

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670210

研究課題名(和文)ゼブラフィッシュ感染モデルを用いた病原細菌リボソーム修飾の意義解明

研究課題名(英文)Using zebrafish to understand the ribosomal modification in pathogenic bacteria

研究代表者

高屋 明子(Takaya, Akiko)

千葉大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80334217

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：内因性23S rRNAメチル化修飾の機能解明のため、抗菌薬感受性を調べた。肺炎球菌23S rRNAを標的とするテリスロマイシン感受性化に必要なメチル化酵素RlmAIIの活性に、RlmCDによるメチル化が関与することを見出した。又、国内で分離されたLZD耐性ブドウ球菌を調べたところ、LZD結合部位近傍であるG2576がUに変異し、LZD耐性高度化にはG2576Uとなった23S rRNAコピー数が増加することに加え、内因性23S rRNA酵素RlmNに変異を見出した。内因性23S rRNA修飾が変異した菌の病原性を野生株と比較するためゼブラフィッシュの利用を試みたが、その利用は困難であった。

研究成果の概要(英文)：Some ribosome-targeting antibiotics can inhibit bacterial growth by binding to 23SrRNA and interfering with protein synthesis. i) We have found that RlmCD-mediated U747 methylation promotes efficient G748 methylation by RlmAII, facilitating the binding of telithromycin, a 23SrRNA-targeting antibiotic, to the ribosome in *Streptococcus pneumoniae*. ii) Linezolid (LZD) is an antibiotic used for the treatment of serious infections caused by multidrug-resistant Gram-positive bacteria including MRSA. We analyzed LZD-resistant CoNS isolated in Japan. Resistance to LZD has been associated with a G2576U mutation in 23SrRNA, which is close to the binding region of LZD. Furthermore, all LZD-resistant isolates had mutations in the gene encoding RlmN methyltransferase. iii) The infection model using zebrafish was difficult to examine the role of the intrinsic methylation of nucleotides in 23S rRNA for the bacterial pathogenesis.

研究分野：細菌学

キーワード：23S rRNAメチル化酵素 薬剤感受性 グラム陽性菌 ゼブラフィッシュ

1. 研究開始当初の背景

細菌 70S リボソームは、30S サブユニットと 50S サブユニットからなる。50S サブユニットの主要な構成成分は 23S rRNA であり、ドメイン I-VI から成る。23S rRNA のドメイン V は、ペプチジルトランスフェラーゼセンター (PTC) であり、ペプチド結合形成を触媒する。PTC で合成された新生ペプチドは、PTC から伸びる新生ペプチド排出トンネル (NPET) を通ってリボソーム外に送り出される。NPET の入り口は、PTC と 23SrRNA ドメイン II 及びリボソームタンパク質 L4、L22 が構成される。大腸菌の 23SrRNA はリボソームに組み込まれる前に、35 スクレオチドが修飾されるが、この修飾のほとんどは NPET の入り口部位に集中している。しかしながら、これら修飾がリボソームに与える影響については、ほとんど解明されていなかった。

リボソームを標的とする抗菌薬の多くは、23S rRNA の PTC 付近に結合することで、タンパク質合成を阻害する。マクロライド・ケトライド系抗菌薬は細菌リボソームの NPET 入り口に結合し、タンパク質合成を阻害する。マクロライド系抗菌薬は、ドメイン V の A2058 周囲に結合するが、細菌は A2058 を特異的にジメチル化する酵素 Erm を獲得することによりマクロライド耐性となる。一方、ケトライド系抗菌薬、テリスロマイシン (TEL) は、ドメイン V に加えてドメイン II に結合することにより、Erm を獲得した細菌にも抗菌力を発揮する。これに加え、我々は先行研究において、肺炎球菌の内因性 23S rRNA メチル化酵素であり、ドメイン II に存在するヘリックス 35 の G748 をメチル化する RImA^{II} の活性が、TEL 感受性を増強させることを見出した。RImA^{II} による G748 メチル化は多くの菌で見られるものの、すべての菌に保存されていない。従って、菌種特異的なリボソームのメチル化は、抗菌薬活性の調節に関わることが示唆されているが、他の 23S rRNA メチル化酵素と薬剤感受性に関する知見はほとんどなかった。

