

論文の内容の要旨

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌が持つ病原性抑制機構に関する研究

齊藤 祐樹

【序論】

抗生物質メチシリンに対して耐性能を獲得した黄色ブドウ球菌 MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) の出現は臨床上大きな問題となっている。MRSA はその出現以来、病院内を主な感染の場とする日和見感染菌とされてきた。しかし、近年では市中でも MRSA の感染例が報告されている。市中感染型 MRSA は病院分離型 MRSA よりも高い病原性を示し、健常人に対しても病気を引き起こすため、社会的に問題となっている。市中感染型 MRSA の高い病原性の原因は細胞外毒素の高発現であるとされているが、それを導く分子メカニズムについては不明である。

MRSA はゲノム上に、SCCmec 領域と呼ばれる外来遺伝子領域を有する。SCCmec 領域にはメチシリン耐性遺伝子を含む複数の遺伝子が存在する。市中感染型 MRSA が獲得した SCCmec 領域は病院分離型 MRSA の SCCmec 領域に比べて短く、いくつかの遺伝子領域に欠損が生じている。私は病院分離型 MRSA の SCCmec 領域において特異に見いだされる遺伝子が病原性を抑制する効果を持つと考え、遺伝子の同定とその機能解析に着手した。その結果私は、病院分離型 MRSA に特有の遺伝子である *psm-mec* 遺伝子と *mecR2* 遺伝子が MRSA の病原性を抑制する機能を持つことを見いだした。

【結果】

1. *psm-mec* RNA は MRSA の病原性を抑制する

病院分離型 MRSA と市中感染型 MRSA の SCCmec 領域を比較すると、市中感染型 MRSA の SCCmec

領域では *psm-mec* 遺伝子の周辺領域を欠損していた。そこで私は *psm-mec* 遺伝子が病原性を抑制する機能を持つかについて検討した。その結果、*psm-mec* 遺伝子を市中感染型 MRSA に導入すると、マウス全身感染モデルにおける病原性が低下した (図 1)。この結果は、*psm-mec* 遺伝子が MRSA の病原性を抑制する機能を有することを示唆している。*psm-mec* 遺伝子を導入した市中感染型 MRSA について表現型を解析したところ、PSM α の産生能が抑制されていることがわかった (図 1)。PSM α は黄色ブドウ球菌が放出する低分子の細胞溶解毒素で α 1、 α 2、 α 3、 α 4 の 4 種が同定されており、市中感染型 MRSA の高病原性を説明する重要な毒素である。さらに、PSM α の産生能を抑制する機能は、*psm-mec* 遺伝子に終止コドンを導入しても保持されていることがわかった。したがって、*psm-mec* 遺伝子の翻訳産物ではなく、転写産物が PSM α の産生を抑制する活性を担うと考えられた。すなわち、病院分離型 MRSA がもつ *psm-mec* 遺伝子の転写産物が機能性 RNA として MRSA の病原性を抑制していることがわかった。

2. *psm-mec* RNA は *agrA* mRNA と結合し、AgrA の翻訳を抑制する

次に私は、*psm-mec* RNA が細胞溶解毒素 PSM α の産生を抑制するメカニズムの解明を試みた。*psm-mec* 遺伝子を導入した黄色ブドウ球菌では、PSM α をコードする *psm α* 遺伝子のプロモーター活性および mRNA 量が低下していた。この結果は、*psm-mec* RNA は *psm α* の転写を抑制していることを示唆している。*psm α* の転写を正に制御する転写因子として AgrA が知られている。そこで *psm-mec* 遺伝子が AgrA の発現を抑制しているかについて検討した。その結果、AgrA をコードする *agrA* 遺伝子の mRNA 量は *psm-mec* 遺伝子導入株と非導入株との間で同程度であったのに対し、AgrA タンパク質の発現量は *psm-mec* 遺伝子導入株において減少していることが判明した (図 2A)。また、AgrA タンパク質の発現量の低下は、終止コドン変異を持つ *psm-mec* 遺伝子を導入した株においてもみられた (図 2A)。これらの

