

平成30年 5月24日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14852

研究課題名(和文)トランスポゾン挿入黄色ブドウ球菌ライブラリーを用いた新規乳房炎予防治療戦略の構築

研究課題名(英文) Construction of a transposon insertion mutants library in *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis for development of a novel strategy to treat mastitis

研究代表者

米山 裕 (Yoneyama, Hiroshi)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：10220774

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：畜産領域で経済的損失の甚大なウシ乳房炎の予防・治療戦略の構築は喫緊の課題である。乳房炎起因菌の中でも黄色ブドウ球菌は根治が困難であることからその対策が求められている。そこで、これまで欠けていたウシ乳房炎由来黄色ブドウ球菌の基礎微生物学的研究を行うため、ウシ由来株におけるトランスポゾン挿入変異ライブラリーを構築するための条件検討を行い、頻度は低いトランスポゾンがウシ乳房炎由来株のゲノムに転移していることを検証した。また、ヒト由来株を対象とした先行研究から本菌の病原因子である sortase に注目し、ウシ由来株の sortase を相同組み換えで破壊したアイソジェニック変異株の構築に成功した。

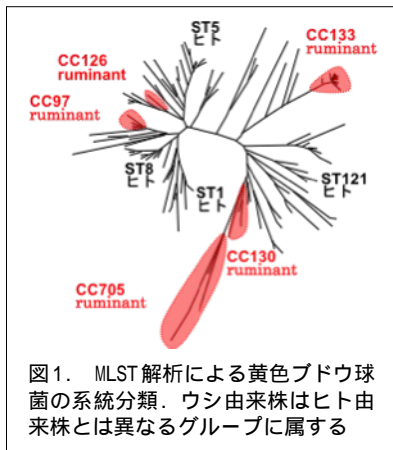
研究成果の概要(英文)： *Staphylococcus aureus* is the most important etiologic agent of bovine mastitis. To develop a novel prophylactic and/or treatment strategy, it is important to understand virulence factors and microbial physiology of *S. aureus* isolated from bovine mastitis. However, information about the mastitis-associated virulence factors is very limited. We therefore attempted to construct a transposon-mutagenized library using *S. aureus* SA5, which was isolated from bovine mastitis, to understand the bovine mastitis-related virulence factors in this study. As a result, although the frequency of transposition of the transposon into the SA5 genome was low, we confirmed that two candidate clones actually had a transposon insertion in their genome. Next, we focused on sortase because it presents several known virulence factors on the cell surface of this bacterium. We thus constructed an isogenic sortase-deficient mutant derived from SA5 using the homologous recombination technique.

研究分野：動物微生物学

キーワード：黄色ブドウ球菌 乳房炎 トランスポゾン 病原微生物

### 1. 研究開始当初の背景

常在細菌である黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) は、乳房炎の主要起因菌であると同時にヒト感染症の主な起因菌である。近年、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に代表される多剤耐性病原細菌によるヒト感染症が増加し公衆衛生上大きな問題となっている。そのため黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) の病原因子に関する多くの研究がこれまでなされ、宿主細胞への付着に關与するアドヘシン、分泌毒素、スーパー抗原等多くの病原因子が見いだされてきた。しかし、ウシ乳房炎に關しては、*S. aureus* の乳腺上皮細胞への付着・侵入に關わる因子、乳腺組織内での増殖・維持に關与する因子はもとより、乳房炎ワクチンの抗原になり得る分子もまったく不明である。一方、ゲノム情報の解析技術の進展に伴い、*S. aureus* のゲノム解読が積極的に行われているが、乳房炎に深く關与する原因遺伝子の特定と、症状の重篤化に密接に關与する因子の特定には至っていない。その理由として、(1)ゲノム解析がなされた多くの *S. aureus* は乳房炎由来株ではない、(2)乳房炎由来の強毒株と弱毒株についてゲノム解析がなされている数例の *S. aureus* は遺伝学的に關連がない株であるため、厳密な比較ゲノム解析ができない、(3)乳房炎成立には複数の因子が複合的に關与する、等が挙げられる。加えて、各種動物から分離された黄色ブドウ球菌のハウスキーピング遺伝子の塩基配列の差異に基づく系統学的な解析から、本菌は異なった宿主域特異性をもつ複数のグループに分類できることが近年明らかとなってきた (図 1)。



