

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2023

課題番号：18K16187

研究課題名（和文）酵母発現系を用いたMycoplasma hominis病原因子の同定

研究課題名（英文）Identification of Mycoplasma hominis virulence factors using yeast expression system

研究代表者

河合 泰宏（Kawai, Yasuhiro）

金沢大学・医学系・協力研究員

研究者番号：10388936

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：Mycoplasma hominis(ATCC23114株)の全ゲノム情報を基に機能未知遺伝子を選抜し、それぞれに対する1対のプライマーを作製した。ATCC23114株を液体培地で培養し、ゲノムからPCR産物を得た。また、酵母発現系の実験環境の整備が完了した。臨床分離株を用いて、標準株(ATCC23114株)との相違について検討を行った。標準株と臨床分離株を培養し各種抗菌薬のMIC測定を行った。一部で既報の変異なく標準株と異なる値を示す株を認め、その株でも効果が期待できる抗菌薬を見出すことができた。抗菌薬の感受性が変化した株や非常に増殖力の強い菌株を見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床分離株を用いて、既に機能が明らかにされている一部の遺伝子配列について解析を行い、菌株間での相違について検討を行った。M. hominisは他のMycoplasmaと異なり、第一選択薬となるマクロライド系抗菌薬に耐性を示す。抗菌薬耐性に関与する遺伝子配列について解析を行い、菌株間での相違について検討を行うために、臨床分離株の各種抗菌薬のMIC測定をした。一部で既報の変異なく標準株と異なる値を示す株を認め、その株でも効果が期待できる抗菌薬を見出すことができた。また、非常に増殖力の強い菌株も見出すことができ、抗菌薬耐性や増殖に関する新たな遺伝子変異の同定に繋がる結果が得られた。

研究成果の概要（英文）：Based on the whole genome information of Mycoplasma hominis (ATCC23114), genes of unknown function were selected, and a pair of primers for each of them was prepared. ATCC23114 strain was cultured in liquid medium, and PCR products were obtained from the genome. The experimental environment for the yeast expression system was completed. Clinical isolates strains were examined for differences from the standard strain (ATCC23114). The standard strain and clinical isolates strains were cultured and MICs of various antimicrobial agents were measured. Although some of the clinical isolates strains showed values different from those of the standard strain without the previously reported mutations, we were able to find antimicrobial agents that could be expected to be effective even in these strains. We were able to find strains with altered susceptibility to antimicrobial agents and strains with very strong growth ability.

研究分野：感染症

キーワード：Mycoplasma hominis

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

*Mycoplasma hominis* は、骨盤内炎症性疾患、帝王切開術後感染症や不妊などの周産期病態との関連や従来効果のある抗菌薬に対する耐性が報告されている。マイコプラズマ科の細菌は細菌蛋白を宿主へ注入し、宿主細胞内での生理的機能を攪乱することにより病原性を発揮していると予想される。*M. hominis* の病原因子の同定により、マイコプラズマ属感染症の新たな治療や予防および持続感染による慢性炎症の阻止が期待できる。

さて、研究者代表者の河合らは、*M. hominis* と同じく周産期領域におけるマイコプラズマ属細菌であるウレアプラズマが宿主細胞(HeLa 細胞)に感染した際に感染細胞の細胞死を回避するメカニズムとして、UpVF (ウレアプラズマ空胞化因子) と名付けた蛋白質が担っていることを報告した。一方で、ウレアプラズマの遺伝子操作は困難なため、ウレアプラズマを改変して UpVF の解析はできなかった。そこで、最近大きな注目を集めている、人工的に合成した DNA から生物(細菌)を作り出す新技術(合成生物学)を使ってウレアプラズマの遺伝子を人工ゲノム細菌に導入することに世界で初めて成功し、UpVF の病原性を明らかにした(Nishiumi F, Kawai Y, et al. Cell Microbiol, 2021) (AMED 成果情報 令和3年10月20日)。UpVF はウレアプラズマが持続感染に寄与する分子と考えられ、早産や新生児の合併症を予防する新たな治療の標的となると期待されている。