2. 研究の目的

本研究では、まず、23S rRNA 標的抗菌薬の耐性化における内因性メチル化酵素活性の関与の解明を目指し、(1) 肺炎球菌の新規 23S rRNA メチル化酵素の同定と TEL 感受性メカニズムについて検討した。(2) 難治性感染症原因菌の一つである、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) の治療薬として用いられる 23S rRNA 標的抗菌薬、リネゾリドの薬剤耐性機構に 23S rRNA 修飾が関与する可能性について検討した。(3) 我々は、臨床分離耐性菌の研究から、内因性リボソーム修飾が、感染症発症における病原因子産生制御に関わる可能性を考えた。この仮説の証明のために、感染症発症モデルとしてゼブラフィッシュ感染モデルの構築を目指した。

3. 研究の方法

(1) 肺炎球菌 23S rRNA メチル化酵素 RImCD の同定: DNA およびアミノ酸配列が公開されている肺炎球菌 TIGR4 の情報を用いて大腸菌 RImC のホモログを検索し、Sp_1029 および Sp_1901 を得た。各遺伝子欠損株を構築し、rRNA を抽出後、LC-MS/MS により 23S rRNA のメチル化を解析した。

(2) 肺炎球菌および臨床分離コアグラエゼ陰性ブドウ球菌の薬剤感受性試験: 各種薬剤の感受性を調べるため、微量液体希釈法また寒天平板希釈法により最小発育濃度 (MIC) を測定した。

(3) 臨床分離株の薬剤耐性遺伝子変異解析: 薬剤耐性に関わる遺伝子を PCR で増幅し、遺伝子配列を解析し、標準株の配列と比較した。

(4) *in vitro* メチル化アッセイ: GST 融合 RImA^{II} を調製し、FactorXa で切断することで、精製 RImA^{II} を得た。肺炎球菌野生株と RImCD 欠損株から rRNA を抽出し、それぞれ RImCD modified-23S rRNA および RImCD unmodified-23S rRNA として基質に用いた。G748 のメチル化はプライマーエクステンションアッセイにより評価した。

(5) ゼブラフィッシュ感染実験: 黄色ブドウ球菌を PBS で調製し、2 日胚の血管から感染させた。28 時間で培養し、12 時間毎に感染 72 時間まで生存数を調べた。

4. 研究成果

(1) 肺炎球菌 23SrRNA メチル化酵素 RImA^{II} と RImCD によるテリスロマイシン感受性制御

肺炎球菌 23SrRNA のヘリックス 35 にある G748 は内因性のメチル化酵素 RImA^{II} によりメチル化され、このメチル基がケトライド系抗菌薬、テリスロマイシン (TEL) のリボソーム結合を安定化させることを、先行研究で見出している。大腸菌において G748 に隣接する U747 はメチル化酵素 RImC によりメチル化される。TEL 感受性に U747 のメチル基が関与する可能性を検討した。

肺炎球菌における 23SrRNA の U747/U1939 メチル化酵素 RImCD の同定: まず、肺炎球菌の 23SrRNA の U747 のメチル化とメチル化酵素 RImC を同定するため、大腸菌 RImC のホモログを検索した。その結果、肺炎球菌 TIGR4 ゲノム上に、2 つのホモログ、SP_1029 と SP_1901 を見出した。これらは、大腸菌の 23SrRNA の U1939 メチル化酵素 RImD のホモログでもあった。そこで、TIGR4 株の SP_1029 および SP_1901 遺伝子内にスペクチノマイシン耐性遺伝子を導入することで各遺伝子破壊株を構築し、野生株および各欠損株から rRNA を抽出した。抽出した rRNA を RNaseT1 で処理し、LC-MS/MS で解析したところ、野生株および SP_1901 欠損株では U747 および

U1939 がメチル化した RNA 断片が検出されたが、SP_1029 欠損株では両断片とも検出されなかった。SP_1029 欠損株に SP_1029 をプラスミドで導入したところ、U747 および U1939 のメチル化が相補された。このことから、肺炎球菌 SP_1029 は 23SrRNA の U747 および U1939 の両方をメチル化する RlmCD であることが明らかとなった。

