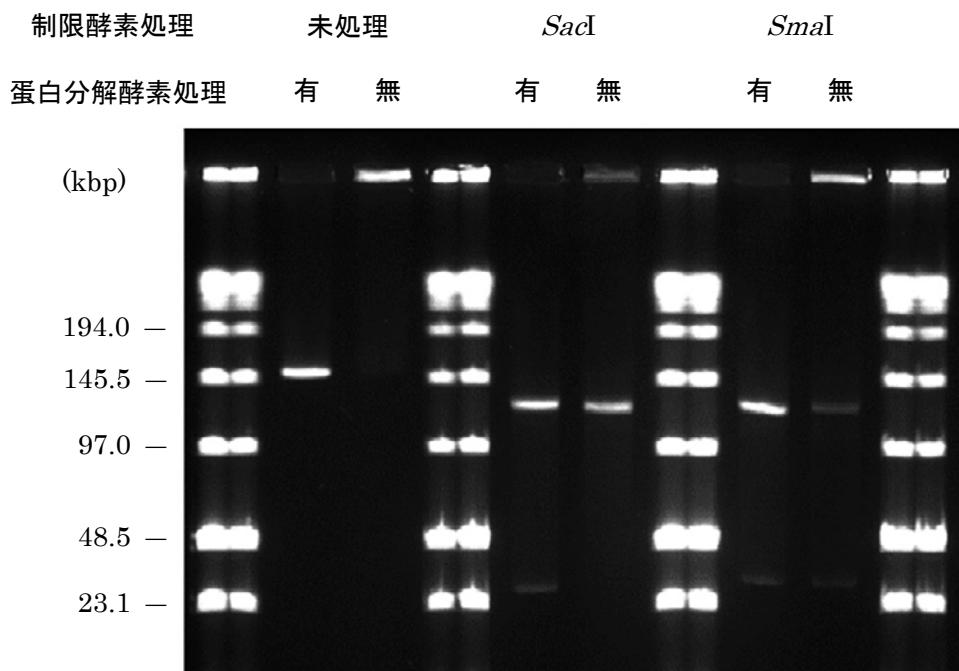


Fig. 6. Gel retardation assay of pELF1-DNA molecules.

pELF1 の DNA 分子の gel retardation assay の結果を示す。DNA の蛋白分解酵素 (proteinase K) 未処理の条件下でのみ、右端を含む DNA 断片が電気泳動されずにウェル内に留まつたことから、右端側に terminal protein (TP) の結合が示唆された。(文献 10 を改変)

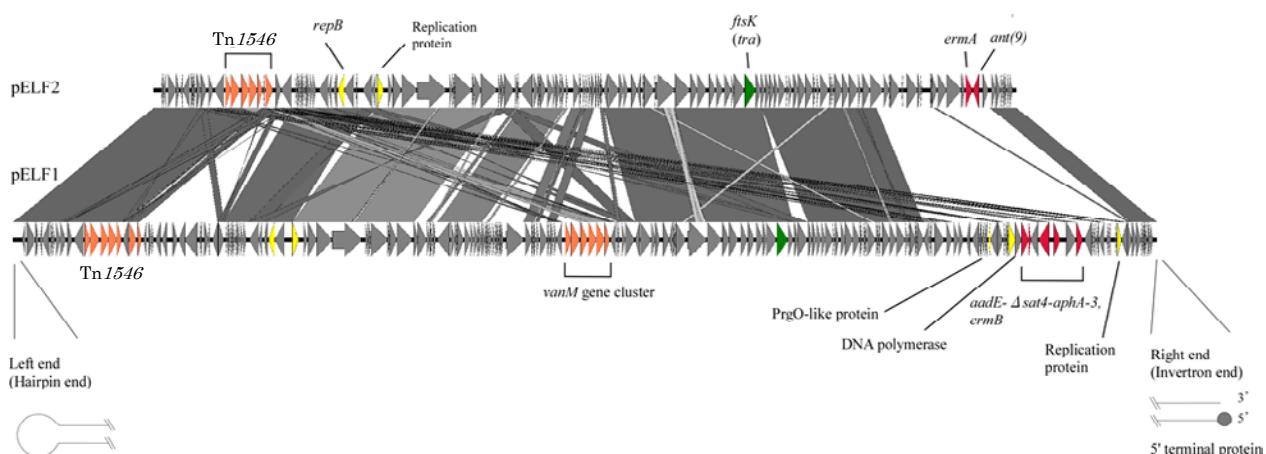


Fig. 7. Two pELF1-like linear plasmids found in Japanese VRE strains.

