

平成 22 年 6 月 16 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17019048

研究課題名（和文） ゲノムの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

研究課題名（英文） Genome-wide study on pathogenesis of bacteria causing nosocomial infection

研究代表者

菅井 基行 (SUGAI MOTOYUKI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：10201568

研究成果の概要（和文）：院内感染原因菌として *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* を用いた。*S. aureus* はその菌がおこす疾病のタイプと菌が保有する遺伝子セットの関係を明らかにし、疾病に特有のマーカー遺伝子の存在を検討した。*S. marcescens* は動物実験によって病原因子遺伝子のスクリーニングを行うと同時に、トランスポゾンを用いた変異実験でヒト血清抵抗性因子の同定を行った。*P. aeruginosa* はトランスポゾンを用いた変異実験でヒト血清抵抗性因子の同定を行った。また多剤耐性菌(MDRP)について系統間での性状の相違、耐性メカニズムについて検討した。

研究成果の概要（英文）：We employed *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa* as target agent causing nosocomial infection. For *S. aureus*, we delineated gene sets present in *S. aureus* causing certain diseases and analyzed candidate genes to detect or foresee specific virulence of *S. aureus*. For *S. marcescens*, we screened for virulence-related genes by animal experiment and investigated for factors (genes) involved in human serum resistance. For *P. aeruginosa*, we investigated for factors (genes) involved in human serum resistance. We also analyzed characteristics and antimicrobial resistance mechanism of MDRP clones.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	16,100,000	0	16,100,000
2006年度	20,300,000	0	20,300,000
2007年度	20,100,000	0	20,100,000
2008年度	20,500,000	0	20,500,000
2009年度	20,500,000	0	20,500,000
総計	97,500,000	0	97,500,000

研究分野：細菌学

科研費の分科・細目：ゲノム科学・応用ゲノム科学

キーワード：黄色ブドウ球菌、緑膿菌、セラチア、病原性、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

院内感染をおこす病原細菌は多種存在する。近年のゲノム科学の進展により、各種細菌のゲノム情報が明らかになってきている。しかしながら、ゲノム情報を利用して病原細菌の病原性を明らかにする手法はまだ確立されていなかった。また研究開始当初はゲノム塩基配列が決定された細菌種は限られており、限られたゲノム情報をもとに多数の臨床分離株を解析する方法は確立されていなかった。

2. 研究の目的

本研究ではゲノム情報が明らかになった院内感染原因菌に焦点を絞り、ゲノム情報から細菌の病原性や薬剤耐性に関連する遺伝子セットを明らかにし、特定の疾病を引き起こす細菌に特有のゲノム情報を明らかにする。また、病原性に関連する遺伝子発現の解析を行い、院内感染の治療、予防法開発の為にシーズの発掘、菌の病原性を規定する遺伝子パネルあるいは発現パネルを作成し、臨床検体の病原性を推定する院内サーベイランス用チップを開発するための基礎データを得ることを目標とした。

3. 研究の方法

(黄色ブドウ球菌)黄色ブドウ球菌の多様な病原性の基盤となるゲノム情報を明らかにするために1)異なる病原性を示した臨床分離株の収集とパルスフィールド電気泳動(PFGE)によるゲノタイプピング、2)異なる病原性を示した臨床分離株の whole genome PCR scanning による解析、3)異なる病原性を示した臨床分離株のマイクロアレイを用いたCGH解析、4)異なる病原性を示した臨床分離株のカイコならびにマウスを用いた病原性の評価、5)環境因子による毒素産生制御、糖源による細胞壁合成の制御のそれぞれのメカニズムを明らかにすることを旨としたマイクロアレイ解析を行うことを計画した。

(セラチア)病原性セラチアの本体を明らかにするために1)病原因子の同定、2)臨床分離株と自然分離株のマイクロアレイを用いたCGH解析、3)抗菌薬多剤耐性臨床分離株での耐性遺伝子保存性とプラスミド保有の解析、生育環境シグナル応答機構をQuorum-sensing、二成分制御系、ECFシグマ関連遺伝子の発現からカスケードを明らかにすることを計画した。