このことは、黄色ブドウ球菌を起因菌とするウシ乳房炎の新規防除法を開発するためには、ウシ乳房炎に由来する黄色ブドウ球菌に特徴的な病原因子の解明が必須であることを意味している。

### 2. 研究の目的

畜産業界において乳房炎等泌乳器疾患は最も発生頻度の高い疾患でその経済的損失は甚大であり我が国における乳房炎の損失は年間 800 億円にも達する。そのため乳房炎

の克服は獣医畜産領域の最重要研究課題である。乳房炎の主要起因菌である黄色ブドウ球菌は、ヒト感染症の主な起因菌でもあり、近年急増している MRSA による感染症の脅威から、本菌の病原因子に関する多くの研究がなされてきた。しかし、乳房炎を対象とした病原因子に関する研究はヒト由来黄色ブドウ球菌のそれに比べ大きく遅れており、乳房炎の成立・維持に關与する因子は全く不明である。そこで、本研究ではトランスポゾン (Tn) 挿入変異ライブラリーを構築し、乳牛への感染試験の実施という細菌遺伝学的に厳密な手法を用いて乳房炎の成立・維持に重要な因子の同定を行う。

### 3. 研究の方法

(1)ウシ由来 *S. aureus* 株への pBursa および pFA545 の形質転換

*S. aureus* 野生株は一般的に強力な制限・修飾システムを有しているために、外来のプラスミドを形質転換することが非常に困難である。そこで、ウシから分離した *S. aureus* 株に Tn 挿入変異を導入する際に使用するプラスミド pBursa (Tn である *bursa aurealis* を保有) および pFA545 (Tn 転移酵素遺伝子を保有) を、*S. aureus* が共通して保有するタイプ I 制限能を欠いた RN4220 株にエレクトロポレーション法にて形質転換し、各々の選択マーカーであるクロラムフェニコール (2.5 μg/ml) およびテトラサイクリン (5 μg/ml) を用いて形質転換体を選別する。次いで、得られた形質転換体から、タイプ I 型の修飾を施された pBursa および pFA545 を分離し、ウシ由来の *S. aureus* に形質転換する。

(2)ウシ由来 *S. aureus* ゲノムへの Tn ランダム挿入変異の導入

温度感受性プラスミドである pBursa と pFA545 をもつウシ由来の *S. aureus* 形質転換体を、高温 (43°C) で処理した後、Tn のマーカーであるエリスロマイシン (5 μg/ml) を含むトリプトソヤ寒天培地に約  $10^7$  cells 塗布し、1~2 日 43°C にて培養し生育するコロニーを取得する。

(3)インバース PCR 法によるゲノム上への Tn 挿入部位の同定

前項目 (2) で取得した Tn 挿入変異候補株から抽出したゲノム DNA を制限酵素 *Acil* で分解し、DNA リガーゼで自己連結反応を行う。次いで、Tn の両端に相当するフォワードプライマー (5' -TTTATGGTACCATTTCATTTCTGCTTT C-3') とリバースプライマー (5' -AAACTGAT TTTTAGTAAACAGTTGACGATATTC -3') を用い PCR 反応にて Tn が挿入した領域の DNA 断片を増幅する。得られた増幅断片を鋳型とし、上記のフォワードプライマーを用いてシーケンスを決定して得られた *S. aureus* の配列をクエリーとして BLAST 検索を行うことにより Tn が挿入したゲノム上の位置を決定する。

(4) 相同組み換えによるウシ由来 *S. aureus* の Sortase 遺伝子 (*srtA*) の破壊

*S. aureus* の表層タンパク質は宿主との相互作用に関与し感染が成立するために重要な病原因子として機能することが、ヒト由来の *S. aureus* の研究から知られている。Sortase はこれらの表層タンパク質のうち 20 以上のタンパク質を細胞壁であるペプチドグリカンに結合させる酵素である。そこで、ウシ由来 *S. aureus* のこれら表層タンパク質の乳房炎における病原性との関連を調べるために、ウシ由来株の *srtA* 遺伝子を相同組み換えによって破壊する。具体的には、ヒト由来株の *srtA* 遺伝子を Tn で破壊した変異株 *S. aureus* JE2( $\Delta srtA$ ) から抽出したゲノム DNA を鋳型とし、Tn が挿入した前後約 500 bp に設定したプライマーを用いて Tn 挿入により破壊された *srtA* 遺伝子の断片を増幅する。得られた DNA 断片を自殺ベクターである pJB38 にクローン化した後、ウシ乳房炎由来の *S. aureus* 株にこの組換えプラスミドを導入する。取得した形質転換体を高温処理 (43°C) 後、エリスロマイシン耐性クローンを選抜することによって、*srtA* 遺伝子が破壊された相同組み換え株を取得する。

