

博士学位論文

「*Staphylococcus aureus* N315 株を用いた Daptomycin 低感受性因子
MprF の機能解析及び低感受性機序の解析」

2019 年度

北里大学 大学院 医療系研究科

環境医科学群 環境微生物学

川田 逸人

指導教授 北里 英郎

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、
得られた事実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことを宣言する

要旨

背景・目的

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) に対する抗菌薬である Daptomycin (DAP) は、生体内の Ca^{2+} 依存的に陽性荷電の膜貫通型ミセルを形成し、菌体膜電位を利用して細胞膜を障害することで殺菌する。DAP は一般的に耐性菌が生じにくい抗菌薬として知られているが、近年の使用増加に伴い、DAP に低感受性を示す MRSA が散見されている。DAP 低感受性の原因の1つとして multiple peptide resistant factor (MprF) に生じる変異が挙げられる。*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) の細胞膜は phosphatidylglycerol (PG)、lysyl-PG (L-PG) 及び cardiolipin (CL) にて構成される。MprF は本来、細胞膜の PG に陽性荷電物質であるリジンを付加し、L-PG を合成する機能と L-PG を脂質二重層の外側に転移することで膜電位を維持している。しかしながら、MprF に遺伝子変異が生じると細胞膜の荷電が変化し、DAP を電氣的に反発することで、結果として DAP に対する感受性が低下すると考えられている。一方、他の機序として MprF 変異によって細胞膜の流動性が変化し、結果的に細胞膜上でミセルを形成できなくなるために DAP の感受性が低下するとの報告もある。実際、解析に用いられる菌株の違いによってもフェノタイプが異なるこ

とから DAP 低感受性機序については一定のコンセンサスが得られていない。株によってフェノタイプが異なる原因が菌株間の臨床的背景の違いにあると考え、DAP 低感受性 MRSA から検出された *mprF* 変異を、MRSA の標準株である *S. aureus* N315 株に導入し、DAP 低感受性メカニズムについて解析を行った。

方法

臨床検体から分離された MRSA 4 株を用いて薬剤感受性及び MprF のシーケンス解析を行った。次いで、*S. aureus* N315 株に対し、pIMAY を用いて MprF 変異を導入した。また、ネガティブコントロールとして同方法によって MprF 欠損株を作製した。作製した各菌株の薬剤感受性については微量液体希釈法にて評価し、菌体表面の膜電位を cytochrome C 吸着率から算出した。さらに、MprF 変異による細胞膜への影響を調べるため細胞膜の組成について薄層クロマトグラフィー (thin-layer chromatography: TLC) を用いて解析した。加えて、細胞膜の流動性について Laurdan を用いて細胞膜を染色することで評価した。なお、これらの実験は、同様の遺伝子導入法によって樹立した *S. aureus* N315 MprF-WT 株を用いて比較検討した。

結果及び考察

MRSA 4 株の臨床分離株を解析したところ、3 株で DAP 感受性が低下しており、うち 2 株については MprF に変異が認められた (MprF (T345I)、MprF (L341S))。これらの変異を導入した *S. aureus* N315 株および当研究室の先行研究にて樹立した MprF (T345P) 株における細胞膜の荷電を評価した。その結果、細胞膜電位が、MprF 変異株では有意に陽性へ推移しており、MprF 欠損株では有意に陰性へ推移していた。しかし、TLC にて L-PG について解析したところ、細胞膜における総 L-PG 量に有意な変化はなかったが、細胞膜外膜の L-PG 量が有意に減少しており、膜電位の変化と MprF 変異との間に相関は認められなかった。一方で、CL について解析したところ MprF 変異株では CL が有意に減少しており、MprF 欠損株では CL が有意に増加していることが明らかになった。さらに細胞膜の流動性を評価したところ、T345P 株で流動性が有意に上昇しており、T345I 株でも同様の傾向が見られた。一方、L341S 株と欠損株では細胞膜の流動性が有意に低下していることが明らかになった。これらの結果より、MprF 変異によって CL の含有率の低下による流動性の亢進によって DAP 低感受性を獲得することが示唆された。同時に、この機序は各 MprF 変異のサイトによっても異なることが明らかになった。CL が細胞膜の構造維持や膜タンパクの機能に関与すること

が知られているが、DAP 低感受性機序の詳細を解明するためには更なる解析も必要と考える。

Abstract

Background

Daptomycin (DAP) has been used as one of the anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) drug. DAP forms positively charged transmembrane micelle in Ca^{2+} -dependent manner and sterilized by damaging bacterial membrane. Recently, DAP non-susceptible MRSA was reported associated with increasing usage frequency. It was reported that the causative gene of DAP is multiple peptide resistant factor (MprF). In the general, the cell membrane of *Staphylococcus aureus* is constituted by major components, phosphatidylglycerol (PG), lysyl-PG (L-PG) and cardiolipin (CL). MprF maintains the electric charge of cell membrane by synthesis of L-PG from PG and lysine and translocates L-PG from inner membrane to outer membrane. The mechanism of DAP non-susceptibility (DAP-NS) is considered that DAP is electrically repelled by positive charge of cell membrane that increased by mutated MprF. On the other hands, it was also reported that DAP dose not from by increasing the membrane fluidity. However, the detail mechanism of DAP-NS has not been fully clarified yet,

since these previous studies have been used clinically isolated MRSA strains that have various clinical backgrounds. In this study, I analyzed DAP-NS mechanisms using stable laboratory strain, *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) N315, without clinical background.

Material and method

Drug susceptibility and sequence of *mprF* and *dltAB* was analyzed in clinically isolated four MRSA. MprF mutation was introduced using pIMAY into *S. aureus* N315 and MprF defected strain (MprF-Null) was also generated as a negative control. In these strains, drug susceptibility and electric charge of cell membrane were evaluated using microdilution method and cytochrome *C* binding assay, respectively. In addition, the composition and fluidity of bacterial membrane were analyzed by thin-layer chromatography and laurdan staining, respectively.

Results and discussion

Drug susceptibility test revealed that three of four MRSA were

DAP-NS, and *mprF* was mutated in two strains (*MprF* (T345I) and *MprF* (L341S)) but no mutation was detected in *dltAB*. Then these mutations were genetically introduced into *S. aureus* N315, and it was confirmed that the drug susceptibility to DAP was decreased in those *MprF* mutated strains. Next, in order to elucidate the mechanism of DAP-NS, the positive charge of cell membrane of the four strains in addition to *MprF* (T345P), which has been generated in our previous study, was measured using cytochrome *C* binding assay. As a result, the positive charge was significantly increased in all *MprF* mutated strains that was tested in this study. Then the population of L-PG to total PG and localization of L-PG have been analyzed using TLC. The population of L-PG to total PG was not changed, while the localization of L-PG into outer membrane was decreased in outer membrane. In addition, CL, known as a lipid involving maintaining cell membrane structure, was also evaluated. Interestingly, the population of CL to total PG was significantly decreased in all *MprF* mutated strains but increased in *MprF*-Null strain, respectively. In addition, fluidity of cell membrane of *MprF* (T345P) was significantly increased and same tendency was observed

in MprF (T345I), while it was decreased in MprF (L341S). In contrast, the fluidity was significantly decreased in both MprF (L341S) and MprF-Null. Taken together, these results strongly suggested that CL alteration induced MprF (T345I) and MprF (T345P) is deeply contributed to DAP-NS. However, CL function has not fully clarified in bacteria, and it is considered that the mechanism is different depending on the type of mutation. In this study, I could not clarify the detail of mechanism in MprF (L341S). I consider that the detail of the mechanism of DAP-NS in MprF (L341S) strains remains to be studied.