(緑膿菌)大病院でのアウトブレイクが頻繁に報道されている多剤耐性緑膿菌(MDRP)の出現のメカニズムを解明するために系統解析を行うこと、変異修復遺伝子のSNPs解析

を計画した。多剤耐性緑膿菌の耐性化メカニズムの多くは染色体遺伝子の変異によっている。変異の多重化は天文学的確率でしか起こりえない。しかし、病院内での発生は現実の問題である。これは多剤耐性緑膿菌では自然変異を修復する機能が低下していることに起因するという作業仮説を建て、その検証を行う。

①緑膿菌の臨床分離株および環境分離株計300株のHouse-keeping遺伝子の塩基配列をもとに、Multilocus sequencing typing (MLST)解析を行う。

②系統解析を行った300株について、変異修復に働く*mutS*, *mutL*, *uvrD*, *recA*, *mutT*, *mutY*遺伝子および不均衡変異をもたらすDNA複製遺伝子*dnaQ*遺伝子の配列を決定する。

(黄色ブドウ球菌と緑膿菌の相互作用)院内感染で問題となるMRSAによる肺炎はしばしば、経過とともに緑膿菌に取って代わられるいわゆる菌交代現象がおこることが知られている。本研究の前半で我が国で臨床から分離される黄色ブドウ球菌のタイピングが整ったことをうけて、黄色ブドウ球菌と緑膿菌の相互作用について、とくに増殖抑制ならびにクロラムセンシング阻害作用について検討することを計画した。

4. 研究成果

【黄色ブドウ球菌】1. 系統解析 1) 臨床分離株の解析-臨床分離株約3,000株についてPFGEを行い、染色体切断パターンをBioNumerics softwareを用いてクラスタリング解析を行った。その結果、全部で我が国の臨床分離株代表株をPFGEタイプで41クラスターに分類した。それぞれのクラスターから数株ずつをランダムに選択し、これらの株500株について採取部位、院内感染か市中感染か、*mecA*遺伝子保有の有無、各種蛋白毒素遺伝子(23種)の保有状況の評価した。さらに代表株を絞り込みカイコを用いた病原性評価を行い、最終的に176株を選定した。一方、初年度(2005)に黄色ブドウ球菌N315, Mu50, MW2株の染色体上に存在する全orfおよび他の株が保有する毒素関連遺伝子、フェージ関連遺伝子計523orfを網羅するマイクロアレイを作製した。このマイクロアレイを用いて代表株176株についてCGH解析を行った。また平行して臨床分離株代表株のMLST解析を行った。その結果、①臨床分離株はゲノタイプにより、市中感染型と院内感染型に分かれ、少なくとも2つの院内感染型の系統が存在すること、②院内感染型は腸管毒素遺伝子・毒素性ショック症候群毒素遺伝子の種類が多く、*sec*, *seg*, *sei*, *selo*, *selm*, *tst-1*をほぼ

