

論文の内容の要旨

薬剤耐性黄色ブドウ球菌 MRSA の病原性抑制機構の解明

幾尾真理子

【導入】

感染症は現代においてもヒトの死亡要因の第一位を占める。薬剤耐性を獲得した黄色ブドウ球菌 MRSA (Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*)による感染症は抗生物質では治療できず、临床上大きな問題となっている。従来、病院において分離される MRSA (HA-MRSA: hospital associated MRSA) は免疫力の低下した患者に感染する。しかし近年では、健常人に対しても高い病原性を示す市井感染型 MRSA (CA-MRSA: Community acquired MRSA) が出現し脅威となっている。しかしこれまで CA-MRSA と HA-MRSA の病原性の差の原因は不明だった。本研究において私は、両者の病原性の違いを導く原因因子として新規機能性 RNA *psm-mec* を同定した。

MRSA (薬剤耐性黄色ブドウ球菌)		
	HA-MRSA	CA-MRSA
病原性	低い (日和見感染)	高い (健常人に感染)
<i>psm-mec</i> 遺伝子	有り	無し

表 1 HA-MRSA および CA-MRSA の病原性と *psm-mec* 遺伝子の存否

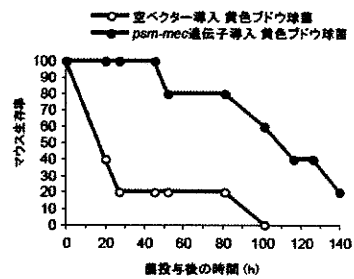


図 1 *psm-mec* 遺伝子は黄色ブドウ球菌の動物殺傷能を抑制する CD-1 マウス静脈内に CA-MRSA およびその *psm-mec* 遺伝子導入株 (2×10^8 CFU) を注射した。

【結果と考察】

HA-MRSA が持つ薬剤耐性遺伝子領域 SCC_{mec} 上の 遺伝子 *psm-mec* は黄色ブドウ球菌の病原性を抑制す る。

MRSA は遺伝子領域 SCC_{mec} の獲得により薬剤耐性となる。HA-MRSA と CA-MRSA の持つ SCC_{mec} 領域を比較すると、CA-MRSA は *psm-mec* 遺伝子を含む領域を欠損していた。私は *psm-mec* 遺伝子が HA-MRSA の病原性を抑制していると考え検討した。CA-MRSA に *psm-mec* 遺伝子を導入すると、敗血症モデルにおいてマウス殺傷能が低下した(図 1)。この結果は HA-MRSA の薬剤耐性遺伝子領域 SCC_{mec} 上に存在する *psm-mec* 遺伝子が CA-MRSA の動物殺傷能を抑制すること、すなわち HA-MRSA と CA-MRSA の病原性の差が *psm-mec* 遺伝子の存否によって導かれることを示唆している。*psm-mec* 遺伝子導入株の表現型を解析したところ、好中球を溶解する毒素 PSM α の発現量が減少し(図 2B)、バイオフィーム形成能が上昇した(図 2C)。敗血症モデルでは毒素 PSM α が重要な役割を果たすことから、*psm-mec* 遺伝子を導入した黄色ブドウ球菌における PSM α の発現量の低下がマウスに対する病原性の低下を導くと考えられる。