腸球菌のパンコマイシン耐性線状プラスミド pELF1 と pELF2 の構造比較を示す。全ゲノム配列 (WGS) 解析から、左端は hairpin loop を形成することが予想され、末端の loop 配列は 5'-TATA-3' であった。右端は複数の palindrome 配列を持ち、Fig. 6 で示されたように TP が結合した invertron 型であった。pELF1 には左端近傍に VanA 型耐性トランスポゾン Tn1546、中央付近に VanM 型耐性遺伝子群、右端近傍にアミノグリコシド耐性とエリスロマイシン耐性遺伝子クラスターの挿入を認めた。pELF2 も Tn1546 の挿入を認め、その挿入部位は pELF1 と類似していることから挿入ホットスポットの存在が推察された。いずれの Tn1546 も Fig. 1 のプロトタイプとは異なり、中国で分離された VanA 型 VRE にみられる構造と類似しており、耐性遺伝子あるいは耐性プラスミドの由来は中国であったことが推察される³³⁾。(文献 9 を改変)

伝達機構は極めてユニークなことが考えられることから、現在、これらの解析を進めている。

さらに私達は、pELF1と類似した構造を持つ、いわゆるpELF1型線状プラスミドを、国内で過去に分離された腸球菌 *E. faecium* 株や中国の臨床分離 VRE の *E. avium* 株にも見出している（未発表）。また近年、関西の医療施設において複数菌種 (*E. faecium*, *E. raffinosus*, *E. casseliflavus*) の VRE 株による院内感染事例が発生したが、これらの株は共通する pELF1 型バンコマイシン耐性伝達性線状プラスミドを保持しており、pELF2 と命名した (Fig. 7)⁹⁾。pELF2 は液体培地で異種間の伝達が可能であり、その伝達によって多菌種 VRE による院内感染が引き起こされたと考えられた。現在、臨床において感染症起因菌として注目されている菌種は *E. faecalis* と *E. faecium* のみである。今後、このような広宿主域を持つ高頻度接合伝達性の pELF1 型プラスミドが環境中に拡散した場合、バンコマイシン耐性を含めた薬剤耐性遺伝子の担体として、あるいは腸管内の耐性遺伝子のリザーバーとして他の腸球菌種も問題となることが考えられる。

7. 腸球菌の高頻度接合伝達性プラスミドの研究への利用

腸球菌の高頻度接合伝達性プラスミドは研究の対象としてだけではなく、解析用ツールとして各種グラム陽性菌の研究にも利用されている⁷⁾。大腸菌などのグラム陰性菌と比較して、グラム陽性菌においては効率的な遺伝子導入法は限られていた。現在、腸球菌の接合伝達機能を利用した遺伝子導入ツールが開発され、各種グラム陽性菌の研究解析に用いられている。特にフェロモン反応性プラスミド pCF10 の高頻度伝達性を利用して他菌種への効率的な遺伝子導入や組換え体の作成などが行われている^{7,14)}。pCF10 の oriT を組み込んだ組換え用プラスミドを共存する pCF10 による可動化によって他菌種へ接合伝達させることで、比較的容易に遺伝子導入や、組換え体の作成が出来るようになった。また私達は pAD1 の接合伝達調節領域の全てを組み込んだクローニング用ベクターを作成し、フェロモン (cAD1) あるいは拮抗フェロモン (iAD1) の添加によって厳密な調節が可能な遺伝子発現系を構築している（未発表）。この遺伝子発現系は *E. faecalis* だけでなく *E. hirae* においても機能することが示されており、他菌種への応用也可能と考えられる。この遺伝子発現系を用いることで、宿主菌にとって致死的な遺伝子のクローニングや遺伝形質の確認が可能となっている。将来的には pMG1 型プラスミドや pELF1 型プラスミドについても、そのような利用が可能かもしれない。

8. まとめ

腸球菌は腸管内常在菌として抗菌薬の暴露を受けやすく、また豊富な遺伝子伝達機構を持つことから、人類による抗菌薬の使用に伴う菌の薬剤耐性化が速やかに進んだと考えられている。治療薬としての各種抗菌薬の人への投与、あるいは肥育目的とした家畜への抗菌薬の投与

による選択圧によって耐性腸球菌がそれぞれ病院内、環境中に増加した。さらに腸球菌の持つ遺伝子伝達機構である伝達性プラスミドや伝達性トランスポゾンによって、耐性遺伝子の遺伝担体への集約と、その効率的な伝播と拡散が生じた。それらが急速な腸球菌の多剤耐性化と、VRE を含む多剤耐性腸球菌の増加を加速させた。このように腸球菌における多様な伝達性プラスミドと遺伝子伝達機構の存在は、薬剤耐性を含む様々な遺伝形質の外来からの獲得に寄与し、腸球菌の多様性と進化、環境への適応に重要な役割を担っている。一方で、腸球菌が長い進化の過程において、外界から様々な遺伝形質だけでなく多様な遺伝担体をも伝達機構として取り込んできた。腸球菌には pMG1 型や pELF1 型の他にも未知の伝達性プラスミドや新規の伝達機構が存在することも示されている²²⁾。これらのプラスミドの多くは非常に大きく (100 kbp 以上)、コピー数も少ない (1~2/cell) ことから、プラスミド DNA の分離、抽出を含め、その解析は容易ではない。今後、WGS 解析が進み、塩基配列データの蓄積によって、徐々にそれらが明らかになると見える。同時に、それら伝達性プラスミドを利用した様々な研究用ツールの開発も可能となるだろう。