共通して保有していたのに対し、市中感染型は腸管毒素遺伝子のレパートリーにバラエティが見られ、院内感染型と同じレパートリーを保有する系統、2-3遺伝子しか保有しない (*sec*, *tst-1* は保有しない) 系統、既知の腸管毒素・毒素性ショック症候群毒素遺伝子を全く保有しない系統に分類された、③ SEA, SEB を保有する株は特定の系の株にのみ認められる事、④院内感染型の株は比較的カイクに対する病原性が低い株が多く、市中感染型の株は逆にカイクに対する病原性が強いこと、⑤市中感染型の株は *chp*, *scn*, *sak* のいずれかが欠損しているのに対し、院内感染型の株は、3者が揃っていること、⑥アトピー由来の株は *mecA* 遺伝子を保有していないこと、⑦欧米で市中感染株に高率に認められる *pvl* は少なくとも2つの系統が存在し、うち一つは米国で問題となった市中感染型 MRSA MW2 と同系統であること、⑧我が国で分離された MRSA 株でゲノム塩基配列が明らかになっている N315, Mu50 株は2つの院内感染型の系統のうちマイナーなものに属すること、⑨今回分離された市中感染型の株の大部分が膿痂疹、せつ、アトピー性皮膚炎由来株であったが、これらは CGH 解析で明らかに異なるクラスターを形成していたことから、系統によって引き起こす臨床病変あるいは病態との関連性が異なること、⑩ PFGE を用いたクラスタリング解析と CGH によるクラスタリング解析の相関を調べた結果、両者はかなり良い一致を示し、黄色ブドウ球菌では PFGE によるクラスターは各菌株の系統をある程度反映していること、などが明らかとなった。2) クラス識別-臨床分離株の CGH 解析データをもとに、疾患特異的な遺伝子セットの検出をする目的で、クラス識別を支援班九大久原先生、平川先生と共同で行った。その結果、敗血症を起こした株に特有の 69 遺伝子、アトピー性皮膚炎から分離される株に特有の 193 遺伝子、水疱性膿痂疹のうち、膿痂疹から分離される株に特有の 149 遺伝子、SSSS から分離される株に特有の 135 遺伝子を見いだした。

2. 網羅的発現解析 1) 増殖過程における発現解析 アレイの試行を兼ねて増殖時期による遺伝子発現の差異を調べるために黄色ブドウ球菌 N315 株を液体培地で培養し、対数増殖期で2点 (OD=0.3, 1.0) および静止期で2点 (初期、後期) の計4点について菌を回収後、RNAの抽出を行なった。静止期初期のサンプルをコントロールとしてそれぞれのサンプルとの比較を行ない、増殖過程における発現解析を行なった。結果、カテゴリー別に見てみるとカテゴリーの中で全ての因子が同じパターンを示すことはなかった。しかし、傾向として対数増殖期から静止期初期にかけてアミノ酸代謝、糖代謝、核酸代謝

系では発現量が増大する因子が多く認められ、その後は大きな変化は認められなかった。また、逆にタンパク合成系やトランスポーターの因子の多くは対数増殖期で発現量が多くその後減少傾向を示した。脂質代謝系や RNA 合成系や病原性に関与する因子は増殖過程で減少傾向を示すもの、増加傾向を示すもの、ほとんど変化がないものと3つのパターンに分かれた。病原性因子では付着に関与する因子は減少傾向を示し、溶血毒やプロテアーゼなどは増加傾向を示した。DNA複製や細胞壁合成系はほとんどの因子が増殖過程での発現パターンに大きな変化が認められなかった。2成分制御系因子では *VicRK*, *ArlRS*, *PhoPR* は静止期にかけて増加傾向を示し、*SaeRS* はやや減少傾向を示した。2) 生体 (ヒト) の環境は CO₂ 濃度が空気中より高いことが知られており、経験的に CO₂ 濃度が高くなると毒素の産生量が増大することが知られている。CO₂ 存在下および非存在下で培養した菌についての遺伝子発現を比較した。その結果、病原性因子である溶血毒 (α , γ -hemolysin)、プロテアーゼ (*sp1A-D*) の発現量の増大が認められたが、種々の代謝系、合成系に関与する因子については大きな変化は認められなかった。3) 2成分制御系因子の役割を明らかにする目的で、親株として MW2 株を選択し、2成分制御因子の調節性因子全16個の破壊株を作成した。二成分制御系因子を含む多くの転写調節性因子は対数増殖期から定常期に移行する過程で発現が変化するものが多く認められ、その変動に呼応する形で病原性因子遺伝子の発現も変動することが分かった。ゲノムが明らかにされている4種の黄色ブドウ球菌について比較検討した結果、病原性因子、転写調節性因子の発現は共通のパターンの増減をする物がある一方、株により異なるものがあることが明らかとなった。