目次

1. 略語	01
2. 序論	03
3. 材料と方法	06
3-1. 使用菌株	
3-2. POT kit による核型解析	
3-3. 最小発育阻止濃度の測定	
3-4. シークエンス解析	
3-5. <i>S. aureus</i> N315 コンピテントセルの作成	
3-6. <i>S. aureus</i> N315 株における MprF 変異株及び MprF 欠損株の作成	
3-7. Cytochrome <i>C</i> binding assay	
3-8. 薄層クロマトグラフィー	
3-9. L-PG の細胞内分布の解析	
3-10. 細胞膜の流動性解析	
4. 結果	14
4-1. 臨床分離株の解析	
4-2. 遺伝子導入株における薬剤感受性の評価	
4-3. 遺伝子導入株における細胞膜荷電の評価	
4-4. 細胞膜における L-PG の定量的解析	
4-5. CL の定量及び細胞膜の流動性解析	
5. 考察	18
6. 総括	23
7. 謝辞	26
8. 引用文献	27
9. 業績目録	37
9-1. 論文業績	
9-2. 学会発表	

10. 図表	-----	41
--------	-------	----

1. 略語

ABK	arbekacin
ABPC	ampicillin
ATc	anhydrotetracycline
CL	cardiolipin
Cls	cardiolipin synthase
Cm	chloramphenicol
DAP	daptomycin
DAP-NS	daptomycin non-susceptibility
DMF	N, N-dimethylformamide
GP	generalized polarization
L-PG	lysyl-phosphatidylglycerol
MALDI-TOF-MS	matrix assisted laser desorption/ionization time-of flight mass
MIC	minimum inhibitory concentration
MRSA	methicillin-resistant Staphylococcus aureus
MOPS	3-(N-morpholion)propansulfonic
MprF	multiple peptide resistant factor
OD	optical density
PBP	penicillin binding protein
PG	phosphatidylglycerol

POT	PCR based open reading frame typing
<i>S. aureus</i>	Staphylococcus aureus
TEIC	teicoplanin
TLC	thin-layer chromatography
TSA	tryptic soy agar
TSB	tryptic soy broth
VCM	vancomycin

2. 序論

メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) は院内感染において最も重要な原因菌の一つで、抗菌薬開発や感染制御の概念が発展した現代においても、そのコントロールは未だに問題である [1]。MRSA は β -ラクタム系抗菌薬全般に対して幅広く耐性を獲得しており、治療に使用できる抗菌薬も大きく制限される。加えて、近年、MRSA に対する抗菌薬にさえ耐性を獲得した MRSA の存在が報告されている [2]。また、近年では院内感染型 MRSA のみでなく、院内感染のリスクを有さない小児や若年者が感染する市中感染型 MRSA や畜産や獣医など動物を介して感染する家畜関連 MRSA などが感染の場を広げるようになってきており [3-6]、MRSA を含めた薬剤耐性菌に対する世界的規模の対策が WHO によって提唱されている。

ダプトマイシン (daptomycin: DAP) は、環状リポペプチド系薬に分類される抗菌薬で、 Ca^{2+} 依存的に陽性荷電の膜貫通型ミセル形成により、細胞膜を障害し、細胞膜の脱分極を引き起こすことで殺菌作用を示す抗菌薬である [7-10]。DAP は 2003 年アメリカ食品医薬品局にて皮膚軟部組織感染症の治療薬として認可され、次いで 2006 年に右心系心内膜炎の治療薬として認可された [11]。現在

では、抗菌活性が早いことや、殺菌の際にタイコ酸などの発熱物質を放出しないなどの理由から敗血症などの急性感染症にも使用されている。さらに、菌が静菌状態の症例やバイオフィルムを形成している症例にも有効であることが示され、皮膚軟部組織感染症やインプラント挿入が起因する感染症に対しても使用されている [12-15]。一般的には、耐性菌が生じにくい抗菌薬として知られているが、近年の使用頻度増加に伴って DAP 低感受性 (DAP non-susceptibility: DAP-NS) MRSA が散見されるようになってきた。

DAP-NS の原因は菌体の膜タンパク質である multiple peptide resistant factor (MprF) の遺伝子変異と考えられている [16]。 *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) の細胞膜は、phosphatidylglycerol (PG)、lysyl-PG (L-PG) および cardiolipin (CL) によって構成されている [17]。MprF は、PG に陽性荷電物質であるリジンを付加し、L-PG の合成機能と、合成した L-PG を細胞膜の内側から外側に転移する転移機能を有するタンパク質であり、細胞膜の外膜に存在する L-PG 量を調整することで菌体膜電位の維持に関与している [18]。DAP は細胞膜の荷電を利用して菌体を殺菌することから、MprF 遺伝子に生じた変異によって機能が亢進し、細胞膜の荷電が陽性に推移した結果、DAP を電氣的に反発することで薬剤に対す

る感受性が低下すると考えられている [19]。しかし、DAP-NS MRSA の全ゲノム解析が行われたことで、DltAB など他の細胞表面構造を合成するタンパク質も DAP-NS に関与している可能性も示唆されている。加えて DAP-NS メカニズムに関しては、細胞壁の肥厚や細胞膜の流動性が変化するなど多様なフェノタイプも検出されており、十分なコンセンサスは得られていないのが現状である [20, 21]。

これらの理由として、臨床株の場合、患者背景や投薬背景によって生体内ですでに選択圧を受けていると考えられる。特に、生体内で分泌される抗菌ペプチドの中には、DAP と同様に菌体の膜電位を利用して殺菌するものがあり、これまでに DAP と抗菌ペプチドの交差耐性が報告されている [22]。したがって、DAP-NS メカニズムの詳細を明らかにするためには臨床的背景を除いた条件による解析が必要である。そこで本研究は、北里大学病院及びその関連病院にて分離された臨床分離株の解析によって検出された変異を、全ゲノム解析が終了している MRSA の標準株である *S. aureus* N315 株に導入し、遺伝子導入株におけるフェノタイプを比較解析することで DAP-NS メカニズムの解明を試みた。

3. 材料と方法

3-1. 使用菌株

花木 秀明 先生（北里大学生命科学研究所感染制御研究センター）より譲渡いただいた化膿性膝関節炎患者より分離された MRSA 4 株（S1、S2、S3 及び S4）を用いて解析を行った。本症例はメロペネム、DAP、バンコマイシン（vancomycin: VCM）、テイコプラニン（teicoplanin: TEIC）にて治療が行われており、治療時に採取された血液検体、関節液検体から分離されたものを用いた。また、すべての株については matrix assisted laser desorption/ ionization time-of-flight mass (MALDI-TOF-MS)を用いることにより *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) と同定した。

DAP の薬剤感受性試験における精度管理株としては、*S. aureus* ATCC29213 株を用いた。遺伝子導入のレシピエント及びシークエンスにおけるノーマルコントロールとして片山 由紀 先生（順天堂大学医学部微生物学講座）より譲渡いただいた *S. aureus* N315 株を使用した [23]。さらに当研究室の先行研究で同定した MprF (T345P) 変異を導入した *S. aureus* N315 MprF (T345P) 株も用いた [24]。

3-2. PCR-based open reading frame typing (POT) kit による核型解析

MRSA の核型解析は CicaGeneus Staph POT kit (Kanto Chemical, Tokyo, Japan) を用いて解析した。

3-3. 最小発育阻止濃度 (minimum inhibitory concentration: MIC) の測定

MIC はドライプレート (Eiken Kemical, Tokyo, Japan) による微量液体希釈法によって測定した。

3-4. シークエンス解析

MRSA 4 株における *mprF* 及び *dltAB* のシークエンスを当研究室にて以前に報告した下記のプロトコルに従って行った [24]。トリプトソイ寒天培地 (tryptic soy agar: TSA) (Eiken Chemical) にて前培養した菌株を、Lysis buffer [20 µg/ml lysostaphin (Sigma, MO, USA), 1 kU/ml achromopeptidase (Sigma)] にて DNA を抽出した。これを TaKaRa Taq HS perfect MIX (TaKaRa, Shiga, Japan) による PCR にて増幅し、増幅産物を Exo-SAP-IT (Affymetrix, CA, USA) にて処理した。なお、目的遺伝子の増幅は 1% アガロースによる電気泳動にて確認した。最終的に得

られたサンプルと MprF、DltAB の特異的プライマーを調合し、シーケンス解析を Eurofins Genomics (Tokyo, Japan) に依頼した。使用したプライマーは表 1 に示した。得られたシーケンスデータは DNA 編集ソフト ApE を使用して解析を行った。

3-5. *S. aureus* N315 コンピテントセルの作成

S. aureus N315 株を 2 ml の B2 broth で 28°C にて一晩培養し、200 ml に希釈した上で、さらに吸光度 (optical density: OD)_{590nm} = 0.4 ~ 0.6 になるまで培養した。菌液を氷にて急激に冷却することで菌の発育を停止させ、あらかじめ氷中にて冷却した滅菌水にて 3 回洗浄し、10% グリセロール含有滅菌水にて懸濁した。その後、12000 rpm にて 5 分間遠心し、2 ml の 10% グリセロール含有滅菌水に懸濁した。これを 0.2 µl tube に 100 µm ずつ分注し、アセトン/ドライアイスにて急速冷凍した。

