

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19094

研究課題名(和文)黄色ブドウ球菌から緑膿菌への菌交代現象の分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular analysis of the microbial substitution of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*

研究代表者

鹿山 鎮男 (Kayama, Shizuo)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：50432761

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：黄色ブドウ球菌から緑膿菌へ咽頭フローラが変化していくことに関して、臨床的な報告が過去から存在する一方で、基礎的な機序はほとんど明らかになっていない。黄色ブドウ球菌の緑膿菌抵抗性に関わる因子を明らかにすることを目的に、市中感染型黄色ブドウ球菌TY825株のトランスポゾンランダム変異株ライブラリを作製し、緑膿菌抵抗因子の探索を行った。その結果、ランダム変異株ライブラリから、緑膿菌に対する抵抗性に関与する可能性がある遺伝子を見出した。

研究成果の概要(英文)：In order to find the resistant factors of *Staphylococcus aureus* against *Pseudomonas aeruginosa*, we made transposon mutagenesis library of community-acquired *S. aureus*, TY825. We found 16 candidate genes that might be related to the resistance factor against *P. aeruginosa*.

研究分野：細菌学

キーワード：日和見感染症 緑膿菌 黄色ブドウ球菌 混合感染 ランダム変異

## 1. 研究開始当初の背景

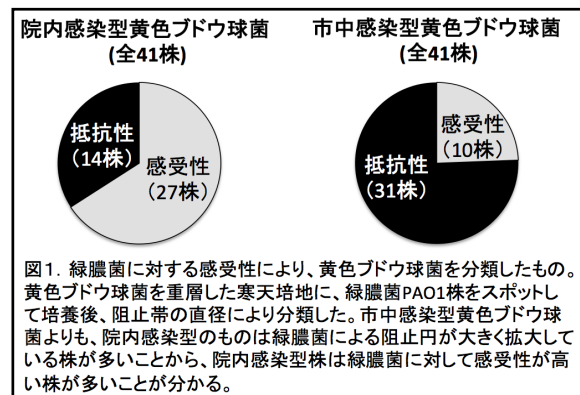
日和見感染症患者における肺炎には、感染初期において咽頭の常在菌としても存在する黄色ブドウ球菌の感染が認められるが、在院日数の長期化に伴い、緑膿菌感染へと移行していく。このような現象は、臨床においては比較的古くから知られているが、**菌交代現象の分子メカニズムについてはほとんど明らかにされていない。**気道の常在菌である黄色ブドウ球菌は、宿主の免疫の低下などにより日和見感染状態となった際、しばしば宿主に肺炎を起こす。その後、黄色ブドウ球菌から緑膿菌へと咽頭細菌叢（フローラ）が変化し、臨床症状が増悪していく。また、嚢胞性線維症（Cystic fibrosis）は、小児期において咽頭に黄色ブドウ球菌の感染が認められるが、青年期以降には緑膿菌感染へと移行していくことにより感染症状が増悪していくことで知られている(Lyczak JB. *et al.* Clin Microbiol Rev, 2002. 15(2): p. 194-222)。

黄色ブドウ球菌から緑膿菌へ咽頭フローラが変化していくことに関して、上記のように臨床的な報告が過去から存在する一方で、基礎的な機序はほとんど明らかになっていない。緑膿菌が産生する LasA が黄色ブドウ球菌を溶菌させる(Mashburn LM. *et al.* J Bacteriol, 2005. p. 554-566) ことなど、緑膿菌と黄色ブドウ球菌の直接的関与の報告があるものの、咽頭部における黄色ブドウ球菌フローラから緑膿菌フローラへの経時的変化及び病態の悪化について、分子的考察を含めた現象解明に至るには、より深い知見・考察が必須である。

研究代表者が所属する研究室では、過去に日本全国から収集した黄色ブドウ球菌臨床分離株約 3,000 株の PFGE 解析結果をもとに臨床分離株を 40 のクラスター

に分類し、各クラスターから選んだ代表株 200 株についてマイクロアレイを用いた比較ゲノム解析を行った。その結果、**市中感染型の黄色ブドウ球菌と院内感染型の黄色ブドウ球菌は異なるゲノタイプをもつこと、またゲノタイプによって病原性が異なることが明らかになった。**

一方、緑膿菌の培養上清には黄色ブドウ球菌の増殖を抑制する活性があることが知られている。緑膿菌 PA01 株培養上清を用いて上述した臨床分離株の代表株の感受性を調べた結果、これらの黄色ブドウ球菌臨床分離株は緑膿菌培養上清に対する**感受性に大きな差が認められた。**すなわち、**院内感染型の黄色ブドウ球菌は緑膿菌培養上清に強い感受性を示すものが多く、市中感染型の黄色ブドウ球菌は抵抗性を示す株が多かった(図1)。**



