

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32651

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07546

研究課題名（和文）細胞壁ターンオーバーを介した黄色ブドウ球菌の薬剤耐性と抵抗性の包括的制御

研究課題名（英文）Control of drug resistance and tolerance in *Staphylococcus aureus* through cell wall turnover

研究代表者

奥田 賢一（Okuda, Kenichi）

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：70624245

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：黄色ブドウ球菌の細胞壁ターンオーバーに関わる因子としてlytic transglycosylase（LT）であるIsaAとSceDが知られている。本研究では、黄色ブドウ球菌のLTのうち特にIsaAがバイオフィーム形成に関与していることを明かにした。また、isaA遺伝子の欠損によりMRSAのβ-ラクタム薬感受性が誘導されることを明かにした。これらの結果は、IsaAが黄色ブドウ球菌感染症の難治化要因であるバイオフィーム形成やβ-ラクタム薬耐性を制御するうえでのターゲットとして有望であることを示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

黄色ブドウ球菌の薬剤耐性とバイオフィーム形成は本菌による感染症の難治化要因であり、効果的な制御法の開発が求められている。本研究では、細胞壁ターンオーバー因子であるIsaAが黄色ブドウ球菌の薬剤耐性とバイオフィーム形成の両方に関与することを明かにした。今後、バイオフィーム形成やβ-ラクタム薬耐性におけるIsaAの役割をさらに深く理解することで、細胞壁ターンオーバーを標的とした黄色ブドウ球菌感染症の新規治療法の開発につながるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：We revealed that IsaA, a lytic transglycosylase involved in cell wall turnover of *Staphylococcus aureus*, is involved in biofilm formation. We also revealed that β-lactam resistance was significantly decreased in isaA-deleted strains compared with that of wild-type strains. These results suggest that IsaA is a promising target to attenuate biofilm formation and β-lactam resistance, which are factors that make *Staphylococcus aureus* infections difficult to treat.

研究分野：微生物制御学、細菌学、応用微生物学

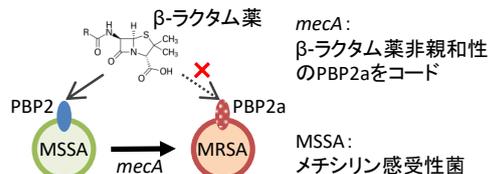
キーワード：薬剤耐性 バイオフィーム 黄色ブドウ球菌 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 MRSA 細胞壁

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

近年、多剤耐性を獲得したメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の蔓延が世界的問題となっており、感染による死者は米国だけで年間 11,000 人と推定されている。ペニシリンなどの β -ラクタム薬はペニシリン結合タンパク質 (PBP) に結合することで細胞壁合成を阻害する薬剤であるが、MRSA は獲得した *mecA* 遺伝子にコードされる β -ラクタム薬非親和性の PBP2a を発現するため耐性を示す。さらに、黄色ブドウ球菌はバイオフィルムを形成することで幅広いタイプの抗菌薬に高い抵抗性を示す。バイオフィルムは有機物・無機物の表面に形成される菌の集合体であり、医療用デバイス表面におけるバイオフィルム形成に起因する感染症が大きな問題となっている。バイオフィルムを形成した菌は代謝活性を低く保つことで通常より 10~1000 倍高い薬剤抵抗性を示すため¹、感染源のデバイスを除去する他に効果的な治療法が存在しない。このような背景から、黄色ブドウ球菌の薬剤耐性と抵抗性の制御は現代医学に求められる重要かつ喫緊の課題である。申請者は独自に行ったスクリーニングで黄色ブドウ球菌バイオフィルム形成を阻害する 2 つの化合物 JBD1 と norgestimate² を取得し、これらが細胞壁ターンオーバーにおける分解因子に影響を及ぼすことを見出した。加えて、JBD1 と norgestimate に本菌の薬剤感受性を向上させる効果があることを明らかにした。これらの知見を統合的に俯瞰することで、『細胞壁ターンオーバーは黄色ブドウ球菌の薬剤耐性とバイオフィルム形成に対する包括的制御因子である』という仮説が導かれ、『細胞壁ターンオーバーを標的とした新規制御法の開発』を想起した。

