

## 論 文 要 旨

### Association of two-component systems - ABC transporters with the susceptibility to bacitracin and various bacteriocins in *Staphylococcus aureus*.

黄色ブドウ球菌におけるバシトラシンおよびバクテリオシン感受性と  
二成分制御系-ABC トランスポーターとの関連性

吉田 裕真

#### 【序論および目的】

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は鼻腔や口腔に常在し、化膿性疾患、毒素性ショック症候群、食中毒、肺炎など、種々の疾患を引き起こす病原性細菌である。また、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) は院内感染の原因菌としても問題となっている。これまでに、*S. aureus* の抗菌剤耐性については、*mec* 遺伝子によるメチシリン耐性等多くが明らかになっている。近年、細菌特有の情報伝達および環境適応機構である二成分制御系 (Two-component system; TCS) の抗菌剤耐性への関与が報告されている。黄色ブドウ球菌は 16 組の TCS を保有するが、その多くは詳細な機能が明らかにされていない。本研究では、これまで機能未知であった TCS を介した抗菌剤耐性メカニズムについて解析を行った。

#### 【材料および方法】

MRSA 臨床分離株である MW2 野生株を用い、必須遺伝子である *vicR* を除く全ての TCS (15 組) 遺伝子破壊株を相同性組み換え法により作製し、細胞壁合成阻害剤、蛋白質合成阻害剤等を含む種々の抗菌剤感受性を網羅的に評価した。感受性の評価には微量液体培地希釈法を用い、最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。細胞壁合成阻害剤であるバシトラシン (BC) に対する感受性への関与が認められた TCS (*BceRS* と命名) に関しては、*bceRS* 下流域に存在する薬剤排出性 ABC トランスポーター (*BceAB* と命名) および *VraDE*、2 組の ABC トランスポーター遺伝子破壊株を作製し、微量液体培地希釈法に加え Population 解析による、より詳細な BC 感受性試験を行った。さらに、*S. aureus* MW2 株における未同定の薬剤排出 ABC トランスポーター (12 組) の遺伝子破壊株を新たに作製し、各々の TCS 遺伝子破壊株とともにバクテリオシン (細菌の産生する抗菌性物質。Class I, IIa~d に分類される) に対する感受性を検証した。また、MW2 野生株および TCS 遺伝子破壊株における、BC 作用時の ABC トランスポーターの遺伝子発現解析については、定量性 PCR 法を用いた。さらに *S. aureus* と Class I バクテリオシン産生株との共培養試験では、MW2 野生株もしくは TCS および ABC トランスポーター遺伝子破壊株を、Class I バクテリオシン産生株と同時培養し、その生存率を検証した。

#### 【結 果】

TCS 遺伝子破壊株を用いた感受性試験の結果、*BceRS* が、BC 耐性に関与していることが明らかになった。また、本 TCS 下流に位置する ABC トランスポーター (*bceAB*) および他の ABC トランスポーター (*vraDE*) の遺伝子破壊株において、BC 感受性の変化が認められた。また、Population 解析による、より詳細な感受性試験においても、*bceRS* および *bceAB*, *vraDE* 遺伝子破壊株において BC 感受性が高くなっていることが示された。遺伝子発現解析の結果、BC 添加時、MW2 野生

株では *bceAB*, *vraDE*、2組の薬剤排出性 ABC トランスポーター発現が誘導されるのに対し、TCS である *bceRS* 遺伝子破壊株では ABC トランスポーターの発現誘導が認められなくなった。以上のことから、BceRS は BC を感知し、2組の ABC トランスポーター(*bceAB*, *vraDE*)の発現を誘導することで BC 耐性を担うことが明らかになった。

