

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 13 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590093

研究課題名(和文)メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の多剤耐性化に関する因子の同定

研究課題名(英文)Identification of genetic factors responsible for multidrug resistance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)

研究代表者

松尾 美記(Matsuo, Miki)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：70320322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：in vitroで作成した耐性変異株45株の全ゲノム配列を決定し、バンコマイシン耐性(VISA)に関与する遺伝子を網羅的に同定し、その耐性メカニズムを解明した。二成分制御系因子の変異に加えて、rpoB、rpoCなどの制御的遺伝子の変異により、細胞のmetaboliteの流れが変化し、peptidoglycanの産生量が増加することとautolysis活性の低下が頻度の高い耐性メカニズムであった。さらにmetabolismの分岐点にある酵素をコードする数十の遺伝子の変異も同様の効果を持つ。そのため、MRSAのバンコマイシン耐性化は多様な遺伝子変異でおこり、結果的に高頻度におこりえることを示した。

研究成果の概要(英文)：Vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* (VISA) affects the sensitivity of not only glycopeptides (vancomycin and teicoplanin) but also daptomycin. To understand the overall vancomycin resistance mechanism of VISA, we performed whole genome sequencing of 45 VISA strains isolated by vancomycin selection, and identified mutations using a comparative genome analysis. The results indicated that mutations in rpoB and rpoC genes, in addition of two-component regulatory systems, led to changes in the flow of metabolites, and caused increased peptidoglycan production and reduced autolytic activity. We also found that the functional alteration of the genes in multiple metabolic pathways in addition to those with regulatory functions can achieve hVISA-to-VISA phenotypic conversion. This explains the high frequencies of hVISA-to-VISA conversion and the characteristic shape of the population curves of hetero-VISA strains.

研究分野：細菌学、分子生物学

キーワード：薬剤耐性機構 黄色ブドウ球菌 耐性変異 VISA MRSA バンコマイシン slow-VISA

### 1. 研究開始当初の背景

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA) は今や世界中に蔓延する代表的な院内感染菌である。MRSA はメチシリンのみならず、あらゆるラクタム薬やキノロン、テトラサイクリン、マクロライドなどの多種の薬剤に対しても耐性を示し、院内感染症の治療を困難にしている。数少ない抗 MRSA 薬に対しても耐性を獲得した菌の蔓延は脅威であり、新たなターゲットを持つ抗菌剤の開発は急務である。

バンコマイシンは数少ない抗 MRSA 薬の一つである。研究代表者らの研究室ではバンコマイシン治療無効の患者からバンコマイシン耐性株を分離し、世界で初めて VISA (Vancomycin-intermediate *S. aureus*) 株 Mu50 を発見した。

VISA はバンコマイシンやテイコプラニンなどのグリコペプチド系抗菌薬だけでなくダプトマイシンの感受性も相関して低下を引き起こす。しかし、その他剤耐性機構については不明な点も多い。

VISA の耐性機構は細胞壁の肥厚化と構造変化により、バンコマイシンの細胞壁での消費と作用部位までの到着の遅延化である。そのような Mu50 の細胞壁の肥厚化と構造変化は二成分制御系因子 (*vraSR* と *graRS*) の変異と RNA ポリメラーゼのサブユニット *rpoB* 遺伝子の変異によって成し遂げられている。二成分制御系は細菌において、主要な環境感知・応答システムとして機能しているので、黄色ブドウ球菌は薬剤という環境シグナルを認知し遺伝子発現パターンの変化により、細胞壁の構造変化を成し遂げていると考えられる。

VISA 株 Mu50 の発見以降、世界各国から VISA の分離が報告されている。それらの VISA 耐性メカニズムは研究代表者らのグループが報告した *vraSR* や *graRS* の他にも、二成分制御系 *walKR*、レギュレーター *sarA* や *mgrA* などの変異も同定されているので、VISA 耐性に関わる経路は単一ではないと考えられる。実際、これまでに臨床分離された VISA のなかには、変異が報告されている遺伝子に変異が見出せない株がある。これらの株は未だ明らかにされていない因子により、バンコマイシン耐性を獲得していることを示している。