3-6. *S. aureus* N315 株における MprF 変異株及び MprF 欠損株の作成

遺伝子導入には Dr. Timothy J. Foster (Trinity College, Dublin, Ireland) より譲渡

いただいた pIMAY ベクターを用い、Schneewind らによって報告された *S. aureus* に対する遺伝子導入方法を用いた [25]。 *S. aureus* N315 株の *mprF* をクローニングし、pIMAY ベクターの multi-cloning sight に挿入することで pIMAY-*mprF*-wt を作製した。次に PrimerSTAR® Mutagenesis Basal kit (TaKaRa) を用いて pIMAY-*mprF*-wt 内に T345I 変異及び L341S 変異を挿入した。なお、方法はキット付属のマニュアルに準じ、作成したベクターをそれぞれ pIMAY-*mprF*(T345I) および pIMAY-*mprF* (L341S) と定義した。また、*mprF* 欠損株を作製するために、MprF の前後 500 bp を In-Fusion HD Cloning kit (TaKaRa) にて結合し、multi-cloning sight に挿入した pIMAY-*mprF*-null を作製した。これら作成したベクターを *E. coli* JM109 にて増幅し、回収したベクターをエレクトロポレーション [25 μ F, 2.5 μ V, 100 Ω] にて導入した。得られた菌株を 10 μ g/ml クロラムフェニコール (chloramphenicol: Cm) 含有 TSA にて 28°C、48 時間培養した。これを TSB に懸濁し、Cm 含有 TSA にプレーティングしたのち、39°C にて一晩培養した。得られたコロニーを生理食塩水に懸濁し、pIMAY detection primer 1, 2 (表 1) にて PCR を行うことで染色体内への組み込みを確認した。また、同時に pIMAY detection primer 2, 3 (表 1) で PCR を行うことでベクターが菌体内に残存してい

ないことを確認した。得られた菌株をトリプトソイ液体培地 (tryptic soy broth: TSB) にて 28°C で一晩培養したのち、Cm 含有 TSA 及びアンヒドロテトラサイクリン (anhydrotetracycline: ATc) 含有 TSA に分離し、37°C にて一晩培養した。ATc 含有 TSA にのみ発育した菌株をシーケンス解析することで MprF の変異及び欠損が導入されている菌株を選択した。なお、作製の過程で菌株の薬剤感受性が変動する可能性があるため、コントロール株についても同様の手技にて野生型の MprF を導入した株を用いた (以下 MprF-WT とする)。

3-7. Cytochrome C binding assay

Cytochrome C binding assay は Yang らによって報告された方法を一部改変して行った [26-28]。各菌株を TSB にて対数増殖期 (*S. aureus* N315 株の場合 6 時間) まで培養し、遠心にて集菌した。得られた菌体を 3-モルホリノプロパンスルホン酸 (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid: MOPS) バッファー [20 mM, pH 7.0] にて 3 回洗浄し、集菌後同バッファーにて $OD_{590nm} = 1.00 \pm 0.02$ になるよう懸濁した。これを 8000 rpm にて 20 分間遠心し、得られたペレットを 250 μ l の MOPS バッファーにて再懸濁した。ここに終濃度が 0.5 mg/ml となるようにウシ心臓由

来 cytochrome C (SIGMA)を添加し、室温にて 20 分間静置した。反応後、14000 rpm
にて 20 分遠心し、上清を 0.2 μ m フィルターにて処理し、OD_{530nm}にて上清中の
cytochrome C を測定した。0.5 mg/ml cytochrome C 溶液を 100% とし、cytochrome
C の残存率を算出した。

3-8. 薄層クロマトグラフィー (thin-layer chromatography: TLC)

各菌株を 200 ml の TSB にて 37°C で 6 時間培養し、氷冷によって発育を停止さ
せた。8000 rpm、20 分間の遠心にて集菌し、20 mM の酢酸バッファーにて洗浄
した。洗浄後、得られたペレットを 10 ml 滅菌イオン交換水にて懸濁し、
Bleigh-Dyer 法にてリン脂質を抽出した。得られたサンプルを TLC にて解析した。
TLC のシリカゲルプレートは Silica 60 F254 HPTLC plate (Merck, Darmstad,
Germany) を用いた。L-PG を分離する展開溶媒はクロロホルム：メタノール：
水 = 65 : 25 : 4 を、CL を分離する展開溶媒はクロロホルム：ヘキサン：メタノ
ール：酢酸 = 50 : 30 : 10 : 5 をそれぞれ用いた。また、検出試薬は L-PG は Ninhydrin
試薬を、CL 及び Total PG は Dittmer 試薬をそれぞれ用いて検出し、発色強度を
画像解析ソフト ImageJ にて解析した。また、内部標準は Total PG を用いた。

3-9. L-PG の細胞膜内分布の解析

L-PG の細胞膜内分布は蛍光色素 Fluorescamine を用いて解析した。方法は Mishra らの報告を一部改変して行った [22, 29]。各菌株を TLC の方法同様に培養、洗浄及び集菌した。得られたペレットをバッファーA [100 mM リン酸二水素カリウム, 600 mM 塩化カリウム, pH 8.2] に 0.2 g/ml となるよう懸濁し、25 ml ガラスフラスコに移した。これを浸透しながら水中にて十分に冷却し、予めジメチルスルホキシドに 0.52 M となるよう融解した Fluorescamine を 30 μ l/ml 添加し、30 秒水中にて反応させた。バッファー B [1 M アンモニア水, 600 mM 塩化カリウム] にて反応を停止させ、バッファー C [200 mM 酢酸カリウム, 600 mM 塩化カリウム, pH 4.5] にて 4 回洗浄した。得られたペレットから Bleigh-Dyer 法にてリン脂質を抽出し、TLC (展開溶媒はクロロホルム：メタノール：水 = 65 : 25 : 4) にて解析した。Fluorescamine を UV = 365 nm および Total PG を Dittmer 試薬にてそれぞれ検出し、ImageJ にて発色強度を解析した。

3-10. 細胞膜の流動性解析

細胞膜の流動性は Muller らの報告をもとに蛍光色素 Laurdan を用いて行った [30]。各菌株を TSA にて培養し、TSB に $OD_{590nm} = 0.10 \pm 0.02$ となるように菌液を調整した。これを $OD_{590nm} = 1.00 \pm 0.02$ となるまで $37^{\circ}C$ で培養し、 $10 \mu M$ の Laurdan 溶液を $10 \mu l$ 加え 5 分間室温にて静置した。なお、Laurdan は N, N-dimethylformamide (DMF) に溶解し、Laurdan の溶解性を保つ為、TSB 内の DMF 終濃度が 1% となるようにした。反応後、wash buffer [PBS + 0.1 % glycerol] にて 4 回洗浄し、得られたペレットを 2 ml の同バッファーに懸濁した。作製した菌液における Laurdan の蛍光波長 (励起波長 $350 \pm 5 nm$, 測定波長 $440 \pm 5 nm$, $490 \pm 5 nm$) を FP-8300 spectrofluorometer (JASCO Corporation, Tokyo, Japan) にて測定した。得られた波長強度から generalized polarization (GP) = $(I_{440} - I_{490}) / (I_{440} + I_{490})$ 値を算出し、得られた結果を比較した。

4. 結果

4-1. 臨床分離株の解析

始めに DAP-NS の原因遺伝子を明らかにする為に臨床にて分離された MRSA 4 株 (S1, S2, S3 及び S4) の薬剤感受性及び遺伝子型を解析した。始めに、POT kit を用いて MRSA 4 株の遺伝子学的相同性について比較解析したところ、4 株全てで同様の泳動パターンを示したことから、これら 4 株が同一の菌株による単一の感染症であることが明らかになった (Fig. 1)。次に、これら 4 株の各種抗菌薬に対する薬剤感受性を評価するために MIC を測定した (Table 2)。その結果、DAP の MIC は 4 株のうち S2 及び S3 にて 1 µg/ml まで上昇しており、S4 については 2 µg/ml まで上昇していた。また、S2 と S3 ではアルベカシン (arbekacin: ABK)、TEIC、VCM に対する MIC も上昇しており、その一方でアンピシリン (ampicillin: ABPC) に対する MIC については低下していた。次に MRSA の DAP 感受性に影響すると報告されている *mprF*、*dltAB* に関してシーケンス解析を行った。*mprF* については、S2 は 1034 番目のシトシンがチミンに、S4 は 1022 番目のチミンがシトシンに変異していることが明らかとなった (Fig. 2)。その変異により、S2 は 345 番目のアミノ酸がスレオニンからイソロイシンに変異しており (T345I)、

S3 は 341 番目のアミノ酸がロイシンからセリンに変異している (L341S) ことが示唆された。しかし、S3 では MprF 変異は検出されなかった。一方で、*dltAB* に関しては、塩基の変異は検出されなかった (Data not shown)。以上より総合的に S2 と S4 を DAP-NS MRSA と判定した。

4-2. 遺伝子導入株における薬剤感受性の評価

S2 と S4 より検出された MprF 変異が確かに DAP-NS に関与していることを明らかにする為に、T345I 変異及び L341S 変異を *S. aureus* N315 株に導入し (以下、MprF (T345I)、MprF (L341S)とする)、薬剤感受性に対する MprF 変異の影響を解析した (Table 3)。同様の方法にて樹立した MprF 欠損株 (以下 MprF-Null とする) に関しても薬剤感受性について解析した。これらの結果、変異を導入した 2 株 (MprF (T345I) 及び MprF (L341S)) に関して共に DAP に対する MIC が上昇していたが、MprF 欠損株においては MIC の低下が見られた。さらに興味深いことに臨床分離株で認められた ABK、VCM 及び TEIC に対する MIC 上昇や ABPC に対する MIC 低下が、MprF (T345I) 及び MprF (L341S) においても再現された。