BC は枯草菌の産生する抗菌物質、バクテリオシンの1つであることから、BceRS を介した ABC トランスポーター薬剤排出システムは、BC のみならず、バクテリオシン耐性に関与するの可能性があると考えた。種々のバクテリオシン(Class I, IIa~d)産生株を用いて、MW2 株における TCS および薬剤排出 ABC トランスポーター遺伝子破壊株を用い、種々のバクテリオシン感受性を網羅的に検証した。その結果、乳酸菌である *Lactococcus lactis* の産生する Nisin A をはじめとする Class I バクテリオシン耐性に3組の TCS( BceARS ApsRS, VraSR )の関与が認められた。また、BceRS の制御下にある2組の ABC トランスポーター(*bceAB*, *vraDE*)に加えて、ApsRS 下流に位置する ABC トランスポーター(*vraFG*) 遺伝子破壊株においても Class I バクテリオシン感受性の増大が認められた。ClassII バクテリオシンについては IIc, IId において、ApsRS および *vraFG* 破壊株のみ感受性の増加が認められた。また、Class I バクテリオシン精製標品添加時、*bceRS* 破壊株では *bceRS* - *bceAB*, *vraDE* に関しては BC 添加時と同様の結果が見られたことから、本システムは Class I バクテリオシン耐性にも関与することが明らかになった。また、ApsRS 遺伝子破壊株においては、バクテリオシン添加、非添加に関わらず ABC トランスポーター-*vraFG* 遺伝子発現が抑制されていた。このことより、TCS である BceRS は、Class I バクテリオシンを感知することで2組の ABC トランスポーター(*bceAB*, *vraDE*)を活性化し、Class I バクテリオシン耐性の本体を担い、ApsRS は *vraFG* を常時発現させることで耐性の補助的役割を担う可能性が示唆された。Class I バクテリオシン産生菌との共培養試験において、3組の TCS (*bceRS*, *apsRS*, *vraSR*)、ならびに3組の ABC トランスポーター(*bceAB*, *vraDE*, *vraFG*)遺伝子破壊株では MW2 野生株に比較し、共培養時の生存率の減少が認められ、共培養時においても TCS- ABC トランスポーターによるバクテリオシン耐性メカニズムは重要な役割を果たしていることが示された。

#### 【結論及び考察】

本研究では、*S. aureus* における BceRS を介した ABC トランスポーターによる新規薬剤耐性システムを明らかにした。興味深いことに、本システムは BC のみならず、Class I バクテリオシン全般の耐性にも関与することが示された。また、BceRS を含む3組の TCS が、他菌の産生するバクテリオシン耐性に関与することが明らかになった。*S. aureus* などの生体内常在菌は、生体に定着する際、他の常在菌の産生するバクテリオシンに耐性を示すことが、生体への常在化に重要であると考えられる。本研究で明らかにした BceRS を介した薬剤排出性 ABC トランスポーターによるバクテリオシン耐性システムは、細菌の生体内定着において重要な役割を果たすシステムであると考えられる。

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 177 号		学位申請者	吉田 裕真
審査委員	主査	於保 孝彦	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	杉原 一正	副査	松口 徹也
	副査	佐藤 友昭	副査	町頭 三保

### Association of two-component systems - ABC transporters with the susceptibility to bacitracin and various bacteriocins in *Staphylococcus aureus*.

(黄色ブドウ球菌におけるバシトラシンおよびバクテリオシン感受性と二成分制御系-ABC トランスポーターとの関連性)

黄色ブドウ球菌は化膿性疾患、食中毒など種々の疾患を引き起こす病原性細菌である。近年、細菌特有の環境適応機構である二成分制御系 (TCS) の抗菌剤耐性への関与が報告されているが、その多くは詳細な機能が明らかにされていない。そこで、学位申請者はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 臨床分離株である MW2 野生株を用い、必須遺伝子である *vicR* を除く全ての TCS (15 組) 破壊株を相同性組み換え法により作製し、種々の抗菌剤感受性を網羅的に評価した。抗菌剤感受性に変化が認められた TCS に関連する ABC トランスポーター遺伝子破壊株を作製し、抗菌剤感受性を検証した。TCS の ABC トランスポーター発現に及ぼす影響については定量性 PCR 法を用いて検証した。次に種々のバクテリオシン産生菌を用いて TCS 及び ABC トランスポーター遺伝子破壊株における感受性の変化を検証した。さらにバクテリオシン産生株と黄色ブドウ球菌との共培養試験を行い、TCS 遺伝子破壊株の生存率について検証した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