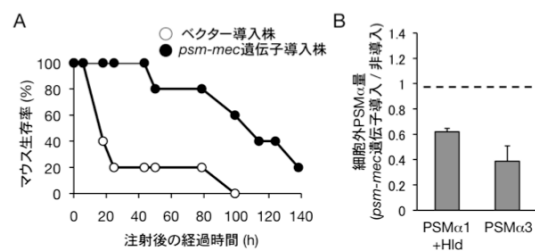


図 1 *psm-mec* 遺伝子はマウスへの病原性および毒素産生を抑制する

A. ICR マウスへ市中感染型 MRSA およびその *psm-mec* 遺伝子導入株を静脈内注射した。
B. 市中感染型 MRSA およびその *psm-mec* 遺伝子導入株の培養上清中の PSM α 量を HPLC により定量した。縦軸は、非導入株に対する *psm-mec* 遺伝子導入株の産生量の比を示す。

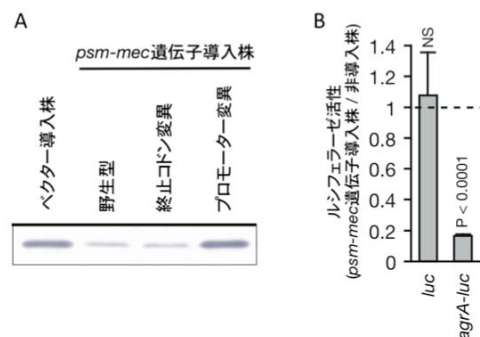


図 2 *psm-mec* RNA は *agrA* の翻訳を抑制する

A. 野生型、終止コドン変異型、プロモーター変異型の *psm-mec* 遺伝子を導入した黄色ブドウ球菌について、菌体内の AgrA をウエスタンブロットングにより検出した。
B. *agrA* ORF を融合したルシフェラーゼ遺伝子を黄色ブドウ球菌へ導入し、*psm-mec* 遺伝子を導入した時のルシフェラーゼ活性の変化率を求めた。
(* *luc* = ルシフェラーゼ遺伝子)

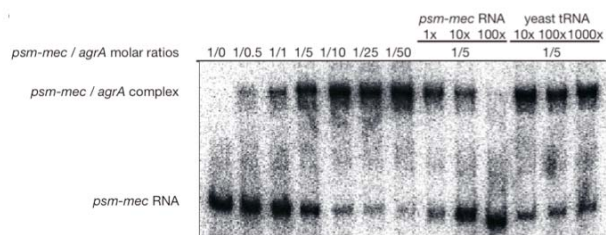


図 3 *psm-mec* RNA は *agrA* mRNA と特異的に結合する

³²P で標識した *psm-mec* RNA に対して各濃度の *agrA* RNA を添加し、ゲルシフトアッセイに供した。さらに、非標識の *psm-mec* RNA もしくは酵母由来の tRNA を添加し、ゲルシフトアッセイに供した。

結果、AgrA をコードする *agrA* 遺伝子の mRNA 量は *psm-mec* 遺伝子導入株と非導入株との間で同程度であったのに対し、AgrA タンパク質の発現量は *psm-mec* 遺伝子導入株において減少していることが判明した (図 2A)。また、AgrA タンパク質の発現量の低下は、終止コドン変異を持つ *psm-mec* 遺伝子を導入した株においてもみられた (図 2A)。これらの

結果から、*psm-mec* RNA は AgrA の翻訳を抑制していると考えられた。翻訳段階を抑制しているかについて検討するために、*agrA* ORF を融合させたルシフェラーゼ遺伝子を DNA ジャイレースのプロモーターの下流に組み込んだ構造を持つプラスミドを作成し、黄色ブドウ球菌に導入した。この株に *psm-mec* 遺伝子を導入したところ、ルシフェラーゼの発現量が低下した（図 2B）。この結果は、*psm-mec* RNA による PSM α の産生能の低下は、転写因子である AgrA の翻訳の抑制によることを示唆している。そこで AgrA の翻訳抑制が、*psm-mec* RNA と *agrA* mRNA の直接の結合によるかについて検討した。その結果、*psm-mec* RNA は *agrA* mRNA と特異的に結合することが見いだされた（図 3）。