4-3. 遺伝子導入株における細胞膜荷電の評価

DAP による抗菌活性は細胞膜の荷電に依存していることから、変異を導入した *S. aureus* N315 株における細胞膜の荷電を調べるため cytochrome C binding assay にて遺伝子導入株の細胞膜荷電を評価した (Fig. 3)。また、当研究室で同定し、先行研究にて *S. aureus* N315 遺伝導入株を樹立している T345P 変異についても同様に解析した (以下 MprF (T345P) とする) [24]。その結果、MprF 変異を導入した *S. aureus* N315 株で全てにおいて MprF-WT と比較してわずかではあるが有意に陽性荷電に推移していることが明らかになった。一方で MprF-Null では有意に陰性に推移していることが明らかになった。

4-4. 細胞膜における L-PG の定量的解析

S. aureus の膜電位は L-PG 含有率もしくはその分布によって調整されており、MprF は L-PG の合成と転移に関与している。そこで、始めに MprF の L-PG 合成機能を評価するため細胞膜全体中の L-PG 含有率について、MprF-WT および 3 種の MprF 変異株及び MprF-Null で比較検討した (Fig. 4A)。その結果、全ての MprF 変異株と MprF-WT の間に有意な差は認められなかった。また、MprF-Null

については L-PG の産生を認めなかった。次いで、MprF の転移機能を評価するために細胞膜外膜の L-PG のみを Fluorescamine にて染色し、細胞膜内の分布を解析した (Fig. 4B)。すると興味深いことに、すべての MprF 変異株において細胞膜外側の L-PG 分布が有意に低下していることが明らかになった。

4-5. CL の定量及び細胞膜の流動性の解析

DAP は菌体の細胞膜を特異的に障害することから、細胞膜の構造維持に必要であると考えられている CL について TLC にて解析した (Fig. 5A)。すると興味深いことに MprF 変異を導入した 3 株では細胞膜全体での CL 含有率が有意に低下しており、MprF-Null では有意に上昇していることが明らかになった。この結果は、DAP に対する MIC と強い相関を示しており、CL 量が DAP-NS に大きく関与していることが示唆された。さらに、CL はその構造から細胞膜の流動性に関与すると考えられることから、さらに Laurdan を用いて細胞膜の流動性についても評価した (Fig. 5B)。その結果、MprF (T345P) 株では細胞膜の流動性が有意に上昇しており、MprF (T345I) 株も同様の傾向が見られた。一方、MprF (L341S) 株及び MprF-Null 株では流動性が有意に低下していた。

5. 考察

MRSA 感染症は抗菌薬や感染制御の概念が進歩した現代においても、依然として世界規模で解決すべき問題である。さらに、MRSA に有効であるとされる新規抗菌薬である DAP に対しても低感受性菌の存在が報告されるようになり、臨床における喫緊の課題として早急な対策が必要である [19, 31]。本研究は、DAP-NS に関与する原因遺伝子を特定するとともに、CL に関連した新しい DAP-NS のメカニズムを提唱するものである。

はじめに、我々は化膿性膝関節炎の患者より分離された MRSA 4 株のうち 2 株の DAP-NS MRSA よりそれぞれ独立した変異 (MprF (T345I) 及び MprF (L341S)) を検出した。また、これら 2 つの変異を *S. aureus* N315 株にそれぞれ導入したところ、MprF (T345I) 株及び MprF (L341S) 株ともに DAP に対する MIC が上昇することを見出した。一方、VCM、TEIC に対する交差耐性や ABPC に対しては薬剤感受性が低下するシーソー効果を検出した。今回、私が見出したこれら 2 つの変異に関しては Bayer らが臨床分離株を用いた研究にて報告しており、これら 2 つの変異が DAP-NS に重要であるという私の知見とも一致する [32]。しかし、臨床株においては、患者に対する投薬背景や患者自身の自然免疫によ

って産生される抗菌ペプチドによって菌株の生化学的性状が変化する可能性があるため、MprF 変異が DAP-NS に直接関与することを必ずしも明確にしたとは言えない [33, 34]。私が本研究で樹立した *S. aureus* N315 MprF 変異株は *in vitro* にて新たに実験株に対して MprF 変異を挿入したものであり、患者体内での臨床株同士の外来遺伝子の交換や DAP を含む抗菌薬などの暴露がないものである。したがって、今回化膿性膝関節炎の患者由来の DAP-NS MRSA (S2, S4) より検出された2つの MprF 変異が DAP-NS の直接的な原因であると明確にされたと考えられる。加えて、本研究によってグリコペプチド系抗菌薬に対する交差耐性やシーソー効果についても MprF 変異に起因するものであることが明らかになった。

MprF は L-PG の合成と転移に関与しており、この作用によって菌体の膜電位を調節している [18]。実際、DAP-NS MRSA は MprF 変異によって L-PG 転移機能が亢進し、電氣的に DAP を反発することが原因であると報告されている [12]。そこで、本研究において MprF 変異導入株を用い MprF の L-PG 合成機能と転移機能を解析したが、L-PG 合成機能において有意な変化は認められなかった。また、細胞膜における L-PG 転移機能については有意に低下していることが明らか

になった。以上の結果は、従来通説とされている電氣的反発による DAP-NS のメカニズムの証明には至らなかった (Fig. 6A)。その一方で興味深いことに、MprF の機能と直接関係ないと考えられていた CL の含有率が MprF 変異株において有意に低下していることが明らかになった。CL は細胞膜の構造維持に必要なリン脂質としても知られており、カルジオリピン合成酵素 (cardiolipin synthase: Cls) 1/2 によって PG から合成される。また、この Cls 1/2 は細菌が有するシグナル経路である二成分制御系によって制御されることが明らかになっている [35]。実際、これら合成経路や二成分制御機構の一部に MprF が関わること、MprF 変異によって Cls 1/2 の発現が変化することが報告されている [36]。さらに、*S. aureus* は酸化ストレスや浸透圧の変化に対し細胞膜の CL 含有量を調整することで対応していることが Ohniwa らによって報告されている [37, 38]。これらの報告と我々の知見より、MprF は CL の合成に間接的に関与しており、CL が細胞膜から減少することで DAP-NS を獲得する可能性が示唆された。

また、CL は PG が二つエステル結合したものであることから、細胞膜の流動性に関与している可能性を考え Laurdan を用いて流動性の評価をおこなった。その結果、MprF (T345I) 及び MprF (T345P) の 2 株において細胞膜の流動性が

MprF-WT と比較して上昇していることが明らかになった。従来、DAP は細胞膜全体に非特異的に結合するとされていたが、近年の解析によって細胞膜の合成起点に特異的に結合することが明らかになった [39]。また Boudjemaa らは MRSA の細胞膜流動性が亢進することで、DAP が細胞膜上でミセル形成できないことを報告している (Fig. 6B) [40]。これらの報告と我々の知見から、*S. aureus* の MprF が変異することで細胞膜における CL 含有率の低下に伴い、細胞膜の流動性が亢進することで、細胞膜上で DAP がミセルを形成できずに低感受性を獲得するといった新しいメカニズムの存在が示唆された (Fig. 6C)。一方で、MprF (L341S) 株については CL の低下が観察されたにもかかわらず、流動性が低下することが見出された。この相反する知見については CL が持つ機能は細胞膜の流動性のみに関与するのではなく細胞膜の構造維持や膜タンパク質の機能維持などに関与することが明らかになっており、今後、細胞膜の構造や機能維持に関しても解析を行う必要がある。

しかし、CL の含有量が低下することで DAP に対して低感受性を獲得することは *S. aureus* の生存にとって有利に働くとは限らない。例えば、Rosh らや Li らは、DAP-NS MRSA の “fitness cost” が高いことを報告している [41, 42]。

Fitness cost とは進化の代償に求められる負荷の大きさとされており、一般的に生物は環境への適応性が高く、fitness cost が低い方に進化が進むとされている。

つまり、DAP-NS MRSA は DAP が存在する特殊な環境下では細胞膜の流動性が上昇するために優位に存在できるが、細胞膜自体の脆弱性は CL が低下することで増すため、自然環境下における菌としての生存能力は低く進化論的に保存されないことが考えられる [43]。本研究における *S. aureus* N315 MprF 変異株の解析で β -ラクタム系抗菌薬に対する MIC が低下するというシーソー効果が観察された。シーソー効果とは Mehta らによって報告された概念で MRSA が DAP-NS を獲得すると β -ラクタム系抗菌薬に対する耐性を失う現象である [44-46]。そのメカニズムに関して、Renzoni らは DAP-NS MRSA ではペニシリン結合タンパク (penicillin binding protein: PBP)-2a が細胞膜にアンカーされなくなることを報告している。本研究の結果より、MprF 変異株における DAP-NS 獲得とともに他の抗菌薬に対するシーソー効果が MprF 変異によって誘導されることが明らかになった。また MprF 変異によって細胞膜の CL が低下することで、細胞膜の不安定性が増し、PBP-2a が細胞膜上に維持されないことでシーソー効果をきたすことが考えられる。これらより、実際の臨床現場における新たな治療方法として

