

【要約】

Reversible silencing of quorum sensing in  
*Staphylococcus aureus* accelerates its environmental  
adaptation in hospital

(黄色ブドウ球菌はクオラムセンシングを可逆的に  
発現抑制することで病院環境に適応する)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：松江 弘之 教授)

山崎 由里子

## 【序論】

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）は病原性が高いだけでなく、頻繁にアウトブレイクを起こすために世界中で問題となっている病原菌である。古典的に MRSA は市中感染型と院内感染型の2つに分類されている。市中感染型 MRSA は健康な人における皮膚軟部組織感染症の原因菌として最も多く検出されている。一方で院内感染型 MRSA は抗生剤多剤耐性を持ち、免疫抑制患者に感染して時に致死的な感染症を引き起こす。MRSA のアウトブレイクを制御するためには、菌のどのような特性が環境適応を可能にしているのかを知ることが不可欠である。

MRSA の毒素産生中心機構の一つとして accessory gene regulator (Agr)が知られている。ブドウ球菌は恒常的に auto-inducing peptide (AIP)を分泌しており、環境中の細胞密度が高まり AIP 濃度が細胞膜受容体の閾値を超えると、Agr オペロンが活性化されてその下流にある様々な病原因子が発現される。したがって Agr は菌の生息密度を感知するシステム、すなわちクオラムセンシングとして機能している。市中感染型 MRSA は Agr 下流の病原因子を発現して健康人に感染するのに対して、院内感染型 MRSA ではしばしば Agr の欠損が知られている。しかし Agr 欠損と MRSA の院内感染との関連性は未だわかっていない。また、MRSA はヒトの様々な臓器に感染を起こしうるが、酸素濃度が異なる様々な環境において Agr 発現がどのように影響されるのかはわかっていない。

## 【目的】

MRSA が院内で蔓延するために有利な遺伝子型、表現型を解析する。

## 【方法】

単施設の新生児集中治療室(neonatal intensive care unit: NICU)において検出された MRSA を2年間追跡し、全ゲノム解析によりアウトブレイク系統を同定した。本系統の表

現型を、Agr 発現、抗生剤感受性、抗生剤寛容性の観点で解析した。トランスクリプトーム解析により Agr 発現の有無で影響される遺伝子を検討した。アウトブレイク株をプラスミドで形質転換し、外来遺伝子の取り込み能力（コンピテンシー）を解析した。

## 【結果】

NICU に在室する新生児に対して咽頭および糞便中の MRSA を毎週スクリーニングするとともに、MRSA 感染症を起こした症例のサンプルも収集した。2 年程度の観察期間において MRSA は 35 名の患者より検出された。検出株を時系列順に CN01-35 とし、そのうち 21 株を代表株として解析した。全ゲノム解析に基づいて MRSA のジェノタイプを行ったところ、18 株が ST1-SCC*medV*-AgrIII と分類された。これらは系統樹において遺伝学的に近縁であることから、同一クローンから派生した単一系統であると同定された（アウトブレイク系統）。本系統のオリジナル株は幅広い抗生剤に感受性を示していたが、調査期間の後期で検出された CN33 はゲンタマイシン耐性を獲得していた。アウトブレイク系統ではない CN12 も CN33 と同一のトランスポゾン形式でゲンタマイシン耐性を有していたことから、両株間における耐性遺伝子の水平伝播を疑った。

様々な環境におけるアウトブレイク系統の Agr 発現を見るために酸素条件を変えて培養し、*RNAIII* の定量 PCR により Agr 発現を評価した。オリジナル株は Agr が陽性だったが、2 株は機能喪失変異により Agr が欠損していた。系統のうちいくつかの株は、高酸素条件では Agr 陽性だが低酸素では Agr をサイレンスしていることが判明した。これらの細胞密度に依存しない表現型を持った株を、環境適応型 MRSA と命名した。

一般に細菌はストレス環境下において、休眠状態となることで抗生剤寛容になることが知られている。アウトブレイク株にバンコマイシンを投与したところ、Agr をサイレンスしている株では抗生剤寛容性が上がるということがわかった。したがって環境適応型 MRSA は

Agr をサイレンスすることで抗生剤寛容となり、院内環境適応に有利だった可能性が示唆された。

トランスクリプトーム解析では、Agr の有無によりファージ遺伝子や、制限修飾系の遺伝子、遺伝子修復に関わる遺伝子の発現が影響されていることがわかった。これらは遺伝子の水平伝播に関わる遺伝子であることから、Agr 発現が遺伝子の水平伝播に関わっている可能性が示唆された。アウトブレイク系統の代表株ゲノムを比較したところ、Agr をサイレンスする環境適応型においてのみ、外来遺伝子がゲノム上に取り込まれていることがわかった。また、プラスミドにより MRSA の形質転換を行ったところ、Agr サイレンスにより外来遺伝子取り込み率が上がることがわかった。

#### 【考察】

NICU に在室する新生児は免疫不全状態にあることが多く、MRSA 感染症が時に致死的となることがある。院内で一度アウトブレイクが起これば、消毒や抗生剤使用といった従来の対策では拡大を防ぎきれないことが多く、アウトブレイクを制御する有効策を確立するためには、菌の特性を理解することが必要である。

本研究では MRSA が進化の過程で Agr をサイレンスし、それによって抗生剤寛容性とコンピテンシーを獲得していることが *in vitro* で示された。これらの性質により細菌は抗生剤環境下において生き延びつつ有利な遺伝子を獲得することができるようになり、その結果として、アウトブレイク系統は 2 年以上に渡って NICU に蔓延し、実際に抗生剤耐性遺伝子を獲得していた。Agr 発現は MRSA が健康人へ感染したり皮膚へ生着したりするためには必要不可欠と報告されている。一方で、院内で検出される MRSA ではしばしば Agr 欠損が見られることから、常在菌叢が健康人と異なる免疫抑制状態の患者においては、Agr 発現は必須でないとは推定される。本研究でわかったのは、むしろ Agr を発現しない方が、抗生剤や消毒薬といった様々な環境ストレス下において生存し進化するためには有利であるとい

うことである。本研究では Agr 完全欠損株も 2 株同定されたが、それらは進化の過程で絶滅しており、2 年にわたる追跡で後半に検出され続けていたのは環境適応型 MRSA であった。従って、Agr が完全欠損している株よりも、環境に合わせて時には病原性を発揮し、一方では抗生剤寛容かつコンピテンシーをあげることができる株の方が、院内環境には有利であったと考えられる。

#### 【結語】

MRSA は進化の過程で Agr の可塑性を獲得していた。Agr 発現時には病原性を発揮する一方で、Agr サイレンス時には抗生剤寛容性、コンピテンシーを上げて最終的に環境適応に有利な耐性遺伝子を獲得していた。