文 献

- Bao, K. and S.N. Cohen. 2001. Terminal proteins essential for the replication of linear plasmids and chromosomes in *Streptomyces*. *Genes. Dev.* 15: 1518–1527.
- Clewel, D.B. 2007. Properties of *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1, a member of a widely disseminated family of pheromone responding, conjugative, virulence elements encoding cytolsin. *Plasmid*. 58: 205–227.
- Clewel, D.B. and G.M. Dunny. 2002. Conjugation and genetic exchange in enterococci. pp. 263–300. In M.S. Gilmore, D.B. Clewell, P. Courvalin, G.M. Dunny, B.E. Murry, and L.B. Rice (eds.), *The enterococci: pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance*. ASM Press, Washington, DC.
- Dunny, G.M., B.L. Brown, and D.B. Clewell. 1978. Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*: evidence for a bacterial sex pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75: 3479–3483.
- Fujimoto, S. and D.B. Clewell. 1998. Regulation of the pAD1 sex pheromone response of *Enterococcus faecalis* by direct interaction between the cAD1 peptide mating signal and the negatively regulating, DNA-binding TraA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 6430–6435.
- Fujimoto, S., H. Tomita, E. Wakamatsu, K. Tanimoto, and Y. Ike. 1995. Physical mapping of the conjugative bacteriocin plasmid pPD1 of *Enterococcus faecalis* and identification of the determinant related to the pheromone response. *J. Bacteriol.* 177: 5574–5581.
- Gilmore M.S., D.B. Clewell, Y. Ike, and N. Shankar (eds.). 2014. *Enterococci: from commensals to leading causes of drug resistant infection* [Internet]. Boston: Massachusetts Eye and Ear Infirmary.
- Grohmann, E., G. Muth, and M. Espinosa. 2003. Conjugative plasmid transfer in gram-positive bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67: 277–301.
- Hashimoto Y, I. Kita, M. Suzuki, H. Hirakawa, H. Ohtaki, and H. Tomita. 2020. First report of the local spread of vancomycin-resistant enterococci ascribed to the interspecies transmission of a vanA gene cluster-carrying linear plasmid. *mSphere*. 5: e00102–20.
- Hashimoto Y, M. Taniguchi, K. Uesaka, T. Nomura, H. Hirakawa, K. Tanimoto, K. Tamai, G. Ruan, B. Zheng, and H.