DAP と β -ラクタム系抗菌薬を同時に投与することを考慮する必要がある。この併用療法が確立することで、DAP-NS を有さない通常の MRSA は DAP によって殺菌され、DAP-NS MRSA については β -ラクタム系抗菌薬によって殺菌でき、さらなる耐性菌が生じないというこれまでにない画期的な治療法が可能と考えられる。この新規治療戦略を確立するために、*in vitro* での殺菌効果の検討や *S. aureus* の感染モデルマウスを用いた *in vivo* での解析を行い、臨床へフィードバックしたいと考えている。

6. 総括

本研究において臨床より分離された 4 株の MRSA を解析した結果、ダプトマイシン (daptomycin: DAP) 低感受性 (DAP non-susceptible: DAP-NS) MRSA 2 株より MprF (T345I) 変異および MprF (L341S) 変異が検出され、これらを *S. aureus* N315 株に導入したところ、DAP に対する MIC が上昇した。以上より、今まで状況証拠でしかなかった MprF 変異と DAP-NS の関係を *in vitro* にて立証した。

また、DAP-NS のメカニズムに関して MprF 変異を導入した *S. aureus* N315 株を用いて解析したところ、従来定説とされていた細胞膜外側における L-PG の上昇は見られず、むしろ低下することが明らかになった。また、興味深いことに MprF 変異株全てにおいて細胞膜中のカルジオリピン (cardiolipin: CL) 含有率が低下することが明らかになった。加えて、MprF (T345I) 株および MprF (T345P) 株において細胞膜の流動性が亢進することが明らかになった。以上より、細胞膜における CL の存在が DAP-NS に深く関与することが示唆された。

さらに、MprF 変異を導入した株において β -ラクタム系抗菌薬に対する MIC が低下するシーソー効果を観察しており、DAP と β -ラクタム系抗菌薬におけるシーソー効果が MprF 変異によって生じるものであることが明らかになった。こ

の知見により、MRSA 感染症に対して DAP と β -ラクタム系抗菌薬を同時に投与
するという新たな併用療法の有効性が示唆された。

7. 謝辞

本研究を行うにあたり、多大なご指導、ご鞭撻をいただきました北里大学 大学院 医療系研究科 環境医科学群 環境微生物学研究室 教授 北里 英郎 先生、助教 中村 正樹 先生、助教 前花 祥太郎 先生及び同大学 生命科学研究所 感染制御研究センター センター長 花木 秀明 先生に深く御礼申し上げます。

また、実験を進めるにあたり貴重なディスカッションをいただきました北里大学 医療衛生学部 薬理学教室 准教授 小島 史章 先生、免疫学研究室 講師 久保 誠 先生に深く御礼申し上げます。

さらに本実験に関する技術的な援助を頂きました、北里大学 生命科学研究所 感染制御研究センター 上級研究員 松井 秀仁 先生、北里大学 医療衛生学部 病態生化学研究室 講師 川島 麗 先生、講師 川上 文貴 先生並びに北里大学 海洋生命学部 資源化学研究室 神保 充 先生に深く御礼申し上げます。

最後に、本研究を行うにあたり献身的にサポートいただいた北里大学 大学院 医療系研究科 環境医科学群 環境微生物学研究室 修士課程 修了生 堀 翼 君に深く御礼申し上げます。

2019 年 1 月 7 日
北里大学 大学院 医療系研究科
環境微生物学研究室 博士課程
川田 逸人

8. 参考文献

1. Grema HA, Geidan YA, Suleiman A, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): A review. *Advances in Animal and Veterinary Science*. 2014; 3 ; 79-98.
2. Lee JH. Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl Environ Microbiol*. 2003; 69; 6489-6494.
3. Umaru GA, Kabiru J, Umar YA. A review of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): A growing threat to Veterinarians. *Nigerian Veterinary Journal*. 2011; 32; 174-186.
4. Tietz A, Frei R, Windmer AF. Transatlantic spread of the USA300 clone of MRSA. *New Engl J Med*. 2005; 353; 532-533.
5. Donnio PY, Preney L, Lafforgue N, et al. Change in staphylococcal cassette chromosome type and antibiotic resistance profile in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from a French hospital over and 11 years period. *J Antimicrob Chemother* 2004; 53; 808-813.

6. Monecke S, Coombs G, Ehricht R, et al. A field guide to pandemic, epidemic and sporadic clone of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *PLoS One*. 2011; 6; e17936.
7. Muraih JK, Pearson A, Palmer M, et al. Oligomerization of daptomycin on membrane. *Biochem et Biophy Acta*. 1808; 1154-1160.
8. Ho SW, Jung D, Straus SK, et al. Effect of divalent cations on the structure of the antibiotic daptomycin. *Eur Bioohys J*. 2008; 37; 421-433.
9. Strauss SK, Hancock RW. Model of action of the new antibiotic for gram-positive pathogens daptomycin: comparison with cationic antimicrobial peptides and lipopeptides. *Biochim Biophys Acta*. 2006; 1758; 1215-1223.
10. Scott WR, Beak SB, Straus SK, et al. NMR structural studies of the antibiotic lipopeptide daptomycin in DHPC micelles. *Biochim Biophys Acta*. 2007; 1768; 3116-3126.
11. Tran TT, Munita JM, Arias CA. Mechanism of drug resistant: daptomycin resistant. *Ann N. Y. Acad Sci*. 2015; 1354; 32-53.

12. Bayer AS, Schneider T, Sahl HG. Mechanism of daptomycin resistance in *Staphylococcus aureus*: role of the cell membrane and cell wall. *Ann N. Y. Acad Sci.* 2013; 1277;139-158.
13. Roveta S, Marchese A, Schito GC. Activity of daptomycin on biofilms produced on a plastic support by *Staphylococcus* spp. *Int J Antimicrob Agents.* 2008; 31; 312-328.
14. Malizos K, Sarma J, Hamed K et al. Daptomycin for the treatment of osteomyelitis and orthopedic device infections: real-world clinical experience from a European registry. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2016; 35; 111-118.
15. 日本化学療法学会・日本感染症学会 MRSA 感染症の治療ガイドライン作成委員会. MRSA 感染症の治療ガイドライン 2017 年度改訂版. 日本化学療法学会雑誌. 2017; 65; 343.
16. 川田 逸人、花木 秀明、北里 英郎. 適正抗菌薬療法最新マニュアル MRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌). *Modern Physician.* 2018; 38; 237-242.

17. Kanesaka Y, Yoshioka T, Hayashi H. Alteration of the phospholipid composition of *Staphylococcus aureus* cultured in medium containing NaCl. *Biochim Biophys Acta*. 1972; 280; 444-450.
18. Ernst CM, Staubitz P, Peschel A, et al. The bacterial defencin resistance protein MprF consists of separable domains for lipid lysinylation and antimicrobial peptide repulsion. *PLoS ONE*. 2009; 5:e1000660.
19. Miller WR, Bayer AS, Arias CA. Mechanism action and resistance to daptomycin in *Staphylococcus aureus* and Enterococci. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2016; 6: pii=a026997.
20. Cafiso V, Bertuccio T, Stefani S, et al. *dltA* overexpression: A strains-independent keystone of daptomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents*. 2014; 43; 26-31.
21. Kanesaka I, Fujisaki S, Kobayasi I, et al. Characterization of compensatory mutations associated with restoration of daptomycin-susceptibility in daptomycin non-susceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and role in *mprF* mutation. *J Infection Chemother*. 2019; 25; 1-5.