#### 4. 研究成果

(1) ウシ由来 *S. aureus* 株への pBursa および pFA545 の形質転換

ウシ由来の *S. aureus* SA1006 株はウシ感染実験モデルで再現性よく乳房炎を発症させることができるモデル株として知られている。この SA1006 株に RN4220 から分離した pBursa と pFA545 の導入を試みたが、形質転換体は得られなかった。SA1006 株は外来 DNA に対する制限能が非常に強いことがその理由と考えられた。そこで、宮城県の酪農現場からウシ乳房炎に由来する *S. aureus* 株を 30 株ほど分与してもらい、これらの菌株へのプラスミドの形質転換を試み pBursa と pFA545 が形質転換可能な株をスクリーニングした。その結果、各プラスミドのマーカであるテ

トラサイクリンとクロラムフェニコールに同時に耐性を示す形質転換候補株 6 株の取得に成功した。次いで取得した候補株よりプラスミドを抽出し制限酵素解析 (*Bam*HI と *Sac*I による二重切断) を行った結果、pBursa (3.1 kb と 4.1 kb

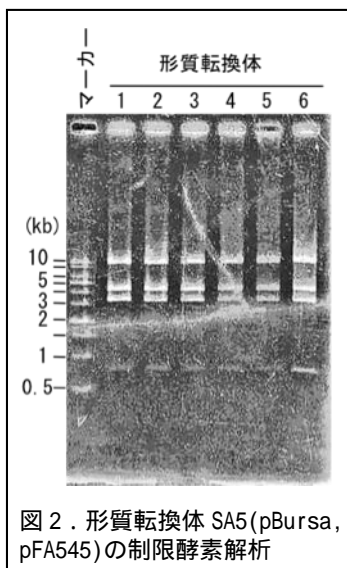


図 2. 形質転換体 SA5(pBursa, pFA545) の制限酵素解析

の 2 本のバンド) と pFA545 (0.8 kb と 9.3 kb の 2 本のバンド) の両プラスミドを、取得したすべての形質転換体が保持していることが明らかとなった (図 2)。

(2) ウシ由来 *S. aureus* ゲノムへの Tn ランダム挿入変異の導入

Tn 挿入変異ライブラリーを構築するために、高温 (43°C) 処理した SA5 (pBursa, pFA545) 株を Tn マーカーであるエリスロマイシン (5 µg/ml) を含む寒天培地で選択を試みた (表)。ゲノム上への Tn 転位が予定どおり起こったときに、寒天平板上に約 50 個のコロニーが出現する条件 (Tn の転位頻度である約  $10^{-6}$  から計算) で選択した結果、43°C 処理の場合、2 枚のプレートでそれぞれ 19 個、23 個のコロニーが認められたが、コロニーが出現しなかったプレートが 148 枚、200 個以上のコロニーが出現したプレートが 70 枚であった。この 1 プレートあたり 200 個以上のコロニーの出現は、温度感受性複製機能が変異したことが原因と考えられる。

また、温度処理を 43.5°C にて同様に Tn 転移実験を行ったところ、転移が起こったと思われるプレートが 2 枚、コロニーが出現しなかったプレートが 49 枚、200 個以上のコロニーが出現したプレートが 65 枚認められた。このことから、本実験条件において SA5 株ゲノム上への Tn 転移頻度は非常に低いこと、43.5°C 処理における Tn 転移効率は 43°C のときよりも良いことが分かった。

表 Tn 挿入変異ライブラリー構築の条件検討

処理温度	コロニー出現数 / プレート	観察されたプレート数
43°C	0	148
	10~100	2
	>200	70
43.5°C	0	49
	10~100	2
	>200	65