TEL 感受性における RlmCD の寄与：TEL 感受性に RlmCD 活性が関与する可能性について、Erm(B) を構成的に発現することで TEL 低感受性を示す株に RlmCD 欠損を導入し、TEL 感受性を比較した。RlmCD⁺ 株では TEL の MIC が 2 μ g/mL であったが、RlmCD 欠損株では MIC が 8 μ g/mL と耐性となった。TEL 耐性の上昇は RlmCD プラスミドを導入することで消失した。このことから、RlmCD 活性は TEL 感受性に寄与することが示唆された。

RlmCD による TEL 感受性化機構：RlmCD により生じる U747 のメチル基は結合する TEL の方向とは逆方向に位置することが分子モデリング解析から示唆された。又、TEL 低感受性をもたらす Erm(B) による A2058 のジメチル化率も RlmCD の活性により変化しなかった。そこで、RlmCD 活性が G748 のメチル化に影響する可能性について検討したところ、野生株では 81.0 \pm 5.9% であったが、RlmCD 欠損株では 41.4 \pm 2.8% にまで減少した (図 1)。RlmCD 欠損株に RlmA^{II} プラスミドを導入したところ 100% となった。又、RlmCD/pRlmA^{II} 株の TEL の MIC は 2 μ g/mL と TEL 感受性となった。このことから、RlmCD 活性の消失は、RlmA^{II} による G748 メチル化率を低下させることで TEL 耐性をもたらすことが明らかとなった。

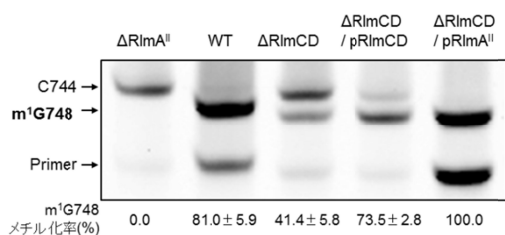


図 1 肺炎球菌野生株及び 23S rRNA 修飾酵素変異株における G748 のメチル化率

RlmCD 修飾による RlmA^{II} 活性制御：RlmCD によるメチル化が RlmA^{II} による G748 メチル化に影響する可能性を明らかにするため、RlmCD⁺/RlmA^{II} 株 (RlmCD-modified 23SrRNA) および RlmCD⁻/RlmA^{II} 株 (RlmCD-unmodified 23SrRNA) から rRNA を抽出し、精製 RlmA^{II} による G748 メチル化率を調べた。10nM RlmCD-modified 23SrRNA を基質として用いた時には、100nM RlmA^{II} と反応させると約 87% の G748 がメチル化された。一方、10nM RlmCD-unmodified 23SrRNA を基

質として用いた時には、2000nM RlmA^{II} を加えても 62% しか G748 のメチル化が見られなかった。この結果から、RlmA^{II} による G748 の効率的なメチル化には RlmCD によって先にメチル化されることが重要であることが明らかとなった。

(2) 国内臨床分離コアグラーゼ陰性ブドウ球菌のリネゾリド耐性機構

オキサゾリジノン系抗菌薬リネゾリド (LZD) は MRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌) 感染症の治療薬として用いられている。LZD 耐性菌出現の割合は世界的に低いものの、徐々に増加傾向にある。臨床分離 LZD 耐性ブドウ球菌のうち、黄色ブドウ球菌が 0.05% に対して、コアグラーゼ陰性ブドウ球菌 (CoNS) は 1.4% と多い傾向であると報告されている。これまで国内での LZD 耐性 CoNS の報告がなかった。2012 年から 2015 年に国内で分離された LZD 耐性 CoNS (*Staphylococcus capitis*) 25 株について LZD 耐性化機構について検討した。

LZD 耐性 CoNS の各種抗菌薬感受性：LZD の MIC を調べたところ、8 μ g/mL が 4 株、16 μ g/mL が 2 株、32 μ g/mL が 19 株と LZD 耐性値が徐々に上昇していることが明らかとなった。又、バンコマイシン、アルベカシンには感受性であったものの、オキサシリンなどの複数の薬剤に耐性であった。そこで、*mecA* 遺伝子を獲得しているかを PCR で調べたところ、すべての株が *mecA* 陽性であり、MR-CoNS であった。

