

令和 2 年 5 月 16 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H05279

研究課題名(和文)世界の流行MRSAにおけるpsm-mec変異多型と病原性との関連性把握

研究課題名(英文)Research on the relationship between psm-mec mutations and MRSA virulence

研究代表者

垣内 力(Kaito, Chikara)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：60420238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：日本で分離されたMRSAのうち、psm-mecの変異を有する株は高い毒素産生能を示すことが明らかになっている。しかしながら、日本のMRSAとは異なる遺伝的背景のMRSAにおいて、psm-mecの変異と毒素産生能に関係性が存在するかは不明である。本研究では、タイのMRSAについて、psm-mecが変異または欠失している株は、野生型のpsm-mecを有する株に比べて、高い毒素産生能を示すことを明らかとした。さらに、タイのMRSA株の遺伝的背景は日本のMRSA株とは異なっていた。以上の結果は、psm-mecの変異が、MRSAの遺伝的背景に依存せず、毒素産生量増加の原因となっていることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は世界規模で流行する病原性細菌であり、新しい治療法と予防法の確立が急務である。本研究では、海外で流行するMRSAにおいて、psm-mec遺伝子の変異の有無が毒素産生量と対応していることを見出した。本研究結果は、psm-mecの変異の有無を検出することが、患者から分離されたMRSA株の危険度を判定する上で有効であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In MRSA isolates in Japan, strains carrying psm-mec gene mutations produce higher amounts of toxins than those carrying intact psm-mec gene. However, it is not known whether this theory is applicable to other MRSA strains having different genetic backgrounds from the MRSA isolates in Japan. In this study, we isolated MRSA strains from north and center regions of Thailand and revealed that strains carrying psm-mec mutations produce higher amounts of toxins than those carrying intact psm-mec. In addition, the MRSA isolates in Thailand had different genetic backgrounds from the MRSA isolates in Japan. These results suggest that psm-mec mutations cause high toxin production in MRSA isolates having various genetic backgrounds.

研究分野：分子生物学

キーワード：psm-mec MRSA 毒素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

代表者は黄色ブドウ球菌の軟寒天培地表面での拡散現象を発見し、「コロニースプレッディング」と命名した (J Bacteriol. 2007)。さらに、病院にて患者から分離される MRSA は著しくコロニースプレッディング能力を低下しており、その原因遺伝子が外来遺伝子領域 SCCmec に存在する *psm-mec* 遺伝子であることを突き止めた (PLOS ONE. 2008, PLOS pathogens 2011 図 1)。

SCCmec を持たない黄色ブドウ球菌 (MSSA) に *psm-mec* 遺伝子を導入すると、コロニースプレッディングの低下とともに、毒素産生量の低下、ならびにマウスに対する病原性の低下が観察される一方、バイオフィーム形成は促進されることが明らかとなった。すなわち、*psm-mec* 遺伝子は、黄色ブドウ球菌の毒素や移動能力にカップルした病原性を抑制する一方、バイオフィーム形成に関連する病原性は促進すると考えられる。代表者は、*psm-mec* ORF に変異を導入することにより、*psm-mec* の機能が転写産物によって担われるか、翻訳産物によって担われるかを検討した。その結果、*psm-mec* によるコロニースプレッディング抑制機能とバイオフィーム形成促進機能は *psm-mec* 遺伝子の転写産物と翻訳産物の両方によって担われていること、*psm-mec* による毒素産生の抑制は *psm-mec* の転写産物によって担われていることが明らかとなった (PLOS pathogens 2011, 図 2)。すなわち、*psm-mec* 遺伝子は、転写産物と翻訳産物がそれぞれ異なる機能を有する病原性制御遺伝子であると考えられる。

