

平成 21 年 4 月 15 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19590456

研究課題名(和文) 市中獲得 MRSA 出現の遺伝学的解析

研究課題名(英文) Genetic bases for the emergence of community-associated MRSA strains

研究代表者

伊藤 輝代 (ITO TERUYO)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10095763

研究成果の概要：

近年世界中に蔓延しつつある市中感染型 MRSA の出現をその SCC*mec* の構造解析と遺伝子伝達実験の2つの方向から解析をした。その結果、市中感染型 MRSA のもつ多様な SCC*mec* の構造を明らかにし、SCC*mec* の形成を考察する貴重は知見を得た。即ち、ブドウ球菌属のもつ SCC と呼ぶ動く遺伝因子に、*mec* 遺伝子複合体が composite transposon として転移したという説を裏付ける新しい傍証を提供した。しかし実験的にその形成過程を解明する目的は、現段階は、終了したとは言えずその途上にある。本研究で明らかにし得た遺伝子伝播に関する知見は以下に要約される。

- (1) Phage transduction による SCC*mec* の伝達はおこるが、その頻度は低い。本実験で検討した限り、SCC*mec* の伝達は、全ての全領域が伝達された場合のみ成功している。
- (2) Phage の吸着により、competency に関する遺伝子の発現が上昇する。
- (3) conjugative plasmid の伝達に伴ってトランスポゾン Tn*554* の転移が促進され、ともに伝達される。しかし、メチシリン耐性に関する遺伝子はこの限りではない。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
平成 20 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学(含真菌学)

キーワード：MRSA、市中感染症、コンピテンス、耐性伝達

## 1. 研究開始当初の背景

市中におけるMRSAの出現

我が国ではMRSAは1980年代より問題とな

り、現在病院で分離される黄色ブドウ球菌の約50%を占める院内感染の重要な起因菌である。しかし最近では、MRSAによる市中感染症や健康人におけるMRSAの保有も数多く報

告されるようになった。米国からは、MRSA感染症に罹患した小児が壊死性肺炎、敗血症の結果死亡するという大変衝撃的な事例が報告された (CDC, 1999)。原因となった市中獲得MRSAの全ゲノム配列の決定により、この株は病院型MRSAとは異なるSCC*mec*を持ち、病原性に関与する遺伝子としては、Panton Valentine Leucocidine (PVL)、エンテロトキシンH、コラーゲン結合蛋白遺伝子等を保有することが明らかにされた (Baba et al, 2002)。

現在、米国では、特定の市中獲得MRSAクローンUSA300 (ST8, SCC*mec* type-IV PVL陽性) がスポーツ選手、老人ケア施設、同性愛の男性、受刑者、退役軍人などいわゆる市中から分離されるばかりでなく、病院内でも蔓延するようになり大問題となってきている。我が国でも、幼稚園、保育園の園児の一部が保有し、また小児のとびひ由来の患者から分離された黄色ブドウ球菌の多くがMRSAであることが報告されている。米国の市中獲得MRSAクローンの我が国へ伝播する可能性も極めて高く、その対策も急務となっている。

#### SCC*mec*の発見によるMRSAの分子疫学の進歩

MRSAのメチシリン耐性はβ-ラクタム薬に親和性の低い特有のペニシリン結合蛋白PBP 2'の産生によることが判明し、染色体上に存在するPBP2'をコードする遺伝子*mecA*もクローニングされた。MRSAにもMRC-NSにも共通した*mecA*遺伝子が存在することから、

*mecA*が種を超えて広くブドウ球菌属の間に伝播することが示唆されていたが、*mecA*をコードする遺伝因子Staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*)の存在を明らかにしたのは我々の研究であった (Ito et al. 1999, Katayama et al, 2000)。更に、我々は詳細に幾つかの株の持つSCC*mec*の構造を解析した結果、SCC*mec*は共通して*ccr*遺伝子複合体 (SCC*mec*の転移に関与する部位特異的組替え酵素 [cassette chromosome recombinase; *ccr*]と*mec*遺伝子複合体 (*mecA*及びその制御遺伝子である*mecRI*, *mecI*及びその周辺に存在する挿入配列の複合体)を持つこと、しかし両複合体ともにアロタイプが存在すること、及び両複合体以外の領域にも違いが存在することを見だし、それらの違いに基づいてSCC*mec*をタイプ別に分けることを世界に先駆けて提唱した (Ito et al. 2001)。以後、MRSAクローンの決定にSCC*mec*タイプの決定は必須なものとなり、病院型MRSA (type-I, II, III SCC*mec*を持つものが多い) と市中獲得MRSA (type-IV, type-V SCC*mec*が多

