

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09553

研究課題名（和文）多剤耐性黄色ブドウ球菌の口腔定着を阻害する天然由来プレバイオティクス因子の探索

研究課題名（英文）Search for naturally-derived prebiotic factors that inhibit oral colonization of multidrug-resistant *S. aureus*

研究代表者

松尾 美樹（Kawada-Matsuo, Miki）

広島大学・医系科学研究科（歯）・准教授

研究者番号：20527048

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究で黄色ブドウ球菌（Sa）への抗菌活性を検証した結果、皮膚分離 *Staphylococcus epidermidis*（Se）については新規を含む3株、口腔分離 *Streptococcus mutans*（Sm）については複数の菌株が候補として挙げられた。Seについてはゲノム解析から抗菌効果を有する因子は、細菌が産生する抗菌物質バクテリオシンであることが明らかとなった。Smは、ゲノム解析から得られたデータを元に系統樹を作成し、各バクテリオシンならびに血清型分布状況の比較や各細菌に対する抗菌活性を網羅的に検証した結果、Smのバクテリオシンが細菌叢形成に影響を与えることが示唆された（論文投稿中）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、誤嚥性肺炎や化膿性疾患等の重篤な疾病を惹起する口腔黄色ブドウ球菌の中でも多剤耐性黄色ブドウ球菌の口腔内定着阻害を目的としたプレバイオティクス因子をヒトに常在する細菌から見出した。口腔から分離した黄色ブドウ球菌に有効な天然由来の新規プレバイオティクス因子発見とその抗菌作用機序解明による薬剤耐性化有無を評価することが可能になると予測される。本研究から得られた結果は、多剤耐性黄色ブドウ球菌を口腔から排除することで、臨床の現場で問題となっている術中の敗血症や高齢者における誤嚥性肺炎などの予防への貢献が期待できると考える。

研究成果の概要（英文）：As a result of verifying the antibacterial activity against Sa in this study, three strains including a new antibacterial agent of *Staphylococcus epidermidis* (Se) isolated from the skin and multiple strains of *Streptococcus mutans* (Sm) isolated from the oral cavity were listed as candidates. Genome analysis of Se revealed that the factor having an antibacterial effect is the bacteriocin, an antibacterial substance produced by bacteria. In Sm, it was created a phylogenetic tree based on the data obtained from genome analysis, compared the distribution of each bacteriocin and serotype, and comprehensively verified the antibacterial activity against each bacterium. It was suggested that it affects the microbiome formation (submission of paper).

研究分野：細菌学、口腔細菌学

キーワード：多剤耐性菌 黄色ブドウ球菌 バクテリオシン 二成分制御系

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*, 以下 Sa) はヒトの皮膚や粘膜に常在する細菌であり、およそ 20-30% のヒトに定着している。最も分離頻度の高い部位は鼻前庭や鼻咽腔であり、その他の定着部位として皮膚や口腔などからも分離される。

薬剤耐性 Sa が口腔に常在していた場合、口腔を起点に各臓器へ本菌が拡がる可能性は高く、その結果重篤な感染症が起こる確率が高くなってしまふ。超高齢化社会を迎える日本において、高齢者の死因第 3 位は Sa などによる肺炎であり、口腔に定着する Sa は肺疾患罹患率の上昇ならびに薬剤投与による治療費の増加という大きな問題を引き起こす。そのため、口腔から Sa を除菌することは重要であり、口腔内の多剤耐性化 Sa 排除の重要性は高まるものと考えられ、高齢者・要介護者に対する多剤耐性黄色ブドウ球菌のコントロールの実践は必要不可欠である。

### 2. 研究の目的

本研究は、誤嚥性肺炎や化膿性疾患等の重篤な疾病を惹起する口腔黄色ブドウ球菌の中でも多剤耐性黄色ブドウ球菌の口腔内定着阻害を目的としたプレバイオティクス因子を検索することが目的である。方法としては、1. 生体由来ペプチド因子・植物由来ペプチドのプレバイオティクス因子精製とヒト口腔から分離した黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性評価 2. ヒト口腔から分離した黄色ブドウ球菌におけるプレバイオティクス因子の耐性パターン解析、以上の 2 つの研究について解析を行なった。本研究により得られる結果は、口腔から分離した黄色ブドウ球菌に有効な天然由来の新規プレバイオティクス因子発見とその抗菌作用機序解明による薬剤耐性化有無を評価することが可能になると予測される。本研究は多剤耐性黄色ブドウ球菌を口腔から排除することで、臨床の現場で問題となっている術中の敗血症や高齢者における誤嚥性肺炎などの予防への貢献が期待できると考える。

