

令和 2 年 5 月 22 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15691

研究課題名(和文)細菌のゲノム再編成とそれによる持続感染機構の解明

研究課題名(英文)Mechanism of persistent infection caused by genome rearrangement

研究代表者

佐藤 祐介 (Sato'o, Yusuke)

自治医科大学・医学部・助教

研究者番号：20757265

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：黄色ブドウ球菌はヒトに感染症を起こす病原体である。本菌は皮下膿瘍などの局所感染症から敗血症などの全身性の感染症まで幅広い疾病を引き起こす。そして本菌は、しばしば、治療に抵抗し持続感染を示すことが知られている。この持続感染に関わる要因として、これまでパーシスター菌の関与が知られていたが、この研究ではゲノム再編成による新しい持続感染機構の解明を行った。in vitroおよびin vivo解析を進めた結果、本菌はゲノム再編成で変化する2つの表現型を巧みに利用することで生体内で生存していることが明らかになった。この研究により、黄色ブドウ球菌における新たな病原性の一面が明らかになったと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

黄色ブドウ球菌はヒトや動物の常在菌の一種としての側面だけではなく、感染症での分離頻度が高い病原菌としての側面を併せ持つ。本菌を原因とする感染症は、他の病原菌と比較しバリエーションに富んでおり、その一つが持続感染症である。治療を行っても奏功せず難治化する症例や一度治癒したと思われても再発する症例が存在する。このような感染症に対して、本研究は基盤的な知見を与えられると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Staphylococcus aureus is one of important pathogens in clinical setting. This bacterium causes various types of diseases, from local infections, such as subcutaneous abscesses, to systemic infections, such as toxic shock syndrome and sepsis. Further, it is well known that this pathogen shows resistance against treatment and causes persistent infection. in vitro and in vivo analysis revealed that the bacterium is able to survive in host by switching between two phenotypes that are altered by genome arrangement. This study may reveal a new aspect of pathogenicity in Staphylococcus aureus.

研究分野：細菌学

キーワード：ブドウ球菌 持続感染 ゲノム再編成 細菌感染症

1. 研究開始当初の背景

ブドウ球菌は様々な感染症の原因となる。さらに、しばしばブドウ球菌感染症が慢性化し、治療が困難を極めるため、臨床現場で問題となっている。この持続感染の原因として、免疫および化学療法に抵抗する小型変種 (Small colony variants, SCVs) が注目されている。SCVs は菌が自身の代謝機構を変化させることで、生体内での生存に適した性質を獲得している。一般的に SCVs は増殖が遅く、正常な親株 (Normal colony variants, NCVs) と比較し、小さいコロニーを作る。また病原性は低下するが、抗菌薬に対する最小発育阻止濃度は上昇し、化学療法に対して抵抗性を示す。このような特性が、菌の持続感染に寄与していると考えられているが、その持続感染成立の病態生理学的機構は未だ完全には解明されていない。

私たちの研究グループはゲノム再編成による新たな SCVs 発生機構を報告した (引用 1)。このゲノム再編成現象を示す黄色ブドウ球菌株 (Mu50) は慢性心内膜炎患者より分離され、この患者は3年半にも渡り慢性感染を起こしていた。ゲノム再編成は菌の染色体上に存在する相同配列により起こる。菌は相同領域を起点として、ゲノムの約半分を可逆的に反転させることで SCVs と NCVs の表現型を可逆的に入換え、病原因子などの発現や薬剤感受性などの様々な表現型を変化させている (図1・表)。しかし、本機構がどのように生体内での持続感染に関与しているのかは不明であった。

