

## 論 文 要 旨

### Expression of virulence factors in *Staphylococcus aureus* grown in serum

血清中における黄色ブドウ球菌の病原性因子  
発現性解析

大 貝 悠 一

#### 【序論および目的】

黄色ブドウ球菌は化膿性疾患、食中毒、肺炎、毒素性ショック症候群などを引き起こす病原性細菌である。黄色ブドウ球菌は溶血毒素や白血球殺滅毒素、腸管毒素、表皮剥奪毒素といった様々な毒素やプロテアーゼやリパーゼ、コアグララーゼなどの菌体外産生性酵素、宿主免疫力に対する抵抗性を示す表層因子など多種多様な病原性因子を保有することが報告されている。これまでに、黄色ブドウ球菌の病原性因子発現性解析は数多く行われてきているが、それらの多くは細菌用培地中で行われた解析である。しかしながら、黄色ブドウ球菌が宿主に感染した際の環境(生体中)と培地では成分が大きく異なることから、病原性因子の発現性も生体中と培地中では異なると考えられる。そこで、本研究では生体中成分の一つである血清を用いて、病原性因子の発現性を解析した。

#### 【材料および方法】

黄色ブドウ球菌 MW2 株を子牛血清(CS)及び細菌用培地 Tryptic soy broth (TSB)で培養し、代表的な病原性因子 27 遺伝子の発現量を定量性 PCR により解析した。一部の病原性因子においてはヒト及びウサギ血清による解析も行った。血清タンパクの黄色ブドウ球菌の病原性因子発現性への影響を解析するため、限外濾過膜を用い、50 kDa 以上の分子を含まない CS、3 kDa 以上の分子を含まない CS、ペプチド及び脂質を含まない CS 画分を作成し、病原性因子の発現性を解析した。黄色ブドウ球菌の病原性因子の発現性に及ぼす鉄の影響を解析するため、FeCl<sub>3</sub>を添加した CS 及び鉄非添加の合成培地(CDM)を用い病原性因子の発現性を解析した。CS からアフィニティークロマトグラフィーにより高純度のアルブミンを精製し、アルブミンを 20 mg/ml 含む CDM を作成し、病原性因子の発現性を解析した。一部の解析は、黄色ブドウ球菌の二成分制御系因子である *agrC* の欠損株を用いて行った。

#### 【結 果】

黄色ブドウ球菌 MW2 株の CS 培養により、病原性因子 27 遺伝子のうち 21 遺伝子の発現量が TSB 培養と比べ有意な増加を示した。特に溶血毒素(*hlgA*)や白血球殺滅毒素(*lukD*, *psmβ1*)、腸管毒素(*secA*)、プロテアーゼ(*splA*)、菌体表層因子 (*capG*, *icaA*, *clfA*)の発現量は TSB 培養と比べ 10 倍以上の増加を示した。黄色ブドウ球菌の病原性因子調節因子として機能する small RNA である RNAlII (*hld*)は 100 倍近い発現量増加を認めた。また、多くの鉄獲得性因子(*sirA*, *sbnF*, *isdD*)が 30 倍程度の発現量増加を認めた。これらの現象はヒト及びウサギ血清を用いた解析においても同様の結果が得られた。

黄色ブドウ球菌の病原性因子発現量増加に影響を及ぼす血清中因子の同定を行うため、50 kDa 以上の分子を除去した CS 画分、3 kDa 以上の分子を除去した CS 画分、ペプチド及び脂質を除去した CS 画分を作成し、培養実験を行った結果、病原性因子(RNAlII)の発現量はどの画分においても依然 CS 培

養と同様に TSB 培養より高い発現量を示した。

FeCl<sub>3</sub> を 300 μM 添加した CS を用いて病原性因子発現解析を行った結果、CS 培養において TSB 培養と比べ有意に発現量増加を示す 21 遺伝子のうち、19 遺伝子の発現量が未添加のものに比べ有意に減少した。しかしながら、3 μM の FeCl<sub>3</sub> 添加では、病原性因子の発現量減少は認められなかった。