### 3. 研究の方法

(1) direct 法、MIC 法による抗菌剤感受性試験：Direct 法では、バクテリオシン産生性を検証する目的で行った。方法としては、口腔・鼻腔・皮膚から分離した *Streptococcus mutans* (Sm) や *Staphylococcus epidermidis* (Se) を TSA に spot 後培養し、soft agar に Sa を添加し、spot した TSA 上に pour し、培養した。判定は 16 時間後の阻止円の有無や大きさを測定することで行った。最小発育阻止濃度 (MIC) 法は二倍機積放を用いて、OD=1.0 の菌を  $10^5$  個接種し、24 時間後の MIC を測定した。

(2) ゲノム解析：ゲノム解析に用いる DNA は、Sa は lysostaphin 処理、Sm は mutanolysin 処理、Se は mutanolysin+lysostaphin 処理を各々行った後、エタノール沈殿で濃縮し、濃度が  $100 \mu\text{g/ml}$  以上になるよう調整した。による染色体 DNA を抽出後、エタノール沈殿により精製した DNA を、共同研究機関である国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター (AMRRC) にてシーケンスを実施、その後遺伝子パターン解析は SNPGENE ソフトを用いて行なった。具体的には DNA library を作成して sequence を行い、Illumina MiSeq による short read sequence, Oxford NANOPORE MinION による long read sequence を行い、DNA 断片を assembly して contig を作成後、long read の遺伝子情報を取得・遺伝子配列を再現し、既報の遺伝子配列との alignment を行なった。

(3) RNAseq, quantification PCR (qPCR) を用いた遺伝子発現解析：抗菌剤による遺伝子誘導を検証する目的で、RNAseq, qPCR を行なった。対数増殖期の菌液に  $1/8\text{MIC}$  の抗菌剤を添加し 15 分培養後、菌を回収し、acid-phenol 法を用いて RNA 抽出を行なった。RNAseq では TAPEstation にて RNA の品質チェックを行なった後、マクロジェンジャパンへ RNAseq 解析を委託した。得られた raw

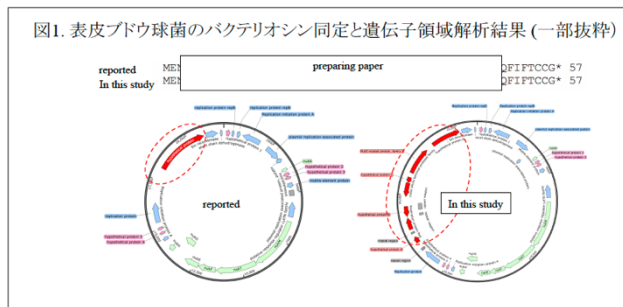
data からコントロールと抗菌剤添加時のリード数を比較し、発言誘導の有無を検証した。qPCR は、RNA から cDNA を作成後、設計した primer を用いて internal control との相対比較による発現を検証した。

(4) 遺伝子欠損株、相補株作成 : Sm, Sa で必要に応じて遺伝子欠損株、相補株を作成した。方法は申請者がこれまで用いた方法に準じて行った。(広島大学遺伝子組み換え承認番号 2019-239,2019-240)

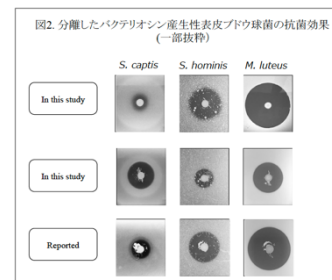
#### 4. 研究成果

##### (1) 口腔・皮膚から分離した常在細菌が産生する抗菌性ペプチドの同定

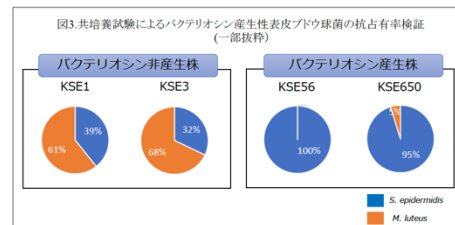
① ボランティアの皮膚から分離した *Staphylococcus epidermidis* (Se) と口腔から分離した *Streptococcus mutans* (Sm) の Sa 含めた各種細菌種に対する抗菌活性を、direct 法を用いて行なった。その結果、Sm は多数の株で抗菌活性を認め、Se も 3 株で抗菌活性を認めた。