psm-mec 遺伝子の翻訳産物はバイオフィーム形成を促進し、 転写産物は RNA として細胞溶解毒素 PSM α の発現を抑制する。

2010年に海外のグループから *psm-mec* 遺伝子産物が毒素活性を有することが報告された。しかし私たちが見出した *psm-mec* 遺伝子の病原性抑制効果は PSM-mec タンパク質の毒素活性では説明できない。この点を説明するため最初に私は、PSM-mec タンパク質が病原性抑制効果を持つかどうか検討した。終止コドンを導入した変異型 *psm-mec* 遺伝子(図 2A)はバイオフィーム形成促進活性が低下したが(図 2C)、好中球溶解毒素 PSM α の発現抑制活性は維持された(図 2B)。よって PSM-mec タンパク質はバイオフィーム形成促進活性を有するが、PSM α 発現の抑制効果を持たないことが示唆された。次に、*psm-mec* 遺伝子の PSM α 発現抑制効果が *psm-mec* RNA によるかを検討した。*psm-mec* 遺伝子のプロモーター領域に変異を導入すると(図 2A)、PSM α の発現抑制効果が失われた(図 2B)。したがって *psm-mec* 遺伝子の転写産物が PSM α の発現を抑制することが示唆された。この点についてさらに検証するため、塩基配列を同義コドンに置換した *psm-mec* 遺伝子を作成した(図 2A)。同義コドン置換型 *psm-mec* 遺伝子においては、RNA 配列は変化するが野生型 PSM-mec タンパク質と同じアミノ酸配列を有するタンパク質が翻訳される。同義コドン置換型 *psm-mec* 遺伝子は、野生型 *psm-mec* 遺伝子と同程度の PSM-mec タンパク質を発現したが、PSM α 発現抑制活性は低下していた(図 2D-1)。また野生型

psm-mec 遺伝子または同義コドン置換型 *psm-mec* 遺伝子をアンハイドロテトラサイクリン(ATc)誘導性プロモーターに接続すると、野生型 *psm-mec* 遺伝子導入株では ATc の添加により PSM α の発現が抑制されたが、同義コドン置換型 *psm-mec* 遺伝子導入株においては ATc を添加しても PSM α の発現はほとんど抑制されなかった(図 2E)。以上の結果は、*psm-mec* 遺伝子の翻訳産物ではなく、転写産物が機能性 RNA として細胞溶解毒素 PSM α の発現を抑制することを示唆している。

薬剤耐性遺伝子領域 SCCmec 上の *psm-mec* 遺伝子は

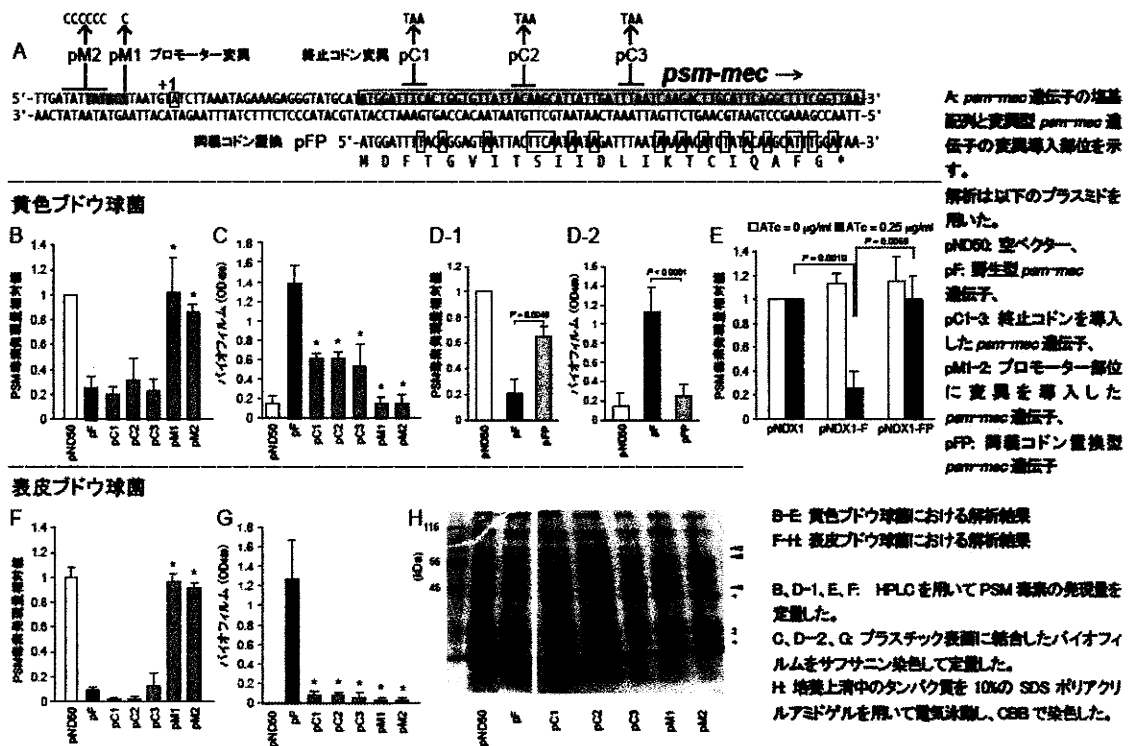
表皮ブドウ球菌においてもバイオフィーム形成を促進し、細胞溶解毒素 PSM β の発現を抑制する