## 2. 研究の目的

日和見感染症患者における肺炎には、感染初期において咽頭の常在菌としても存在する黄色ブドウ球菌の感染が認められるが、在院日数の長期化に伴って緑膿菌感染へと移行していく。このような現象は臨床においては比較的古くから知られているが、菌交代の分子メカニズムについては、ほとんど明らかにされていない。

本研究では、黄色ブドウ球菌感染状態から経時的に緑膿菌感染状態へと菌交代が起こる現象の分子レベルでの解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

緑膿菌に対する黄色ブドウ球菌の抵抗性因子は明らかになっていない。そこで本研究期間内に、黄色ブドウ球菌の緑膿菌抵抗性因子を明らかにすることを目的に、トランスポゾンを用いた黄色ブドウ球菌の変異株ライブラリから得られた緑膿菌に対する抵抗性が減弱した株の解析を行った。これらの遺伝子を機能解析することにより、黄色ブドウ球菌の対緑膿菌抵抗性の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

#### 緑膿菌の攻撃に対する、黄色ブドウ球菌の防御因子の探索

緑膿菌の培養上清を含んだ培地に播種すると、増殖が著しく阻害される黄色ブドウ球菌と、あまり影響を受けない黄色ブドウ球菌が存在する。トランスポゾン変異株ライブラリを用いて、この現象に関与する遺伝子の探索を行った。

#### 緑膿菌に対する、黄色ブドウ球菌の攻撃因子の探索

緑膿菌を重層した培地に播種すると、緑膿菌の発育阻止帯を形成する黄色ブドウ球菌と形成しない株に分かれる。これについても、トランスポゾン変異株にて探索を行った。

実験を進める上で、黄色ブドウ球菌トランスポゾン変異株ライブラリを作成する際に使用する親株の選択が重要であった。上記の条件で効率的にスクリーニングを行うため、緑膿菌に対して強い阻止帯を形成し（緑膿菌に対する攻撃力が強く）、全塩基配列が明らかになっている当教室が保有する黄色ブドウ球菌 臨床分離株 TY825 株を用いてスクリーニングを実施する。

#### 緑膿菌の攻撃に対する、黄色ブドウ球菌の防御因子の探索

緑膿菌に対して、黄色ブドウ球菌の増殖が野生株よりも阻害されやすくなった変異株の検討を行い、緑膿菌に対する黄色ブドウ球菌の感受性を決定する原因遺伝子の探索を行った。

#### 【実験の流れ】

- 1) TY825 トランスポゾン変異株ライブラリを、96 穴プレートにて培養。
- 2) 緑膿菌を重層した培地に、上記変異株をスポット。
- 3) 96 穴プレートにて発育に問題がないが、緑膿菌重層培地上で発育が抑制されているトランスポゾン変異ライブラリ株を、緑膿菌の攻撃に対する防御因子に変異が起こった株として採取。
- 4) 変異部位を同定し、緑膿菌の攻撃に対する防御に関わる遺伝子の特定を行った。
- 5) 野生株の同じ部位を変異させ、再現性があるかを確認。
- 6) 遺伝子の機能を、blast、KEGG などの検索にて推定。
- 7) タンパクを精製し、機能を調査。

#### 緑膿菌に対する、黄色ブドウ球菌の攻撃因子の探索

緑膿菌を重層した培地において、黄色ブドウ球菌野生株よりも発育阻止帯が減少しているトランスポゾン変異ライブラリ株について検討を行い、緑膿菌に対する黄色ブドウ球菌の攻撃因子に関する原因遺伝子の探索を行った。

### 4. 研究成果

黄色ブドウ球菌の緑膿菌抵抗性に関わる因子を明らかにすることを目的に、市中感染型黄色ブドウ球菌 TY825 株のトランスポゾン

ランダム変異株ライブラリを作製し、緑膿菌抵抗因子の探索を行った。その結果、ランダム変異株 5,130 株から、緑膿菌に対する抵抗性が減弱した株を 16 株選出した。これらの遺伝子は、いずれも機能未知なものが多かった。この 16 株の内、遺伝子のプロモーターに変異が入ることで緑膿菌に対する抵抗性が低下したと考えられたものが 8 株だった。残りの 8 株に関しては、ORF そのものがトランスポゾンによって破壊されることにより、緑膿菌に対する抵抗性が減弱した株と考えられたため、それらの遺伝子の変異株を作成することにした。

*cydA* 遺伝子が破壊されると、緑膿菌に対する黄色ブドウ球菌の抵抗性が減弱することが明らかになった。*cydA* 遺伝子は、cytochrome d ubiquinol oxidase subunit I として知られているものの、その詳細な役割に関しては未知な部分が多い。現在、変異株を作成し、緑膿菌に対して抵抗性が低下する原因をさらに検討している。

