

〔別紙2〕

審査の結果の要旨

氏名 幾尾 真理子

感染症は現代においてもヒトの重大な死亡要因の一つである。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、臨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、健康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。ところが、これまでCA-MRSAとHA-MRSAの病原性の差を説明することはできていなかった。薬剤耐性菌の病原性制御機構の理解は、薬剤耐性菌感染症の治療に貢献する重要な課題である。本研究において申請者は、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*を同定し解析した。

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。このことから申請者は*psm-mec*遺伝子がHA-MRSAの病原性を抑制していると考えて検討を行った。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。この結果より、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申請者は示唆している。さらに、*psm-mec*遺伝子を導入すると好中球を溶解する毒素PSM α の発現量が減少し、バイオフィルム形成能が上昇した。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申請者は考察している。

*psm-mec*遺伝子が病原性を制御する機構を理解するために、まず申請者は*psm-mec*遺伝子の翻訳産物である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*遺伝子はバイオフィルム形成促進活性が低下したが、好中球溶解毒素PSM α の発現抑制活性は維持された。よってPSM-mecタンパク質はバイオフィル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と申請者は考えた。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、PSM α の発現抑制効果が失われた。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。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。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。以上の結果から、*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申請者は示唆している。

SCC*mec*領域は黄色ブドウ球菌以外のブドウ球菌属である表皮ブドウ球菌にも存在し、薬剤耐性表皮ブドウ球菌をうむ。表皮ブドウ球菌はバイオフィーム形成能が強く、カテーテルや心臓弁などの医療用器具への付着が問題となる。申請者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増強の原因となっ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、バイオフィーム形成能を上昇させた。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、バイオフィーム形成促進活性は低下していた。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。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。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。以上の結果から、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申請者は示唆している。

次に申請者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申請者は、*psm-mec* 遺伝子によって発現量が増加する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) の発現量が増加した。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申請者は予想した。*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。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。以上の結果から、*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している。

最後に申請者は、*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申請者は考えた。*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。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申請者は考察している。

本研究において、可動性遺伝子領域SCC*mec*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申請者は明らかにした。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SCC*mec*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。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SCC*mec*領域双方にとって利益をもたらしてきたと考えられる。HA-MRSAとCA-MRSAの病原性の違いの原因を明らかにし、新規機能性RNAとして*psm-mec* RNAを同定しその病原性調節機構について明らかにした本研究は、薬剤耐性菌を原因とする感染症の理解及び治療法の開発に大きく貢献するものである。よって申請者は、博士（薬学）の学位を受けるに十分な資格を有すると判定した。