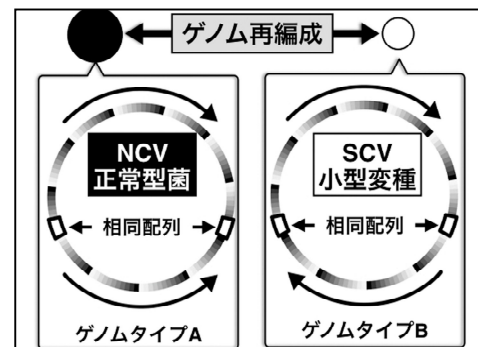


図1. 染色体逆位によるゲノム再編成。相同配列を起点に細菌ゲノムの半分が可逆的に逆位を起こす。菌はゲノム再編成により2つの表現型を使い分ける

表. NCVとSCVの表現型の相違点

	NCV	SCV
ゲノム構造	タイプA	タイプB
増殖速度	早	遅
溶血毒産生性 (細胞障害性)	陽性	陰性
イミペネム (βラクタム系抗菌薬)	耐性	感受性

2. 研究の目的

黄色ブドウ球菌は临床上重要な病原細菌の一菌種である。しかし、その病原性、特に感染症の慢性化に関わるメカニズムは未だ不明な点が多く存在する。この研究では、ゲノム再編成がどのように持続性ブドウ球菌感染症を引き起こしているのか、そのメカニズムに着目し研究を行った。

3. 研究の方法

遺伝子改変効率の向上

一般的に遺伝子工学に使用されている細菌、例えば大腸菌や枯草菌などと比較し、黄色ブドウ球菌の遺伝子改変は難易度が高く、しばしば困難を極める。この原因の一つとして考えられるのは、遺伝子改変の重要なステップである DNA 導入のためのエレクトロポレーションである。今後

の遺伝子操作を容易にするために、この点について様々なパラメーターの見直しを行い、効率化を進めた。

感染モデルの構築と光イメージングを用いた非侵襲性観察

一般的に広く使用されているブドウ球菌の感染モデルは急性感染モデルである。そこで、一ヶ月以上に渡り持続感染を示すカテーテル感染モデルの構築を行った。また生体内での菌の生死を観察するため、ルシフェラーゼを利用した観察モデルの構築を行った。

表現型 (SCVs or NCVs) 固定変異株の作出と in vitro での評価

図1に示すように、ゲノム上の相同配列を起点にゲノム再編成が起きる。そこで、この相同配列を削った表現型固定変異株を作成した。これら SCVs (NCVs) 固定変異株について、薬剤感受性や増殖速度などについて、親株との比較を行った。

生体内での持続感染機構の解明

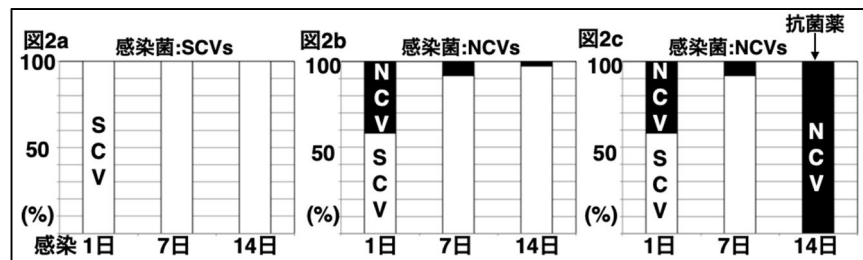
3で作製した変異株および親株について、バイオフィルム試験およびマウスへの感染実験を行った。各試験中に、必要に応じて抗菌薬 (イミペネム) による処理と治療を行い、菌の生存力を評価した。