黄色ブドウ球菌の CDM 培養は病原性因子 27 遺伝子のうち 22 遺伝子の発現量が TSB 培養と比べ有意な増加を示した。また、3 μM の FeCl<sub>3</sub> を添加した CDM 培養は、TSB 培養と比べ有意に発現量増加を示す 22 遺伝子のうち、20 遺伝子の発現量が未添加のものに比べ有意に減少した。

50 kDa 以下の分子を除去した CS 画分培養の場合、CDM と同様に 3 μM の FeCl<sub>3</sub> の添加により、病原性因子の発現量減少を示した。

CS より精製したアルブミンを血清中の濃度の半量(20mg/ml)添加した CDM を用い、3 μM の FeCl<sub>3</sub> を添加した際の RNAIII の発現量を解析した結果、3 μM の FeCl<sub>3</sub> 添加による発現抑制の障害が認められた。

黄色ブドウ球菌の二成分制御系因子の一つである *agrC* は、CS 及び CDM 培養により TSB 培養と比べ、発現量の増加を示した。他の二成分制御系因子の発現量に大きな変動は見られなかった。*agrC* 欠損株を用いた解析より、RNAIII, *psm*, *sec4* の CS 及び CDM 培養による発現量増加は抑制された。

#### 【結論及び考察】

本研究により、黄色ブドウ球菌 MW2 株は血清培養により、数多くの病原性因子及び鉄獲得性因子の発現量を増加させることが明らかとなった。黄色ブドウ球菌はタンパク成分や脂質を除去した CS で培養した場合でも、依然として高い病原性因子の発現性を示したことから、血清中の病原性因子発現促進因子は血清タンパクや脂質ではない可能性が示唆された。

血清中には遊離状態の鉄が極めて少ない(10<sup>-24</sup> M)ことに着目し、FeCl<sub>3</sub> を 300 μM 添加した CS による黄色ブドウ球菌の培養実験を行った結果、病原性因子の発現量が減少した。また、黄色ブドウ球菌の CDM 培養は CS 培養と似た遺伝子発現パターンを示した。これらの結果より、血清培養による黄色ブドウ球菌の病原性因子の発現量増加は、血清中の鉄欠乏が主要因であることが示唆された。

CDM 培養は 3 μM の FeCl<sub>3</sub> 添加により病原性因子の発現抑制を示すが、CS 培養の場合、3 μM の FeCl<sub>3</sub> 添加は発現抑制を引き起こさなかった。血清中に最も高濃度に存在するアルブミンは、鉄との結合能が報告されている。アルブミンを含む 50 kDa 以上の分子を除去した CS 画分による培養は、3 μM の FeCl<sub>3</sub> 添加により病原性因子の発現抑制を示した。また、アルブミンを含有する CDM 培養は、3 μM の FeCl<sub>3</sub> 添加による病原性因子の発現抑制を阻害した。これらの結果より、アルブミンが黄色ブドウ球菌の血清中における鉄獲得を阻害する可能性が示唆された。

二成分制御系因子は外環境の変化に応答し、様々な遺伝子の発現制御を行う因子である。黄色ブドウ球菌の二成分制御系因子の一つである AgrAC は、病原性因子の主要なレギュレーターであることが報告されている。*agrC* は血清培養で発現量の増加を示し、*agrC* 欠損株は一部の病原性因子の血清培養による発現量増加を示さないことから、黄色ブドウ球菌の血清中における病原性因子発現調節の一部に AgrAC が関与することが示唆された。

以上の結果により、黄色ブドウ球菌は血中において増殖に必要な鉄を獲得するために、溶血毒素や白血球殺滅毒素などの細胞溶解因子と鉄獲得性因子の産生量を増加させることにより、宿主細胞から鉄を獲得することが示唆された。一方宿主側は、血中に溶出した鉄をアルブミンと結合させることにより、細菌の鉄獲得を防いでいることが示唆された。

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 154号	学位申請者	大貝 悠一
審査委員	主査	於保 孝彦	学位 博士 (医学・ <span style="border: 1px solid black;">歯学</span> ・学術)
	副査	原田 秀逸	副査 松口 徹也
	副査	中村 典史	副査 佐藤 友昭

### Expression of virulence factors in *Staphylococcus aureus* grown in serum

(血清中における黄色ブドウ球菌の病原性因子発現性解析)