代表者は関東地域の 3 病院、ならびに東北大学附属病院から、377 株の MRSA 株を分離した。これらの MRSA 株の *psm-mec* 遺伝子の塩基配列を決定し、変異を同定した。これらの MRSA 株の細胞外毒素産生量を測定したところ、*psm-mec* 遺伝子変異を有する MRSA 株においては、細胞外毒素産生量が増加していることが明らかになった (PLOS pathogens 2013)。さらに、東北由来の MRSA 株についての解析から、*psm-mec* 変異を有する株が肺炎を引き起こしやすいこと、野生型の *psm-mec* を有する株がカテーテル疾患を引き起こしやすいことが判明した。以上の結果は、*psm-mec* の変異の有無が、MRSA の病原性に対する決定因子であることを示唆している。

しかしながら、これまでの代表者らの研究は日本国内で分離される MRSA 株を用いた結果である。世界で流行する MRSA には様々な遺伝学的背景の系統が知られており、*psm-mec* と病原性との関連性が世界で流行している MRSA に適用されるかについては実験的に検証する必要がある。

2. 研究の目的

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は世界規模で流行する病原性細菌であり、その薬剤耐性から効果的な治療法と予防法の確立が急務である。これまでに代表者は、MRSA が有する *psm-mec* 遺伝子が黄色ブドウ球菌の病原性を制御する機能を有することを明らかとしてきた。日本の病院において分離される MRSA の約 3 割においては、*psm-mec* が変異した結果、

図 1 *psm-mec* 遺伝子が黄色ブドウ球菌のコロニースプレッディングを抑制する

(左; 非導入、中央; *psm-mec* 導入、右; 点変異 *psm-mec* 導入)

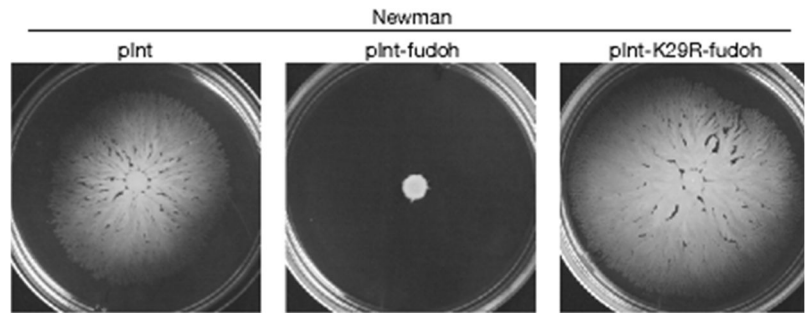
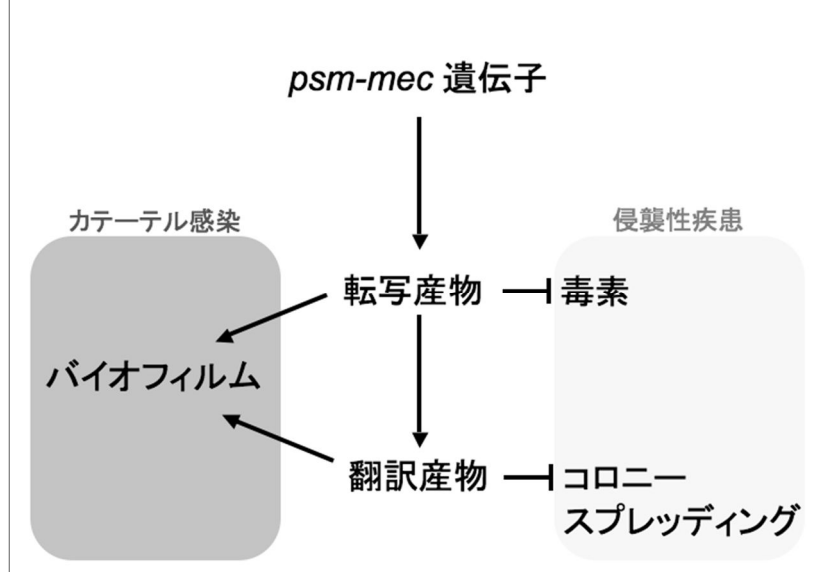