- Tomita. 2019. Novel multidrug-resistant enterococcal mobile linear plasmid pELF1 encoding *vanA* and *vanM* gene clusters from a Japanese vancomycin-resistant enterococci isolate. *Front. Microbiol.* 10: 2568.
- 11) Hinnebusch, J. and K. Tilly. 1993. Linear plasmids and chromosomes in bacteria. *Mol. Microbiol.* 10: 917–922.
 - 12) Ike, Y., K. Tanimoto, Y. Ozawa, T. Nomura, S. Fujimoto, and H. Tomita. 1999. Vancomycin-resistant enterococci in imported chickens in Japan. *Lancet* 353: 1854.
 - 13) Ike, Y., K. Tanimoto, H. Tomita, K. Takeuchi, and S. Fujimoto. 1998. Efficient transfer of the pheromone-independent *Enterococcus faecium* plasmid pMG1 (Gm^r) (65.1 kbp) to *Enterococcus* strains during broth mating. *J. Bacteriol.* 180: 4886–4892.
 - 14) Kristich, C.J., J.R. Chandler, and G.M. Dunny. Development of a host-genotype-independent counterselectable marker and a high-frequency conjugative delivery system and their use in genetic analysis of *Enterococcus faecalis*. 2007. *Plasmid*. 57: 131–144.
 - 15) Kurushima J, Y. Ike, and H. Tomita. 2016. Partial diversity generates effector immunity specificity of the Bac41-like bacteriocins of *Enterococcus faecalis* clinical strains. *J. Bacteriol.* 198: 2379–2390.
 - 16) Kurushima J, I. Hayashi, M. Sugai, and H. Tomita. 2013. Bacteriocin protein BacL₁ of *Enterococcus faecalis* is a peptidoglycan D-isoglutamyl-L-lysine endopeptidase. *J. Biol. Chem.* 288: 36915–36925.
 - 17) Lim, S.K., K. Tanimoto, H. Tomita, and Y. Ike. 2006. Pheromone responsive conjugative vancomycin resistance plasmids in *Enterococcus faecalis* isolates from humans and chicken feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 6544–6553.
 - 18) Nomura T, Y. Hashimoto, J. Kurushima, H. Hirakawa, K. Tanimoto, B. Zheng, G. Ruan, F. Xue, J. Liu, J. Hisatsune, M. Sugai, and H. Tomita. 2018. New colony multiplex PCR assays for the detection and discrimination of vancomycin-resistant enterococcal species. *J. Microbiol. Methods*. 145: 69–72.
 - 19) Schroder, G. and E. Lanka. 2005. The mating pair formation system of conjugative plasmids—versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA. *Plasmid* 54: 1–25.
 - 20) Shiojima, M., H. Tomita, K. Tanimoto, S. Fujimoto, and Y. Ike. 1997. High-level plasmid-mediated gentamicin resistance and pheromone response of plasmids present in clinical isolates of *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41: 702–705.
 - 21) Suzuki A, M. Mori, Y. Sakagami, A. Isogai, M. Fujino, C. Kitada, R.A. Craig, and D.B. Clewell. 1984. Isolation and structure of bacterial sex pheromone, cPD1. *Science*. 226: 849–850.
 - 22) Takeuchi, K., H. Tomita, S. Fujimoto, M. Kudo, H. Kuwano, and Y. Ike. 2005. Drug resistance of *Enterococcus faecium* clinical isolates and the conjugative transfer of gentamicin and erythromycin resistance traits. *FEMS Microbiol. Lett.* 243: 347–354.
 - 23) Tanimoto, K. and Y. Ike. 2002. Analysis of the conjugal transfer system of the pheromone-independent highly transferable Enterococcus plasmid pMG1: identification of *tra* gene (*traA*) upregulated during conjugation. *J. Bacteriol.* 184: 5800–5804.
 - 24) Tanimoto, K. and Y. Ike. 2008. Complete nucleotide sequencing and analysis of the 65-kb highly-conjugative *Enterococcus faecium* plasmid pMG1: identification of the transfer-related region and the minimum region required for replication. *FEMS Microbiol. Lett.* 288: 186–195.
 - 25) Tomita, H. and D.B. Clewell. 2000. A pAD1-encoded small RNA molecule, mD, negatively regulates *Enterococcus faecalis* pheromone response by enhancing transcription termination. *J. Bacteriol.* 182: 1062–1073.
 - 26) Tomita, H., S. Fujimoto, K. Tanimoto, and Y. Ike. 1996. Cloning and genetic organization of the bacteriocin 31 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYI17. *J. Bacteriol.* 178, 3585–3593.
 - 27) Tomita, H., S. Fujimoto, K. Tanimoto, and Y. Ike. 1997. Cloning and genetic and sequence analyses of the bacteriocin 21 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone responsive conjugative plasmid pPD1. *J. Bacteriol.* 179: 7843–7855.
 - 28) Tomita, H. and Y. Ike. 2005. Genetic analysis of transfer-related regions of the vancomycin resistance *Enterococcus* conjugative plasmid pHT_β: identification of *oriT* and a putative relaxase gene. *J. Bacteriol.* 187: 7727–7737.
 - 29) Tomita, H. and Y. Ike. 2008. Genetic analysis of the *Enterococcus* vancomycin-resistance conjugative plasmid pHT_β: identification of the region involved in cell aggregation and *traB*, a key regulator gene for plasmid transfer and cell aggregation. *J. Bacteriol.* 190: 7739–7753.
 - 30) Tomita, H., E. Kamei, and Y. Ike. 2008. Cloning and genetic analyses of the bacteriocin 41 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYI14: a novel bacteriocin complemented by two extracellular components (lysin and activator). *J. Bacteriol.* 190: 2075–2085.
 - 31) Tomita, H., C. Pierson, S.K. Lim, D.B. Clewell, and Y. Ike. 2002. Possible connection between a widely disseminated conjugative gentamicin resistance (pMG1-like) plasmid and the emergence of vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* 40: 3326–3333.
 - 32) Tomita, H., K. Tanimoto, S. Hayakawa, K. Morinaga, K. Ezaki, H. Oshima, and Y. Ike. 2003. Highly conjugative pMG1-like plasmids carrying Tn1546-like transposons that encode vancomycin resistance in *Enterococcus faecium*. *J. Bacteriol.* 185: 7024–7028.
 - 33) Zheng, B., H. Tomita, Y.H. Xiao, S. Wang, Y. Li, and Y. Ike. 2007. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* isolates from mainland China. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2813–2818.
 - 34) Zheng, B., H. Tomita, T. Inoue, Y. Arakawa, and Y. Ike. 2009. The isolation of VanB-type *Enterococcus faecalis* strains from nosocomial infections. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 53: 735–747.