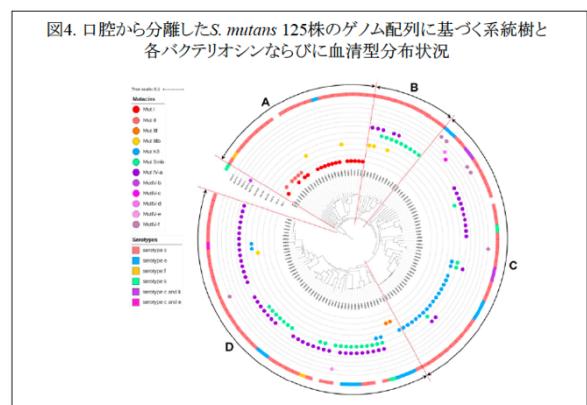
Se については、ゲノム解析後 bactibase データベースを用いてバクテリオシン遺伝子の検索を行なった。その結果、3つのバクテリオシン候補を認め、そのうち1つは図1のようにプラスミド性であった。Direct 法による感受性試験結果を図2、共培養による Se の占有率を図3に示す。Direct 法から、今回分離したバクテリオシン産生能を持つ Se の多菌に対する抗菌活性には多様性があることが明らかになった。さらに、生体常在化とバクテリオシンの関わりについて検証する目的で行なった共培養試験では、バクテリオシン非産生 Se である



KSE1,3 に比較し、バクテリオシン産生性を持つ KSE56, 650 では、他菌との共培養時に有意に占有率が上昇していることが明らかとなった。これらのことから、Se が産生するバクテリオシンは他菌に対する抗菌力も持つことならびに細菌叢における自己領域の確保に重要な役割を果たしていることが明らかになった。現在 Se が産生するバクテリオシンについてのデータは論文投稿準備中である。



Sm が産生するバクテリオシンについては、ゲノム解析後系統樹を作成し、各バクテリオシンならびに血清型分布状況を比較した。図4は、分離した123株のゲノム配列に基づく系統樹を示す。NGS ベースの系統樹は、グループ A~D の4つの主要なクラスターを形成した。各種バクテリオシン遺伝子の分布については、例えば赤丸のムタシン I、朱色のムタシン II 陽性株は全て同じグループ A のクラスターに分類されたが、紫~ピンクのグラデーションで示すムタシン IV 陽性株はグループ B, C、および D に分散していた。このようにバクテリオシンのタイプによってクラスターを形成するものとしめないものがあることが明らかになった。一番外枠は血清型抗原とバクテリオシンの関係を示し、ほとんどの Sm 株は血清型 c を示し、



バクテリオシンと血清型抗原の相関は今回のクラスタリングからは認められなかった。さらにこれらの Sm の各細菌種に対する抗菌効果を検証した結果、菌種によって抗菌パターンが異なることが明らかとなり、保有するバクテリオシンによって活性パターンが異なるため、Sm のバクテリオシン細菌叢形成に影響を与えることが示唆された。現在 Sm についてのこれらの結果は論文投稿中である。

本研究に先立って、乳酸菌由来バクテリオシンであるナイシンを sub-MIC 濃度作用させることにより生じた、新たな高度耐性 MRSA について報告した。この研究を元に、臨床で用いられる薬剤を用いた同様の菌株分離の有無を検証した。

図5. BC高度耐性菌のDNAマイクロアレイの結果 (一部抜粋)

BC-		BC+		Gene name
SAB/MW2	SAB/MW2	SAB/MW2	SAB/MW2	
88.10250855	105.1195829	MW1959		hld
58.28923561	91.54543908			delta-hemolysin
50.95093352	49.82559084	MW1959-1960		RNAIII
33.7453219	29.02624508	MW1960		agrB
33.28364733	27.41367894	MW1961		agrD
32.83923711	76.3250905	MW1056		hypothetical protein, similar to antibacterial protein
25.29551582	55.78272116	MW1057		hypothetical protein, similar to antibacterial protein
23.05210495	22.88458878	MW1962		agrC
14.79402351	19.08948684	MW1963		agrA
				accessory gene regulator B
				accessory gene regulator A

