

ゲノム解析に基づく院内感染原因菌の病原性評価のための情報基盤の確立

●菅井 基行¹⁾ ◆後藤 直正²⁾

1) 広島大学大学院医歯薬学総合研究科 2) 京都薬科大学薬学部

<研究の目的と進め方>

本研究では主に黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*)、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) およびセラチア (*Serratia marcescens*) の全ゲノムを研究対象として、それぞれ院内感染発症のメカニズムを明らかにし、病原性の本態を明らかにすることを目的に下記の方針で研究を進めた。

[I] 黄色ブドウ球菌

異なる病原性を示すゲノタイプを明らかにし、そのゲノタイプに特徴的なゲノム情報を明らかにすること、獲得免疫系を欠いた無脊椎動物であるカイコをモデル生物に用いて異なるゲノタイプの菌株の病原性を評価すること、環境変化に伴う遺伝子発現制御解析を行うこと。

[II] セラチア

ヒト血清に感受性化した変異株を検索し、その原因を明らかにすることによって、セラチア菌のヒト血清耐性メカニズムを解明すること、また、獲得免疫系を欠いた無脊椎動物であるカイコをモデル生物に用いて、IVET (in vivo expression technology) 法による生体環境応答遺伝子群の検索を行なうことにより、本菌の血液感染成立のメカニズムを明らかにする。

[III] 緑膿菌

MLST 分子系統解析から臨床で大きな問題となっている多剤耐性緑膿菌には、進化的に異なった少なくとも2つのクラスターがあることを昨年度の研究で明らかにした。本年度は系統間での耐性メカニズムの違いを解析した。また、変異修復遺伝子群の解析を行う。

<2007年度の研究の当初計画>

黄色ブドウ球菌では昨年に続き、41のクラスター（当初42であったが、再検討の結果41となった）の内、40のクラスターに属する菌株約500株について個別の毒素遺伝子、病原因子遺伝子についてさらに検討するものを追加し、そのPCR検索を行う。また、これらのクラスターから抽出した臨床分離株119株についてカイコを用いた病原性評価を実施する。さらに病原性の強い株について、その株を用いた二成分制御系の網羅的欠失株を作成し、それらについて再度、病原性評価を実施する。膿瘍・SSSS株と敗血症株についてはCGH解析のN数をさらに増やす。膿瘍由来株について、その病原性と密接に関連する表皮剥脱毒素遺伝子に注目し、表皮剥脱毒素遺伝子の発現制御システムを解析する。血清添加による遺伝子発現の網羅的解析を行う。

セラチアについては、2006年度に引き続いてIVETを用いて得られた病原因子候補の評価を行い、病原因子、薬剤耐性因子の探索を継続すると同時に、構築したTn挿入変異株バンクでヒト血清抵抗性因子の同定を行う。また、緑膿菌ではセラチアと同様に血液感染メカニズムの解析を行うのと並行して、緑膿菌で大きな問題となっている多剤耐性化のメカニズムを解析する。これら

の研究により、グラム陰性の日和見感染菌による血液感染の共通メカニズムをゲノムレベルで明らかにすることを計画した。

<2007年度の成果>

[I] 黄色ブドウ球菌

昨年度末にCGH解析を行った株について、クラスタリングの基本となるアルゴリズムを再検討する必要があったため、再度、新しいアルゴリズムの下で計算を行った。実際には118株について対照として用いたMW2の2545個のORFについて再解析を行った。また118株についてカイコを用いた病原性評価を行った結果、株間で大きな差が認められ、傾向として院内感染型の菌は病原性が弱く、市中型の菌が強い病原性を示すことがわかった。中でもSSSS例を多く含む膿瘍由来株は最も強い病原性を示した。昨年度明らかにしたスーパー抗原遺伝子(SagG)の分布から院内感染型が多くSagGを保有するのに対して、市中型はSagG保有株が少ないことが明らかとなっている。即ち、黄色ブドウ球菌の病原性として院内感染型は獲得免疫機構を攪乱する能力に優れ、市中感染型は自然免疫機構を凌駕する能力に優れていることが強く示唆された。さらに、カイコを用いた病原性評価で強い病原性を示した膿瘍由来株を用いて二成分制御系の網羅的欠失株を作成し、それぞれについてカイコ病原性を調べた結果、多くの二成分制御系で病原性の著しい低下が認められた。膿瘍に伴う水疱形成に直接関与する表皮剥脱毒素の遺伝子発現を制御する転写因子を検討し、新たにSarSが関与することを見出した。血清添加によるMW2株の遺伝子発現の網羅的解析を行った結果、small RNAとして病原因子等の発現調節に関わるhldの発現量が著しく増加した。また病原因子の遺伝子発現も変動した。

