

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860321

研究課題名(和文)ブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群由来黄色ブドウ球菌の病原性発現機序に関する研究

研究課題名(英文)Pathogenic analysis of *S. aureus* isolated from Staphylococcal Scaled skin syndrome

研究代表者

久恒 順三 (Hisatsune, Junzo)

広島大学・医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：40513180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：検討課題A)において、SkipのN末領域のAドメインを欠損させた株は、ヒト血清及びヒト由来プラスミンでは切断されないことがわかった。また、Skip切断部位をMALDI-TOF/MSにより探索したところ、SkipのN末端側からAドメイン内に位置する僅か20残基付近で限定切断されていることが判明した。検討課題B)について、Skip高発現しているimpetigo/SSSS原性株は、sarTとsarU遺伝子間領域に6塩基欠損があるためにSkip発現の負の制御因子MgrAが結合できず、SarT及びSarU発現が増大するために、結果的にSkipが過剰発現していることが判明した。

研究成果の概要(英文)：On the investigation A), we found that A domain of Skip deletion mutant strain was not digested by human serum and human plasmin. And then, we found that cutting site of Skip have about N terminus 20 amino acid in A domain of Skip. On the investigation B), highly expressing Skip strain lacked 6-nucleotides in internecine region of arT and sarU. We found that global regulator MgrA binds to the region containing 6-nucleotides and lack of the short stretch prevents the binding of the MgrA, hence expression of SarT/SarU induces expression of Skip. In this study, we uncovered one of the reason why the strains causing SSSS shows high expression of Skip.

研究分野：細菌ゲノム

キーワード：細菌 ゲノム タンパク質 微生物

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌による水疱形成は、本菌が産生する表皮剥脱毒素 (Exfoliative toxin, ET; ETA, ETB, ETD の3つ) によって、表皮細胞の細胞間接着に関わるデスモグレイン1の選択的切断で表皮剥脱により生じる。両疾患ともに水疱を形成するが、何故 SSSS が皮膚の広範囲に広がって重症化してしまうのか、未だに不明である。両者の相違点としては、表皮剥脱毒素の血清型の違いが挙げられる。impetigo 由来株は ETA、SSSS 由来株では ETB が多いが、両毒素は同じ生物比活性を有する。また、ET 産生量は、一般的に ETA の方が ETB よりも多い。したがって、ET の血清型や産生量が病態の重症度に影響しているとは考え難い。その原因は他の要因にある可能性が考えられる。

2. 研究の目的

黄色ブドウ球菌による水疱を伴う皮膚疾患には伝染性膿痂疹 (impetigo) とブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群 (SSSS) が知られている。impetigo は水疱を伴う局所病変を形成するが、SSSS の病変は広範囲に、もしくは、全身性に広がって重症化する。両者の重症度は明らかに異なり、その病態の違いを説明する根拠は明らかにされていない。私どもは SSSS 由来株に選択的に発現する新規表層蛋白質 Skip を見出し、Skip が皮膚組織への菌の付着に関わる事を示唆してきた。本研究では表層蛋白質 Skip の皮膚感染における役割、病態の重症化との関連性に焦点を当てて究明する。

私どもは、これまでに国内の医療施設から収集した様々な疾患由来の臨床分離した約 200 株について、マイクロアレイを用いた比較ゲノム解析を行い、各疾患原因菌のゲノムの特徴及び病原因子関連遺伝子群の保有パターンを調査してきた。その過程で、SSSS 由来株に特徴的な遺伝子として表層蛋白質 MW2416 が検出された。加えて、タンパクレベルでの解析から、SSSS を含む重症化膿痂疹由来株で約 200 kDa の大型の蛋白質が高頻度かつ大量に発現している事を見出し、タンパク同定により前述した表層蛋白質 MW2416 と一致し、皮膚疾患由来株に極めて集中していた。私どもは、この表層蛋白質を Skin infection-related protein (Skip) と名付け、本菌による皮膚感染症の病態形成への役割を解析している。

3. 研究の方法

検討課題 A 『**皮膚組織への菌付着に関わる Skip の宿主因子によるプロセッシングに関する解析**』について、本研究を遂行する上で必要な種々の遺伝子変異株の作製を行い、この変異株の性状について、skip 遺伝子や関連する転写因子の発現レベルを解析する。また、菌凝集やバイオフィルム形成などの表現型を評価する。検討課題 B 『**何故 SSSS 由来株で高頻度にかつ大量に表層**

蛋白質 Skip を発現し得るのか?』について、skip 遺伝子領域の周辺構造をみると、転写制御因子である sarT 及び sarU がごく近傍に存在し、skip が両者により転写制御されていると考えられる。最近、私どもは、各疾患由来黄色ブドウ球菌株から選抜した 21 株のゲノムドラフト配列決定を行った。skip 保有株の殆どは skip 遺伝子の近傍に転写因子 sarT 及び sarU を保有していたが、SSSS 由来 Skip 高産生株は他の株との比較から、skip 遺伝子のプロモーター領域内に変異はなく、また、SarT 及び SarU 転写因子のアミノ酸配列についても相違がない。しかしながら、SSSS 由来 Skip 高産生株において、sarT 遺伝子と sarU 遺伝子の間の DNA 領域で 6 塩基の欠損を見出した。また、組換え Skip を用いた pull-down 法による skip と結合するターゲット分子をプロテオミクス解析にて同定する。