### 2. 研究の目的

本研究では、バンコマイシンの耐性化に関わる因子を網羅的に同定し、VISA の抗 MRSA 薬耐性機構の全貌を明らかにする。

### 3. 研究の方法

#### 耐性株の分離

臨床分離 hVISA 株 Mu3 および Mu3 由来の種々の hVISA 株を用いて、バンコマイシンにより選択した。具体的には Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地で一晚培養した菌液を  $10^4$  CFU

に調整して、BHI 液体培地に接種し一晚培養した。独立に得られた 50 本の一晚培養液をそれぞれ  $10^6$  CFU に調整してバンコマイシン (4 あるいは 6mg/L) を含む寒天平板培地に塗り広げて培養した。各寒天平板培地には平均しておよそ 20 個のコロニーが形成された。各平板培地から任意の一つのコロニーをとり、純化を 3 回繰り返して VISA 株を得た。

#### 全ゲノム解析と変異部位の同定

抽出したゲノム DNA は Nextera XT DNA library preparation kit を使用して DNA ライブラリーを調整し、MiSeq システムに供してシーケンスを行った。Mu3 株はすでに全ゲノム配列が決定された株 (accession number NC\_009782.1) であるのでこれを reference 配列として、得られたリード配列を mapping し、親株との比較により変異を同定した。

#### 遺伝子置換株の構築

遺伝子変異の置換は pKOR1 システムを用いて行った。

#### 相補株の構築

野生型 (親株) の DNA を template として、当該遺伝子を PCR により増幅し、シャトルベクターに組み込み、プラスミドを構築した。当該変異株に野生型遺伝子を持つプラスミドを electroporation により導入し、相補株を得た。

#### 薬剤感受性試験

##### 最小発育阻止濃度 (MIC)

各菌株に対する薬剤の MIC は Etest を用いて測定した。一晚培養した菌液を OD600=0.3 になるように調整し、綿棒で寒天培地に塗布した後 Etest を置いて 37 °C で培養し、24 時間毎に判読した。

##### Population 解析

37 °C で一晚培養した菌液を適当に希釈し、0-12 mg/L の各濃度のバンコマイシンを含む BHI 寒天培地に塗布した。37 °C で 48-72 時間培養した後、形成されたコロニーの数をグラフにプロットした。

##### 倍加時間の測定

一晚培養した菌液を OD600=0.3 に調整した後 10ml の BHI 培地に 10  $\mu$ l 接種し、automatic photorecording incubator を用いて 25rpm、37 °C で培養した。2分毎に OD600 値を測定し、プロットして増殖曲線を得た。倍加時間は次式を用いて求めた。

$$[(t_2 - t_1) \times \log 2] / [\log(\text{OD}_{600} \text{ at } t_2) - \log(\text{OD}_{600} \text{ at } t_1)]$$

##### 細胞壁の透過型電子顕微鏡観察

細胞壁の厚さの測定は最終倍率 30,000 倍で得られた電子顕微鏡画像から形態学的に測定した。各サンプルで赤道面にカットされた少なくとも 30 細胞について壁の厚さを測定

して評価した。

#### Autolysis 活性の測定

37 で対数増殖期後期 (OD600=2.0) まで培養した細胞を急冷し回収した。水で wash した後 Triton-X 含有 50mM Tris-HCl バッファーに懸濁し、30 でインキュベーションし、OD600 値の減少をモニタリングした。

#### 4. 研究成果

Van 耐性に関与する 15 の新規遺伝子を同定した。(発表論文)

比較ゲノム解析の結果から、45 株の全て株で 1 から 4 つの変異が同定された。驚くべきことに各株での変異は全てが異なるもので、同じ変異を持つ株は一つもなかった。この結果は MRSA のバンコマイシン耐性化は多様な遺伝子で起こることを示した。