○耐性遺伝子の獲得(耐性)



○バイオフィルム形成(抵抗性)

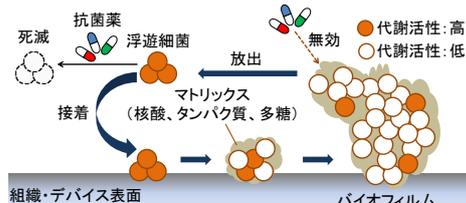


図1. 黄色ブドウ球菌における薬剤耐性と抵抗性

2. 研究の目的

本研究では、上記の仮説に基づき、細胞壁ターンオーバー因子と薬剤耐性・バイオフィルム形成がどのような分子基盤によって結びついているかを検証することを目的とした。黄色ブドウ球菌の細胞壁の恒常性が合成と分解の動的平衡 (ターンオーバー) によって保たれていることは知られていたが、薬剤耐性・抵抗性との結びつきについては全く報告がない。申請者は、独自のスクリーニングによって見出した JBD1 と norgestimate の作用機序研究を通して、細胞壁の分解に関与するタンパク質が薬剤耐性・抵抗性に対する包括的制御因子であることを強く示唆する結果を得ており、これを足がかりとして分子基盤の解明を試みた。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子欠損・過剰発現株の作製

MRSA である *S. aureus* MR23³、MR10³、USA300⁴ を使用した。細胞壁ターンオーバーに関わる lytic transglycosylase (LT) をコードする遺伝子である *isaA* と *sceD* の遺伝子欠損株は Bae らが報告した方法⁵に従って作製した。また、PBP2a をコードする *mecA* の遺伝子欠損株も同様の方法で作製した。LT 遺伝子と *mecA* のプラスミドからの過剰発現には、pCN51 プラスミド⁶ のエリスロマイシン耐性遺伝子をクロラムフェニコール耐性遺伝子で置換した pCN51Cm プラスミドを新たに構築し、これを使用した。

(2) バイオフィルム形成試験

Brain Heart Infusion (BHI) 培地にグルコースを最終濃度 1% で添加した BHIG 培地を用いて、96 ウェルマイクロタイタープレート内で *S. aureus* を 37°C 条件下で 24 時間静置培養した。ウェル底面に形成されたバイオフィルムをクリスタルバイオレットで染色し、595nm の吸光度を測定することでバイオフィルムの定量を行った。

(3) 抗生物質感受性試験

S. aureus に対する抗菌薬の最小発育阻止濃度 (MIC) は、EUCAST ガイドライン (<http://www.eucast.org/>) に従って微量液体希釈法により決定した。

4. 研究成果

(1) 細胞壁ターンオーバー因子である IsaA はバイオフィルム形成に関与する

LT 遺伝子の変異は、*Lactococcus lactis*、*Salmonella enterica*、*Pseudomonas aeruginosa* においてバイオフィーム形成に影響を与えることが報告されている⁷⁻⁹。そこで、*S. aureus* MR23 の野生株 (WT) および LT 遺伝子欠損株のバイオフィーム形成能を評価した (図 2)。*isaA* の欠損はバイオフィーム形成を著しく低下させたが、*sceD* の欠損はバイオフィーム形成に影響を与えなかった。 $\Delta isaA \Delta sceD$ 株のバイオフィーム形成能は、 $\Delta isaA$ 株とほぼ同等であった。また、*isaA* をプラスミドから発現させると、 $\Delta isaA$ 株のバイオフィーム形成が回復することが確認された。一方、プラスミドからの *sceD* の発現は WT および $\Delta isaA$ 変異体のバイオフィーム形成に影響を与えなかった。これらの結果は、2 つの LT のうち、特に *IsaA* が *S. aureus* MR23 のバイオフィーム形成に関与することを示している。

