

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2013

課題番号：24590519

研究課題名(和文) 外来遺伝子によるMRSAの病原性調節機構に関する研究

研究課題名(英文) Research on the regulatory mechanism of MRSA virulence by mobile genetic elements

研究代表者

垣内 力(Kaito, Chikara)

東京大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60420238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において代表者らは、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)が保有する機能性RNAのターゲット分子の同定を行った。機能性RNAは黄色ブドウ球菌の病原性に必須の役割を果たす因子のmRNAをターゲットとして、その翻訳を阻害し、黄色ブドウ球菌の病原性を抑制することが判明した。本知見から代表者らは、MRSAが自らの病原性を抑制する新しい分子メカニズムを提唱した。また代表者らは、このRNAを発現するMRSAに比べて、発現しないMRSAの方が高い割合で重篤な疾患を引き起こしていることを見出した。従って、このRNAの有無を調べることは、MRSAによる疾患の重篤度を予測する上で役立つと期待される。

研究成果の概要(英文)：This study identified a target molecule of a regulatory RNA that methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) carries. The regulatory RNA targets mRNA encoding an essential virulence factor of *S. aureus*, inhibits its translation, and attenuates *S. aureus* virulence. This finding suggests a novel molecular mechanism that MRSA decreases the virulence by itself. This study also revealed that MRSA strains that do not express the regulatory RNA cause a severe disease at a higher rate than MRSA strains that express the regulatory RNA. This finding suggests that examination of the expression of regulatory RNA is useful to predict the severity of MRSA diseases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：機能性RNA メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 病原性

1. 研究開始当初の背景

代表者ら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メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (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)。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。すなわち、*psm-mec* 遺伝子は、黄色ブドウ球菌の病原性を抑制する。代表者らは、*psm-mec* ORF に変異を導入した F 領域の病原性抑制活性を検討した。*psm-mec* ORF に終止コドンを導入した F 領域は元の F 領域に比べてコロニースプレッディング抑制活性を減弱するものの、依然としてコロニースプレッディング抑制活性を示した。一方、*psm-mec* ORF のプロモーターに変異を導入した F 領域はコロニースプレッディング抑制活性を失った。従って、F 領域のコロニースプレッディング抑制機能は *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が明らかとなった (PLoS pathogens 2011)。

代表者らは F 領域の活性を担う実体を明らかにすると同時に、F 領域が黄色ブドウ球菌の性状に与える影響を検討した。F 領域は、黄色ブドウ球菌のコロニースプレッディングと細胞外毒素 PSM アルファの発現を抑制する一方で、バイオフィーム形成を促進した。バイオフィームとは、手術後患者体内に留置されたカテーテルの表面に形成される菌と血液成分の混合体であり、黄色ブドウ球菌の病原性に関与すると考えられている。すなわち、F 領域は毒素産生や菌の移動による浸襲性の病原性を抑制する一方で、バイオフィーム形成を伴うカテーテル表面への付着増殖などの持続性の病原性を促進すると考えられた。コロニースプレッディング抑制とバイオフィーム形成促進活性は、*psm-mec* ORF の転写産物と翻訳産物の両方によって担われている。一方、細胞外毒素 PSM アルファの産生抑制は、*psm-mec* RNA に担われており、*psm-mec* 翻訳産物は関わらない。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。可動遺伝要素 (外来性遺伝子領域) 上に毒素遺伝子がコードされることは既に多くの研究例があるが、可動遺伝要素上の機能性 RNA が宿主細菌の病原性を制御する機能を有することは、代表者らが初めて見出した知見である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新規機能性 RNA *psm-mec* に

よるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の病原性の制御機構の解明である。*psm-mec* 遺伝子は、MRSA が持つ外来遺伝子領域 SCCmec に存在する。SCCmec 領域には *mecA*、*mecR1*、*mecI* 遺伝子が存在し、これらの遺伝子が抗生物質であるメチシリンに対する耐性を賦与する能力を持つ。これまで、SCCmec 領域は抗生物質に対する耐性を与える領域であると考えられてきたが、我々の研究から、この外来遺伝子領域にコードされる機能性 RNA が黄色ブドウ球菌の移動能力と病原性を制御する新たな機能を有することが明らかになってきた。この病原性制御機能は、外来遺伝子領域 SCCmec がホストである黄色ブドウ球菌の適応度を上げるために役立っていると推定される。本研究は、MRSA の病原性の違いを決定する分子基盤の解明に貢献すると期待される。