この中で、ゲノム上に一つだけ変異が見出された株 32 株に注目した。これらの株に見出された変異は直接耐性の原因因子と考えられる。変異遺伝子の種類は 20 にのぼり、既に VISA 耐性との関与が明らかになっている遺伝子 (walk や pbp4 など) の他に、これまでに報告のない 15 の新規耐性遺伝子を見出した。

45 株のうち約 25% (12/45 株) が転写制御に関与する遺伝子であった。残り 75% は様々な代謝経路にある遺伝子であった。VISA 耐性機序はペプチドグリカン層の肥厚化にある。従ってこれらの遺伝子変異株も転写因子と同様に、ペプチドグリカン産生量を増大させる方向へ特定の遺伝子群の発現を増減させて、代謝の流れを変えていると考えられた。実際、細胞壁合成の代謝の分岐点にある多くの遺伝子 (例えば pykA や tarA など) が見出された。

表1 同定された耐性遺伝子

Category	Gene
<b>Cell envelope synthesis and modification</b>	
peptidoglycan synthesis	<i>pbp4</i>
cell wall hydrolase	SAHV_1760
Wall teichoic acid biosynthesis	<i>tagO</i>
	<i>tagA</i>
	SAHV_0256
Lipoteichoic acid biosynthesis	<i>gtaB</i>
<b>Transcription</b>	
basic transcription machinery	<i>rpoB</i>
	<i>rpoC</i>
regulator	<i>walk</i> or <i>vicK</i>
<b>Pyrimidine metabolism</b>	
	<i>cmk</i>
<b>Pyruvate metabolism</b>	
	<i>pykA</i>
	SAHV_1392
<b>Ribosomal protein</b>	
	<i>rpsU</i>
<b>Amino acid metabolism</b>	
	<i>trpC</i>
<b>Urease formation</b>	
	<i>ureD</i>
<b>Serine/threonine phosphatase</b>	
	SAHV_1209 ( <i>pp2c</i> )
<b>Unknown function</b>	
	SAHV_0372
	SAHV_0612
	SAHV_0741
	SAHV_2101

cytidylate kinase をコードする *cmk* 遺伝子変異による VISA 耐性 (発表論文)

新規に見出された *cmk* 変異遺伝子について、遺伝子置換実験と相補性試験を行い、確かに *cmk* 変異がバンコマイシン耐性に寄与することを示した。また、この *cmk* 変異 VISA 株はこれまでの VISA に観察されていたように細胞壁の肥厚化を伴っていた。

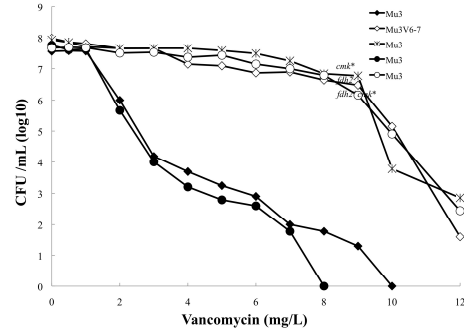


図1 *cmk*\* 遺伝子変異を導入した株 (Mu3*cmk*\* と Mu3*dh2*\**cmk*\*)、およびその親株 (Mu3 と Mu3*dh2*\*) の population 解析

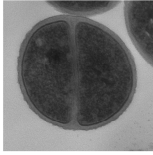
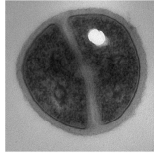
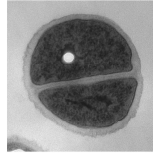
Parent	Vancomycin-selected	<i>cmk</i> gene-replaced
Mu3	Mu3V6-7	Mu3 <i>cmk</i> *
		
28.99 ± 2.59	32.64 ± 3.04	32.50 ± 3.31 (nm)

図2 *cmk*\* 変異による細胞壁の肥厚化

*rpoC* 変異は slow-VISA 耐性を発現する。(発表論文)