1. TCS 遺伝子破壊株と種々の抗菌剤における網羅的感受性試験の結果、一つの TCS (BceRS) 破壊株において細胞壁合成阻害剤であるバシトラシン (BC) 感受性が増大した。
2. BC 感受性試験において BceRS 直下の遺伝子を含む 2 組の ABC トランスポーター (*bceAB*, *vraDE*) 破壊株でバシトラシン (BC) 感受性が増大した。
3. BC 作用時の遺伝子発現解析により BceRS を介した *bceAB* および *vraDE* の発現誘導による BC 耐性機構が明らかになった。
4. 種々のバクテリオシンとの網羅的感受性試験において、BceRS, ApsRS および VraSR の 3 つの TCS 破壊株でランチオニン構造を有する Class I バクテリオシン感受性が増大した。
5. Class I バクテリオシン作用時の遺伝子発現解析により、BceRS は *bceAB* および *vraDE*、ApsRS は直下の ABC トランスポーター遺伝子 *vraFG* を各々制御し耐性を持つことが明らかになった。
6. 黄色ブドウ球菌と Class I バクテリオシン産生菌を共培養した場合、3 つの TCS 破壊株では野生株に比べ生存率が減少した。特に BceRS 破壊株においては著しい生存率の低下を認めた。

本研究により、黄色ブドウ球菌における BceRS を介した抗菌物質耐性システムが明らかになった。また BceRS は BC のみならず、Class I バクテリオシン全般の耐性に関与することが示された。さらに Class I バクテリオシン耐性には BceRS を含む 3 組の TCS が耐性に関与することが明らかになった。他菌との共培養において、BceRS は黄色ブドウ球菌の生存率に大きく影響することが示され、本耐性システムは、細菌の生体内定着において重要な役割を果たすことが考えられる。

本研究は、黄色ブドウ球菌において未解析であった TCS の役割を検討したものであり、生体への感染および細菌間の共存に関与することを示した点で非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 177 号	学位申請者	吉田 裕真
審査委員	主査	於保 孝彦	学位 博士 (医学・ <del>歯学</del> ・学術)
	副査	杉原 一正	副査 松口 徹也
	副査	佐藤 友昭	副査 町頭 三保
<p>主査および副査の5名は、平成 24 年 2 月 10 日、学位申請者 吉田 裕真 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問 1) 実験に使用した菌株は多剤耐性 MRSA 株か？バンコマイシンやキノロンに対する感受性は臨床でも有効であるか？  (回答) 敗血症患者由来の多剤耐性 MRSA 株である。本菌はバンコマイシンには感受性を持つので臨床でも有効であり、キノロンには耐性を持つので無効である。</p> <p>質問 2) ABC トランスポーターのバシトラシン輸送機構とは？  (回答) ATP 結合タンパク、膜貫通タンパクからなり、物質の輸送に関わると言われるが、詳細な輸送機構については明らかになっていない。</p> <p>質問 3) ABC トランスポーターあるいは TCS を阻害することでバシトラシン耐性を阻害できるか？  (回答) TCS が ABC トランスポーターを制御しているので、ABC トランスポーターあるいは TCS の阻害により耐性阻害が可能と考える。</p> <p>質問 4) バクテリオシン Class I, II における抗菌メカニズムの違いは？  (回答) 構造の違いと抗菌作用機序には関連性はなく、個々により詳細なメカニズムは異なる。</p> <p>質問 5) バシトラシンおよびバクテリオシンの作用機序は？  (回答) バシトラシンは細胞膜上のペプチドグリカン合成の際に関与するリピドに結合し、細胞壁合成阻害を引き起こす。バクテリオシンの作用機序はタイプにより様々である。</p> <p>質問 6) バシトラシンやバクテリオシンは、一度細胞内に取り込まれてから排出されるのか？  (回答) 本研究で同定した ABC トランスポーターについての排出機構は明らかではないが、細胞膜に存在するバクテリオシンを排出していると考ええる。</p> <p>質問 7) TCS 破壊株は、センサータンパク、調節性タンパクどちらを破壊しているか？  (回答) 調節性タンパクを阻害し、破壊株を作製している。</p> <p>質問 8) ダイレクト法の手技について綺麗な阻止円にするコツはあるか？  (回答) バクテリオシン産生株を寒天培地上に滴下し、十分に乾燥した上でブドウ球菌を播種する。</p> <p>質問 9) ディスク法は使用しなかったのか？ろ紙ではできなかったか？  (回答) バクテリオシン用のディスクは市販されていない。ろ紙では阻止円が形成できなかった。</p> <p>質問 10) バクテリオシン由来の抗菌剤が作られた際、既存の抗菌剤と比較して利点があるか？  (回答) 生体常在菌由来であるため、人体に無害であり、また、Class I バクテリオシンは他のバクテリオシンと比較して抗菌スペクトルが広い。</p>			