黄色ブドウ球菌は化膿性疾患、食中毒、肺炎などを引き起こす病原性細菌であり多種多様な病原性因子を保有することが報告されている。黄色ブドウ球菌の病原性因子発現性解析はこれまでに数多く報告されているが、その大部分は一般的な細菌用培地で行われた解析であり、生体中における病原性因子の発現性には不明な点が多く残されている。そこで学位申請者は、生体成分の一つである血清を用いた培養実験により、黄色ブドウ球菌の溶血毒素や腸管毒素に代表される 27 の病原性因子の発現性解析を行い、病原性因子発現促進に影響する血清中因子の同定を試みた。次に、血清中において病原性因子の発現調節に関与する転写調節因子同定のため、二成分制御系因子の欠損株を用いた解析を行った。さらに、黄色ブドウ球菌の鉄獲得を阻害する血清中因子の同定を行った。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

1. 黄色ブドウ球菌の子牛血清培養において、一般的な細菌用増殖培地(TSB)培養と比べ、病原性因子 27 遺伝子のうち 21 遺伝子の発現量が有意な増加を示した。
2. 血清中における黄色ブドウ球菌の病原性因子発現促進の多くは、鉄添加により抑制された。また鉄欠乏性の合成培地による解析により、血清と同様に多くの病原性因子の発現促進が認められた。以上の結果より、血清中の鉄欠乏が病原性因子の発現性促進に影響することが明らかとなった。
3. 黄色ブドウ球菌の二成分制御系因子 Agr は、血清中において一部の病原性因子(RNAIII, *psm*, *sec4*)の発現調節を行うことが明らかとなった。
4. 血清アルブミンが血清中に遊離した鉄と結合することにより、黄色ブドウ球菌の鉄獲得を阻害することが明らかとなった。

黄色ブドウ球菌の病原性因子発現性は血清中において著しく上昇することが本研究により明らかとなった。この現象は鉄を過剰量添加することにより抑制されることから、黄色ブドウ球菌は鉄欠乏性の血中において、鉄獲得を行うために、赤血球を病原性因子の発現性を高めることにより破壊し遊離した鉄を獲得し増殖していることが示唆された。一方宿主側は、遊離した鉄をアルブミンに吸着させることにより、細菌の鉄獲得を阻害することが示唆された。

本研究は、敗血症の起炎菌でもある黄色ブドウ球菌の血中における病原性を明らかにしたものであり、黄色ブドウ球菌の鉄獲得が病原性因子の発現性と密接に関与する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 154 号	学位申請者	大貝 悠一
審査委員	主査	於保 孝彦	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	原田 秀逸	副査 松口 徹也
	副査	中村 典史	副査 佐藤 友昭
<p>主査および副査の5名は、平成23年11月15日、学位申請者 大貝 悠一 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) 鉄欠乏性培地培養において、なぜ黄色ブドウ球菌は増殖できるのか？ (回答) 前培養は鉄を含む培地を用いているため、菌体内に貯蔵されている鉄を利用しているためと 考えられる。</p> <p>質問2) 黄色ブドウ球菌の病原性因子発現性上昇に関与する金属イオンは鉄だけか？ (回答) マグネシウム、カルシウムなど他の因子も検討したが、病原性因子の発現性には大きく影響 しなかった。</p> <p>質問3) 黄色ブドウ球菌の血清培養実験は、実際にはどのような状況を想定した解析なのか？ (回答) 黄色ブドウ球菌は敗血症の起炎菌として知られているため、外科手術等により本菌が血中に 感染した際を想定している。</p> <p>質問4) 黄色ブドウ球菌の病原性低下を目的とした血中への鉄添加は臨床応用が可能か？ (回答) 過剰な遊離鉄は人体にとって有害であるため、単純な臨床応用は難しいと考える。</p> <p>質問5) small RNA の一つである RNAIII が血清中で発現量を高めていたが、具体的にはどのような働 きをするのか？ (回答) 溶血毒素である <math>\alpha</math> 毒素の翻訳促進、抗体結合タンパクであるプロテインAの転写及び翻訳阻 害を行うことが報告されている。</p> <p>質問6) 本研究で用いている血清は非働化しているのか？ (回答) 非働化した血清を用いて解析した。非働化していない血清を用いても結果に大きな違いがな いことは確認している。</p> <p>質問7) 培地と血清培養において病原性因子の発現性の違いに鉄濃度が関与することは、本研究で初 めて明らかにされたのか？ (回答) 鉄濃度が病原性細菌の病原性因子の発現性に関与することは、いくつか知られている。血清 培養と培地培養における黄色ブドウ球菌の病原性因子発現性解析は本研究が2例目であるが、鉄濃度 と病原性因子発現性を関連づけた報告は初めてである。</p> <p>質問8) 黄色ブドウ球菌の病原性因子発現性と鉄獲得の関与について今後の研究展望はあるか？ (回答) 鉄獲得因子の発現調節因子である Fur による病原性因子発現調節機構の解明を行う。また、 トランスポゾンを用いたランダム突然変異体作製により、鉄欠乏性環境において病原性因子の発現性 を増加させない変異株の解析を行う予定である。</p>			