研究代表者らは VISA 耐性の新たな表現型として slow-VISA (sVISA) を同定している。(発表論文) sVISA は増殖速度が非常に遅く、耐性発現までに時間がかかり、さらに薬剤存在下では安定に耐性が保持されるが、一旦薬剤を取り除いて増殖させると、すぐに耐性を消失する性質をもつことから、難治性 MRSA 感染症の再燃に重要なのではないかと考えている。さらに sVISA は *rpoB* 変異により発現することが分かっている。今回得られた 45 の耐性株のうち、*rpoC* 変異を有する株もまた sVISA 耐性を発現することを明らかにした。

表2 *rpoC*(P440L) 変異を持つ sVISA 株の同定

strain	Phenotype of vancomycin resistance <sup>(a)</sup>	D.T. (min)	Vancomycin MIC (mg/L)					Appearance rate of large colonies
			24h	48h	72h	96h	120h	
V6-5	sVISA	72.9	6	12	16	16	16	10/2910 (0.3%)
V6-5-L1	hVISA	41.0	3	4	4	4	4	N.D.
Mu3 <i>dh2</i> *	hVISA	37.7	3	3	3	3	4	N.D.
Mu50	VISA	40.3	8	12	12	12	12	N.D.
6R-P	sVISA	62.2	8	12	16	16	16	3/1.0 x 10 <sup>7</sup>

(a) sVISA, slow VISA; hVISA, hetero-VISA.

表3 野生型rpoC遺伝子の導入によりsVISAの表現型は消失した

Strain	rpoC gene		D.T. <sup>(a)</sup> min	MIC <sup>(a,b)</sup> (mg/L)
	chromosome	plasmid		
V6-5(pSR_rpoC)	P440L	pSR_WTrpoC	43.0	4
V6-5(pSR)	P440L	pSR	72.7	16
V6-5	P440L	(-)	71.0	16
Mu3fdh2*	WT	(-)	37.1	3

(a) When the MICs and doubling times for the strains carrying the pSR plasmids were measured, 10 mg/L chloramphenicol was added to the BHI agar plates and medium to maintain the plasmids.

(b) The value of MIC was determined at 72h.

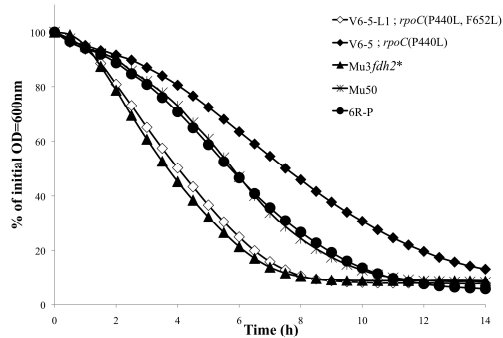


図3rpoC(P440L) 変異 sVISA 株 V6-5とその表現型復帰株V6-5-L1の autolytic 活性

rpoC 変異による sVISA 耐性にはペプチドグリカン合成促進と緊縮応答の機能が必要である。(発表論文)

rpoC 変異 sVISA 株は薬剤非添加の培地では高頻度で VISA あるいは hVISA へ戻ること、さらに、これらの hVISA あるいは VISA へ表現型が復帰した 10 株の全ゲノム解析、および表現型の解析により、この過程にペプチドグリカン合成経路と緊縮応答が関与することを示した。

## 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6件)

Matsuo M, Hishinuma T, Katayama Y, Hiramatsu K. A mutation of RNA polymerase ' subunit (RpoC) converts heterogeneously vancomycin intermediate S. aureus (hVISA) into 'slow-VISA' (sVISA). Antimicrob Agents Chemother. 2015. In printing 「査読有り」

Hiramatsu K, Katayama Y, Matsuo M, Sasaki T, Morimoto Y, Sekiguchi A, Baba T. Multi-drug-resistant Staphylococcus aureus and future chemotherapy. J Infect Chemother. 2014 Oct;20(10):593-601. 「査読有り」

Saito M, Katayama Y, Hishinuma T, Iwamoto A, Aiba Y, Kuwahara-Arai K, Cui L, Matsuo M, Aritaka N, Hiramatsu K. "Slow VISA," a novel phenotype of vancomycin resistance, found in vitro in heterogeneous vancomycin-intermediate Staphylococcus

aureus strain Mu3. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Sep;58(9):5024-35. 「査読有り」

Hiramatsu K, Ito T, Tsubakishita S, Sasaki T, Takeuchi F, Morimoto Y, Katayama Y, Matsuo M, Kuwahara-Arai K, Hishinuma T, Baba T. Genomic Basis for Methicillin Resistance in Staphylococcus aureus. Infect Chemother. 2013 45(2):117-36.