[II] セラチア

ヒト血清耐性株KC68から作成した約10,000のTn挿入変異株からヒト血清感受性製変異株を検索し、79個の血清感受性変異株を得た。Tn挿入遺伝子を解析したところ、LPSの外部コア領域の生合成に関するwabHやorf6、O抗原の生合成に関するwbbAやそのABCトランスポーターであるwzt、コアとO抗原の結合に関与するwaaL、Enterobacterial Common Antigen (ECA)の生合成に関するrfeやwecG、糖代謝に関するgalU、その他機能未知な遺伝子も含め、計13種類の遺伝子変異株が顕著な血清感受性を示すことが分かった。これらの結果から、LPSO抗原が血清に対する抵抗性に重要であることが示唆された。この結果はLPSプロファイル解析の結果とも一致した。また、これら変異株の殺菌に寄与しているヒト血清因子のひとつとして補体が明らかとなった。以上の結果から、セラチアの血清抵抗には補体結合部位であるLPSのO抗原の寄与が大きいことが判明した。

また、IVET解析ではカイコ体液中での応答遺伝子として45種の遺伝子群を同定した。その中には、嫌気的条件下で発現量が増加する事が報告されている遺伝子が多数同定された。

[III] 緑膿菌

1. MLSTクラスターの耐性機構の解析

検出した耐性機構をMLST解析による系統樹にプロットし、抗菌薬耐性機構の分布を調べたところ、一部例外はあったが、つぎに示すようなMDRPクラスターの特徴が明らかとなった。

クラスター1: OprD(-), IMP-1(+), *aacA4*(+), *gyrA*の二重変異と*parC*の一重変異; クラスター2: OprD(-), Mex高発現, VIM-2(+), *gyrA*と*parC*の各々の一重変異; クラスター3: OprD(-), IMP-1(+), *gyrA*の二重変異と*parC*の一重変異; クラスター4: OprD(-), Mex高発現, IMP-1(+), *aacA4*(+), *gyrA*と*parC*の各々の一重変異

これらの結果は、MDRPのクラスター間での発生メカニズムが異なっていることを示唆している。

2. 耐性変異率の測定

Cystic fibrosis (CF)の慢性呼吸器感染症の患者から分離された多剤耐性緑膿菌では、DNA変異修復システムの一員として機能するMutSの変異と、それに応じて耐性変異株(Rifr)の出現頻度が高いことが報告されている(Science 288:1251-1253, 2000; AAC 49:3382-3386, 2005; AAC 51:2574-2581, 2007)。そこで、MLST解析に用いた株でのRif耐性変異株の出現率を測定したところ、MDRPとNon-MDRPでは耐性変異株の出現率に差は見られなかった。また、MLST解析に用いた各株の塩基配列を、PAOIのそれらと比較したところ、House-keeping genesや*mutS*では、MDRPとNon-MDRPに変異数の差は見られなかったが、*mutL*で明らかな差が観察された。これは日本でのMDRPの出現メカニズムが欧米でのCFの場合とは異なっていることを示している。

<国内外での成果の位置づけ>

(黄色ブドウ球菌) 昨年度の臨床分離株のPCR, PFGE解析からdisease oriented strainの存在が示唆されたが、CGH解析によるクラスタリングにより、ゲノムコンテンツをみてもdisease oriented strainが存在することが強く示唆された。さらにスーパー抗原遺伝子の解析とカイコに対する病原性評価から院内感染型と市中感染型の両者が病原性において大きく、獲得免疫を攻撃するタイプと自然免疫を攻撃するタイプにわかれることが初めて示された。この点は単に黄色ブドウ球菌の問題にとどまらず、細菌の病原性を考える上で重要なあたらしい概念の構築になったと考えられる。