4. 研究成果

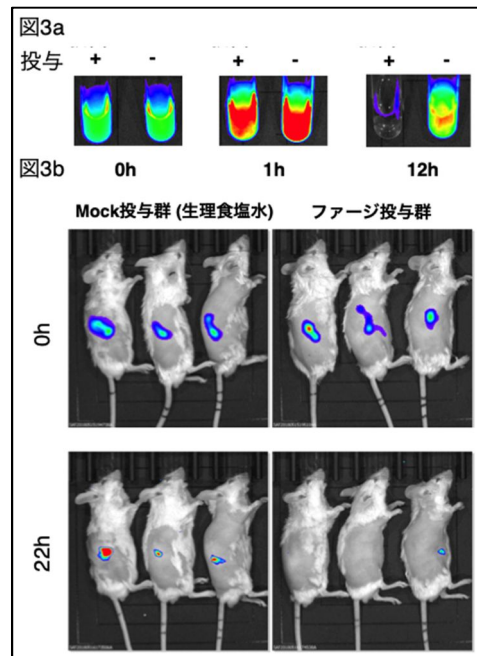
今回の実験対象菌株である Mu50 は頻繁に自身のゲノムを入れ換え、NCVs-SCVs 表現型を行き来する。そのため、野生株のままでは NCVs と SCVs のそれぞれの表現型について、詳細を解析することができない。そこで、表現型を固定した変異株を作出する必要があるが、一般的にブドウ球菌臨床分離株は遺伝子改変の難易度が高い。そこで、遺伝子改変の重要な工程であるエレクトロポレーションについて、その効率化を行った。具体的には、導入する DNA のメチル化の状態やコンピテントセル作製時の培地や洗浄液、通電時の条件を最適化した。黄色ブドウ球菌では既報の方法と比較し、約 10 倍の効率を実現した。また表皮ブドウ球菌をはじめとするコアグラゼ陰性ブドウ球菌では、黄色ブドウ球菌以上の難易度であることが知られている。これらについても最適化以前では全く遺伝子導入できない株に対して遺伝子導入できることを確認した。*Staphylococcus caprae* など 8 菌種については今回の方法で初めて遺伝子組換えが行えることを報告した (引用 2)。

菌の持続感染を観察するためのカテーテル埋め込みモデルを確立した。麻酔下でマウスの皮膚を切開し、約 1cm 長に切断した人用の中心静脈カテーテルを埋め込み縫合した。このカテーテ

ルの内部に培養した菌を接種した。カテーテルは無処置の状態で1ヶ月以上に渡り、安定して生体内に定着した。さらに中空内への



菌接種により菌がバイオフィームを形成し、同様に長期に渡る感染を持続しているのを確認した。このモデルに対して、ゲノム再編成可能な SCVs と NCVs の表現型を示す親株をそれぞれ投与すると、SCVs を投与した場合には SCVs を維持する (図 2a) が、NCVs では徐々に NCVs が優位になっていった (図 2b)。しかし、抗菌薬を投与することにより、一度優位になった SCVs は耐性菌である NCVs に遷移した。これまで持続感染には SCVs のみが注目されていたが、この結果から NCVs の働きも同様に重要であると考えられた。また菌の生体内での生死を継続的に観察するために光イメージングによるモデルを確立した。菌のゲノム中に Lux システム



による発光に必要な遺伝子を組み込んだ。このシステムを使用することで、菌体内の ATP が枯渇し (=菌が死ぬ)、消光することを確認した。図 3a に示すように菌を殺すバクテリオファージを投与することで、菌の発光が止まることを試験管内で確認した。同様に図 3b に示すように、生体内でも発光の維持・退行という形で検出できた。

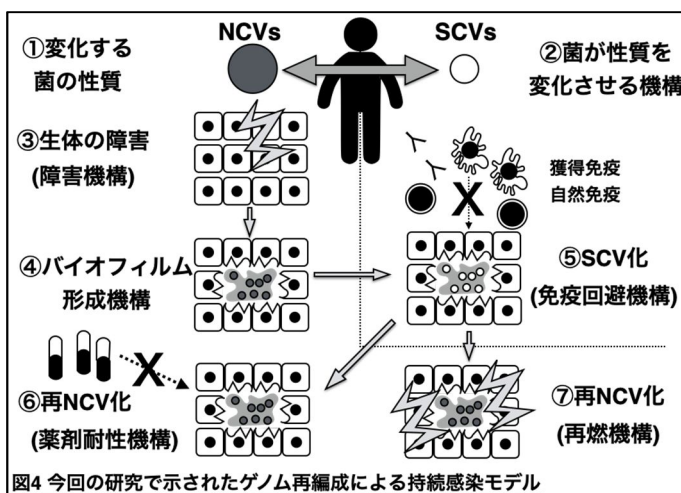
ゲノム再編成の起点となる相同配列をロックアウトし、NCVs か SCVs のどちらかに固定された変異株を作出した。PCR を用いて、これらのロックアウト株が培養を繰り返してもゲノム再編成が起きないことを確認した。さらに in vitro の表現型の解析においても、例えば抗菌薬に対する感受性をはじめとし、表に示すほぼ全てについて表現型のうち片方のみを示すことを確認できた。一方で、コロニーサイズに関しては、ゲノム再編成を遮断しても表現型の行き来が認められた。コロニーサイズは増殖速度以外の要因が絡んでいることも知られており、他要因の関連が示唆された。実際に液体培養中での増殖速度は NCVs > SCVs であり、コロニーサイズの違いについても BHI 寒天培地では認められるが、MHA や TSA では認められなかった。