LZD 耐性機構：23SrRNA ドメイン V の LZD 結合領域を増幅し、ヌクレオチド変異について調べた。その結果、すべての菌で G2576 が U に変異していた。CoNS のゲノム上には 6 コピーの rRNA オペロン (*rrnA-rrnF*) が存在している。そこで、各オペロンを特異的に増幅するプライマーを設計し、G2576U となった 23SrRNA コピー数を調べた。その結果、MIC 8 μ g/mL は 3 コピー、16 μ g/mL は 4 コピー、32 μ g/mL では 4 または 5 コピーとなっていた。MIC 32 μ g/mL の株では 1 コピーの *rrn* オペロンで 16SrRNA と 23SrRNA の 10bp 相同配列で組み換えが起こり、約 3000bp が欠失していた。この結果は、LZD 耐性の高度化には、G2576U となった 23SrRNA 数が増加することが関与することを示唆している。

23SrRNA 以外の寄与を調べるため、リボソームたんぱく質 L3、L4、L22 のアミノ酸変異を調べたところ、L3 にのみ Thr83Ala が見つかった。又、23SrRNA メチル化酵素 RlmN を調べたところ、Thr62Met/Gly148Ser が生じていた。RlmN は LZD 結合領域近傍にある A2503 の 2 位の炭素をメチル化する内因性酵素である。海外で分離される LZD 耐性株において、A2503 の 8 位の炭素をメチル化する外来性酵素 Cfr の保有株が多数分離されている。今回調べた株では Cfr は検出されなかったものの、RlmN のアミノ酸変異により A2503 のメチル化

に影響することで、LZD 耐性に寄与することが考えられる。

以上より、国内で分離された LZD 耐性 CoNS の LZD 耐性には、23SrRNA の G2576U 変異に加え、リボソームたんぱく質 L3 および 23SrRNA メチル化酵素 RImN 変異といった複数の要因が関与することが示唆された。又、LZD 耐性の高度化には、ゲノム上 23SrRNA の複数のコピーに G2576U 変異蓄積する、あるいは欠損することで野生型の 23SrRNA が減少することに寄与することが強く示唆された。

(1)(2)の結果から、細菌は修飾などを变化させた様々なリボソームを細胞内で発現させることにより、抗菌薬などの環境変化に素早く適応することを示唆された。

(3) グラム陽性菌のゼブラフィッシュ感染実験

抗菌薬に対応するために、リボソーム修飾などが変化する過程が示唆されたが、肺炎球菌の TEL 耐性株および LZD 耐性ブドウ球菌の臨床分離頻度は高くない。このことから、リボソーム修飾の変化は、病原性が低下をもたらされ、宿主免疫などの環境適応が低下している可能性を考えた。このことを明らかにするために、ゼブラフィッシュを用いた感染実験系を確立し、野生株とリボソーム修飾変異株での病原性を調べることに試みた。感染実験の系を構築するため、2 日胚のゼブラフィッシュに黄色ブドウ球菌を投与し、感染後の生存率を調べた(図 2)。その結果、黄色ブドウ球菌を 100CFU 投与したときにはゼブラフィッシュは 100% 生存したが、投与数を増加させると、ゼブラフィッシュは感染の早い段階で死に至り、生存率は徐々に低下した。

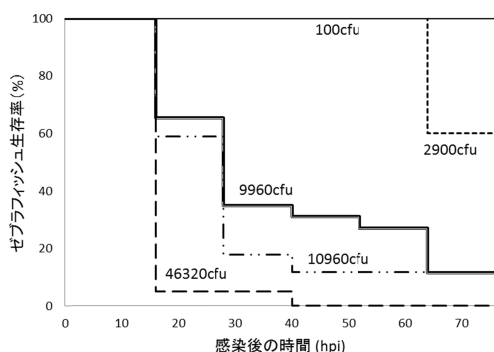


図 2 様々な黄色ブドウ球菌数を投与したときのゼブラフィッシュの生存率の経時的变化

しかしながら、実験の再現性に乏しく、黄色ブドウ球菌の投与数と投与 72 時間後のゼブラフィッシュ生存率との相関を調べると、感染させる菌数が少ないときの相関がみられなかった(図 3)。このことから、ゼブラフィッシュは黄色ブドウ球菌などの病原性の評価に使用可能であると考えられるが、投与量依存的な評価は極めて難しいと考えられた。従って、ゼブラフィッシュ感染実験の結果で