細胞壁をもたないマイコプラズマ科の細菌は細胞壁を標的としたβ-ラクタム系の抗菌薬の効果はない。従って、核酸の複製やタンパク質合成過程を標的とした抗菌薬が一般的に用いられている。

マイコプラズマ科の細菌はコレステロールの合成を行うことが出来ない。従って、*M. hominis* の増殖の為にはコレステロールなどの膜系を取り込む必要がある。細胞膜系を利用しながら増殖し病原性を発揮している可能性がある。

### 2. 研究の目的

1) *M. hominis* の機能未知遺伝子を NCBI データベースのゲノム情報を参考に機能未知遺伝子を選別し、網羅的に *M. hominis* 病原因子候補をスクリーニングする。

2) 本邦の周産期領域におけるマイコプラズマ薬剤感受性を調べる

3) 増殖能力の高い臨床分離株と標準株の遺伝子を比較する。

### 3. 研究の方法

(酵母を用いた *M. hominis* 由来の増殖抑制分子のスクリーニング)

*M. hominis* (ATCC23114 株) の全ゲノムデータベースから機能未知の遺伝子を標的として、酵母内で発現させ、真核生物へ影響を及ぼし増殖を抑制する遺伝子をスクリーニングする。

(*M. hominis* の薬剤感受性)

全国の周産期医療施設から大阪母子医療センターに解析依頼のあった検体から分離された *M. hominis* の各種抗菌薬に対する感受性を調べる。また、DNA を抽出し、キノロン耐性決定領域のシーケンスを行い、キノロン耐性遺伝子を獲得しているか否かを調べ感受性低下が起こっているメカニズムを推察する。

(高い増殖力を持つ *M. hominis* 株の探索)

全国の周産期医療施設から大阪母子医療センターに解析依頼のあった検体から分離された *M. hominis* の増殖を比較し、高い増殖力も持った株を解析する。

### 4. 研究成果

(酵母を用いた *M. hominis* 由来の増殖抑制分子のスクリーニング)

上記、ATCC23114 株ゲノムから約 600 個の機能未知遺伝子を選別、プライマーを作成し PCR 産物を得ることができた。真核細胞の増殖を抑制する遺伝子を同定するため酵母内で発現させ評価を行っていく。

(*M. hominis* の薬剤感受性)

臨床検体より *M. hominis* は計 11 株が分離され検討を行った。薬剤感受性は  $10^4$  CCU の菌量を用いて各抗菌薬存在下に 48 時間培養し判定した。特にキノロン系薬に対する薬剤感受性の变化を認めた。続いて、MIC が上昇している株についてキノロン耐性に関係する *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE* の遺伝子の解析を行った。検討した株では全て既報の変異を認めず、他の変異やメ

カニズの関与が示唆された。新たな変異やメカニズムの探索のため、全ゲノム解析による評価を計画している。細菌が薬剤耐性能を獲得する背景に、抗菌薬の不適切な使用も一因であり、すでに各分野での活動も行われているが、適切な抗菌薬投与について、生殖年齢層へのさらなる啓発が必要である。

(高い増殖力を持つ *M. hominis* 株の探索)

*M. hominis*臨床分離株計11株について検討した。液体培地のブロス中に含まれる基質 (*M. hominis*のためのアルギニン) が利用され、指示薬であるフェノールレッドがpHの上昇により変色するまでの時間を目視確認し、増殖力を評価した。概ね48時間程度で変色する株が主であったが、他の株と比べて2/3程度の時間で変色する株が1株、1/2程度の時間で変色する強い増殖力を持つと考えられる株を1株見出すことができた。機能未知、既知の増殖に関わる遺伝子の変異やメカニズムの探索のため、全ゲノム解析による評価を計画している。