3. 研究の方法

(1) *psm-mec* RNA を発現させた黄色ブドウ球菌において発現変動するタンパク質を同定し、その情報を元に *psm-mec* RNA のターゲット分子を同定する。

(2) 関東地域の 3 病院、ならびに東北大学付属病院にて臨床分離された MRSA 株の *psm-mec* 遺伝子の変異と患者の病態、ならびに *psm-mec* 遺伝子変異と毒素産生量との対応関係を検討する。

(3) 臨床分離株される MRSA において *psm-mec* 遺伝子が病原性抑制に働いているかについて知るために、*psm-mec* 遺伝子欠損株を作成し病原性の上昇が起こるかを検討する。

4. 研究成果

(1) *psm-mec* 遺伝子で形質転換した黄色ブドウ球菌においては、病原性制御に働く転写因子である AgrA によって発現制御を受ける複

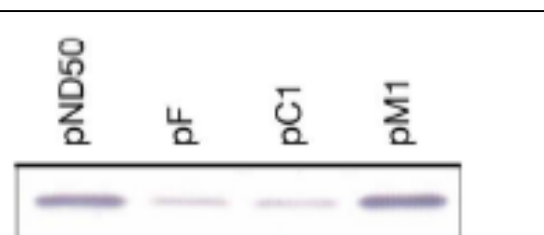


図 1. *psm-mec* RNA は AgrA のタンパク質量を減少させる

ウェスタンブロットティングにより AgrA タンパク質を検出した。

pND50 : 空ベクター

pF : *psm-mec* 遺伝子を有するプラスミド

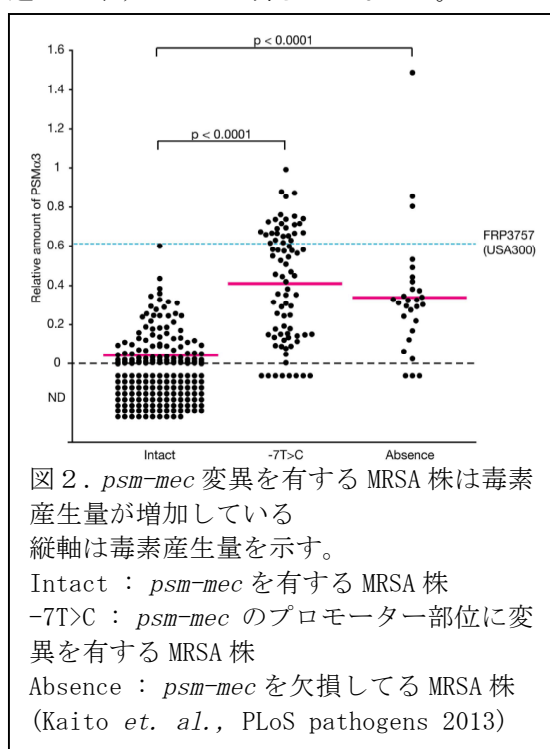
pC1 : *psm-mec* ORF に終止コドンを導入したプラスミド

pM1 : *psm-mec* のプロモーターに変異を導入したプラスミド

(Kaito et. al., PLoS pathogens 2013)

数種のタンパク質の発現が変動していることが明らかになった。*in silico* 解析によって、*psm-mec* RNA と結合する RNA を探索したところ、AgrA をコードする *agrA* mRNA が同定された。*psm-mec* 遺伝子で形質転換した黄色ブドウ球菌においては、*agrA* の翻訳産物である AgrA タンパク質の量が減少していることが見出された (図1)。さらに、*agrA* 遺伝子と融合させたレポーター遺伝子の発現が *psm-mec* RNA によって抑制されること、*in vitro* において *psm-mec* RNA が *agrA* mRNA と特異的に結合することが見出された。従って、*psm-mec* RNA のターゲット分子が病原性制御に働く転写因子 AgrA をコードする *agrA* 遺伝子の mRNA であることが明らかになった。

(2) 関東地域の3病院、ならびに東北大学付属病院から、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 (図2)。さらに、東北大学付属病院から分離されたMRSA株についての臨床解析から、*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明らかとなった。



(3) 臨床分離された MRSA 株の18株について、*psm-mec* 遺伝子欠損株を作出した。*psm-mec* 遺伝子欠損株においては、親株に比べて細胞外毒素の産生量が増加していた。また、*psm-mec* 遺伝子欠損株は親株に比べてマウス感染モデルにおいて強い病原性を示し

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8件)

(1) Omae Y, Sekimizu K, *Kaito C: Identification of *Staphylococcus aureus* Colony-Spreading Stimulatory Factors from Mammalian Serum.