図 2 *psm-mec* 遺伝子の転写産物と翻訳産物による黄色ブドウ球菌の病原性制御



毒素の産生量が増大している。すなわち、*psm-mec* は、MRSA の病原性を予測するためのマーカー遺伝子として利用出来ることが期待される。世界で流行している MRSA は地域によってその遺伝的背景が異なることが知られているため、*psm-mec* のマーカー遺伝子としての有効性を知るためには世界規模での調査が必要となる。本研究の目的は、海外諸国で分離される MRSA における *psm-mec* の変異の種類と病原性との対応関係を明らかとすることである。

3. 研究の方法

諸外国において分離された MRSA 株を収集し、*psm-mec* の塩基配列を決定し、*psm-mec* の変異多型の把握を行う。それらの株の毒素産生量を測定し、*psm-mec* の変異と毒素産生量の関係性について検討する。また、分離部位などの臨床情報が得られる場合には、それらの情報と *psm-mec* 変異との対応を明らかにする。さらに、*psm-mec* の変異とこれまでに確立されている MRSA のタイプング法による分類との対応を行い、病原性の強い MRSA クローンの判定基準の確立を行う。新しく見出された *psm-mec* 変異については、実験室株に形質転換し、遺伝的背景を揃えた条件において、黄色ブドウ球菌の表現型に与える影響を解析する。

4. 研究成果

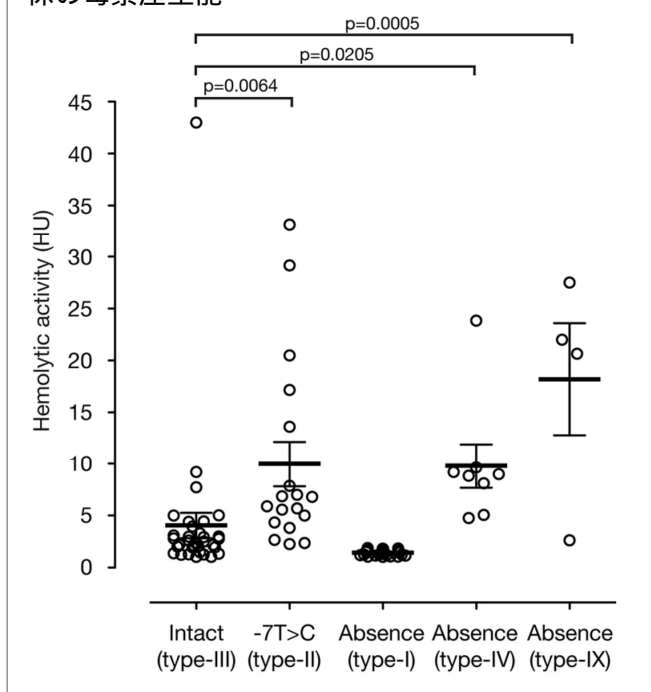
【結果】

タイの北部および中央部において 102 株の MRSA 株を収集し、その中に *psm-mec* 遺伝子が欠失または変異している株が存在することを見出した。変異の中には、日本の MRSA に見出されている -7T>C 変異以外に、新しいタイプの変異が 3 種類見出された。新しいタイプの変異について、黄色ブドウ球菌実験室を用いて毒素産生能とバイオフィーム形成に対して影響を与えるかを検討したところ、野生型の *psm-mec* とその効果が変わらなかったことから、*psm-mec* の機能に影響を与えないと判断した。

毒素産生量について解析を行った結果、-7T>C 変異を有する MRSA 株においては、野生型の *psm-mec* 遺伝子を有する MRSA 株に比べて、毒素の産生量が増加していた(図 3)。また、*psm-mec* 遺伝子が欠失している MRSA 株のうち、type-I 型の SCCmec を有する MRSA 株以外は、毒素の産生量が増加していた(図 3)。