質問 1 1) バクテリオシンは常在菌に効くのか？

(回答) バクテリオシンに対して耐性機構を持たない菌種には有効である。

質問 1 2) MRSA 株では BceRS-ABC トランスポーターが機能しているが、他の株ではどうか？

(回答) メチシリン感受性株においても同様に BceRS-ABC トランスポーター遺伝子破壊株でバシトラシン感受性が高くなっており、同様の機構が働いていると考えられる。

質問 1 3) 多剤耐性獲得メカニズムにおいて過去に TCS が関与しているという報告はあるか？

(回答) ApsRS が陽性に帯電した抗菌剤に、VraSR が細胞壁合成阻害剤耐性に関与している等の報告がある。

質問 1 4) MRSA と TCS の特異的な関係は無いのか？

(回答) メチシリン耐性と TCS とは直接には関連が無い。

質問 1 5) 相同性組み換えによる遺伝子破壊ではどのくらいの大きさのものが導入されているか？

ランダムに導入される可能性を考慮しなくていいのか？

(回答) 約 500bp。ランダム導入の可能性については検討していない。

質問 1 6) ApsRS は *vraFG* を常時発現させているというが、センサーとしては機能しないのか？また、Class IIc, IId バクテリオシンでも感受性が変化しているが構造とは関係無いのか？

(回答) ApsS は陽性に帯電した抗菌物質を感知することが知られている。また *vraFG* のみでなく *dlt* を制御し、菌体表層チャージを変化させる。本実験で用いた Class I, IIc および IId バクテリオシンは何れも陽性に帯電している。

質問 1 7) MRSA 耐性機構と TCS による機構の相違点は？

(回答) メチシリン耐性は PBP2' によるものであり、今回同定した TCS は ABC トランスポーターを介した耐性機構である。

質問 1 8) 将来的な臨床応用としてはどういったものが想定されるか？

(回答) バクテリオシン産生菌を用いた特定の病原性細菌の定着阻害、または TCS をブロックすることによる定着阻害等が考えられる。

質問 19) ABC トランスポーター *bceAB* 遺伝子破壊株においてオキサシリンの感受性が高くなっているが、どう考えるか？

(回答) 再現性をもってオキサシリン感受性の変化が認められた。ABC トランスポーターが細胞壁合成系に関与するかは現時点では不明である。

質問 20) バシトラシン感受性試験で、Population 解析と微量液体培地希釈法の違いは何か？

(回答) Population 解析と微量液体培地希釈法では播種した菌数が異なる。Population 解析では  $10^9$  個の黄色ブドウ球菌を播種するため、耐性パターンをより詳細に検討できる。

質問 21) Population 解析におけるヘテロ耐性とはどのようなことをいうか？

(回答) ある濃度の抗菌剤において、一部は生存しているが、一部は死滅している、というように、抗菌剤に対して全ての菌が同じ挙動を示さない状態を示す。一方ホモ耐性では、全て同じ挙動を示す。

質問 22) 共培養試験において、コロニー採取において均一性はあるか？

(回答) 採取したコロニー数は必ずしも一定では無いが、全体の菌数における黄色ブドウ球菌の生存率を算定するため、影響は無い。

質問 23) Nukacin ISK-1 産生菌である *Staphylococcus warneri* とはどのような菌か？

(回答) *Staphylococcus* 属であり、主に皮膚に常在する。

質問 24) ApsRS によるチャージの変化とは具体的にどのようなものか？

(回答) 菌体表層の陰性の電荷を弱めることで、陽性抗菌物質を作用しにくくする。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。