22. Mishra NN, McKinnell J, Nast CC, et al. *In vitro* cross-resistance to daptomycin and host defense cationic antimicrobial peptides in clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates. *Antimicrob Agents Chemother*. 2011; 55; 4012-4018.
23. Kuroda M, Ohta T, Hiramatsu K, et al. Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* 2001; 357: 1225-40.
24. Kawada H, Hori T, Kitasato H. Novel MprF amino acid mutations contributing to daptomycin non-susceptibility in MRSA. *The Kitasato Medical Journal*. 2019; 50. (掲載予定).
25. Schneewind O, Missiakas D. Genetic manipulation of *Staphylococcus aureus*. *Curr Protoc Microbiology*. 2014; 1; 1-23.
26. Yang SJ, Kreiswirth BN, Bayer AS, et al. Enhanced expression of *dltABCD* is associated with development of daptomycin nonsusceptibility in a clinical endocarditis isolate of *Staphylococcus aureus*. *J Infect Dis*. 2009; 200; 1916-1920.
27. Yang SJ, Nast CC, Bayer AS, et al. Cell wall thickness is not a universal accompaniment of the daptomycin nonsusceptibility phenotype in *Staphylococcus*

- aureus*: evidence for multiple resistance mechanisms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010; 54; 3079-3085.
28. Yang SJ, Bayer AS, Cheung AL, et al. The *Staphylococcus aureus* two-component regulatory system, GraRS, senses and confers resistance to selected cationic antimicrobial peptides. *Infect Immun*. 2012; 80; 74-81.
29. Mishra NN, Yang SJ, Nast CC, et al. Analysis of cell membrane characteristics of *in vitro*-selected daptomycin-resistant strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53; 2312-2318.
30. Muller A, Wenzel M, Hamoen LH, et al. Daptomycin inhibits cell envelope synthesis by interfering with fluid membrane microdomains. *PNAS*. 2016; 113; E7077-E7086.
31. Jones T, Yeaman MR, Proctor RA, et al. Failures in clinical treatment of *Staphylococcus aureus* infection with daptomycin are associated with alterations in surface charge, membrane phospholipid asymmetry, and drug binding. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52: 269-278.

32. Bayer AS, Mishra NN, Yang SJ, et al. Frequency and distribution of single-nucleotide polymorphisms within *mprF* in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates and their role in cross-resistance to daptomycin and host defense antimicrobial peptides. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59; 4930-4937.
33. Bayer AS, Prasad R, Yearman MR, et al. *In vitro* resistance of *Staphylococcus aureus* to thrombin-induced platelet microbial protein is associated with alterations in cytoplasmic membrane fluidity. *Infect Immun* 2000; 68; 3548-3553.
34. Dhawan VK, Bayer AS, Yeaman MR, et al. Thrombin-induced platelet microbial protein susceptibility phenotype influences the outcome of oxacillin prophylaxis and therapy of experimental *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Antimicrob Agent Chemother*. 2000; 44; 3206-3209.
35. Draper L, Cotter PD, Ross RP, et al. Lantibiotic resistant. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2015; 79; 171-191.
36. Koprivnjak T, Zhang D, Weiss JP, et al. Characterization of *Staphylococcus aureus* cardiolipin synthases 1 and 2 and their contribution to accumulation of

- cardiolipin in stationary phase and within phagocytosis. *J Bacteriol.* 2011; 193; 4134-4142.
37. Ohniwa RL, Kitabayashi K, Morikawa K. Alternative cardiolipin synthase Cls1 compensates for stalled Cls2 function in *Staphylococcus aureus* under conditions of acute acid stress. *FEMS Microbiol Lett.* 2013; 338; 141-146.
38. Tsai M, Ohniwa RL, Morikawa K, et al. *Staphylococcus aureus* requires cardiolipin for survival under conditions of high salinity. *BMC Microbiology.* 2011; 11; 13.
39. Mishra NN, Bayer AS, Yang SJ, et al. Phenotypic and genotypic characterization of daptomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strains: relative roles of *mprF* and *dlt* operon. *PLoS ONE.* 2014; 9; e107426.
40. Boudjemaa R, Cabrie C, Steenkeste K, et al. Impact of bacterial membrane fatty acid composition on the failure of daptomycin to kill *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2018; 2; e00023-18

41. Rosh M, Galletti P, Rosato AE, et al. Daptomycin resistance in clinical MRSA strains associated with a high biological fitness cost. *Front Microbiol.* 2017; 8; 2303.
42. Li S, Yin Y, Wang H, et al. Fitness cost of daptomycin-resistant *Staphylococcus aureus* obtained from *in vitro* daptomycin selection pressure. *Front Microbiol.* 2017; 8; 2199.
43. 舘田 一博. 市中で広がる耐性菌. 日本内科学会雑誌. 2014; 104; 572-579.
44. Renzoni A, Kelley WL, Rosato AE, et al. Molecular bases determining daptomycin resistance-mediated desensitization to β -lactams (seesaw effect) in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 61: e01634-16.
45. Yang SJ, Xiong YQ, Bayer AS, et al. Daptomycin-oxacillin combinations in treatment of experimental endocarditis caused by daptomycin-nonsusceptible strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* with evolving oxacillin susceptibility (the “seesaw effect”). *Antimicrob Agent Chemother* 2010; 54: 3161-3169.

46. Cambers HF, Basuino L, Moise P, et al. Daptomycin- β -lactam combination in a rabbit model of daptomycin-nonsusceptible methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* endocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* 2016; 60: 3976-3979.

9. 業績目録

9-1. 論文業績

原著論文

1. Kawada Hayato, Hori Tsubasa, Kitasato Hidero, et al.

Novel MprF amino acid mutations contributing to daptomycin non-susceptibility
in MRSA

The Kitasato Medical Journal. In press.

2. 川田 逸人、田村 明希、北里 英郎他.

シーソー効果を応用した新規 daptomycin 低感受性 MRSA 判定用培地

北里医学. In press.

3. Miyajima Takashi, Kawada Hayato, Obata Fumiya, et al.

The mouse/human cross-species heterodimer of leucine-rich repeat kinase 2:
possible significance in the transgenic model mouse of Parkinson's disease.

Neurosci Lett. 2015; 588; 142-146.

総説

1. 川田 逸人、花木 秀明、北里 英郎.

適正抗菌薬療法最新マニュアル MRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌).

Modern Physician. 2018; 38; 237-242.

9-2. 学会発表

1. 川田 逸人、中村 正樹、北里 英郎他

MprF 変異を導入した MRSA N315 株における細胞膜の解析.

第 10 回 MRSA フォーラム (ポスター). 2019 年.

2. 川田 逸人、中村 正樹、北里 英郎他.

Staphylococcus aureus N315 株を用いた Daptomycin 低感受性因子 MprF の

機能解析及び低感受性機序の解析

第 22 回北里微生物アカデミー (口演). 2019年

3. 川田 逸人、堀 翼、北里 英郎他.

Staphylococcus aureus N315 株を用いた Daptomycin 低感受性因子 MprF の

機能解析及び低感受性機序の解析

第 21 回北里微生物アカデミー (口演). 2018年

4. 川田 逸人、中村 正樹、北里 英郎他.

Staphylococcus aureus N315 株を用いた Daptomycin 低感受性因子 MprF の

機能解析及び低感受性機序の解析

第 29 回臨床微生物学会 (口演). 2018年.

5. 川田 逸人、中村 正樹、北里 英郎他.

Staphylococcus aureus N315 株を用いた Daptomycin 低感受性因子 MprF の

機能解析及び低感受性機序の解析

第 20 回北里微生物アカデミー (口演). 2017年

6. 堀 翼、川田 逸人、北里 英郎他.

化膿性股関節炎患者より分離された新規アミノ酸変異を有するダプトマイ
シン低感受性 MRSA の解析.

第 30 回北里バイオサイエンスフォーラム (口演). 2017 年.

7. 川田 逸人、堀 翼、北里 英郎他.

化膿性股関節炎患者より分離された新規アミノ酸変異を有するダプトマイ
シン低感受性 MRSA の解析.

第 8 回 MRSA フォーラム (口演). 2017 年.

10. 図表

Table 1. プライマーリスト

Primer name	Sequence 5'-3'
<i>mprF</i> -null_in-fusion_1	CCCGGGGGATCCACTAGTTC
<i>mprF</i> -null_in-fusion_2	CTGCAGGAATTCGATATCAA
<i>mprF</i> -null_in-fusion_3	ATCGAATTCCTGCAGGTAATAAAATAGTTG AATAA
<i>mprF</i> -null_in-fusion_4	TTTTTCACATCAATTCTAAT
<i>mprF</i> -null_in-fusion_5	AATTGATGTGAAAAATTAAAATCCAAGTG CTAAGA
<i>mprF</i> -null_in-fusion_6	AGTGGATCCCCCGGGATTAGAAATATTTTT CTCAG
1034(C > T)_mutagenesis_1	TTCTTTATAAGTATGATCTTTTTTG
1034(C > T)_mutagenesis_2	CATACTTATAAAGAATACTAAAATTG
1022(T > C)_mutagenesis_1	GCAATTTTCAGTATTCTTTACAGTATG

1022(T > C)_mutagenesis_2	GAATACTGAAATTGCTAATGATAATG
<i>mprF</i> _Sequence_1	GCACTCATAATCGGCTGTT
<i>mprF</i> _Sequence_2	ACCATATTGTTCTGTTTGAG
<i>mprF</i> _Sequence_3	TATTGGTGCAGGCGTTAGAG
<i>mprF</i> _Sequence_4	GGCGCTTTCGATTTAGTTGT
<i>mprF</i> _Sequence_5	AGCTATTATTTTTGTTCTGC
<i>mprF</i> _Sequence_6	TTTAACGCAATTTTCAACTT
<i>dltA</i> _Sequence_1	TACTGAGTGGATGTTAGAACT
<i>dltA</i> _Sequence_2	CGATGACGGTATTCGTACAT
<i>dltB</i> _Sequence_1	GTTACATTCAAAAGTGTGGCAG
<i>dltB</i> _Sequence_2	GATCTTTATTCTACATGTCTC
<i>mprF</i> _pIMAY_integration_1	AATCAAAGGTAAATGATATG
<i>mprF</i> _pIMAY_integration_2	TACATGTCAAGAATAAACTGCCAAAGC
<i>mprF</i> _pIMAY_integration_3	AATACCTGTGACGGAAGATCACTTCG

※ in-fusion: MprF-Null 作成用プライマー, mutagenesis: 変異挿入用プライマー,

Sequence: シークエンス解析用プライマー.