は、リボソーム変異株の病原性を野生株と比較するのは困難であると考えている。

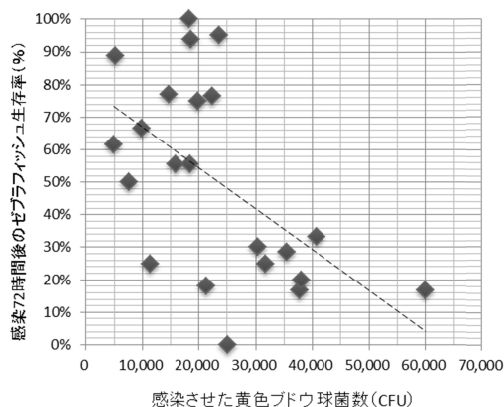


図 3 感染させた黄色ブドウ球菌数と感染 72 時間後のゼブラフィッシュ生存率との関係

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

- Shoji T, Takaya A, Sato Y, Kimura S, Suzuki T, Yamamoto T. (2015) RImCD-mediated U747 methylation promotes efficient G748 methylation by methyltransferase RImA^{II} in 23S rRNA in *Streptococcus pneumoniae*; interplay two rRNA methylation responsible for telithromycin susceptibility. *Nucl. Acids Res.* **43**(18): 8964-8972. peer reviewed. doi:10.1093/nar/gkv609
- Takaya A, Kimura A, Sato Y, Ishiwada N, Watanabe M, Matsui M, Shibayama K, Yamamoto T. (2015) Molecular characterization of linezolid-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* isolates in Japan. *J. Antimicrob. Chemother.* **70**(3): 658-63. peer reviewed. doi:10.1093/jac/dkv443.
- Ishiwada N, Takaya A, Kimura A, Watanabe M, Hino M, Ochiai H, Matsui M, Shibayama K, Yamamoto T. (2015) Linezolid-resistant *Staphylococcus epidermidis* associated with long-term, repeated linezolid use in a pediatric patient. *J. Infect Chemother.* **22**: 187-190. peer reviewed. doi:10.1016/j.jiac.2015.10.004.

[学会発表](計 6 件)

- 木村 旭、高屋 明子、石和田 稔彦、山本 友子：臨床分離メチシリン耐性 Coagulase-negative *Staphylococcus* におけるリネゾリド耐性化機構 第 98 回日本細菌学会関東支部総会、2015 年 10 月 29 ~ 30 日、東京歯科大学(東京都千代田区)
- 高屋 明子、庄司 竜麻、山本 友子：肺炎

球菌 23SrRNA のメチル化とテリスロマイシン感受性 第 17 回日本 RNA 学会年会、2015 年 7 月 15～17 日ホテルライフオーツ札幌（北海道札幌市）

3. 高屋 明子: グラム陽性菌の内因性 rRNA 修飾と薬剤耐性. 感染症研究グローバルネットワークフォーラム 2014 (依頼・招待講演) 2014 年 11 月 15 日、千葉大学 (千葉県千葉市)
4. 高屋 明子, 木村 旭, 山本 友子等: 臨床由来コアグラーゼ陰性ブドウ球菌のリネゾリド耐性機構. 第 43 回薬剤耐性菌研究会, 2014 年 10 月 31 日、加賀観光ホテル (石川県加賀市)
5. 庄司 竜麻, 高屋 明子, 木村 聡, 鈴木 勉, 佐藤 慶治, 山本 友子: 肺炎球菌のテリスロマイシン感受性に寄与する rRNA 内因性修飾. 第 97 回日本細菌学会関東支部総会、2014 年 10 月 30～31 日、東京ドームホテル (東京都文京区)
6. Takaya A, Kimura Y, Sato Y, Yamamoto T: Genetical Assessment of Linezolid Resistance Mechanisms in *Staphylococcus capitis* Isolated Clinically. Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2014.9.6-9, Washington DC, USA.

〔その他〕

ホームページ等

千葉大学大学院薬学研究院微生物薬品化学研究室ホームページ

<http://www.p.chiba-u.jp/lab/bisei/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高屋 明子 (TAKAYA, Akiko)

千葉大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号: 8 0 3 3 4 2 1 7