また、Oligopeptide transport system ATP-binding protein として知られているものの、機能の詳細が明らかになっていない *oppD2* 遺伝子や、その他の遺伝子についても、現在、変異株を作成し、緑膿菌に対する抵抗性が減弱する原因に関して、検討を行っている。

## 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 8 件)

Kayama S, Ohge H, Sugai M. 2017. Rapid discrimination of *bla*<sub>IMP-1</sub>, *bla*<sub>IMP-6</sub>, and *bla*<sub>IMP-34</sub> using a multiplex PCR. J Microbiol Methods 135:8-10. 査読有り

Khalifa HO, Soliman AM, Ahmed AM, Shimamoto T, Hara T, Ikeda M, Kuroo Y, Kayama S, Sugai M, Shimamoto T. 2017. High carbapenem resistance in clinical gram-negative pathogens isolated in Egypt.

Microbial Drug Resistance mdr.2015.0339-7. 査読有り

Shimada N, Kayama S, Shigemoto N, Hisatsune J, Kuwahara R, Nishio H, Yamasaki K, Wada Y, Sueda T, Ohge H, Sugai M. 2016. Complete nucleotide sequence of pK01-34, an IncL/M plasmid carrying *bla*<sub>IMP-34</sub> in *Klebsiella oxytoca* isolated in Japan. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 60:3156-3162. 査読有り

Shrestha L, Kayama S, Sasaki M, Kato F, Hisatsune J, Tsuruda K, Koizumi K, Tatsukawa N, Yu L, Takeda K, Sugai M. 2016. Inhibitory effects of antibiofilm compound 1 against *Staphylococcus aureus* biofilms. Microbiol Immunol 60:148-159. 査読有り

Joichi Y, Kayama S, Hayashi I, Onodera M, Furushimo M, Koba Y, Yokozaki M, Ohge H, Sugai M. 2016. Two cases of *Clostridium tertium* infection and successful identification of the organism by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry analysis. Ann Lab Med 36:281-3. 査読有り

Shimizu W, Kayama S, Kouda S, Ogura Y, Kobayashi K, Shigemoto N, Shimada N, Yano R, Hisatsune J, Kato F, Hayashi T, Sueda T, Ohge H, Sugai M. 2015. Persistence and epidemic propagation of a *Pseudomonas aeruginosa* sequence type 235 clone harboring an IS26 composite transposon carrying the *bla*<sub>IMP-1</sub> integron in Hiroshima, Japan, 2005 to 2012. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 59:2678-2687. 査読有り

Kayama S, Koba Y, Shigemoto N, Kuwahara R, Kakuhama T, Kimura K, Hisatsune J, Onodera M, Yokozaki M, Ohge H, Sugai M. 2015. Imipenem-susceptible, meropenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* producing OXA-181 in Japan. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 59:1379-1380. 査読有り

Kayama S, Shigemoto N, Kuwahara R, Oshima K, Hirakawa H, Hisatsune J, Jové T, Nishio H, Yamasaki K, Wada Y, Ueshimo T, Miura T, Sueda T, Onodera M, Yokozaki M, Hattori M, Ohge H, Sugai M. 2015. Complete nucleotide sequence of the IncN plasmid encoding IMP-6 and CTX-M-2 from emerging carbapenem-resistant Enterobacteriaceae in Japan. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 59:1356-1359. 査読有り

〔学会発表〕(計 2 件)

Looniva Shrestha, Shizuo Kayama,  
Michiko Sasaki, Fuminori Kato, Junzo  
Hisatsune, Keiko Tsuruda, Kazuhisa  
Koizumi, Nobuyuki Tatsukawa, Kei Takeda,  
Motoyuki Sugai

Inhibitory effects of Antibiofilm  
compound-1 on *Staphylococcus aureus*  
biofilm.

2015.07.10 第 29 回 日本バイオフィルム学  
会学術集会 愛知県蒲郡 ホテル竹島

Looniva Shrestha, Shizuo Kayama,  
Michiko Sasaki, Fuminori Kato, Junzo  
Hisatsune, Keiko Tsuruda, Kazuhisa  
Koijumi, Nobuyuki Tatsukawa, Kei Takeda  
Motoyuki Sugai

Inhibitory Effects of Antibiofilm  
Compound 1 in *Staphylococcus aureus*  
Biofilms

2015.10.23 The 6<sup>th</sup> Hiroshima conference  
広島市 広島国際会議場

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

鹿山 鎮男 (Kayama Shizuo)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助  
教

研究者番号：50432761