解析方法は、sub-MIC 濃度の各種抗生剤を複数回作用させた Sa MW2 株を、MIC 法にて各種抗生剤感受性を検証した。高度耐性化した株について、RNA 抽出後マイクロアレイ解析による網羅的な遺伝子発現検証後、耐性候補遺伝子発現を定量性 PCR で検証することで耐性遺伝子を確定した。さらに不活性化株、不活性化遺伝子相補株を作製し、各種抗菌物質に対する感受性を MIC 法にて検証した。さらに DNA を抽出し、ゲノム解析を行い、遺伝子の変異等を検証した。図5はマイクロアレイの結果を一部抜粋したものである。アレイ解析から、TCS ならびに TCS 制御下にある遺伝子発現上昇を認めた。今回分離された薬剤高度耐性菌は、同じ薬剤から分離された Sa であるにも関わらず化学療法剤感受性に異なるパターンを認めている。その一因の一つとして agr の制御下にある non coding RNA の関与を現在検証中である。今回見出したバクテリオシン産生性 Se の耐性獲得に、Sm の新規の TCS が関与している可能性を見出した。そこで RNAseq を行い現在耐性因子を検証中である。

また、ヒト常在細菌由来以外にも、植物由来因子であるグリチルレチン酸やオオバクが、Sa ならびに Sm に抗菌活性を持つことも明らかにし、論文として報告を行った(研究業績参照)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Arii K, Kawada-Matsuo M, Oogai Y, Noguchi K, Komatsuzawa H.	4. 巻 Nov;8(11)
2. 論文標題 Single mutations in BraRS confer high resistance against nisin A in <i>Staphylococcus aureus</i> .	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiologyopen	6. 最初と最後の頁 e791
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/mbo3.791. Epub 2019 Jan 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 Yamashita T, Kawada-Matsuo M, Katsumata T, Watanabe A, Oogai Y, Nishitani Y, Miyawaki S, Komatsuzawa H	4. 巻 Jul;63(7)
2. 論文標題 Antibacterial activity of disodium succinoyl glycyrrhetinate, a derivative of glycyrrhetic acid against <i>Streptococcus mutans</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol.	6. 最初と最後の頁 251, 260
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12717.	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 Kawada-Matsuo M, Watanabe A, Arii K, Oogai Y, Noguchi K, Miyawaki S, Hayashi T, Komatsuzawa H.	4. 巻 86(8)
2. 論文標題 <i>Staphylococcus aureus</i> Virulence Affected by an Alternative Nisin A Resistance Mechanism.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Appl Environ Microbiol.	6. 最初と最後の頁 e02923-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.02923-19	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 Tsuji T, Kawada-Matsuo M, Migita H, Ohta K, Oogai Y, Yamasaki Y, Komatsuzawa H.	4. 巻 Jun;64(6)
2. 論文標題 Antibacterial activity of phellodendron bark against <i>Streptococcus mutans</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol.	6. 最初と最後の頁 424, 434
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12787	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 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡邊 温子、松尾 美樹、小松澤 均
2. 発表標題 Analysis of virulence in Nisin A highly resistant MRSA
3. 学会等名 第72回日本細菌学会九州支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾（川田）美樹、渡邊温子、小松澤均
2. 発表標題 Evaluation of high resistant mechanism against nisin A in nisin A high resistant MRSA
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsuko Watanabe, Kawada-Matsuo Miki, Hitoshi Komatsuzawa
2. 発表標題 Analysis of virulence in Nisin A highly resistant MRSA
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松尾(川田) 美樹 , 小松澤 均
2. 発表標題 Skillful survival strategies with TCSs of commensal bacteria against antimicrobial peptides
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松尾 美樹、小松澤 均
2. 発表標題 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌におけるナイシン高度耐性株の分離と耐性機構の解明
3. 学会等名 第60回 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松尾(川田)美樹、渡邊 温子, 小松澤均
2. 発表標題 Association for virulences of psma high-expression MRSA isolated by exposing nisin A
3. 学会等名 第64回 日本ブドウ球菌研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

広島大学 研究者総覧 <a href="https://seeds.office.hiroshima-u.ac.jp/profile/ja.1b583e10bfc1ef0520e17560c007669.html">https://seeds.office.hiroshima-u.ac.jp/profile/ja.1b583e10bfc1ef0520e17560c007669.html</a>
---

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
研究分担者	小松澤 均  (Komatsuzawa Hitoshi)  (90253088)	広島大学・医系科学研究科・教授   (17701)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	大貝 悠一  (Oogai Yuichi)  (40511259)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教     (17701)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関