Matsuo M, Cui L, Kim J, Hiramatsu K. Comprehensive identification of mutations associated with hVISA-toVISA conversion of vancomycin resistance in laboratory-generated VISA strains from hVISA strain Mu3. Antimicrob Agents Chemother. 2013 57(12):5843-53. 「査読有り」

香本晃良、崔龍洙、江端望、渡辺由紀子、松尾美記、片山由紀、ピヤマ ペッチャロン、平松啓一(2015). 黄色ブドウ球菌における RNA ポリメラーゼ遺伝子の突然変異は Linezolid の高感受性に関連する。順天堂医学 2012 58(6):498-505. 「査読有り」

[学会発表](計10件)

Matsuo M, Hishinuma T, Katayama Y, Hiramatsu K (2015). Acquisition and loss of vancomycin resistance in hVISA with rpoC mutation. 第 88 回日本細菌学会総会； 2015.03.28；岐阜市 長良川国際会議場

Katayama Y, Hishinuma T, Iwamoto A, Aiba Y, Sasaki T, Matsuo M, and Hiramatsu K (2015). Characterization of 'slow VISA', a novel phenotype of vancomycin resistance in Staphylococcus aureus. 第 88 回日本細菌学会総会； 2015.03.28；岐阜市 長良川国際会議場

田淵史晃、浜本洋、松尾美記、岡崎充宏、垣内力、関水久 (2015). In vitro での変異原処理および薬剤選択による高度バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌の取得. 第 88 回日本細菌学会総会； 2015.03.28；岐阜市 長良川国際会議場

山口哲央、松尾美記、平松 啓一、松本哲哉(2015). Slow growth VISA strain from clinical isolate. 第 88 回日本細菌学会総会； 2015.03.28；岐阜市 長良川国際会議場

松尾美記、平松 啓一 (2014). VISA 株における cmk (cytidylate kinase) 変異によるバンコマイシン耐性機構の解明 第 87 回日本細菌学会総会； 2014.03.28；東京 タワーホール船橋

松尾美記、崔龍洙、金智英、平松啓一

(2013). 臨床分離 hetero Vancomycin-Intermediate *S. aureus* (hVISA) 株 Mu3 から作製した VISA 株を用いた、hVISA から VISA への変換に關与する遺伝子変異の網羅的同定 第58回 日本ブドウ球菌研究会; 2013.09.27; 八王子市 東京薬科大学

**Matsuo M**, Cui L, Kim J, Hiramatsu K (2013). A mutation of *cmk* (cytidylate kinase) gene confers reduced vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*. 第28回国際化学療法・感染症学会 (ICC 2013); 2013.6.6; Yokohama, Pacifico Yokohama.

松尾美記、崔龍洙、金智英、平松啓一 (2013). *cmk* 遺伝子 (cytidylate kinase) の変異は黄色ブドウ球菌のバンコマイシン耐性に關与する 第86回 日本細菌学会総会; 2013.03.18-20; 千葉市 幕張メッセ

本郷 勇, 松尾 美記, 伊藤 輝代, 平松 啓一 (2012). USA400 MW2 株における新規白血球溶解毒素 MW1941 及び MW1942 の同定と好中球溶解活性 第57回日本ブドウ球菌研究会; 2012.9.14.; 広島大学東京オフィス

**Matsuo M**, Cui L, Kim J, Hiramatsu K (2012). Comprehensive identification of mutations associated with vancomycin-resistance in laboratory-generated VISA strains 15th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections; 2012.8.29. ;LYON, Claude Bernard University Lyon 1

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

松尾 美記 (MATSUO, Miki)  
順天堂大学・医学部・助教  
研究者番号: 70320322