い) がSCC*mec*の違いで明確に区別され、市中に出現したMRSAは、病院のMRSAが市中に流出したものではなく、市中で別個にMRSAが出現しているという事実が明らかにされた。

#### 2. 研究の目的

ブドウ球菌は新しい抗菌薬が使用されるとすぐに自然界に存在する耐性遺伝子を獲得し耐性化を進めてきたという歴史的経過がある。最近の市中でのMRSAの蔓延の背景は市中における抗菌薬の多用という背景があると推察されるが、どのようにしてブドウ球菌は自然界に存在する耐性遺伝子を取り込み、いち早く薬剤存在化で選択され蔓延したという点に関しては不明な点が多い。

本研究では市中に出現したMRSAのもつSCC*mec*の構造解析を行いその特徴を明らかにしつつ、そのようなSCC*mec*がどのような過程で形成されたかを明らかにすることを目的とした。

本研究においては後者を特にブドウ球菌が保持するファージとの関連で検討することにした。

#### 3. 研究の方法

##### 1. 市中感染型MRSAのもつ未知のSCC*mec*の構造決定。

(1) Fosmid libraryの作成とクローニング、Long PCRによるDNA断片の増幅により、未知のSCC*mec*の全領域をカバーするDNA断片を作成する。

(2) 新規SCC*mec*の全塩基配列の決定を行う。

(3) 塩基配列の解析比較を行う。

##### 2. 耐性遺伝子の伝達実験

(1) ブドウ球菌の選定

当研究室で既に収集した多数のMRSA、MRC-NSの中から供与菌として使用する候補を選定する。

(2) ファージ誘発促進に関与する薬剤、因子を検討する。またそれらの遺伝子発現に及ぼす効果をマイクロアレイを用いて解析する。

(3) 種々の実験系での遺伝子の伝達実験を特にファージとの関連で行う。

#### 4. 研究成果

1. 当研究室で収集したMRSA、MRC-NSの薬剤感受性をもとに、代表的菌株を選定し、その保持する耐性遺伝子を決定した。黄色ブドウ球菌を、その保持するrestriction-modification systemを基に分類

する PCR システムを確立し、同じタイプの修飾酵素 *hsd* を持つ受容菌と供与菌の系を確立した。

2. 黄色ブドウ球菌ファージの誘発に関しては、キノロン系薬もマイトマイシンCについてファージ誘発を起こす事が確認された。キノロン系薬及びファージ吸着の黄色ブドウ球菌に及ぼす影響をマイクロアレイにて解析した。その結果、ファージを吸着させた場合には transformation に関与する遺伝子と推定される多くの遺伝子の発現が促進されることが確認された。ノルフロキサシンでは *recA*, *lexA*, *uvrA*, *B* などのファージ誘発に関与する遺伝子の発現の上昇が顕著であったが、transformation に関与する遺伝子の発現もわずかではあるが上昇すると推察された。

3. 伝達実験の予備実験としては phage transduction, mixed culture, filter mating の三つの手法を用いてテトラサイクリン耐性を持つプラスミド (pT181)、エリスロマイシン耐性を持つトランスポゾン (Tn554) の伝達を確認した。

4. 次に上記 (1) で選択された菌、および (2) で検討されたシステムを用いてプラスミド pT181, トランスポゾン Tn554, SCCmec の伝達を行った。しかし、いずれの場合も pT181, および Tn554 の伝達は確認されたが、SCCmec の伝達は確認されず、メチシリン耐性の水平伝播は傍証の段階に留まった。現在までメチシリン耐性の伝達は transduction の場合のみ確認されている。