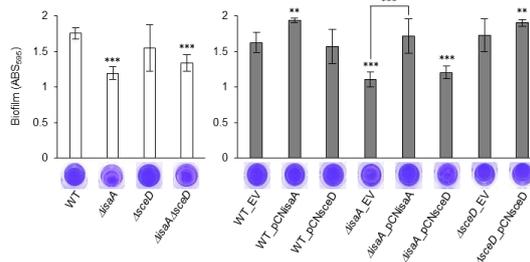


図 2. LT 遺伝子欠損株のバイオフィーム形成能

(2) *isaA* の欠損は MRSA の β -ラクタム感受化を誘導する

S. aureus MR23 の WT および LT 遺伝子欠損株に対する抗菌薬の MIC を測定した (表 1)。なお、WT 比較して 4 倍以上の MIC 値の差を有意とみなした (赤字)。LT 遺伝子欠損株のいずれにおいても、MIC の有意な上昇は認められなかった。特に、*isaA* の欠損は試験に用いた全 7 種類の β -ラクタム薬のうち 5 種類 (オキサシリン、セファゾリン、フロモキシセフ、セフォキシチン、イミペネム) の MIC を低下させ、*sceD* の欠損は 2 種類の β -ラクタム薬 (アンピシリン、セフォキシチン) の MIC を低下させた。プラスミドからの *isaA* の相補により、 $\Delta isaA$ 株に対する β -ラクタム薬の MIC は有意に上昇した ($\Delta isaA_{EV}$ vs $\Delta isaA_{pCNisaA}$)。一方で、 $\Delta isaA$ 株における *sceD* のプラスミドからの発現は効果を示さなかった。これらの結果は、*S. aureus* の LT が β -ラクタム薬耐性に寄与しており、*IsaA* が *SceD* よりも薬剤耐性を発揮する上では重要であることを示している。

表 1. LT 遺伝子欠損株の抗菌薬感受性

Antibiotic	WT	$\Delta isaA$	$\Delta sceD$	$\Delta isaA \Delta sceD$
β-lactam				
Oxacillin	64	2	8	2
Ampicillin	4	2	0.5	0.5
Cefazolin	8	1	8	1
Cefmetazole	8	4	8	2
Flomoxef	8	2	4	1
Cefoxitin	>16	8	8	8
Imipenem	8	<0.25	8	<0.25
Glycopeptide				
Vancomycin	1	2	1	2
Teicoplanin	4	4	4	2
Oxazolidinone				
Linezolid	8	8	8	2
Aminoglycoside				
Gentamicin	>8	>8	>8	>8
Lincomycin				
Clindamycin	0.5	0.5	0.12	0.25
Fosfomycin	<32	<32	<32	<32
Fluoroquinolone				
Levofloxacin	>4	4	>4	4