高温処理後、エリスロマイシン (5 µg/ml) 含有プレートに生育した耐性菌の数を計測した。

(3) インバース PCR 法によるゲノム上への Tn 挿入部位の同定

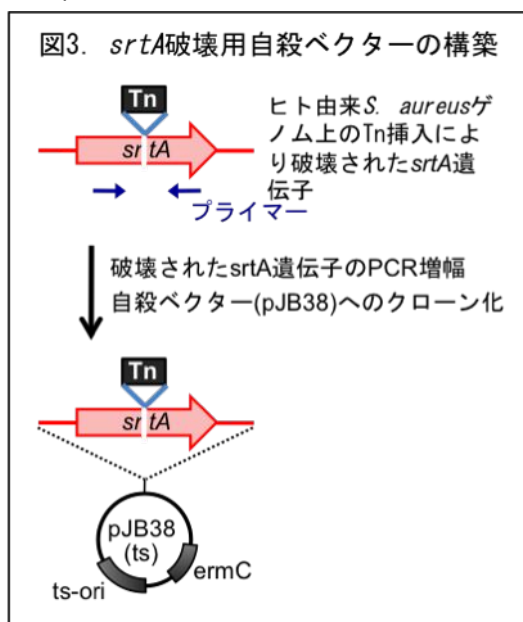
ウシ乳房炎由来株 SA5 のゲノム上に Tn が転移したと思われる 2 つのクローンからゲノムを抽出し、前述したインバース PCR 法にて塩基配列を決定し、Tn が挿入された *S. aureus* ゲノム領域に相当する塩基配列を、ウシ由来の *S. aureus* subsp. *aureus* LA-MRSA ST398 のゲノム情報を対象とした検索を行った。その結果、1 つ目のクローンは 112,518 番目のシトシン、2 つ目のクローンは 1,222,135 番目のアデニンの後方に Tn が挿入されていた。このことから、高温処理後に得られた挿入候補株は、Tn がゲノムに挿入され

た変異株であることが明らかとなった。

前述したように今回得られた Tn 挿入変異効率は非常に低いことから、今後 Tn 挿入変異ライブラリーを構築するために、さらなる転移効率の向上をもたらす条件の検討が必要である。

(4)相同組み換えによるウシ由来 *S. aureus* の Sortase 遺伝子 (*srtA*) の破壊

*S. aureus* 感染症のヒトから分離された本菌の病原因子に関するこれまでの研究から、宿主との相互作用に關与する各種表層タンパク質を呈示する酵素 Sortase に注目した。ウシ乳房炎由来の *S. aureus* SA5 株の Sortase 遺伝子 *srtA* を破壊するために、ヒト由来株の *srtA* 遺伝子が Tn で挿入破壊された *srtA* 遺伝子 (*srtA::Tn*) を温度感受性の自殺ベクター pJB38 にクローン化した (図 3)。



この組換えプラスミドを RN44220 に導入した形質転換体から分離した組換えプラスミドをウシ由来株 SA5 に形質添加し、プラスミドマーカであるクロラムフェニコール (10 µg/ml) で選択し形質転換体を所得した。次いで、プラスミドをもつ形質転換体 SA5/pJB38-*srtA::Tn* を高温処理した後、プラスミドを除去するためのカウンターセクションをアンヒドロテトラサイクリン (200 ng/ml) 処理を施すことによって行った後、クロラムフェニコール感受性、エリスロマイシン耐性の相同組換え候補株をレブリカ法によって選別した。その結果、130 株のレブリカ選抜をおこなったところ、1 株のクロラムフェニコール感受性、エリスロマイシン耐性のクローンを得ることができた。

SA5 のゲノム上にトランスポゾン Tn が挿入変異していることを検証するために、Tn 挿入領域を含む *srtA* 遺伝子断片を PCR 増幅したところ、Tn が挿入された結果と思われる約 5 kb の PCR 断片を確認することができた (図 4) 。さらに、Tn が挿入されていることを検証するために、この相同組換え株からゲノムを抽出し、Tn 挿入領域の塩基配列を調べた結果、Tn

の配列が確認できたことから、ウシ乳房炎由来の SA5 株の *srtA* 遺伝子破壊株を構築することができた。今回構築した *srtA* 組み換え株は、今後、ウシ乳房炎炎症に及ぼす *srtA* 遺伝子の影響を評価するためのツールとして有用な株である。

