

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：84408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870923

研究課題名(和文) 酵母発現系を用いたUreaplasma parvum病原因子の網羅的探索

研究課題名(英文) Genome structure and novel mutations in quinolone resistance-determining region genes of Ureaplasma spp.

研究代表者

河合 泰宏 (KAWAI, YASUHIRO)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)・免疫部門・客員研究員

研究者番号：10388936

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ウレアプラズマの真核細胞に対する影響を調べるため、我が国で分離されたウレアプラズマSV3F4株の全ゲノムを決定した。その結果、これまで報告されているどのウレアプラズマよりも小型のゲノムであることが示された。

機能未知遺伝子に関して、酵母の発現系を用いて機能解析を行っている。

ウレアプラズマの薬剤感受性を調べ、キノロン耐性決定領域に新たな変異を発見しin silicoで感受性低下のメカニズムを調べた。

研究成果の概要(英文)：Ureaplasma spp. cause several disorders, such as preterm delivery with lung infections in neonates. They are opportunistic pathogens that commonly inhabit the human urogenital tract; they lack a peptidoglycan layer and hydrolyze urea. The complete genome sequence of Ureaplasma parvum serovar 3, clinical strain SV3F4 isolated from a Japanese patient with a history of an infectious abortion, included a 727,289-bp contig with a G plus C content of 25.55%. Out of 28 clinical Ureaplasma strains, we isolated 9 with high MICs of quinolones and found a single parC gene mutation, resulting in the change S83L. Novel mutations of ureaplasma ParC (S83W and S84P) were independently found in one of the samples. Homology modeling of the ParC S83W mutant suggested steric hindrance of the quinolone-binding pocket (QBP), and de novo prediction of peptide structures revealed that the ParC S84P may break/kink the formation of the alpha 4 helix in the QBP.

研究分野：感染症学、小児科学、微生物学、分子生物学

キーワード：ウレアプラズマ 全ゲノム解析 薬剤感受性 キノロン耐性決定領域

## 1. 研究開始当初の背景

本邦の早産率はおよそ6%程度である。早産のおよそ半数は細菌感染が関与する。我々はウレアプラズマの外膜リポタンパク質MBAがマウスにおいて流早産を起こすことを発見し、流早産の病原因子として報告し病原細菌であることを証明した(J Repr Immunol, 2013)。ウレアプラズマの産生物MBAによるTLR-2依存的な過剰な免疫反応が感染性流早産の主な病態メカニズムであることが示された。

さて、連携研究者の柳原らは、ウレアプラズマを宿主細胞(HeLa細胞)に感染させると宿主細胞内に侵入し、細胞膜系を利用しながら、一部はオートファジーを回避し、別の宿主細胞に感染することを見出した(Nishiumi F, MicrobiologyOpen, 2017)。

ウレアプラズマを含むマイコプラズマ科の細菌はコレステロールの合成を行うことが出来ない。従って、ウレアプラズマの増殖の為にコレステロールなどの膜系を取り込む必要がある。(後述するので一文削除)

細胞壁をもたないマイコプラズマ科の細菌は細胞壁を標的としたβ-ラクタム系の抗菌薬の効果はない。従って、核酸の複製や、タンパク質合成過程を標的とした抗菌薬が一般的に用いられている。

## 2. 研究の目的

1) ウレアプラズマの宿主膜系への影響を調べる。まず、国内で分離された菌株について、既報のようにコレステロール合成酵素が存在しないことを調べる。また、どのようにして宿主細胞内あるいは、宿主細胞からコレステロールなどの膜を構成する分子を獲得しているのか明らかにする。

2) 我が国の周産期領域におけるウレアプラズマの薬剤感受性を調べる。

## 3. 研究の方法

(日本人由来ウレアプラズマ全ゲノム解析)

国内周産期医療施設で分離されたSV3F4株から高純度にDNAを抽出し、PacBioRS次世代シーケンサーを用いて全ゲノム塩基配列を決定し、アノテーションを行い各遺伝子の機能を調べる。国立遺伝研を通じて、この株のゲノム情報をEMBL, NCBIのデータベースからもアクセスできるようにする。

(酵母を用いたウレアプラズマ由来の増殖抑制分子のスクリーニング)

SV3F4株の全ゲノムデータから機能未知の遺伝子を標的として、酵母内で発現させ、真核生物の増殖を抑制する遺伝子をスクリーニングする。

(ウレアプラズマの薬剤感受性)

全国の周産期医療施設から大阪母子医療センターに解析依頼のあったウレアプラズマ

菌株の各種抗菌薬に対する感受性を調べる。また、ストックされていたウレアプラズマDNAのキノロン耐性決定領域のシーケンスを行い、キノロン耐性遺伝子を獲得しているかどうかを調べ、原子レベルで感受性低下が起きているメカニズムを推察する。