3. 毒素発現解析 黄色ブドウ球菌が産生する表皮剥脱毒素 ETA の産生制御機構を明らかにするために、黄色ブドウ球菌の病原性因子をグローバルに制御することが報告されている *Agr*, *SaeRS*, *ArlRS*, DNA結合タンパク質である *SarA* 及び *SarS*、さらに RNA polymerase のシグマ因子である *SigB* の ETA 産生における関与について遺伝子破壊株を作製し ET 解析を行った。その結果、ETA 産生は *AgrCA*, *SaeRS*, *ArlRS* により正に制御、*SarA*, *SarS*, *SigB* により負に制御されていることを明らかにした。さらに定量 RT-PCR 解析により *SigB* による負の制御は *SarA*, *SarS* を介した制御であること、*ArlRS* による正の制御は *Agr* 及び *SarS* を介した制御であることが示唆された。また、二重遺伝子破壊株の結果から、*SaeRS* が ETA 産生において必須な転写調節因子であることが示唆された。さらに新生児マウスを用いた表

皮剥脱活性から *in vivo* においても ETA 産生を AgrCA、SaeRS、ArlRS が正に制御、SarS、SigB が負に制御していることが示唆された。AgrCA、SaeRS および ArlRS は二成分制御機構に属する遺伝子群であることから、黄色ブドウ球菌に存在するその他の 13 組の二成分制御機構遺伝子の破壊株を作製し、ETA 産生量を解析した結果、顕著な違いを示さなかったが、新生児マウスを用いた感染実験において NreBC、SrrAB、KdpDE および機能未知な SA1158/SA1159、SA1666/SA1667 遺伝子破壊株では表皮剥脱活性が増強された。表皮剥脱毒素 ETA の発現を制御する新規転写調節因子の探索を行った。黄色ブドウ球菌 MW2 株の公開されているゲノム情報では 132 個の遺伝子が転写調節因子としてアノテーションされている。それらのうちから、ETA の新規転写調節因子としての候補を次に挙げる 3 段階により絞り込みを行った。① hypothetical protein など機能未解明な遺伝子を選抜 ② 糖代謝やアミノ酸代謝遺伝子の下流または下流に隣接して位置する遺伝子を排除 ③ 病原性因子や hypothetical protein の近傍に位置する、または単独で位置する遺伝子を選抜。以上より候補として 20 遺伝子に絞り込んだ。続いて表皮剥脱毒素 (ETA) 産生株である TY34 株を用いて遺伝子破壊株を作製し、ETA の産生量の増減により機能を評価した。その結果、DeoR family に属する ORF I. D. MW2232 遺伝子破壊株と RpiR family に属し、DNA 結合ドメインである HTH motif と phosphosugar 結合ドメインである SIS motif を有する ORF I. D. MW2236 遺伝子破壊株の 2 遺伝子破壊株において ETA 産生量および eta 転写量が増加した。さらに、興味深いことに新生児マウスを用いた表皮剥脱活性試験では MW2232 および MW2236 遺伝子破壊株は著しく増強された表皮剥脱活性を示した。これらの結果から、MW2232 および MW2236 は ETA 産生を特に *in vivo* で抑制的に制御する新規転写調節因子であることを明らかにした。さらに DNA マイクロアレイを用いた発現比較解析、定量 RT-PCR 解析により MW2232 および MW2236 遺伝子破壊株では、eta 遺伝子の発現量の変化だけではなく、黄色ブドウ球菌の産生する病原性因子の発現をグローバルに制御する新規転写調節因子であることを示唆する結果を得た。

【セラチア】1. 系統解析およびゲノム解析
臨床分離株および環境分離株の House-keeping 遺伝子 (*mdh*, *mtlD*, *aroE*, *icd*) の配列をもとに Multilocus sequencing typing (MLST) 解析および性状解析を行い、つぎの結果を得た。1) 臨床分離株と環境分離株では系統が異なる。2) セラチアの特徴のひとつである赤色色素 (プロディギオシン) 産生株は、限られたクラスターに分類される。3) ヒト