5. 一方で、市中獲得 MRSA のもつ多様な SCCmec の構造決定を行い、新規 SCCmec として、type II.5 (日本分離株), type VI, IVj, type VII (スウェーデン分離株), type III variant (インド分離株), type V(5&5C2) (日本および台湾分離株), type IX (タイ人由来), および type X (カナダ人由来) を報告した (Kondo Y et al, 2007; Berglund C et al, 2008; Han X et al, 2009; in preparation)。type V(5&5C2) という全く同じ構造の SCCmec が染色体タイプの異なる日本分離株、台湾分離株、および *S. intermedius* に保持されるという、SCCmec の水平伝播の傍証ともなる知見である。また *S. haemolyticus* の *orfX* 下流に集積する数多くの pseudo SCC の構造を決定して行く中で、改めて *mec* 遺伝子複合体と呼んでいた挿入配列 IS431 を両端にもつ構造である class C2 *mec* 遺伝子複合体および class C1 *mec* 遺伝子複合体は composite transposon として転移してきた可能性を示唆する data を得た。

## 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 13 件)

1. Watanabe S, Ito T, Hiramatsu K. 2007 Susceptibilities of healthcare- and community-associated methicillin-resistant staphylococci to the novel des-F(6)-quinolone DX-619. J Antimicrob Chemother. 60 :1384-1387

2. Watanabe S, Ito T, Morimoto Y, Takeuchi F, Hiramatsu K. 2007

Precise excision and self-integration of a composite transposon as a model for spontaneous large-scale chromosome inversion/deletion of the *Staphylococcus haemolyticus* clinical strain JCSC1435. J Bacteriol. 189: 2921-2925

3. Yoko Kondo, Teruyo Ito, ( 4 members), and Keiichi Hiramatsu Combination of multiplex PCRs for SCCmec type assignment: Rapid identification system for *mec*, *ccr*, and major differences in junkyard regions. 2007 Antimicrob Agents Chemother 51: 264-274

4. Otsuka J, (3 members), Ito T, ( 4 members), Tashiro H. 2007

Development and validation of microarray-based assay for epidemiological study of MRSA. Mol Cell Probes. 1-13

5. Tajima Y, Komatsu M, Ito T, Hiramatsu K. 2007. Rapid detection of *Staphylococcus aureus* strains having reduced susceptibility to vancomycin using a chemiluminescence-based drug-susceptibility test. J Microbiol Methods. 70: 434-441

6. Berglund C, Ito T, Ikeda M, Ma XX, Söderquist B, Hiramatsu K. 2008. Novel type of staphylococcal cassette chromosome *mec* in a methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain isolated in Sweden. Antimicrob Agents Chemother 52: 3512-6

7. Kishii K, Ito T, Watanabe S, Okuzumi K, Hiramatsu K. 2009. Recurrence of

heterogeneous methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) among the MRSA clinical isolates in a Japanese university hospital.

J Antimicrob Chemother. 62(2): 324-328

8. Fumihiko Sakai, (8 members) Teruyo Ito  
Multiplex PCRs for Assignment of Staphylocoagulase Types and Subtypes of Type VI Staphylocoagulase  
J Microbiol Methods. 75(2):312-317

9. Kanenari Oishi, Tadashi Baba, Yasuo Nakatomi, Teruyo Ito, and Keiichi Hiramatsu. 2008, A Latex Agglutination Assay for Specific Detection of Panton-Valentine Leukocidin  
J Microbiol Methods. 75(3): 411-5

10. Xiao Xue Ma, Teruyo Ito, et al. 2008.  
Two different PVL phage lineages predominate in Japan  
J Clin Microbiol 46(10):3246-58

11. Kaito C, Omae Y, Matsumoto Y, Nagata M, Yamaguchi H, Aoto T, Ito T, Hiramatsu K, Sekimizu K. 2008. A novel gene, fudoh, in the SCCmec region suppresses the colony spreading ability and virulence of Staphylococcus aureus.  
PLoS ONE. 3(12) e3921

12. Jamaluddin TZ, Kuwahara-Arai K, Hisata K, Terasawa M, Cui L, Baba T, Sotozono C, Kinoshita S, Ito T, Hiramatsu K. 2008.  
Extreme genetic diversity of methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis (MRSE) disseminated among healthy Japanese children.  
J Clin Microbiol. 46(11), 3778-83.