さらに、*agrA* mRNA と結合することが予測される配列に変異を導入した変異型 *psm-mec* RNA は *agrA* mRNA と結合しなかった。次に、ここで用いた変異型 *psm-mec* 遺伝子、および *agrA* mRNA との予測結合配列を欠損した欠損型 *psm-mec* 遺伝子を導入した株の PSM α 産生量および AgrA タンパク質の発現量を測定した。その結果、欠損型 *psm-mec* 遺伝子および変異型 *psm-mec* 遺伝子を導入した株では、野生型 *psm-mec* 遺伝子を導入した株に比べて PSM α および AgrA の発現量を低下させる機能が減弱していることがわかった（図 4）。以上の結果から、*psm-mec* RNA は *agrA* mRNA と結合して AgrA の翻訳を抑制し、PSM α の産生を抑制することが示唆された。

3. 病院分離型 MRSA が持つ *psm-mec* 遺伝子の機能の検討

次に私は、病院分離型 MRSA が内在的に持つ *psm-mec* 遺伝子が MRSA 自身の病原性を抑制しているかについて検討した。関東地方の病院より分離された 326 株の MRSA について *psm-mec* 遺伝子の塩基配列を解析した結果、*psm-mec* 遺伝子のプロモーター部位に変異を持つ株が 24% 存在することが判明した。また、*psm-mec* 遺伝子を欠損している株が 9% 存在した。これらの株は、野生型の *psm-mec* 遺伝子を持つ株に比べて高い PSM α 産生量を示した（図 5）。したがって、*psm-mec* 遺伝子の変異や有無と毒素産生量に対応関係があることが示唆された。次に、*psm-mec* 遺伝子が MRSA の毒素産生能の抑制に必要なかについて、野生型の *psm-mec* 遺伝子を有する MRSA 株のうち 18 株について *psm-mec* 遺伝子欠損株を作成し、検討した。その結果、14 株においては *psm-mec* 遺伝子の欠損による AgrA タンパク質の発現量の上昇が見られ、13 株において PSM α 産生量の上昇がみられた。このうち 3 株について動物個体に対する病原性を検討したと

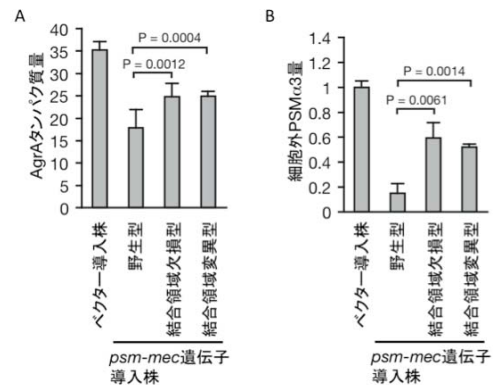


図 4 *psm-mec* RNA と *agrA* mRNA の結合により AgrA の翻訳が阻害される

agrA mRNA との結合が予測される配列を欠損、または変異を導入した *psm-mec* 遺伝子を導入した株について AgrA および PSM α 3 の発現量を定量した。