4. 研究成果

検討課題 A) において、大量精製系により組換え Skip 体を取得し、Ni ビーズによる pull-down assay 法を構築した。温度、血清の添加量など様々な検出条件で検討を行ったが、Skip に結合する候補因子を絞り込みに至っておらず、探索を継続している。Skip の N 末領域の A ドメイン欠損株は、ヒト血清及びヒト由来プラスミンでは切断させないことがわかった。また、Skip 高産生株で認められる菌凝集反応が、A ドメイン欠損株では全く認められなかった。さらに、ヒト血清、または、ヒト由来プラスミンを Skip 発現株に作用させ、Skip 切断部位を MALDI-TOF/MS により探索したところ、Skip の N 末端側から A ドメイン内に位置する僅か約 20 残基付近でほぼ限定切断されていることが判明した。検討課題 B) これまでに、数多くの株を用いた比較ゲノム解析から、高発現 Skip 株は共通して skip 遺伝子の近傍の転写因子である sarT 遺伝子と sarU 遺伝子間に 6 塩基の欠落を有しており、この 6 塩基配列をもつ株と同じ配列にすると Skip の産生が減弱した。また、この 6 塩基の有無によって結合変化のある転写制御因子を探索した結果、6 塩基付加した DNA 断片で特有なバンドを検出し、質量分析から転写因子である MgrA が同定された。続いて、低発現 Skip 株(6 塩基有り)で MgrA 欠損株を作製し、sarT/sarU/skip の発現への影響を調べると、いずれも顕著に増大していた。これらの解析から、impetigo/SSSS 原性株は、6 塩基欠落のために Skip 発現を負に制御する MgrA が結合できず、Skip が異常発現している事が明らかとなった。

本研究は、SSSS 由来の Skip 産生株が宿主側の因子の影響を受けて、皮膚組織への菌の付着様式を変化させて持続感染に繋がる可能性があるという新しいアプローチであり、かつ、独創的である。

これらの研究により、黄色ブドウ球菌による皮膚の局所的な水疱形成から広範囲に広がって重症化するブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群 SSSS への病態形成メカニズムの基礎的な基盤となると考えられる。

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 5 件)

- 1) Horimukai K, Morita K, Narita M, Kondo M, Kitazawa H, Nozaki M, Shigematsu Y, Yoshida K, Niizeki H, Motomura K, Sago H, Takimoto T, Inoue E, Kamemura N, Kido H, Hisatsune J, Sugai M, Murota H, Katayama I, Sasaki T, Amagai M, Morita H, Matsuda A, Matsumoto K, Saito H, Oh Y. Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol*. 2014. 134:824-830. 査読有.
- 2) Harada-Hada K, Harada K, Kato F, Hisatsune J, Tanida I, Ogawa M, Asano S, Sugai M, Hirata M, Kanematsu T. Phospholipase C-related catalytically inactive protein participates in the autophagic elimination of *Staphylococcus aureus* infecting mouse embryonic fibroblasts. *PLoS One*. 2014. 9:e98285. 査読有.
- 3) Hagiya H, Hisatsune J, Kojima T, Shiota S, Naito H, Hagioka S, Morimoto N, Otsuka F, Sugai M. Comprehensive analysis of systemically disseminated SY8/non-USA300 type community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. *Intern Med*. 2014. 53:907-912. 査読有.
- 4) Kayama S, Shigemoto N, Shimizu W, Kuwahara R, Ikeda M, Ikebe K, Maeda K, Hisatsune J, Ohge H, Sugai. Tripoli metallo-beta-lactamase-1 (TMB-1)-producing *Acinetobacter* spp. With decreased resistance to imipenem in Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2014. 58:2477-2478. 査読有.
- 5) Hisatsune J, Hirakawa H, Yamaguchi T, Fudaba Y, Oshima K, Hattori M, Kato F, Kayama S, Sugai M. Emergence of *Staphylococcus aureus* carrying multiple drug resistance genes on a plasmid encoding exfoliative toxin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2013. 57:6131-6140. 査読有.

〔学会発表〕(計 5 件)

- 1) 達川伸行, 久恒順三, 林幾江, 菅井基行. 黄色ブドウ球菌の表層タンパク質 Skip

の発現制御機構の解析. 第 67 回日本細菌学会中国四国支部総会. 2014/10/4-5. 徳島文理大学

- 2) Tatsukawa N., Hisatsune J., Hayashi I., Sugai M., Regulatory mechanism of cell wall protein Skip in *S. aureus*. 2014/8/26-8/29. Chicago Palmer House Hilton. USA.
- 3) Hisatsune J., Murakami T., Tatsukawa N., Hayashi I., Sugai M. Skip, a cell wall protein of *S. aureus* for biphasic skin adhesion strategies. 16th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections. 2014/8/26-8/29. Chicago Palmer House Hilton. USA.
- 4) 久恒順三, 平川英樹, 伊從慶太, 西藤公司, 大島健志朗, 服部正平, 菅井基行. 犬膿皮症由来 *S. pseudintermedius* 表皮剥脱毒素 ExpB 産生株のゲノム解析. 第 59 回日本ブドウ球菌研究会. 2014/8/4. 東京農工大学.
- 5) 久恒順三, 平川英樹, 伊從慶太, 西藤公司, 大島健志朗, 服部正平, 菅井基行. 犬膿皮症由来 *Staphylococcus pseudintermedius* 表皮剥脱毒素 ExpB 産生株のゲノム解析. 第 86 回日本細菌学会総会. 2013/3/20. 幕張メッセ

〔図書〕(計 1 件)

- 1) 久恒順三, 達川伸行, 佐藤祐介, 加藤文紀, 鹿山鎮男, 菅井基行. 解説 黄色ブドウ球菌. 感染症内科. 2013. 1:275-285.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/saikin/in>

dex.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

久恒 順三 (HISATSUNE JUNZO)

広島大学大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：40513180

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：