## 4. 研究成果

(日本人由来ウレアプラズマ全ゲノム解析) ウレアプラズマ等、マイコプラズマ科の細菌はゲノムをより小型化しながら、宿主から栄養素などを取り込み生存する。SV3F4ゲノムはこれまで報告されたヒトウレアプラズマのどのゲノムよりも小型であった。ゲノムサイズは727,289 bpで、最も大きなヒトウレアプラズマゲノムよりも220 kb余りも小さかった。

(酵母を用いたウレアプラズマ由来の増殖抑制分子のスクリーニング)

上記、SV3F4ゲノムから機能未知の遺伝子を酵母内で発現させ、真核細胞の増殖を抑制する遺伝子を複数同定した。これらの遺伝子の中で、実際に膜系に作用する分子についてさらにその詳細な機能解析を行っている。

(ウレアプラズマの薬剤感受性)

分離ウレアプラズマ属は計28株で、*U. p.*が19株、*U. u.*が9株であった。薬剤感受性は $10^4$  CCUの菌量を用いて各抗菌薬存在下に48時間培養し判定した。CPFVのMICsは4-128 µg/ml、LVFXとTFLXはそれぞれ、1-16 µg/mlと2-16 µg/mlであった。GRNXとSTFXは0.5-4 µg/mlで他薬剤より良好であった。続いてキノロン耐性に関係する*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*の遺伝子の解析を行った。9株(32.1%)で既報の変異であるParCのS83Lを認めた。さらにウレアプラズマ陽性130検体より抽出したDNAのキノロン耐性遺伝子の解析を行ったところ、ParCのS83L(28検体)及び新規の変異S83W(1検体)とS84P(1検体)変異を認めた。新規2変異はhomology modeling及び、*de novo* peptide folding予測などによる構造予測よりキノロン系抗菌薬の結合を立体的に障害することが推測された(図1、2)。細菌が薬剤耐性能を獲得する背景に、抗菌薬の不適切な使用が考えられる。周産期医療分野から関連学会に対して生殖年齢層への適切な抗菌薬投与を積極的に呼びかける必要がある。

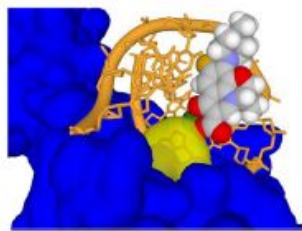


図1 ParC S83W による立体障害

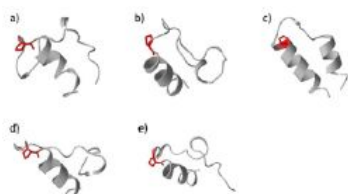


図2 ParC S84P の *de novo* 構造予測 (上位5位)

### 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2件)

Kawai Y, Nakura Y, Wakimoto T, Nomiyama M, Tokuda T, Takayanagi T, Shiraishi J, Wasada K, Kitajima H, Fujita T, Nakayama M, Mitsuda N, Nakanishi I, Takeuchi M, Yanagihara I. *In vitro* activity of five quinolones and analysis of the quinolone resistance-determining regions of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *parE* in *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* clinical isolates from perinatal patients in Japan. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015 Apr;59(4):2358-64. doi: 10.1128/AAC.04262-14.

Wu HN, Nakura Y, Motooka D, Nakamura S, Nishiumi F, Ishino S, Kawai Y, Tanaka T, Takeuchi M, Nakayama M, Fujita T, Yanagihara I. Complete Genome Sequence of *Ureaplasma parvum* Serovar 3 Strain SV3F4, Isolated in Japan. *Genome Announc*. 2014 May 22;2(3). pii: e00256-14. doi: 10.1128/genomeA.00256-14. PubMed PMID: 24855292; PubMed Central PMCID: PMC4031331.

〔学会発表〕(計2件)

河合 泰宏. 第64回日本化学療法学会総会、東京、2016.6.9 - 11、本邦における周産期由来ウレプラズマ属のキノロン系薬感受性および耐性遺伝子の検索・構造解析

河合 泰宏、名倉 由起子、柳原格. 第42回日本マイコプラズマ学会学術集会、東京、2015.5.22 - 23、本邦における周産期由来ウレプラズマ属のキノロン系薬感受性および耐性遺伝子の解析

〔図書〕(計0件)

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

### 6. 研究組織

#### (1) 研究代表者

河合 泰宏 (KAWAI, Yasuhiro)  
大阪母子医療センター研究所・免疫部門・  
客員研究員  
研究者番号：10388936

#### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

#### (3) 連携研究者

柳原 格 (YANAGIHARA, Itaru)  
大阪母子医療センター研究所・免疫部門・  
部長  
研究者番号：60314415

#### (4) 研究協力者

名倉 由起子 (NAKURA, Yukiko)

大阪母子医療センター研究所・免疫部門・  
研究補助員