(3) *isaA* 欠損株における PBP2a 産生と β -ラクタム薬耐性の相関性

MRSA の β -ラクタム薬耐性は主に *mecA* にコードされた PBP2a によってもたらされるため、PBP2a の誘導物質であるオキサシリンの存在下または非存在下で、*isaA* および *sceD* の欠損が PBP2a 産生に及ぼす影響について検討した。使用したオキサシリン濃度は、各菌株に対するオキサシリンの MIC の 1/16、1/8、1/4 とした。抗 PBP2a 抗体を用いたウェスタンブロッティングにより、分子サイズの異なる 2 つのバンドが確認された (図 3A)。 $\Delta mecA$ 株ではこれら 2 つのバンドは検出されなかったことから両者ともに PBP2a に由来するものであると考えられるが、2 本のバンドとして検出される原因については不明である。WT では、上部 PBP2a バンド (PBP2a_{up}) の発現はオキサシリン濃度に依存的であった。また、オキサシリン非存在下では、弱い下部 PBP2a バンド (PBP2a_{low}) のみ検出された。同様の現象は、 $\Delta sceD$ 株でも観察された。PBP2a_{up} の誘導は、WT と比較して $\Delta isaA$ 株では低下し、 $\Delta isaA \Delta sceD$ 株では著しく低下した (図 3A)。重要な点として、 $\Delta isaA$ 株において低レベルであった PBP2a_{up} の産生は、*isaA* のプラスミドからの発現により回復した ($\Delta isaA_{EV}$ vs $\Delta isaA_{pCNisaA}$) (図 3B)。これらの結果から、*isaA* の発現が PBP2a の産生に直接的または間接的に関与し、MR23 の β -ラクタム薬耐性に寄与しているものと推察した。そこで、 β -ラクタム薬感受化と PBP2a 産生量低下の因果関係を明らかにするため、カドミウム誘導性プロモーターの制御下に *mecA* を含むプラスミド pCN*mecA* を $\Delta mecA$ および $\Delta isaA$ 変異体へ導入した。pCN*mecA* を導入した変異体では、培養液に添加したカドミウムの濃度に依存して PBP2a の産生が誘導された (図 3C)。次に、変異体の β -ラクタム薬耐性に及ぼす PBP2a 産生誘導の影響を検討した。 $\Delta mecA_{pCNmecA}$ に対するオキサシリンの MIC は、カドミウム濃度に依存して上昇し、カドミウム誘導により産生される PBP2a が機能していることが確認された。一方で、当初の仮説とは異なり、PBP2a の誘導は $\Delta isaA_{pCNmecA}$ に対するオキサシリンの MIC に影響を与えなかった。これらの結果より、*isaA* の欠損は PBP2a の産生に関わらず β -ラクタム薬感受化を誘導することが明らかになった。