13. Han X, Ito T, Takeuchi F, Ma XX, Takasu M, Uehara Y, Oliveira DC, de Lencastre H, Hiramatsu K. 2009. Identification of a novel variant of SCCmec, type-II.5, and its truncated form by the insertion of putative conjugative transposon Tn6012.  
Antimicrob Agents Chemother. [Epub ahead of print]

[学会発表] (計 13 件)

1. Kondo Y, Ito T, Ma XX, Watanabe S, and

Hiramatsu K Characterization of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus strains isolated in a Japanese geriatric hospital in early 1980s  
APIC 2007年6月 USA、

2. 渡邊真弥, 伊藤輝代, 平松啓一  
Staphylococcus haemolyticus のマンノース及び N-アセチルグルコサミンによる増殖抑制  
第 52 回日本ブドウ球菌研究会 2007年9月20日~21日 徳島大学長井記念ホール

3. 渡邊真弥, 伊藤輝代, 森本ゆふ, 竹内史比古, 平松啓一 挿入配列が引き起こす Staphylococcus haemolyticus ゲノムの大規模ゲノムリアレンジメント  
第 19 回微生物シンポジウム 2007年9月7日~8日 東京大学本郷キャンパス薬学系研究科総合研究棟講堂

4. 渡邊真弥, 伊藤輝代, 森本ゆふ, 竹内史比古, 平松啓一 挿入配列の転移酵素により引き起こされた Staphylococcus haemolyticus ゲノムの逆位と欠失  
第 80 回日本細菌学会総会 2007年3月26日~28日 アジア太平洋トレードセンター

5. 伊藤輝代, 馬 笑雪, 韓 笑, 近藤 陽子, 星 最智, 岸井 こずえ, 桑原 京子, 平松 啓一 ブドウ球菌属に存在する SCCmec の構造解析  
第 80 回日本細菌学会総会 2007年3月26日~28日 アジア太平洋トレードセンター

6. 馬 笑雪, 伊藤 輝代, 平松 啓一 二つの PVL フェージの我が国における分布  
第 80 回日本細菌学会総会 2007年3月26日~28日 アジア太平洋トレードセンター

7. 岸井 こずえ, 伊藤 輝代, 奥住 律子, 平松 啓一 CEZ 感受性 MRSA の薬剤感受性傾向及び遺伝学的性状について  
第 80 回日本細菌学会総会 2007年3月26日~28日 アジア太平洋トレードセンター

8. Teruyo Ito, Shanshuang Li, Anders Rhod Larsen, Robert Leo Skov, Han Xio, Keiichi Hiramatsu. Analysis of SCCmec elements carried by MRSA strains isolated from veterinarians.  
48th ICAAC Washington, USA

9. Teruyo Ito What have we learnt from the structural comparison of SCC elements?  
13th ISSSI 2008.9.7 Cairns,  
Australia

10. Teruyo Ito コアグラマーゼ遺伝子にもとづくタイピング. 第53回ブドウ球菌研究会  
2008.9.17 東京大学

11. 伊藤 輝代、馬 笑雪、渡辺 真弥、平松 啓一  
スウェーデンで分離された市中獲得 MRSA の保持する SCCmec  
第81回日本細菌学会 2008.3.24 京都

12. 韓 笑、伊藤 輝代他 高知大学病院で分離された MRSA の持つ新規 SCCmec  
第81回日本細菌学会 2008.3.25 京都

13. 韓 笑、伊藤 輝代他 S. haemolyticus における cassette chromosome の集積と進化  
第53回ブドウ球菌研究会 2008.9.19 東京

[図書] (計 1 件)

Ito, I., K. Kuwahara, and K. Hiramatsu. 2007.

Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Protocols; Methods in Molecular Biology. Humana press: 391

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

○取得状況 (計 件)

[その他]

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 輝代 (ITO TERUYO)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：10095763

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者

### (4) 協力研究者

順天堂大学・医学研究科・感染制御科学

大学院生・韓 笑