

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 25 日現在

機関番号：30109

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780298

研究課題名(和文) ゲノムワイドな系統解析によるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)誕生の解明

研究課題名(英文) The investigation of the birth of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by using genome-wide phylogenetic analysis.

研究代表者

椿下 早絵 (TSUBAKISHITA, SAE)

酪農学園大学・獣医学群・准教授

研究者番号：50616894

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

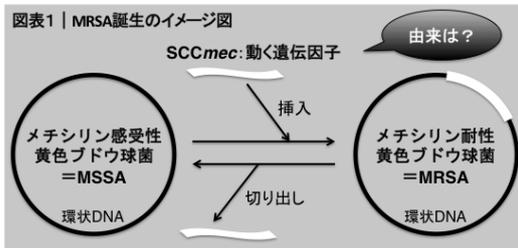
研究成果の概要(和文)：メチシリン耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)は、人および動物の感染症の起因菌となり、時には致死的な病態を引き起こす薬剤耐性菌として脅威である。MRSA誕生のメカニズムを明らかにすることは、MRSAの新たな発現の抑制に繋がる可能性がある。本研究では、メチシリン耐性遺伝子の起源およびそのホモログを保有している動物由来ブドウ球菌に着目し、それらのゲノムの全塩基配列を決定することによりMRSA誕生について考察した。研究の結果、動物由来ブドウ球菌の染色体上でMRSAの決定因子が構成され、黄色ブドウ球菌へ水平伝播されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Methicillin-resistant *Staphylococcus* (*S.*) *aureus* (MRSA) is one of the most important multidrug-resistant pathogen of human and animals. The investigation of the birth of MRSA may contribute to more effective control measures for MRSA. In this study, to elucidate the birth of MRSA, we focus on the animal-borne staphylococci, which harbor the origin of the methicillin-resistant gene and its homologues, and performed the whole-genome sequencing and phylogenetic analysis of them. The results suggest the mobile genetic element encoding methicillin-resistance was composed on the chromosome of the animal-borne staphylococci before the element horizontally transferred to the chromosome of *S. aureus*.

研究分野：獣医学

キーワード：MRSA whole-genome sequencing

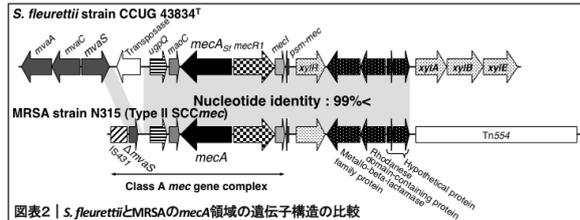
- 研究開始当初の背景
 メチシリン耐性黄色ブドウ球菌：
Methicillin-resistant *Staphylococcus* (*S.*) *aureus* (以下、**MRSA**) は、院内感染の最も重要視される多剤耐性病原体のひとつである。また、近年、市中での **MRSA** 感染症の増加も問題となっており、アメリカでは **MRSA** 感染症による死亡者数が **HIV** 感染症による死亡者数を上回っている。さらに、人獣共通感染症の病原体として、人と動物の間の **MRSA** の伝播も問題となっている。**MRSA** は、メチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (**Methicillin-susceptible *S. aureus*: MSSA**) が外来性に **Staphylococcal cassette chromosome *mec*** (以下、**SCC*mec***) と呼ばれる動く遺伝因子を染色体上に獲得する事により誕生する (図表 1)。



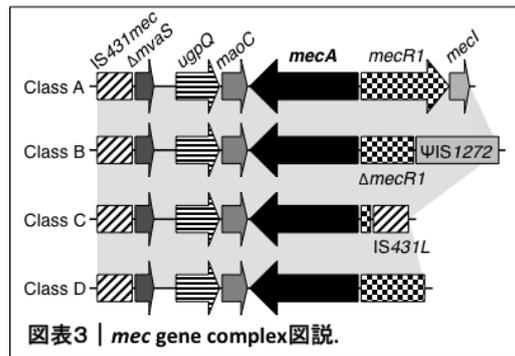
SCC*mec* は ***mec* gene complex** および ***ccr* gene complex** の二つの重要な構成要素から成り立っている。***mec* gene complex** はメチシリン耐性遺伝子 (以下、***mecA***) を保有し、ベータラクタム系抗生物質に低親和性の細胞壁合成酵素 (PBP2') をコードしている。***ccr* gene complex** は **SCC*mec*** の染色体上への挿入と染色体からの切り出しを担うリコンビナーゼをコードしている。**SCC*mec*** は、***mec* gene complex** のクラスおよび ***ccr* gene complex** のタイプの組み合わせによって、様々なタイプが存在し、現在、40種類以上の菌種が登録されているブドウ球菌種間を移動していると考えられているが、その起源は1961年の最初の **MRSA** の発見以来、謎のままであった。***mecA*** 遺伝子および **SCC*mec*** の起源を探索することは、**MRSA** の新たな発現の抑制に繋がることが予測されるため、重要な研究課題である。