## 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 2件）

1. 著者名 Hamasuna R, Yasuda M, Takahashi S, Uehara S, Kawai Y, Miyairi I, Arakawa S, Kiyota H	4. 巻 27
2. 論文標題 The JAID/JSC guidelines to Clinical Management of Infectious Disease 2017 concerning male urethritis and related disorders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 546-554
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2019.12.001	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 Nishiumi F, Kawai Y, Nakura Y, Yoshimura M, Wu HN, Hamaguchi M, Kakizawa S, Suzuki Y, Glass JI, Yanagihara I	4. 巻 23
2. 論文標題 Blockade of endoplasmic reticulum stress-induced cell death by Ureaplasma parvum vacuolating factor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular Microbiology	6. 最初と最後の頁 e13392
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cmi.13392	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 Hamasuna R, Yasuda M, Takahashi S, Uehara S, Kawai Y, Miyairi I, Arakawa S, Kiyota H, The Japanese Association for Infectious Disease/Japanese Society of Chemotherapy, The JAID/JSC Guide/Guidelines to Clinical Management of Infectious Disease Preparing Committee, Sexually Transmitted Infection Working Group	4. 巻 27
2. 論文標題 The JAID/JSC guidelines to Clinical Management of Infectious Disease 2017 concerning male urethritis and related disorders	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 546-554
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2019.12.001	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 濱砂 良一, 安田 満, 高橋 聡, 上原 慎也, 河合 泰宏, 宮入 烈, 荒川 創一, 清田 浩, 一般社団法人日本感染症学会・公益社団法人日本化学療法学会JAID/JSC感染症治療ガイド・ガイドライン作成委員会性感染症ワーキンググループ	4. 巻 66
2. 論文標題 JAID/JSC感染症治療ガイドライン2018 男性尿道炎とその関連疾患	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本化学療法学会雑誌	6. 最初と最後の頁 323-340
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河合泰宏
2. 発表標題 金沢医科大学病院における抗菌薬適正使用支援についての検討
3. 学会等名 第93回日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河合泰宏
2. 発表標題 当院におけるカンジダ血症の後方視的解析と予後因子の検討
3. 学会等名 第93回日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawai Yasuhiro
2. 発表標題 北陸地方における皮膚と軟部組織感染症から分離されたStaphylococcus aureusの遺伝学的特性 (Genetic characterization of Staphylococcus aureus isolates from skin and soft tissue infections in Hokuriku district)
3. 学会等名 第93回日本感染症学会総会・学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河合泰宏
2. 発表標題 カルバペネム系抗菌薬の初期治療および継続投与の適正性に関する検討
3. 学会等名 第67回日本化学療法学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 河合 泰宏
2. 発表標題 耐性菌による市中感染にどう対峙するか マクロライド耐性マイコプラズマによる肺炎
3. 学会等名 第92回日本感染症学会学術講演会・第66回日本化学療法学会総会 合同学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 河合泰宏	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京医学社	5. 総ページ数 1171
3. 書名 小児疾患診療のための病態生理 1 クラミジア感染症	

1. 著者名 清田浩，荒川創一，濱砂良一，石地尚興，上原慎也，河合泰宏，川名敬，高橋聡，三鴨廣繁，安田満，宮入烈	4. 発行年 2019年
2. 出版社 ライフサイエンス出版株式会社	5. 総ページ数 351
3. 書名 JAID/JSC感染症治療ガイド 2019 XIII 性感染症	

1. 著者名 河合泰宏，飯沼由嗣	4. 発行年 2019年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 598
3. 書名 改訂第9版 内科学書 vol. 2 感染経路 host-parasite relation ship	

〔産業財産権〕

〔その他〕

ウレアプラスマによる宿主細胞死の回避 気配を消す流早産原因菌の戦略  
<https://www.amed.go.jp/news/seika/kenkyu/20211020-02.html>

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
研究協力者	上田 忠司  (Ueda Tadashi)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------