(セラチア) セラチアの血清抵抗には補体結合部位であるLPSのO抗原の寄与が大きいことが判明した。

(緑膿菌) MDRPの系統解析によりMDRPが大きく4つのクラスターからなることを見出した。また日本のMDRPは欧米でCFから分離されるMDRPと出現のメカニズムが違うことが示された。これらのことはMDRPの発生メカニズムを考える上で重要な知見を得たと考えられ、我が国に固有の知見が得られたと考えている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

黄色ブドウ球菌を用いた病原性の評価において、カイコと同様、獲得免疫機構を欠失したマウスを用いて評価することを考えたが、感染実験の申請に手間取り、実験の遂行に至らなかった。次年度に持ち越し、マウスを用いた病原性評価を行う予定である。

<今後の課題>

(黄色ブドウ球菌) CGH解析の結果をもとにdisease oriented strainに特徴的な遺伝子を検索する。当然、その中には病原因子遺伝子もあるであろうし、転写因子や代謝に関連する因子も含まれると考えられるので、できるだけ多角的に疾病と遺伝子レパートアの関連性を解析する。また、獲得免疫系を持たないrag knockoutマウスを用いて一連のクラスターに属する株を用いて病原性評価を行い、カイコの実験結果が動物にも適応されるかどうかについて検討する。

(セラチア、緑膿菌)

両菌種とも現在の解析を続行し、セラチアでは補体とLPSとの結合を明確に検証することと、本年度の成果である補体抵抗性へのLPSの重要性を他の血清耐性株でも検証し、セラチアの血液感染メカニズムを明らかにする。また、緑膿菌研究を拡大し、セラチアで得られた血清抵抗性メカニズムを本菌でも検証する。一方、IVET解析は現在まで同定された遺伝子群の環境応答への重要性を検証する。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)

1. 0801301649

Koji Nishifuji, Motoyuki Sugai, Masayuki Amagai
Staphylococcal exfoliative toxins: "Molecular scissors" of bacteria that attack the cutaneous defense barrier in mammals
Journal of Dermatological Science 49, 21-31, (2008)

2. 0702132053

Masaru Ohara, Shuntaro Kouda, Makoto Onodera, Yoshihiro Fujiue, Megumi Sasaki, Tadahiro Kohara, Seiya Kashiyama, Shizue Hayashida, Manami Kadono, Hitoshi Komatsuzawa, Naomasa Gotoh, Tsuguru Usui, Hideyuki Itaha, Masao Kuwabara, Takashi Yokoyama, and Motoyuki Sugai
Molecular characterization of imipenem-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in Hiroshima, Japan
Microbiology and Immunology 51(3): 271-277, (2007)

3. 0801301645

Shuntaro Kouda, Ryuichi Kuwahara, Masaru Ohara, Masanobu Shigetani, Tamaki Fujiwara, Hitoshi Komatsuzawa, Tsuguru Usui, Motoyuki Sugai
First isolation of *bla*_{IMP-7} in a *Pseudomonas aeruginosa* from Japan
Journal of Infection and Chemotherapy 13(4):276-277, 2007.

4. 0801301812

Rashel, M., Uchiyama, J., Ujihara, T., Uehara, Y., Kuramoto, S., Sugihara, S., Yagyuu, K., Muraoka, A., Sugai, M., Hiramatsu, K., Honke, K., Matsuzaki, S.
Efficient elimination of multidrug-resistant *Staphylococcus aureus* by cloned lysine derived from bacteriophage phiMR11.
Journal of Infectious Diseases 196, 1237-1247, 2007.

5. 0801301824

Eguchi, K., Ueda, Y., Kanazawa, K., Sunagawa, M., Gotoh, N.
The mode of action of 2-(thiazol-3-ylthio)-1b-methylcarbapenems against *Pseudomonas aeruginosa*: the impact of outer membrane permeability and the contribution of MexAB-OprM efflux system.
J. Antibiot. 60: 129-135 (2007)