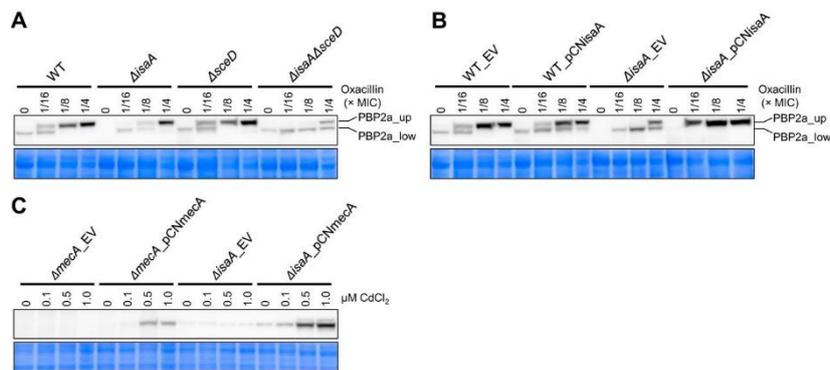


図 3. LT 遺伝子欠損株における PBP2a の産生

(4) 異なるタイプの MRSA クローンにおける LT 遺伝子欠損の影響

LT 変異によって誘導される表現型が MRSA において一般的なものであるかを確認するために、新たに multilocus sequence type 5 (ST5) に属する院内感染型 MRSA (HA-MRSA) クローンである *S. aureus* MR10² と ST8 に属する市中感染型 MRSA (CA-MRSA) クローンである *S. aureus* USA300³ を使用して同様の解析を行った。LT 遺伝子欠損を作成してバイオフィーム形成能を評価したところ、*isaA* の欠損は MR10 と USA300 のバイオフィーム形成能を低下させたが、*sceD* の欠損は影響を与えなかった (図 4A)。USA300 では、 $\Delta isaA \Delta sceD$ 株のバイオフィーム形成能は、 $\Delta isaA$ 株のバイオフィーム形成能とほぼ同じであった。興味深いことに、*isaA* と *sceD* の二重遺伝子欠損は MR10 のバイオフィーム形成能を著しく低下させた。このことは、SceD が MR10 のバイオフィーム形成に補完的な役割を担っていることを示唆している。*isaA* または *isaA* と *sceD* の両方を欠損させると、MR10 と USA300 の両方でオキサシリンの MIC が WT と比較して有意に低下したが、*sceD* の欠損は効果を示さなかった。次に、MR10、USA300 およびそれらの LT 変異体における PBP2a の産生を解析した。MR10 では、WT および $\Delta sceD$ 株ではオキサシリンにより PBP2a 産生が誘導されたが、 $\Delta isaA$ および $\Delta isaA \Delta sceD$ 株ではほとんど誘導されなかった。一方、USA300 では、WT と LT 欠損株で PBP2a の産生が同様に誘導された (図 4B)。以上の結果から、様々な MRSA クローンにおいて、*isaA* の欠損は PBP2a 産生に依存せず β -ラクタム薬感感化を誘導することが示された。

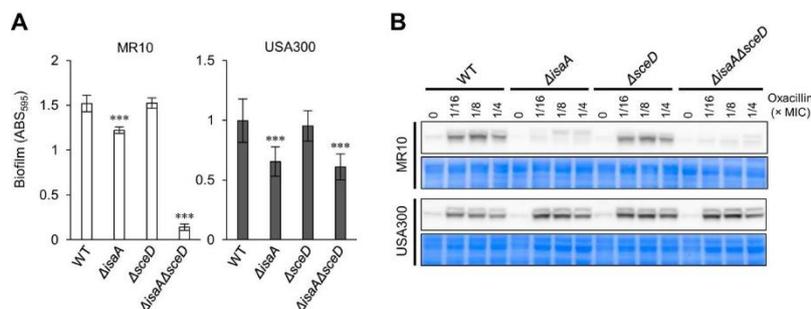


図 4. 異なるタイプの MRSA クローンをを用いた評価

(5) 結論

今回我々は、黄色ブドウ球菌の細胞壁ターンオーバーに関わる LT である *IsaA* と *SceD* のうち特に *IsaA* がバイオフィーム形成に関与していることを明かにした。また、*isaA* の欠損により MRSA の β -ラクタム薬感感化が誘導されることを明かにした¹⁰。これらの結果は、*IsaA* が黄色ブドウ球菌感染症の難治化要因であるバイオフィーム形成や β -ラクタム薬耐性を制御するうえでのターゲットとして有望であることを強く示唆するものである。バイオフィーム形成や β -ラクタム薬耐性における *IsaA* の役割をさらに深く理解することで、細胞壁ターンオーバーを標的とした黄色ブドウ球菌感染症の新規治療法の開発につながるものと期待される。

<引用文献>

- Allison KR, Brynildsen MP, Collins JJ. 2011. Metabolite-enabled eradication of bacterial persisters by aminoglycosides. *Nature* 473:216-220.
- Yoshii Y, Okuda K, Yamada S, Nagakura M, Sugimoto S, Nagano T, Okabe T, Kojima H, Iwamoto T, Kuwano K, Mizunoe Y. 2017. Norgestimate inhibits staphylococcal biofilm formation and resensitizes methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to β -lactam antibiotics. *NPJ Biofilms Microbiomes* 3:18.