PLoS ONE. 9(5):e97670. (2014)

(2) Miyashita A, Kizaki H, Kawasaki K, Sekimizu K, *Kaito C: Primed immune responses to Gram-negative peptidoglycans confer infection resistance in silkworms.

J Biol Chem. 289(20):14412-14421. (2014)

(3) Numata S, Nagata M, Mao H, Sekimizu K, *Kaito C: CvfA and PNPase act in an opposing manner to regulate *Staphylococcus aureus* virulence.

J Biol Chem. 289(12):8420-31. (2014)

(4) *Aoyagi T[‡], Kaito C[‡] ([‡]equally contribution), Sekimizu K, Omae Y, Saito Y, Mao H, Inomata S, Hatta M, Endo S, Gu Y, Tokuda K, Yano H, Kitagawa M, Kaku M: Impact of *psm-mec* in the Mobile Genetic Element on the Clinical Characteristics and Outcome of SCCmec-II

Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* Bacteremia in Japan.

Clin Microbiol Infect. Jan 30. doi: 10.1111/1469-0691.12575. in press.

(5) Omae Y, Hanada Y, Sekimizu K, *Kaito C: Silkworm apolipoprotein protein inhibits hemolysin gene expression of *Staphylococcus aureus* via binding to cell surface lipoteichoic acids.

J Biol Chem. 288(35):25542-50. (2013)

(6) *Kaito C, Saito Y, Ikuo M, Omae Y, Mao H, Nagano G, Fujiyuki T, Numata S, Han X, Obata K, Hasegawa S, Yamaguchi H, Inokuchi K, Ito T, Hiramatsu K, Sekimizu K: Mobile genetic element SCCmec-encoded *psm-mec* RNA suppresses translation of *agrA* and attenuates MRSA virulence.

PLoS Pathog. 9(4):e1003269. (2013)

(7) Omae Y, Sekimizu K, *Kaito C: Inhibition of colony-spreading activity

of *Staphylococcus aureus* by secretion of delta-hemolysin.

J Biol Chem. 287(19):15570-9. (2012)

(8) Miyashita A, Iyoda S, Ishii K, Hamamoto H, Sekimizu K, *Kaito C:

Lipopolysaccharide O-antigen of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for killing both insects and mammals.

FEMS Microbiol Lett. 333(1):59-68.

(2012)

[学会発表] (計 22 件)

(1) 松本靖彦、宮崎真也、林陽平、坂上徹、石井雅樹、山岸徹、大西忠博、垣内力、関水和久: 高血糖カイク感染モデルを用いた糖尿病宿主に対する感染に必要な細菌の遺伝子の同定

第6回細菌学若手コロッセウム、東京(八王子)、2012年8月8-10日

(2) 林陽平、松本靖彦、宮崎真也、坂上徹、石井雅樹、垣内力、関水和久: Isd システムを介したヘムの獲得が糖尿病宿主に対する黄色ブドウ球菌の病原性に必要である

第6回細菌学若手コロッセウム、東京(八王子)、2012年8月8-10日

(3) Yasuhiko Matsumoto, Shinya Miyazaki, Yohei Hayashi, Toru Sakagami, Masaki Ishii, Chikara Kaito, and Kazuhisa Sekimizu: Isd-mediated heme utilization in *Staphylococcus aureus* is required for infection in diabetic hosts

第11回あわじしま感染症・免疫フォーラム、兵庫、2012年9月11-14日

(4) 松本靖彦、宮崎真也、林陽平、石井雅樹、坂上徹、垣内力、関水和久: 黄色ブドウ球菌のヘム取り込み機構は、糖尿病状態の宿主に感染するために必要である

第57回日本ブドウ球菌研究会、東京、2012年9月21-22日

(5) 浜本洋、石川繭子、瀬筒秀樹、坪田拓也、片岡啓子、松本靖彦、垣内力、関水和久: カイク病態モデルを利用した医薬品の探索研究

日本薬学会 第133年会、3月27日~30日、横浜

(6) 石井雅樹、松本靖彦、林陽平、宮崎真也、坂上徹、垣内力、関水和久: The role of glucose response system in infection of *Staphylococcus aureus*