次に、プロテイン A をコードする *spa* 遺伝子の塩基配列のパターンを決定することにより、ゲノムの背景についての検討を行った。その結果、*spa* の塩基配列のパターンは日本の MRSA と全く異なっていることが判明した。次に、*psm-mec* 遺伝子を含む染色体カセットである SCCmec の型についての検討を行った。解析の結果、野生型の *psm-mec* を含む SCCmec は、タイの MRSA と日本の MRSA との間で異なる型であった。一方、-7T>C 変異型の *psm-mec* を含む SCCmec は、タイの MRSA と日本の MRSA との間で共通していた。*psm-mec* が欠失している SCCmec の型は、タイの MRSA と日本の MRSA との間で一部が共通していた。

図 3 タイから分離された変異型 *psm-mec* を有する MRSA 株、ならびに *psm-mec* が欠失している MRSA 株の毒素産生能



【考察】以上の結果は、MRSA のゲノムの背景とは無関係に、*psm-mec* の変異が毒素産生量増加の原因となっていることを示唆している。type-I の SCCmec を有する株において、毒素産生量が増加していない理由として、毒素産生に関わる遺伝子の変異が存在し、毒素の産生ができなくなっている可能性がある。-7T>C 変異型の *psm-mec* を含む SCCmec、ならびに *psm-mec* が欠失している SCCmec の型には、タイの MRSA と日本の MRSA との間である程度の共通性が確認されたことから、*psm-mec* の変異や欠失は頻繁に起きるわけではなく、変異または欠失した *psm-mec* を含む特定の SCCmec が様々な遺伝的背景の MRSA の中に伝播していると推定される。

【得られた成果の国内外における位置づけとインパクト】

海外で分離される MRSA 株においても *psm-mec* の変異の有無が毒素産生量と対応していることが明らかとなった。*psm-mec* の変異の有無が MRSA の毒性を予測する指標として利用出来ると考えられる。

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 Suzuki Takashi, Yamamoto Toshihiro, Kaito Chikara, Miyamoto Hitoshi, Ohashi Yuichi	4. 巻 22
2. 論文標題 Impact of psm-mec in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (ST764) Strains Isolated from Keratitis Patients	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Microbial Drug Resistance	6. 最初と最後の頁 589 ~ 597
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1089/mdr.2015.0315	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 Ishii Kenichi, Tabuchi Fumiaki, Matsuo Miki, Tatsuno Keita, Sato Tomoaki, Okazaki Mitsuhiro, Hamamoto Hiroshi, Matsumoto Yasuhiko, Kaito Chikara, Aoyagi Tetsuji, Hiramatsu Keiichi, Kaku Mitsuo, Moriya Kyoji, Sekimizu Kazuhisa	4. 巻 5
2. 論文標題 Phenotypic and genomic comparisons of highly vancomycin-resistant Staphylococcus aureus strains developed from multiple clinical MRSA strains by in vitro mutagenesis	5. 発行年 2015年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 17092
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/srep17092	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 Tabuchi Fumiaki, Lulitanond Aroonlug, Lulitanond Viraphong, Thunyaharn Sudaluck, Kaito Chikara	4. 巻 64
2. 論文標題 Epidemiological study on the relationship between toxin production and mutations in MRSA isolates in Thailand	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 219 ~ 225
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12764	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 Mitsutomi Shuhei, Akimitsu Nobuyoshi, Sekimizu Kazuhisa, Kaito Chikara	4. 巻 165
2. 論文標題 Identification of 2H phosphoesterase superfamily proteins with 2'-CPDase activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimie	6. 最初と最後の頁 235 ~ 244
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.biochi.2019.08.008	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3件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 田淵 史晃、Aroonlug Lulitanond、Viraphong Lulitanond、垣内 力
2. 発表標題 タイにおいて、psm-mecの変異を有するMRSA株は毒素産生量が上昇している
3. 学会等名 第90回日本細菌学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 垣内 力
2. 発表標題 黄色ブドウ球菌の菌体表層における毒素の機能
3. 学会等名 第90回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Chikara Kaito
2. 発表標題 Mobile genetic element of MRSA encodes a virulence suppressor
3. 学会等名 The 14th Awaji International Forum on Infection and Immunity（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2015年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	松本 靖彦 (Matsumoto Yasuhiko) (60508141)	東京大学・薬学研究科(研究院)・助教 (12601)	