血清による殺菌性に抵抗性が高い株が分布するクラスターがある。4) ゲノム配列を決定した SM39 株が保有する多剤耐性プラスミドの脱落株を作成し、種々の抗菌薬感受性を測定した。その感受性と臨床分離株および環境分離株の感受性の比較から、セラチアの抗菌薬自然耐性のレベルは緑膿菌よりも低いが、大腸菌などの腸内細菌よりも高いことが分かった。5) 私たちのグループでゲノム配列を決定したヒト血液由来 SM39 株および Sanger (England) で行われたショウジョウバエ由来 DB11 株との比較ゲノム解析から、ファージによって特異的な遺伝子群が付加されていることを見出した。7) DB11 はカイコおよびマウス敗血症モデルでの致死活性が SM39 よりも高いことが観察された。

2. 病原性遺伝子の探索 1) ヒト血清抵抗因子: 構築した Tn 挿入変異株ライブラリーの検索から、ヒト血清耐性に寄与する原因遺伝子を同定した。それには莢膜形成遺伝子が含まれていた。ヒト血清に対するセラチアの抵抗因子をさらに明らかにする目的で獲得免疫系を欠いた無脊椎動物であるカイコや白血球減少マウスを用いた感染モデルを用い、IVET (*in vivo* expression technology) によりカイコ体液およびマウス血液中で発現する遺伝子候補を特定した。2) *in vivo* expression technology (IVET) による環境応答遺伝子の検索: 栄養要求性 (*dapB*) を指標にした IVET により、獲得免疫系を欠いた無脊椎動物であるカイコの体液中で発現するセラチア菌の候補プロモーターを 6 個同定した。ヒト血清によるセラチアの殺菌には補体が重要な役割を担っていること、ヒト血清殺菌性に抵抗性が高い株が分布するクラスターがあり、これらの株での抵抗性のひとつは莢膜産生であることを明らかにした。さらに、少なくとも 38 種の遺伝子の特異的な発現を見出した。その中には、ヒドロキシラジカルやスーパーオキシドの消去に働く遺伝子群が含まれていた。これは莢膜産生性と相乗的にセラチアがカイコ生体内のマクロファージなどの食細胞への抵抗に機能していることを示唆した。

3) ゲノム配列情報をもとに作成したマイクロアレイを用いて、系統的に近縁で、致死活性が異なる株の CGH 解析により、高致死活性株に特異的に存在する 62 遺伝子を同定した。それらには、セラリシンやヘモリジン遺伝子が含まれていた。

【緑膿菌】1. 比較ゲノム・発現解析
GeneChip (Affymetrix) によるマイクロアレイ実験により、次の結果を得た。

1) 無脊椎動物であるカイコ (silk worm) を用いた感染致死実験で臨床分離株の致死性を調べ、さらに CGH 解析を行ったところ、致死性の高い株に特有の遺伝子群が同定された。

同定できた遺伝子のノックアウト株を作成し、致死活性の変化を調べる実験は進行中であるが、鉄の取り込みに機能するピオベルジン産生遺伝子が致死性に関与している結果が得られた。さらに致死活性に関与する遺伝子の特定実験を行っている。

2) イヌ腎上皮由来 MDCK およびヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞モノレイヤからのシグナルに対して、緑膿菌では3型分泌装置(TTSS)およびそのエフェクター群および4型線毛遺伝子群の発現の顕著な上昇がマイクロアレイ実験で見出された。これをベースに TTSS およびエフェクター遺伝子のノックアウト、*E. coli* Two-hybridization 法、Pull-down assay を行うことにより、エフェクターと相互作用する宿主タンパク質を同定し、エフェクターとの結合による阻害によって、モノレイヤ細胞間の結合が開裂することを見出した。