Table 2. 臨床分離株における各種抗菌薬の MIC.

	ABPC	LVFX	ABK	VCM	TEIC	LZD	DAP	QPR/DPR
S1	32	0.5	1	1	1	2	0.5	0.5
S2	16	0.5	4	2	4	2	1	0.5
S3	32	0.5	1	1	1	2	1	0.5
S4	16	0.25	4	2	4	1	2	0.25

単位 = $\mu\text{g/ml}$

ABPC = ampicillin, LVFX = levofloxacin, ABK = arbekacin, VCM = vancomycin,

TEIC = teicoplanin, LZD = linezolid, DAP = daptomycin, QPR/DPR =

quinupristin/dalfopristin.

Table 3. 遺伝子導入株における各種抗菌薬の MIC.

	ABPC	LVFX	ABK	VCM	TEIC	LZD	DAP	QPR/ DPR
MprF-WT	4	0.5	0.5	0.5	0.5	2	0.25	1
MprF(T345I)	2	0.5	2	1	1	2	1	1
MprF(L341S)	1	0.5	1	1	1	2	1	0.5
MprF-null	0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	2	0.12	1

単位 = $\mu\text{g/ml}$

ABPC = ampicillin, LVFX = levofloxacin, ABK = arbekacin, VCM = vancomycin,

TEIC = teicoplanin, LZD = linezolid, DAP = daptomycin, QPR/DPR =

quinupristin/dalfopristin.

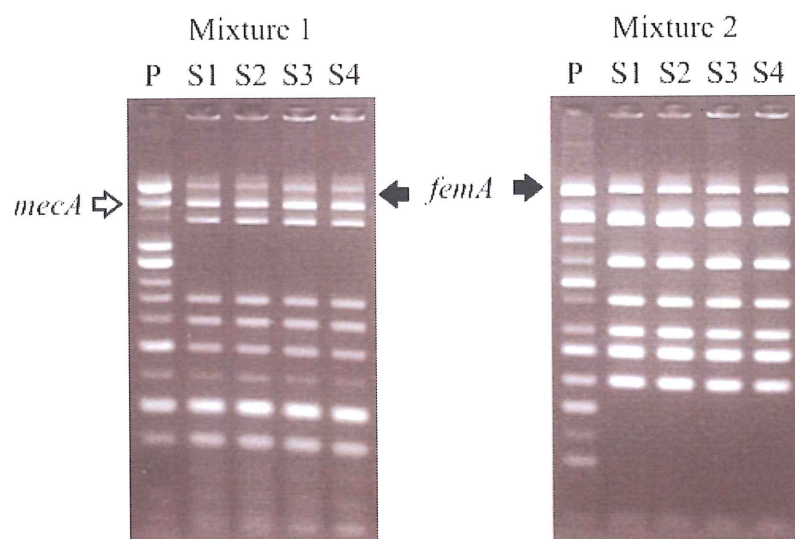


Fig 1. 臨床分離株の核型解析

臨床分離株 4 株 (S1、S2、S3 及び S4) の DNA を POT kit 付属の Primer Mixture 1, 2 にて PCR を行い、4% アガロースゲルにて電気泳動を行ったものである。Primer Mixture 内に MRSA に特異的な *mecA* (白矢印) 及び *femA* (黒矢印) に対するプライマーが入っており、このことから本菌株が MRSA であることを確認できる。

1022th 1034th

↓ ↓

```

MprF_N315-WT: 1011>> ATTAGCAATTTTAGTATTCTTTACAAGTATG
S1: 1011>> ATTAGCAATTTTAGTATTCTTTACAAGTATG
S2: 1011>> ATTAGCAATTTTAGTATTCTTTATAAGTATG
S3: 1011>> ATTAGCAATTTTAGTATTCTTTACAAGTATG
S4: 1011>> ATTAGCAATTTCAGTATTCTTTACAAGTATG

```

S2 : MprF(T345I)
S4 : MprF(L341S)

Fig 2. 臨床分離株における MprF の全長シーケンス解析

シーケンス解析によって得られた配列を *S. aureus* N315 株の配列と比較した。S2 の 1034 番目シトシンがチミンに変異しており (黒矢印)、S3 では 1022 番目のチミンがシトシンに変異していた (白矢印)。以上より、S2 は 345 番目のスレオニンがイソロイシンに範囲しており (T345I)、S3 は 341 番目のロイシンがセリンに変異している (L341S) ことが明らかになった。

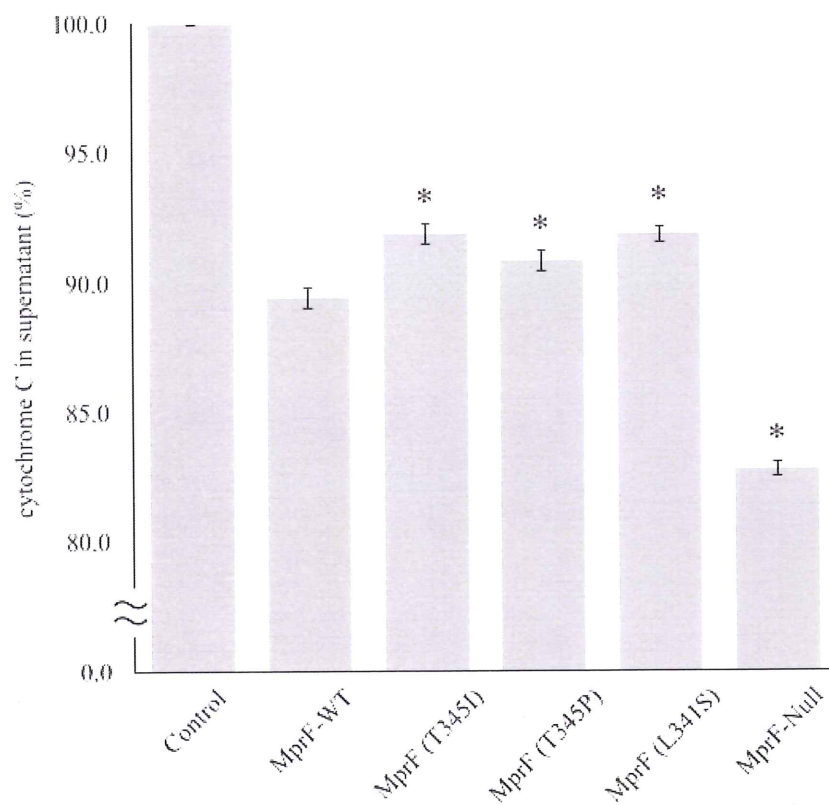


Fig 3. 遺伝子導入を行った *S. aureus* N315 における細胞膜陽性荷電の評価

Cytochrome C を菌体に吸着させ、遠心分離と 0.2 μm フィルターを用いて菌体と上清を分離した。上清中に残存した cytochrome C を吸光度にて測定した結果を示す。この実験は独立した 3 回の試験にて再現性を確認しており、Student t-test にて統計学的処理を行った。* $P < 0.05$ vs MprF-WT.