3. Sugimoto S, Sato F, Miyakawa R, Chiba A, Onodera S, Hori S, Mizunoe Y. 2018. Broad impact of extracellular DNA on biofilm formation by clinically isolated Methicillin-resistant and -sensitive strains of *Staphylococcus aureus*. *Sci Rep* 8:2254.
4. Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG, Lin F, Lin J, Carleton HA, Mongodin EF, Sensabaugh GF, Perdreau-Remington F. 2006. Complete genome sequence of USA300, an epidemic clone of community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 367:731-739.
5. Bae T, Schneewind O. 2006. Allelic replacement in *Staphylococcus aureus* with inducible counter-selection. *Plasmid* 55:58-63.
6. Charpentier E, Anton AI, Barry P, Alfonso B, Fang Y, Novick RP. 2004. Novel cassette-based shuttle vector system for gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* 70:6076-6085.
7. Mercier C, Durrieu C, Briandet R, Domakova E, Tremblay J, Buist G, Kulakauskas S. 2002. Positive role of peptidoglycan breaks in lactococcal biofilm formation. *Mol Microbiol* 46:235-243.
8. Monteiro C, Fang X, Ahmad I, Gomelsky M, Romling U. 2011. Regulation of biofilm components in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by lytic transglycosylases involved in cell wall turnover. *J Bacteriol* 193:6443-6451.
9. Lamers RP, Nguyen UT, Nguyen Y, Buensuceso RN, Burrows LL. 2015. Loss of membrane-bound lytic transglycosylases increases outer membrane permeability and β -lactam sensitivity in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiologyopen* 4:879-895.
10. Lopes AA, Yoshii Y, Yamada S, Nagakura M, Kinjo Y, Mizunoe Y, Okuda K. 2019. Roles of lytic transglycosylases in biofilm formation and beta-lactam resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 63:e01277-19.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ken-ichi Okuda, Satomi Yamada-Ueno, Yutaka Yoshii, Tetsuo Nagano, Takayoshi Okabe, Hirotsu Kojima, Yoshimitsu Mizunoe, Yuki Kinjo	4. 巻 13
2. 論文標題 Small-Molecule-Induced Activation of Cellular Respiration Inhibits Biofilm Formation and Triggers Metabolic Remodeling in <i>Staphylococcus aureus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e00845-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mbio.00845-22	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 Anne-Aurelie Lopes, Yutaka Yoshii, Satomi Yamada, Mari Nagakura, Yuki Kinjo, Yoshimitsu Mizunoe, Ken-ichi Okuda	4. 巻 63
2. 論文標題 Roles of lytic transglycosylases in biofilm formation and β -lactam resistance in methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Antimicrobial Agents and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 e01277-19
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AAC.01277-19.	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 奥田賢一, 金城雄樹
2. 発表標題 低分子化合物による呼吸の活性化は黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成を阻害し代謝リモデリングを誘導する
3. 学会等名 第36回日本バイオフィーム学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥田賢一, 金城雄樹
2. 発表標題 低分子化合物による細胞呼吸の亢進は黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成を阻害し代謝リモデリングを誘導する
3. 学会等名 第70回日本化学療法学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 奥田賢一, 金城雄樹
2. 発表標題 トランスグリコシラーゼ遺伝子の欠損はmecA非依存的にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌のβ-ラクタム感性化を誘導する
3. 学会等名 第69回日本感染症学会東日本地方会学術集会・第67回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥田賢一、Anne-Aurelie Lopes、吉井悠、山田聡美、永倉茉莉、水之江義充、金城雄樹
2. 発表標題 MRSAにおけるトランスグリコシラーゼ遺伝子の欠損はmecA発現レベルに関わらずβ-ラクタム感受性を誘導する
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 奥田賢一、Anne-Aurelie Lopes、吉井悠、山田聡美、永倉茉莉、水之江義充、金城雄樹
2. 発表標題 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成と薬剤耐性におけるトランスグリコシラーゼの関与
3. 学会等名 第33回日本バイオフィーム学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 奥田賢一、金城雄樹
2. 発表標題 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌のトランスグリコシラーゼはバイオフィーム形成と薬剤耐性に関与する
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 奥田賢一、Anne-Aurelie Lopes、吉井悠、山田聡美、永倉茉莉、水之江義充、金城雄樹
2. 発表標題 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成と薬剤耐性におけるトランスグリコシラーゼの関与
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 バイオフィルム形成抑制剤	発明者 奥田 賢一	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-196755	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

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

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		
フランス	Robert Debre Hospital		