第13回東京大学生命科学シンポジウム、2013年6月8日、東京

(7) 吉海周、若松愛、宮下惇嗣、松本靖彦、磯貝隆夫、関水和久、垣内力: 外膜構造の変化により非病原性大腸菌 K-12 株が高病原性化する

第13回東京大学生命科学シンポジウム、2013年6月8日、東京

(8) 石井雅樹、松本靖彦、林陽平、宮崎真也、坂上徹、垣内力、関水和久: 黄色ブドウ球菌のグルコース応答システムの感染における役割

第7回細菌学若手コロッセウム、2013年8月7-9日、広島

(9) 吉海周、若松愛、宮下惇嗣、松本靖彦、磯貝隆夫、関水和久、垣内力: LPS トランスポーターの変異による大腸菌の高病原性化

第86回日本生化学会大会、2013年9月11日~13日、神奈川(横浜)

(10) Han Mao, 齊藤祐樹、関水和久、垣内力: DUF402 ドメインを有する SA1684 は黄色ブドウ球菌の新規病原性因子である

第86回日本生化学会大会、2013年9月11日~13日、神奈川(横浜)

(11) 宮下惇嗣、川崎清史、関水和久、垣内力: 無脊椎動物における適応免疫機構

第86回日本生化学会大会、2013年9月11日~13日、神奈川(横浜)

(12) 久間達彦、木村聡、鈴木勉、関水和久、垣内力: rRNA のメチル化による翻訳忠実性の維持が黄色ブドウ球菌の病原性に寄与する

第86回日本生化学会大会、2013年9月11日~13日、神奈川(横浜)

(13) 幾尾真理子、齋藤裕樹、大前陽輔、毛瀚、長野源太郎、藤幸知子、沼田俊介、韓笑、小幡佳津明、長谷川節雄、山口博樹、猪口孝一、伊藤輝代、平松啓一、伊藤孝司、関水和久、垣内力: 新規機能性 RNA *psm-mec* は *agrA* 遺伝子の翻訳を抑制してメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の病原性を抑制する

第86回日本生化学会大会、2013年9月11日~13日、神奈川(横浜)

(14) 石井雅樹、松本靖彦、林陽平、宮崎真也、坂上徹、垣内力、関水和久: 黄色ブドウ球菌のグルコース応答システムを介した病原性発揮機構

第12回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム2013、2013年9月14日~15日、東京

(15) 石井雅樹、松本靖彦、林陽平、宮崎真也、坂上徹、垣内力、関水和久: 黄色ブドウ球菌のグルコース応答を介した病原性調節

機構

第 58 回日本ブドウ球菌研究会、2013 年 9 月 27-28 日、東京

(16) 石井雅樹、松本靖彦、林陽平、宮崎真也、坂上徹、垣内力、関水和久：黄色ブドウ球菌の N-アセチルグルコサミン代謝を介したグルコース応答性の病原性発揮機構

第 96 回日本細菌学会関東支部総会、2013 年 10 月 31 日-11 月 1 日、東京

(17) 宮下惇嗣、木崎速人、川崎清史、関水和久、垣内力：カイクは細菌リポ多糖に対する応答を増強させ、感染抵抗性を獲得する

第 96 回日本細菌学会関東支部総会、2013 年 10 月 31 日～11 月 1 日、東京

(18) 垣内力、齋藤裕樹、幾尾真理子、大前陽輔、毛瀚、長野源太郎、藤幸知子、沼田俊介、韓笑、小幡佳津明、長谷川節雄、山口博樹、猪口孝一、伊藤輝代、平松啓一、関水和久：黄色ブドウ球菌に見出された病原性抑制機構

第 36 回日本分子生物学会年会（ワークショップ）、2013 年 12 月 3 日～6 日、神戸

(19) 吉海周、齋藤祐樹、関水和久、垣内力：黄色ブドウ球菌の毒素トランスポーターの同定

2014 年インターラボセミナー、2013 年 1 月 25 日、東京

(20) 石井雅樹、松本靖彦、林陽平、宮崎真也、坂上徹、垣内力、関水和久：The Mechanism of Glucose-dependent Virulence in *Staphylococcus aureus*

第 3 回感染症若手フォーラム、2014 年 2 月 13-15 日、長崎

(21) 垣内力、大前陽輔、関水和久：黄色ブドウ球菌のコロニーस्पreading

第 87 回日本細菌学会総会（シンポジウム）
2014 年 3 月 26 日～28 日、東京

(22) 石井雅樹、松本靖彦、宮崎真也、坂上徹、垣内力、関水和久：糖尿病宿主に対する黄色ブドウ球菌の感染におけるグルコース応答機構の役割

第 87 回日本細菌学会総会、2014 年 3 月 26-28 日、東京

〔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

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~bisei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

垣内力 (KAITO CHIKARA)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授

研究者番号：60420238

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし