様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ８ 月 ３１ 日現在

機関番号：３２６２４
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2015～2017
課題番号：１５Ｋ０９５８６

研究課題名（和文）情報基盤定量プロテオミクス法を用いたブドウ球菌薬剤耐性因子のプロテオーム定量解析

研究課題名（英文）Proteomic analysis for drug-resistant mechanisms of Staphylococcus aureus

研究代表者
金本　大成（KANAMOTO, Taisei）

昭和薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：２０２６０７５５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,700,000円

研究成果の概要（和文）：医学的に重要な病原性細菌であるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）がどのような機構で抗菌薬耐性を示すのかを、細菌のタンパク発現の変動に注目して詳細に解析する新しい方法の構築を試みた。従来法である2次元電気泳動での解析によって高濃度の抗菌薬（オキサシリン）存在下で46のタンパクが有意に変動することがわかった。抗菌薬存在下を含む様々な環境におけるMRSAのタンパク発現を高精度に定量可能な新規手法に必要な組換えタンパクのライブラリーを作成中である。

研究成果の概要（英文）：Drug-resistant bacteria are great concern in medicine around the world. To clarify the precise mechanism of the resistance, we attempted to establish de novo method which can analyze the bacterial proteomics efficiently and precisely. A conventional method of 2D-PAGE analysis revealed that the expression level of 46 proteins in methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) varied significantly under the cultivation with high antibiotics (oxacillin) concentration. We are constructing a recombinant protein library of MRSA for the internal control of the de novo proteomic analysis.

研究分野：微生物学

キーワード：黄色ブドウ球菌　薬剤耐性　プロテオミクス

１．研究開始当初の背景

(1) 1940 年代にペニシリン G が抗菌薬として実用化され、感染症治療は大きく進歩した。1960 年代にかけては、新規作用機序の抗菌薬が次々と開発・実用化され、遠くない将来に人類は感染症を克服できるのではという希望を持つことができた。しかしながら、現実には、新しい抗菌薬が登場すると、すぐにその耐性菌が出現するという好ましくない循環に陥っている。これまでは既存の抗菌薬に修飾を加え、補強することで耐性菌に対抗してきたが、近い将来、このような小手先の対抗策では対応しきれなくなることが予測されている。さらに、近年、新規作用機序を持つ抗菌薬の開発は停滞しており、このままでは耐性菌の蔓延によって近い将来には、抗菌薬による感染症治療が成立しなくなるという危機感を全世界の感染症治療に関わる者が共有している。

(2)申請者らは 2010 年から明治大学理工学部応用化学科と共同で新規抗菌化合物の探索を行ってきた。同科が有する化合物ライブラリーの抗菌活性スクリーニングを行い、新規に抗菌活性を有する化合物 16 種類を見出した。それらの中には、現在大きな問題になっているメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) やバンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) を含む多剤耐性菌に対しても抗菌活性を示すものがあった。この抗菌化合物探索においては、化合物の物理化学的特性を手掛かりとして、経験的に側鎖を加えるなどの化学修飾を行って進めていったが、作用機序については抗菌活性スペクトルや光学顕微鏡による菌の形態変化の観察などから推測するのみであった。しかし、抗菌作用は相互に影響し合う複雑な経路から成っている場合も多く、現時点では抗菌物質の作用機序を網羅的に解析する方法は存在しない。そこで、高い効率で抗菌活性化合物を探索するためには、供試化合物存在下の細菌における様々なタンパク発現の変動を精密かつ網羅的に評価可能な手法が必要であるとの考えに至った。

２．研究の目的

(1)ある環境下にある細菌のタンパク発現をターゲット・プロテオミクスの手法を用いて、高精度・高効率かつ網羅的に定量する手法を確立する。

(2)医学的に重要な病原性細菌である MRSA のゲノムに存在する約 2,600 の ORF がコードしているタンパクのうち、薬剤耐性や毒素産生などの病原性に関与するもの、細胞壁合成やゲノム複製、物質代謝などの増殖や生存に必須のもの、さらに現時点では機能がわかっていないものなどについて網羅的に定量解析を試みる。特に抗菌活性物質存在下でのタンパク発現変動の高精度解析を可能にする手法の確立によって、抗菌薬の作用機構や細菌の薬剤耐性機構の詳細を明らかにし、新規抗菌薬の開発や既存抗菌薬の改良を新しいアプローチから支援する。

３．研究の方法

本研究の概略図を図 1 に示す。

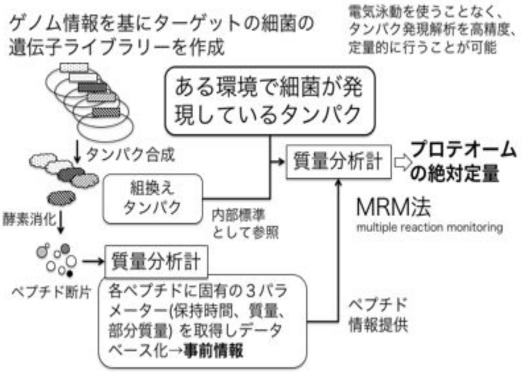

図 1. 定量プロテオミクス法

(1) MRSA には約 2600 の Open reading frame が存在するが、そのすべてを解析の対象とするのは、限られたリソースの中では現実的ではない。対象とすべき遺伝子の目安を付けるために、抗菌薬の存在下での培養時にどのようなタンパクの発現が大きく変動しているかを従来法である 2 次元タンパク電気泳動法 (2D-PAGE) によって調べた。MRSA である *S. aureus* JCM8702 をオキサシリン（128 μg/ml）含有または非含有のトリプティック・ソイ培地でそれぞれ 35℃、20 時間好気培養した。菌体を Cell lysis buffer で処理した後、2D-PAGE を行って、それぞれの培養条件下でのタンパク発現を比較した。

(2) *S. aureus* JCM8702 のゲノム DNA をテンプレートに用いて、DDBJ 上に公開されている MRSA (*S. aureus* subsp. *aureus* N315) の全ゲノム情報 (Accession No. BA000018) を基に、解析対象のタンパクをコードする遺伝子を発現系ベクター (pCold) に組込んで遺伝子ライブラリーを作製した。次にクローニングした各遺伝子を大腸菌の系を用いて、プロテオーム解析の際に内部標準として用いる組換えタンパクのライブラリーを作成した。

(3) MRSA 由来の組換えタンパクをターゲット・プロテオミクスの際の内部標準として用いるために質量分析器による解析を行って当該タンパクの Mass プロファイルを取得する。そして、この Mass プロファイルを事前情報として、様々な環境下での培養時に菌が発現するタンパクを定量する。

４．研究成果

(1) 2D-PAGE によるタンパク発現変動解析

S. aureus JCM8702 のタンパク発現に与える抗菌薬（オキサシリン）の影響を 2D-PAGE で調べた。抗菌薬を含まない培地または抗菌薬を含む培地で培養した場合に発現したタンパクの泳動パターンをそれぞれ図 2a と図 2b に示す。

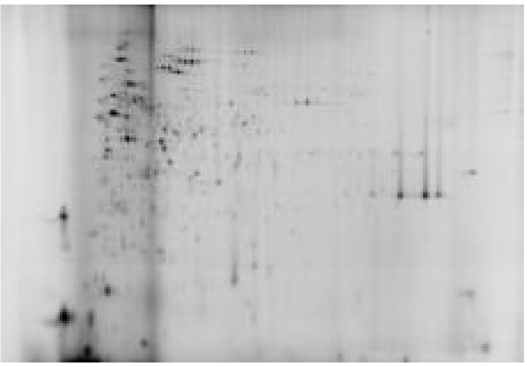

図 2a.　2D-PAGE 抗菌薬なし

図 2b.　2D-PAGE 抗菌薬あり

独立した 3 回の培養で得た検体をそれぞれ 2D-PAGE によって分離し、タンパク発現を比較した。タンパク発現量はタンパクスポットの濃度で評価した。検出できたスポットは 443、発現に有意に変動のあったタンパクスポットのうち、スポットの濃度が 1.5 倍以上増加したものは 34、1.5 倍以上減少したものは 12 あった（表 1)。

表 1. 発現に変動のあったスポット数

total number of detected protein spots	number of spots with different intensity (p<0.05)	fold difference Oxa(+)/Oxa(-)	number of spots
		X ≧ 3.0	8
		3.0> X ≧ 2.0	19
		2.0> X ≧ 1.5	7
443	48	1.3 > X > -1.3	2
		-1.5 ≧ X > -2.0	1
		-2.0 ≧ X > -3.0	3
		-3.0 ≧ X	8

スポットの濃度が有意に 1.5 倍以上増加した 30 スポット、および 1.5 倍以上減少した 7 スポットについては泳動ゲルを切り出し、質量分析装置 (MALDI-TOF/MS) によって同定を試みた。その結果、BA000018 のゲノム情報から得たペプチド配列と質量分析から推定される部分配列がマッチしたものが 11 あった。うち 3 つは同じタンパクであった。残りの 26 スポットでは、マッチする配列は見出されなかった。

(2)タンパクライブラリー作成

定量プロテオーム解析の際には、内部標準として*S. aureus* JCM8702由来の組換えタンパクを使用する。クローニングの対象とした遺伝子周辺の塩基配列の特殊性も影響して、当初想定した以上にクローニングは難航した。従来法である2D-PAGEによる解析によって、抗菌薬存在下で変動することが判明したタンパクを中心に、それに関連するものを加えた77個の遺伝子をクローニングした。クローニングした遺伝子は pCold ベクターに組み込み、大腸菌の系でタンパクを発現させた。組換えタンパクは、ベクターにコードされている 6x Hisとニッケル結合ゲルとの結合を利用して精製を試みた。しかし、発現させたタンパクの特性によっては、精製が困難で現時点で精製できた組換えタンパクは20に留まった。

(3)組換えタンパクのMassプロファイル取得

本研究で使用を予定していた聖マリアンナ医科大学共有機器の質量分析装置 (LC/MS) が H28-29 年度に 2 回故障し、使用不能となったため、精製が終了した組換えタンパクの Mass プロファイルの取得はできていない。次年度以降、質量分析装置が使用可能になり次第、組換えタンパクの Mass プロファイルを取得し、様々な条件下でのプロテオーム解析を実施する予定である。

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 0 件）

〔学会発表〕（計 1 件）
1. 川島汐織、千澤直孝、西中志唯、金本大成. 黄色ブドウ球菌の病原性解明　網羅的タンパク定量からのアプローチ. 昭和大学第 11 回ハイテクリサーチセンター報告会、2018 年 4 月 2 日、昭和薬科大学（東京都）

〔図書〕（計 0 件）

〔その他〕
ホームページ等
昭和薬科大学微生物学研究室
http://www.shoyaku.ac.jp/research/laboratory/kanmen/top

６．研究組織
(1)研究代表者
　金本　大成（KANAMOTO, Taisei）
　昭和薬科大学・薬学部・教授
　研究者番号：20260755

(2)研究分担者
　浅井　大輔（ASAI, Daisuke）
　聖マリアンナ医科大学・医学部・講師
　研究者番号：10423485

有戸　光美（ARITO, Mitsumi）
　聖マリアンナ医科大学・医学部・講師
　研究者番号： 00509911