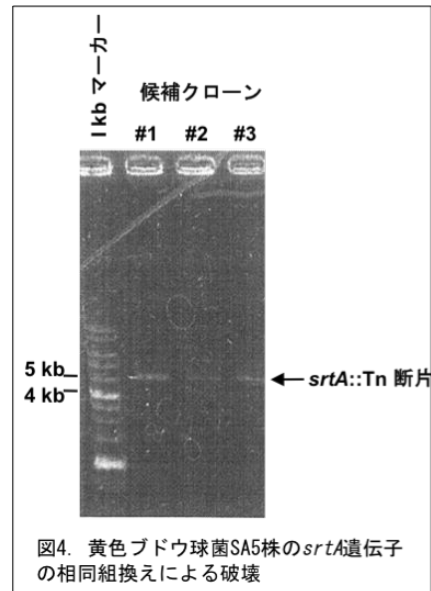


図4. 黄色ブドウ球菌SA5株の *srtA* 遺伝子の相同組換えによる破壊

## 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 1 件)

伊原航平、勝部 哲、松田敬一、米山 裕 (2016) 畜産領域における抗生物質の利用と課題 東北畜産学会報 65(3): 41-53.

〔学会発表〕(計 12 件)

- (1) 田中浩貴、米山竜太、佐藤美佳、松田敬一、安藤太助、磯貝恵美子、米山 裕、ウシ乳房炎由来黄色ブドウ球菌のトランスポゾン挿入変異ライブラリー構築の条件検討、日本畜産学会第 124 回大会 (2018 年 3 月 28 日~30 日)(東京)
- (2) 米山竜太、佐藤美佳、安藤太助、磯貝恵美子、米山 裕、ウシ乳房炎の新規ワクチン開発を目指した微生物学的基盤研究、黄色ブドウ球菌研究会(2017 年 9 月 1 日~2 日)(十和田)
- (3) 那須野俊、宮澤亮太、米山竜太、安藤太助、磯貝恵美子、米山 裕、黄色ブドウ球菌のウシ乳房炎関連病原因子の解明に向けた基盤研究、日本細菌学会東北支部大会 (2017 年 8 月 3 日~4 日)(仙台)
- (4) 米山竜太、佐藤美佳、安藤太助、磯貝恵美子、米山 裕、ウシ由来 *Staphylococcus aureus* の病原因子に対する宿主免疫応答の簡便スクリーニング系の構築、第 90 回日本細菌学会総会、(2017 年 3 月 19 日~21 日)(仙台)

- (5) 米山竜太、佐藤美佳、伊原航平、安藤太助、磯貝恵美子、米山 裕、新規なウシ乳房炎防除法の開発を目指した宿主免疫応答の簡便スクリーニング系の構築、第 66 回東北畜産学会 (2016 年 9 月 6 日～7 日) (盛岡)
- (6) 米山竜太、佐藤美佳、伊原航平、安藤太助、磯貝恵美子、米山 裕、乳房炎罹患牛の黄色ブドウ球菌に対する免疫応答の簡便スクリーニングシステムの構築、日本畜産学会 第 121 回大会 (2016 年 3 月 27 日～30 日) (東京)
- (7) 佐藤美佳、米山竜太、勝部 哲、松田敬一、安藤太助、磯貝恵美子、米山 裕、牛乳房炎由来 Staphylococcus aureus へのトランスポゾン保有プラスミドの形質転換、日本畜産学会 第 121 回大会 (2016 年 3 月 27 日～30 日) (東京)
- (8) 米山竜太、佐藤美佳、安藤太助、磯貝恵美子、米山 裕、牛乳房炎由来 Staphylococcus aureus のトランスポゾン挿入ライブラリー構築に向けた基礎研究、農芸化学会東北支部第 150 回大会 (2015 年 10 月 3 日) (仙台)
- (9) 佐藤美佳、勝部 哲、安藤太助、磯貝恵美子、米山 裕、ウシ乳房炎由来黄色ブドウ球菌の病原因子の解明を目指した微生物学的基礎研究、第 65 回東北畜産学会 (2015 年 8 月 27 日～28 日) (仙台)
- (10) 佐藤美佳、米山竜太、勝部 哲、安藤太助、磯貝恵美子、米山 裕、黄色ブドウ球菌のトランスポゾン挿入変異ライブラリーの構築 - 新規なウシ乳房炎防除法を目指して - 第 2 回乳房炎サマーキャンプ (MSC) (2015 年 8 月 22 日～23 日) (川渡)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

米山 裕 (YONEYAMA, Hiroshi)  
東北大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：10220774

### (2) 研究分担者

林 智人 (HAYASHI, Tomohito)  
(独) 農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所・上席研究員  
研究者番号：90297630

野地 智法 (NOCHI, Tomonori)  
東北大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号：10708001

秦 英司 (HATA, Eiji)  
(独) 農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究所・主任研究員  
研究者番号：50355153