- 研究の目的
MRSA はメチシリン感受性黄色ブドウ球菌の染色体上に ***mecA*** を保有する動く遺伝因子 (**SCC*mec***) を獲得する事により誕生するが、その由来は謎のままであった。我々は、これまでにあまり研究が進んでいなかった動物由来ブドウ球菌に注目し、調査した結果、***S.***

fleurettii の染色体上に ***mecA*** 領域の起源となる構造を発見した (図表 2)。次の課題は、どこでどのように **SCC*mec*** が作られ、どのように黄色ブドウ球菌が獲得するかを明らかにすることである。ゲノムワイドなブドウ球菌属系統解析をベースに **MRSA** 誕生に至る全容解明を行うため、***S. fleurettii*** が含まれるブドウ球菌種グループの一つである ***S. sciuri*** グループに属する 4 菌種の全ゲノム配列を次世代シーケンサーによって決定することを計画した。



<研究①> 動物由来メチシリン耐性ブドウ球菌の ***mec* gene complex** タイプは圧倒的に **Class A** (=プロトタイプ) が多い (図表 3)。しかも、その菌種の大部分が ***S. sciuri*** および ***S. lentus*** である。これらの菌種は ***S. fleurettii*** と近縁であり、動物体内で共存していることから、**SCC*mec*** の形成または供給に関与する菌種としての可能性が高いと考えられる。よって、これらの **SCC*mec*** のゲノム解析を中心に行い、系統解析によって、**SCC*mec*** が形成されている菌種および過程を明らかにする。



<研究②> ブドウ球菌の全ゲノム解析は数多く行われているが、ほとんどがヒト由来ブドウ球菌 (特に ***S. aureus*** と ***S. epidermidis***) である。よって、ゲノムワイドなブドウ球菌属系統解析をベースに、**SCC*mec*** 獲得による **MRSA** 誕生に至る過程の全容解明を進化化学的に行うため、さらには動物由来ブドウ球菌研究の発展のため、***S. sciuri*** グループに属する 4 菌種の全ゲノム解析を行う。精度向上のため、2 種類の次世代シーケンサーを用いたハイブリッド法で解析を実施し、データベース既出の菌

種と合わせてゲノム比較を行う。このデータは学術的に高い意味を持ち、ヒトおよび動物由来ブドウ球菌研究における未解決の問題のブレイクスルーになることが期待される。

3. 研究の方法

<研究①> *S. sciuri* グループの菌種が保有する SCCmec を中心としたゲノム解析を行う (計 10 株)。得られた SCCmec の塩基配列をもとに系統解析を行い、SCCmec の起源を解明する。

<研究②> 次世代シーケンサー: 454 によって得られた *S. sciuri* グループ計 5 株のドラフトシーケンスを環状 DNA に完成させる。次世代シーケンサー: Illumina によって、環状 DNA の塩基配列のエラーを修正し、より正確なゲノム配列を得る。解析用ソフトウェアによって、アノテーションおよび他のブドウ球菌種とのゲノム比較を行う。

4. 研究成果

<研究①> メチシリン耐性をコードしている SCCmec と呼ばれる動く遺伝子の起源を明らかにするため、動物由来ブドウ球菌種である *S. sciuri* および *S. lentus* に注目した。これらの菌種と近縁の動物由来ブドウ球菌種である *S. fleurettii* の染色体上に SCCmec の 2 つの重要な構成因子のうちの一つである *mecA* の起源が保存されていること、またこれらの菌種の SCCmec はプロトタイプが多いことから、SCCmec の形成または供給に参与している可能性が高いためである。動物由来ブドウ球菌 779 株の中から *mecA* 陽性 *S. sciuri* 3 株、*S. lentus* 11 株を選出し、SCCmec の塩基配列を決定し、解析した。これらの株は、いずれも染色体上にプロトタイプの SCCmec を保有していた。また、本実験の中で、*S. sciuri* の染色体上に新規メチシリン耐性遺伝子 (*mecC*) を発見し、動物由来 *S. sciuri* 47 株の *mecC* 遺伝子のスクリーニングを実施した。実験の結果、陽性であったのは最初に発見した 1 株のみであった。