表皮ブドウ球菌も SCCmec 領域を獲得して薬剤耐性表皮ブドウ球菌となる。表皮ブドウ球菌はバイオフィーム形成能が強く医療用器具への付着が問題となる。私は黄色ブドウ球菌での結果をふまえ、*psm-mec* 遺伝子が表皮ブドウ球菌のバイオフィーム形成を増強しているのではないかと考えた。薬剤感受性型表皮ブドウ球菌に *psm-mec* 遺伝子およびその変異型遺伝子(図 2A)を導入した。野生型 *psm-mec* 遺伝子は PSM α と同じファミリーに属する毒素である PSM β の発現を抑制する一方(図 2F)、バイオフィーム形成能を上昇させた(図 2G)。終止コドンを導入した *psm-mec* 遺伝子は PSM β 発現抑制活性を維持していたが(図 2F)、バイオフィーム形成促進活性は低下していた(図 2G)。プロモーター部位に変異を導入した *psm-mec* 遺伝子はこれらの活性を失っていた(図 2 F,G)。また *psm-mec* 遺伝子を導入した表皮ブドウ球菌においては分泌タンパク質の発現パターンが変化した(図 2H)。終止コドンを導入した *psm-mec* 遺伝子も分泌タンパク質の発現パターンを変化させたが、プロモーター部位の変異を導入した *psm-mec* 遺伝子は分泌タンパク質の発現パターンをほとんど変化させなかった。(図 2H)。以上の結果は、表皮ブドウ球菌においても *psm-mec* 遺伝子が機能すること、PSM-mec タンパク質がバイオフィーム形成を促進すること、*psm-mec* RNA が細胞溶解毒素 PSM β を含む分泌タンパク質の発現を調節することを示唆する。

psm-mec 遺伝子は *agr* の発現を抑制する。

次に私は黄色ブドウ球菌において *psm-mec* RNA が細胞溶解毒素 PSM α の発現を抑制する機構について検討した。一般に機能性 RNA は、標的 RNA の安定性、翻訳効率を制御して翻訳産物の発現量を変えることが知られている。この点を検証するため私は、*psm-mec* 遺伝子によって発現量が変化する PSM α 以外のタンパク質を探索した。*psm-mec* 遺伝子の導入により、D-乳酸脱水素酵素(Ddh)、プロテイン A (Spa)の発現量が上昇した(図 3A)。黄色ブドウ球菌の AgrA は、Ddh と Spa の発現を抑制し、

PSM α の発現を促進する転写因子である。 *psm-mec* 遺伝子は、AgrA の発現を抑制して、Ddh と Spa の発現の上昇と PSM α の発現の低下を導くと私は予想した。 *psm-mec* 遺伝子は *agrA* 遺伝子のプロモーター活性と mRNA 量には影響しなかったが、AgrA タンパク質の発現量を低下させた(図 3B)。さらに *psm-mec* 遺伝子の導入により AgrA タンパク質に融合させたルシフェラーゼの発現が低下した(図 3C)。以上の結果は *psm-mec* 遺伝子が *agrA* 遺伝子の翻訳を抑制して黄色ブドウ球菌の病原性を抑制することを示唆する。



psm-mec 遺伝子の発現には

病原性制御領域 *agr* が必要である

最後に私は、*psm-mec* 遺伝子自身の発現がどのように制御されるかについて検討した。臨床分離された MRSA 株の中には、*psm-mec* 遺伝子を持つにもかかわらず、PSM-mec タンパク質を発現しない株が存在し、PSM α 毒素の発現も見られなかった。これらの株においては、*agr* 領域が変異しているために PSM-mec 及び PSM α が発現していないのではないかと私は考えた。*psm-mec* 遺伝子を持つ HA-MRSA 25 株中 6 株において、*agr* 領域中に *agr* の機能を失わせ

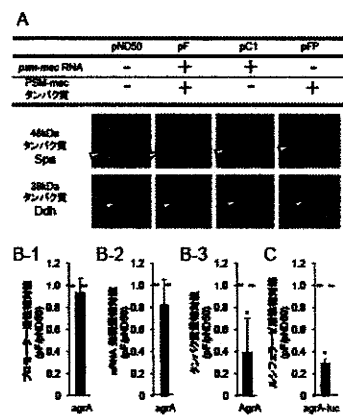


図 3 *psm-mec* 遺伝子による病原性制御因子 AgrA の発現変化

A: 黄色ブドウ球菌のタンパク質を 2 次元ゲル電気泳動した後、ペプチドマスマフィンガープリント法によりタンパク質を測定した。

B-1: ルシフェラーゼプロモーターアッセイにより *agrA* 遺伝子のプロモーター活性を測定した。B-2 定量的 RT-PCR 法により *agrA* mRNA 量を測定した。B-3 ウェスタンブロット法により AgrA タンパク質量を測定した。

C: AgrA タンパク質に融合させたルシフェラーゼの発現を測定した。

る変異が見出された。これら 6 株では PSM-mec タンパク質は発現していなかった。さらに実験株の *agr* 領域を欠損させると、*psm-mec* 遺伝子のプロモーター活性が低下した(図 4)。従って、病原性制御領域 *agr* は *psm-mec* 遺伝子の発現に必要であると考えられる。

【まとめ】

本研究で私は、可動性遺伝子領域 *SCCmec* に存在する *psm-mec* 遺伝子が、薬剤耐性ブドウ球菌の病原性の強弱を決定することを明らかにした。さらに *psm-mec* 遺伝子の転写産物自身が病原性抑制機能を有することを明らかにした。*psm-mec* 遺伝子の機能は *SCCmec* が伝播する表皮ブドウ球菌でも保存されていた。*psm-mec* 遺伝子は *agr* 領域によって

正の発現調節を受け、発現した *psm-mec* 遺伝子は *agr* 領域の発現を抑制する(図 5)。この仕組みは、ブドウ球菌属において毒素の発現を適度に抑制する機構であると解釈できる。宿主動物を殺傷せずに共生をはかることを可能にするこの仕組みは、ブドウ球菌属と *SCCmec* 領域双方にとって利益をもたらしてきたと考えられる。

【発表論文】

- 1) Ikuo M, Kaito C, Sekimizu K. *Microb Pathog.* **2010**, 49(1-2):1-7.
- 2) Kaito C, Saito Y, Nagano G, Ikuo M, Omae Y, Hanada Y, Han X, Kuwahara-Arai K, Hishinuma T, Baba T, Ito T, Hiramatsu K, Sekimizu K. *PLoS Pathog.* **2011**, 7(2) :e1001267.

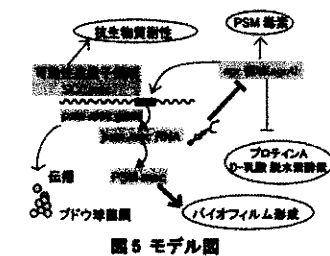
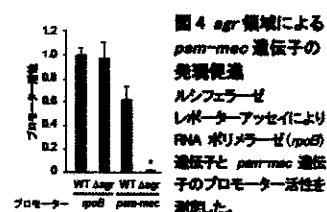


図 5 モデル図