まず、バイオフィームを使った比較解析を進めた。抗菌薬を含まない培地を用いると NCVs

は、SCVsと比較し、一時的に強固なバイオフィルムを形成する。しかし、NCVsのバイオフィルムは短時間で破壊され、菌がバイオフィルム外に拡散した。一方、SCVsでは持続性の面に優れ、長期間に渡り維持していた。次に治療を想定し抗菌薬処理（培地をイミペネム添加培地に変更）を行うと、感性菌であるSCVsの殺菌とともにバイオフィルムが破壊された。一方、耐性菌であるNCVsは抗菌薬下でも生存するとともに、バイオフィルムも強固に保ち続けた。これらの結果は上記の動物実験の結果と一致していた。さらに薬処理後、抗菌薬を除去することで、NCVs本来の性質である速やかなバイオフィルム破壊が進み、菌が外に拡散した。一方、SCVsでは抗菌薬を抜いた後、僅かに残存していた菌から再度バイオフィルムを作る傾向が認められたが、局所での持続性は認められなかった。

この現象はマウスを用いた生体内でも認められ、投薬と断薬により、感染・病態の拡大・縮小として同様の現象が認められた。つまり、感染当初NCVsの方が大きな病巣を作るが、すぐに病原性が強すぎるために排膿してしまう。一方、SCVsでは感染巣こそ小さいが、長く皮下に定着する。抗菌薬投与により、SCVsはすみやかに治療されるが、NCVsは生存し、投薬治療中止後に徐々に悪化した。一方で、表現型が固定されている変異株と異なり、NCVs-SCVsを行き来出来る親株ではゲノム再編成による表現型の切替えにより、緩慢な持続感染を認めた。

各表現型固定株および親株を用いた実験を行い、菌の性状のうちバイオフィルム形成能力および抗菌薬耐性が持続感染に重要であることを確認した。図5に示すように、従来提唱されていたSCVsのみが持続感染に関与する説とは異なり、ゲノム再編成による持続感染では親株のNCVsと変異型のSCVsが交互に行き来し、持続感染を起こしていると考えられた。