<研究②> 動物由来ブドウ球菌である *Staphylococcus sciuri* グループに属する菌種の染色体上には、MRSA の決定因子である *mecA* の起源およびそのホモログが存在している。本研究において、MRSA 誕生の過程を解明するため、全ゲノム配列の解析を予定していた *S. sciuri* グループに属する 4 菌種全て (*S. fleurettii*, *S. sciuri*, *S. vitulinus*, *S. lentus*) の染色体 DNA の解読を完了し、4 株の環状 DNA を完成することができた。transposase、

insertion sequence などの mobile element を多く保有した株があり、*S. sciuri* グループに属する菌種は SCCmec の形成または供給に参与している可能性が示唆された。しかし、同じ配列を複数保有している場合、解読が難しく、*S. sciuri subsp. carnaticus* の保有する約 100kbp のプラスミドの一部に繰り返し配列が複雑に存在するため、約 20kbp の範囲が未解読である。

新規ゲノムの全塩基配列決定は非常に困難で、特に次世代シーケンサーで得たドラフトシーケンスを繋げる作業に時間と労力を費やさなければならない。しかし、4 株の新規ゲノム配列を決定する過程で、本研究の成果として、新規ブドウ球菌種のゲノム完全解読におけるノウハウを獲得したり、新しい解析方法を開拓したりすることができた。全ゲノム解読を予定していたもう 1 つの *S. sciuri* の亜種 (*S. sciuri subsp. sciuri*) に関して、本研究で最終的に最良の方法と判断した 1 分子リアルタイム DNA シーケンサーである PacBio RS II を用いて、今後、全ゲノム配列を早期に決定する予定である。いくつかのアプリケーションを使用して菌種間のゲノム比較を実施し、その選定について検討中である。菌種間のゲノム比較により、進化的に MRSA が誕生した過程を解明する。

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 2 件)

① Hiramatsu K, Ito T, Tsubakishita S, Sasaki T, Takeuchi F, Morimoto Y, Katayama Y, Matsuo M, Kuwahara-Arai K, Hishinuma T, Baba T. Genomic Basis for Methicillin Resistance in *Staphylococcus aureus*. Infection and chemotherapy, 査読有り, 45(2):117-36, 2013.
doi: 10.3947/ic.2013.45.2.117.

② Sasaki T, Tsubakishita S, Tanaka Y, Ohtsuka M, Hongo I, Fukata T, Kabeya H, Maruyama S, Hiramatsu K. Population genetic structures of *Staphylococcus aureus* isolates from cats and dogs in Japan. Journal of Clinical Microbiology, 査読有り, 50(6):2152-5, 2012.
doi: 10.1128/JCM.06739-11

〔学会発表〕（計 2 件）

- ① Sae Tsubakishita, Kyoko Kuwahara, Takashi Sasaki, Tadashi Baba, Tatsufumi Takahashi, Naoya Kikuchi, Keiichi Hiramatsu. International Union of Microbiological Societies 2014 Congress (IUMS), 2014, モントリオール (カナダ)
- ② Sae Tsubakishita, Kyoko Kuwahara, Takashi Sasaki, Tatsufumi Takahashi, Naoya Kikuchi, Keiichi Hiramatsu, Whole genome sequencing of the animal-borne staphylococci as the reservoir of determinant of MRSA. 2012 韓日微生物学シンポジウム, 2012, 扶余 (韓国)

〔図書〕（計 1 件）

Teruyo Ito, Sae Tsubakishita, Kyoko Kuwahara-Arai, Xiao Han, Keiichi Hiramatsu, Staphylococcal Cassette Chromosome (SCC): A Unique Gene Transfer System in Staphylococci. Bacterial Integrative Mobile Genetic Elements, 2013, 291-306

6. 研究組織

(1) 研究代表者

椿下 早絵 (TSUBAKISHITA, Sae)
酪農学園大学・獣医学群・准教授
研究者番号：50616894

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：