3) MDRP を含む臨床分離緑膿菌の house-keeping 遺伝子および変異修復機構に関与する遺伝子群の DNA 塩基配列を基にした MLST 分子系統解析から MDRP は特定のクラスターに分布することを明らかにした。MDRP(多剤耐性緑膿菌)のクラスターに属する株では *mutL* の変異が多いこと、また rifampicin 耐性株の出現頻度が高いこと、多剤耐性株には少なくとも2つの系統が存在すること、多剤耐性株はバイオフィーム形成能が高いことや抗菌薬に対する抵抗性やバイオフィーム系性能とは逆に、ヒト血清やヒト好中球に対する感受性が高いことを明らかにした。

【黄色ブドウ球菌と緑膿菌】黄色ブドウ球菌二成分制御系-既に作成した黄色ブドウ球菌二成分制御系の網羅的欠失変異株を用いて、緑膿菌存在下で増殖抑制がかかる株を探索した結果、TCS2, *ArlRS*, *AgrCA*, TCS5 で増殖抑制が認められた。また同様の変異株を用いて、黄色ブドウ球菌培養上清中クオラムセンシング(QS)阻害物質の *C. violaceum* 増殖抑制活性を測定し、TCS2, *arlRS* で QS 阻害物質の産生促進、*agr*, TCS5 で QS 阻害物質の産生抑制を認めた。黄色ブドウ球菌の系統-系統解析の結果、我が国の臨床分離株の代表として PFGE 解析により見いだされた41のクラスターからクラスターごとに複数株を選択し、緑膿菌 PAO1 株存在下での増殖抑制の程度を調べた結果、院内感染型の株に優位に多く、緑膿菌に対して高感受性を示す株があり、市中感染型の株は逆に低感受性を示す株が多い事が明らかとなった。緑膿菌の産生する黄色ブドウ球菌増殖抑制因子の探索-緑膿菌 PAO1 株の Tn ライブラリーから黄色ブドウ球菌に対する増殖抑制を喪失あるいは減弱した株をスクリーニングし、変異株の Tn 挿入位置の同定を行った。現在までに①PQS の合成系、②QS の合成系、③LasA、④hypothetical

genes が検出されている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 20 件)

① Zhu, L., Inoue, K., Yoshizumi, S., Kobayashi, H., Ouyang, M., Kato, F., Sugai, M., Inouye, M. Staphylococcus aureus MazF specifically cleaves pentad sequence UACAU, which is unusually highly abundant in the pathogenic adhesive factor Srap. Journal of Bacteriology 191, 3248-3255, 2009(査読有り)

② Hirakawa H, Akita H, Fujiwara T, Sugai M, Kuhara S. Structural insight into the binding mode between the target domain of ALE-1 (92AA) and pentaglycine of peptidoglycan PEDS 22, 385-391, 2009 (査読有り)

[学会発表] (計 58 件)

① 皆川周、新野啓介、加藤文紀、稲見浩之、奥田潤、菅井基行、後藤直正、Staphylococcus aureusの増殖抑制に関するPseudomonas aeruginosaの遺伝子群の探索 第82回日本細菌学会総会 屋 2009. 3. 12-14 名古屋

② 甲田俊太郎、小椋義俊、小原勝、林哲也、菅井基行、InI13 に由来するblaIMP-1 インテグロンカセットを含むmobile genetic elementの解析 第82回日本細菌学会総会 2009. 3. 12-14 名古屋

[図書] (計 5 件)

① 菅井 基行, 微生物感染学 -新しい感染の科学- 光山正雄 編集 南山堂 2005. 11. 10 刊分担執筆 「黄色ブドウ球菌」 p. 124-133

② 小松澤均 菅井基行, MRSA-基礎・臨床・対策-編集 河野 茂 2006. 11. 20 刊 医薬ジャーナル社分担執筆 III MRSAの薬剤耐性1メチシリン耐性に関与する機序 pp. 48-56

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅井基行 (SUGAI MOTUYUKI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：10201568

(2) 研究分担者

後藤直正 (GOTO NAOMASA)

京都薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：30121560

(3) 連携研究者

()

研究者番号：