<引用文献>

1. Cui L et al. 2012. PNAS. 109: E1647-56.
2. Sato 'o et al. 2018. Microbiol. Methods.146: 25-32

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sato'o Yusuke, Aiba Yoshifumi, Kiga Kotaro, Watanabe Shinya, Sasahara Teppei, Hayakawa Yasuhiko, Cui Longzhu	4. 巻 146
2. 論文標題 Optimized universal protocol for electroporation of both coagulase-positive and -negative Staphylococci	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Microbiological Methods	6. 最初と最後の頁 25 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mimet.2018.01.006	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sato 'o Yusuke, Hisatsune Junzo, Hirakawa Hideki, Ono Hisaya K., Omoe Katsuhiko, Sugai Motoyuki	4. 巻 5
2. 論文標題 Complete Sequence of a Staphylococcus aureus Clonal Complex 81 Strain, the Dominant Lineage in Food Poisoning Outbreaks in Japan	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genome Announcements	6. 最初と最後の頁 e00853-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/genomeA.00853-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sato 'o Yusuke, Hisatsune Junzo, Yu Liansheng, Sakuma Tetsushi, Yamamoto Takashi, Sugai Motoyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Tailor-made gene silencing of Staphylococcus aureus clinical isolates by CRISPR interference	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0185987
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0185987	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Watanabe Shinya, Cui Bintaο, Kiga Kotaro, Aiba Yoshifumi, Tan Xin-Ee, Sato 'o Yusuke, Kawauchi Moriyuki, Boonsiri Tanit, Thitiananpakorn Kanate, Taki Yusuke, Li Fen-Yu, Azam Aa Haeruman, Nakada Yumi, Sasahara Teppei, Cui Longzhu	4. 巻 10
2. 論文標題 Composition and Diversity of CRISPR-Cas13a Systems in the Genus Leptotrichia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 2838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2019.02838	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Cui Bintao, Watanabe Shinya, Sato 'o Yusuke, Nihashi Fumiya, Aiba Yoshifumi, Kiga Kotaro, Sasahara Teppei, Tan Xin-Ee, Kawauchi Moriyuki, Boonsiri Tanit, Thitiananpakorn Kanate, Taki Yusuke, Li Feng-Yu, Imokawa Shiro, Cui Longzhu	4. 巻 8
2. 論文標題 Complete Genome Sequence of the Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus Strain JMUB3031, Isolated from a Patient with Fatal Community-Acquired Pneumonia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e01652-18
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.01652-18	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Aziz Fatkhanuddin, Hisatsune Junzo, Yu Liansheng, Kajimura Junko, Sato 'o Yusuke, Ono Hisaya K., Masuda Kanako, Yamaoka Mika, Salasia Siti Isrina Oktavia, Nakane Akio, Ohge Hiroki, Kusunoki Yoichiro, Sugai Motoyuki	4. 巻 88
2. 論文標題 Staphylococcus aureus Isolated from Skin from Atopic-Dermatitis Patients Produces Staphylococcal Enterotoxin Y, Which Predominantly Induces T-Cell Receptor V α -Specific Expansion of T Cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 e00360-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/IAI.00360-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe Shinya, Aiba Yoshifumi, Tan Xin-Ee, Li Feng-Yu, Boonsiri Tanit, Thitiananpakorn Kanate, Cui Bintao, Sato 'o Yusuke, Kiga Kotaro, Sasahara Teppei, Cui Longzhu	4. 巻 19
2. 論文標題 Complete genome sequencing of three human clinical isolates of Staphylococcus caprae reveals virulence factors similar to those of S. epidermidis and S. capitis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Genomics	6. 最初と最後の頁 810
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12864-018-5185-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 佐藤祐介, 菅井基行	4. 巻 75
2. 論文標題 ブドウ球菌	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 医学と薬学	6. 最初と最後の頁 753-768
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計39件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 佐藤祐介
2. 発表標題 ブドウ球菌食中毒特異的クローンの同定とその解析
3. 学会等名 第62回ブドウ球菌研究会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤 祐介, 相羽 由詞, 氣駕 恒太郎, 渡邊 真弥, 笹原 鉄平, 早川 靖彦, 崔 龍洙
2. 発表標題 ブドウ球菌属細菌における高効率エレクトロポレーション法の確立
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 祐介, 鐘司 光貴, 渡邊 真弥, 相羽 由詞, 氣駕 恒太郎, 菊池 賢, 平松 啓一, 崔龍洙
2. 発表標題 Staphylococcus capitisにおけるバンコマシン/テイコプラニン耐性の乖離機構の解明
3. 学会等名 第63回 日本ブドウ球菌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤 祐介, 菅井 基行
2. 発表標題 ブドウ球菌食中毒の誤謬
3. 学会等名 第64回 日本ブドウ球菌研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 祐介, 李 峰宇, 氣駕 恒太朗, 渡邊 真弥, 相羽 由詞, 河内 護之, Xin Ee Tan, Tanit Boonsiri, Kanate Thitianapakorn, 崔 龍洙
2. 発表標題 殺菌キメラファージの開発(7) ファージによる細菌感染症治療モデルの確立
3. 学会等名 第92回 日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤 祐介, 鐘司 光貴, 渡邊 真弥, 相羽 由詞, 氣駕 恒太朗, 菊池 賢, 平松 啓一, 崔 龍洙
2. 発表標題 Staphylococcus capitis におけるグリコペプチド系抗菌薬感受性の乖離機構の解明
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yusuke Sato 'o, Mitsutaka Shoji, Shinya Watanabe, Yoshifumi Aiba, Kotaro Kiga, Ken Kikuchi, Keiichi Hiramatsu, Longzhu Cui
2. 発表標題 walK mutation is responsible for the reverse cross-resistance of Staphylococcus capitis against vancomycin and teicoplanin
3. 学会等名 18th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections (ISSSI) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----