## 最終試験の結果の要旨

質問 9) ウサギ血清を用いた解析において、病原性因子の発現量がヒト血清のものに比べ少ないのはなぜか？

(回答) 詳細は不明であるが、ウサギ血清には鉄が混入していた可能性がある。血清中の鉄濃度の測定を行うべきであったと考える。

質問 10) 血清培養においてプロテインAの発現量のみが培地培養と比べ減少を示したのはなぜか？

(回答) プロテインAの発現抑制因子である RNAIII の発現量が血清培養で著しく上昇したためであると考えられる。

質問 11) 臨床分離株を用いた解析において、一株だけ病原性因子の発現パターンが違うのはなぜか？

(回答) 異なる発現パターンを示した株は皮膚疾患由来の株であり、その他は敗血症由来の株である。感染部位により病原性因子発現パターンが異なる可能性はあるが、解析数が少ないので現時点で理由は不明である。

質問 12) キレックス (2 価金属イオン除去担体) 処理により鉄を除いた培地による解析において、いくつか病原性因子の発現量が未処理の培地と比べ落ちているがこれはなぜか？

(回答) キレックス処理により鉄以外の 2 価の金属イオンも除去されるため、鉄以外の金属イオンが欠乏することによる影響が出た可能性が考えられる。

質問 13) 本実験は 3 価鉄で行った実験であるが 2 価鉄ではどうか？

(回答) 2 価鉄添加においても、3 価鉄添加と同様の傾向が認められた。遊離状態の 2 価鉄は、血清への添加後、速やかに 3 価鉄に変換されると考えられる。

質問 14) 血清中ではなく皮膚上の黄色ブドウ球菌はどのように鉄を獲得するのか？

(回答) 詳細は不明であるが、皮膚上での黄色ブドウ球菌は増殖より定着する方向での遺伝子発現を行うことが予想される、血中よりは鉄を必要としないと考えられる。

質問 15) 鉄添加により病原性因子の発現性が抑制されるのはなぜか、詳細なメカニズムは？

(回答) 鉄過剰環境において鉄獲得遺伝子の発現を抑制する Fur ファミリーの転写調節因子が病原性因子の発現調節にも関与する可能性が考えられる。

質問 16) 本研究により示された現象は黄色ブドウ球菌特異的なのか？

(回答) 他菌による血清中の病原性因子発現性解析の報告はない。しかしながら、鉄濃度依存的に病原性因子の発現性を変化する報告例は他菌においてもなされているため、血清培養において同様の傾向を示す他菌の存在は十分に考えられる。

質問 17) 鉄欠乏条件の血清中でも、鉄を含む培地とほぼ同様の増殖を示すのはなぜか？

(回答) 前培養は鉄を含む培地を用いているため、菌体内に貯蔵されている鉄を利用し、血清中においても培地同様に増殖できていると考えられる。

質問 18) 黄色ブドウ球菌はアルブミンやトランスフェリンから鉄を獲得できるのか？

(回答) トランスフェリン結合タンパクの存在が黄色ブドウ球菌において報告されていることから、トランスフェリン結合鉄は利用できるのではないかと考えている。アルブミンにおいては今回の結果から、アルブミン結合鉄の利用は困難であると考えられる。

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。