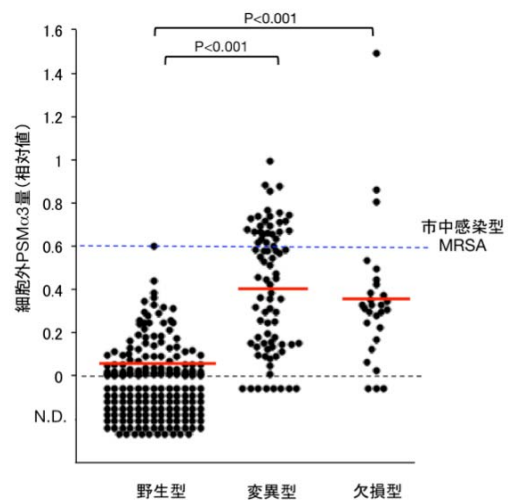


図 5 *psm-mec* 遺伝子の変異や有無と毒素産生量の対応関係

臨床分離された MRSA について、培養上清中の PSM α 3 の産生量を HPLC にて定量した。

ころ、いずれの株においても *psm-mec* 遺伝子欠損株ではマウスに対する病原性が上昇していた。以上の結果から、病院分離型 MRSA は *psm-mec* 遺伝子を持つために自身の PSM α の産生が抑制され、病原性を低下させていることが示唆された。

4. *mecR2* 遺伝子も毒素産生能を抑制する機能を有する

psm-mec 遺伝子欠損株の PSM α の産生量は親株に比べて増加するものの、市中感染型 MRSA の PSM α 産生量には到達していない。私は *psm-mec* 遺伝子以外にも PSM α の産生を抑制する遺伝子が存在すると考え、新たな病原性抑制遺伝子の検索をおこなった。*psm-mec* 遺伝子のアンチセンス鎖には、*mecR1-mecI-mecR2* の 3 遺伝子から構成されるオペロンが存在する。市中感染型 MRSA の SCC*mec* 領域では、*mecR1* の 3' 末端側から *mecR2* 遺伝子までを欠損している。そこで、これらの遺伝子が毒素産生能を抑制する機能を持つかについて検討した。その結果、*psm-mec* 遺伝子と *mecR2* 遺伝子の二重欠損株は、*psm-mec* 遺伝子単独欠損株に比べて PSM α の産生量が上昇していることが見出された (図 6)。この結果は、*psm-mec* 遺伝子とともに *mecR2* 遺伝子も病原性抑制遺伝子であることを示唆している。

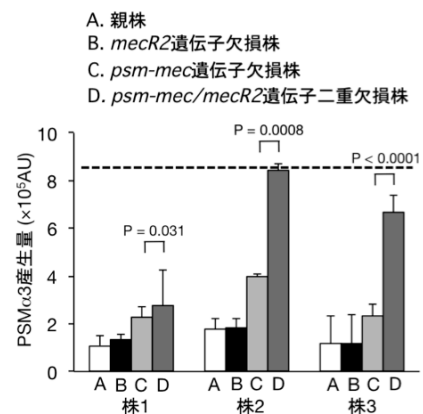


図 6 *mecR2* 遺伝子は毒素産生を抑制する
臨床分離された MRSA について各遺伝子欠損株を作成し、培養上清中の PSM α 3 の産生量を HPLC にて定量した。破線は市中感染型 MRSA (FRP3757 株) の PSM α 3 の産生量を示す。

【考察】

私は、病院分離型 MRSA の SCC*mec* 領域に存在する *psm-mec* 遺伝子から転写される *psm-mec* RNA が、転写因子 AgrA の翻訳を阻害し、毒素 PSM α の発現を抑制することを見いだした。さらに、*psm-mec* 遺伝子の他に *mecR2* 遺伝子が PSM α の発現を抑制する機能を持つことを見いだした。MRSA が獲得した SCC*mec* 領域から病原性の抑制に機能する遺伝子を同定した例は本研究が初めてである。病院分離型 MRSA はこれらの遺伝子を獲得することにより自らの病原性を抑え、免疫力の低下した患者の中で潜伏感染し続けるという戦略をとっていると考えられる。一方、市中感染型 MRSA は *psm-mec* 遺伝子および *mecR2* 遺伝子を欠損しているために病原性を抑えられず、高病原性を示していると考えられる。市中感染型 MRSA は、*psm-mec* 遺伝子および *mecR2* 遺伝子を欠損した SCC*mec* 領域を獲得することにより、市中の健康人に感染する能力を得たと考えられる。

【発表論文】

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.

Transcription and translation products of the cytolysin gene *psm-mec* on the mobile genetic element SCC*mec* regulate *Staphylococcus aureus* virulence.

PLoS Pathogens. 2011; 7, (2) e1001267