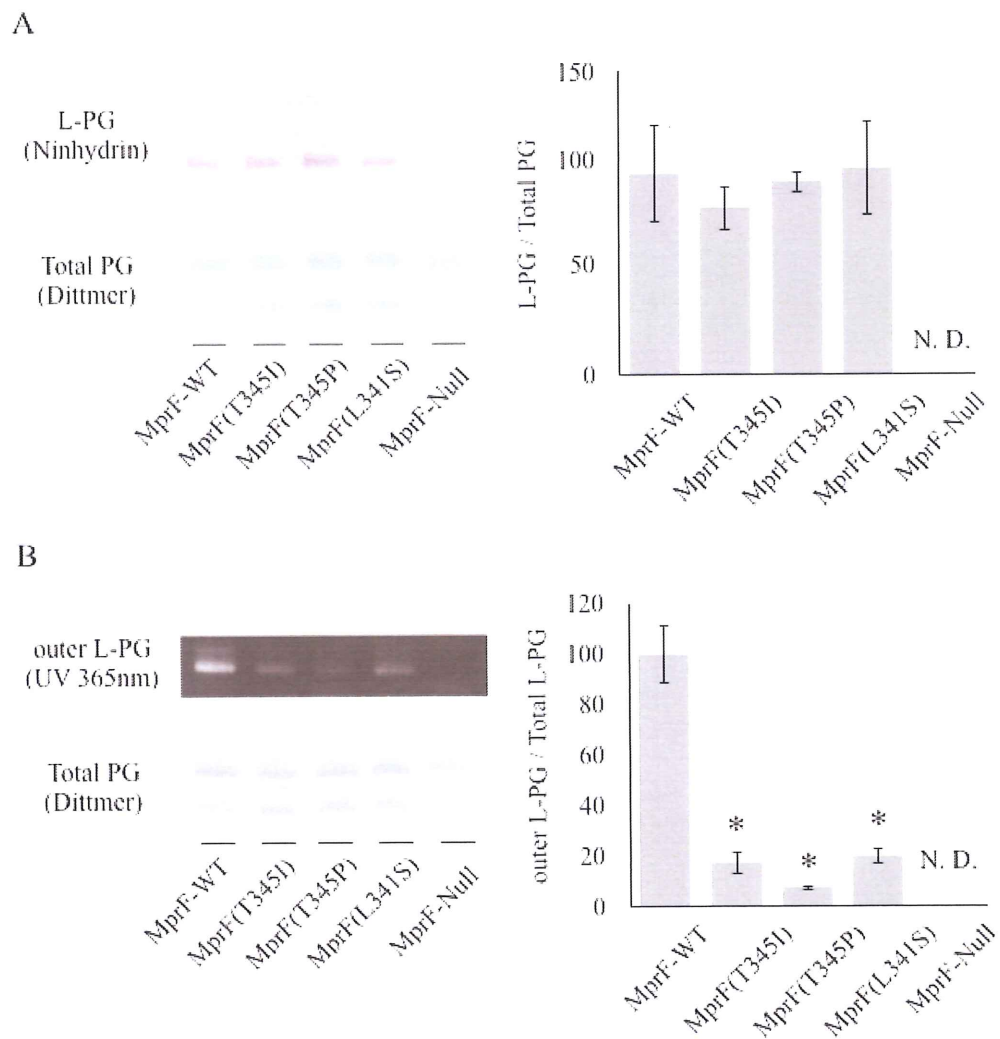


Fig 4. 細胞膜における L-PG の定量的解析

Bleigh-Dyer 法にて抽出した *S. aureus* のリン脂質を TLC にて解析した結果を示す。はじめに、L-PG を Ninhydrin 試薬にて検出し、細胞膜における L-PG 含有量を算出した (A。次に細胞膜の外側の L-PG を、Fluorescamine を用いて解析した (B。この実験は独立した 3 回の試験にて再現性を確認しており、Student t-test にて統計学的処理を行った。* $P < 0.05$ vs MprF-WT.

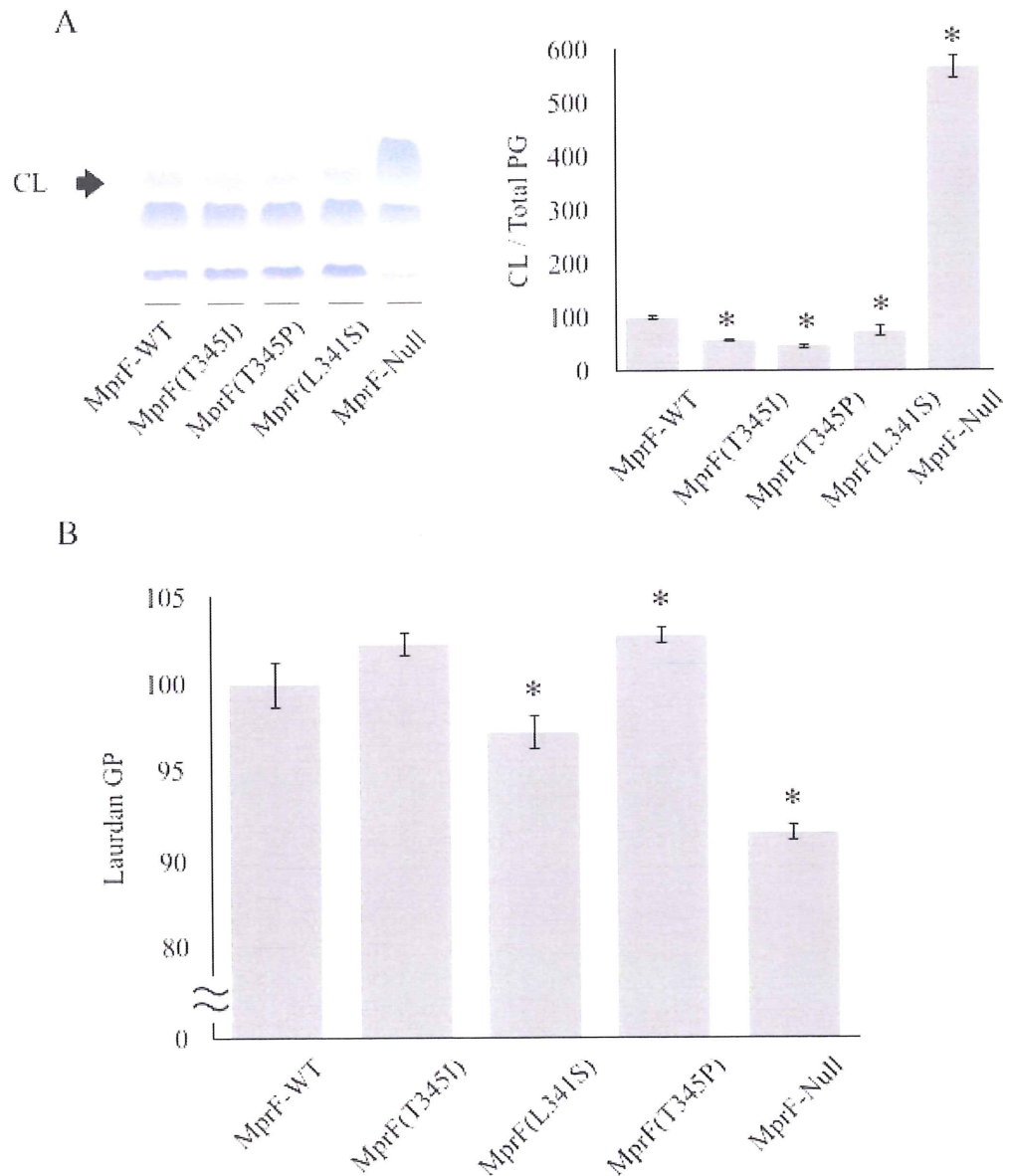
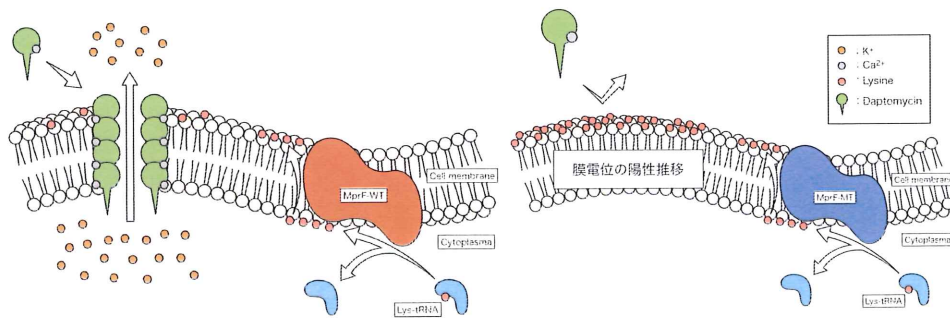


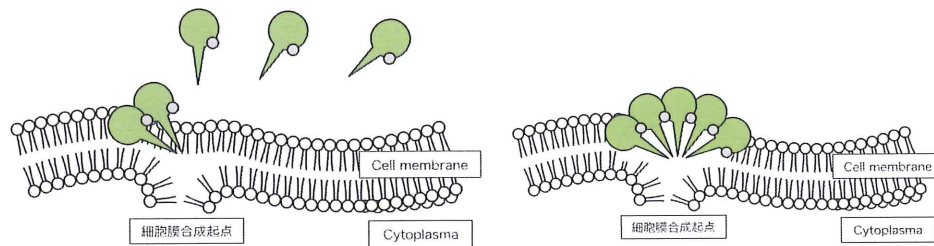
Fig 5. 細胞膜における CL の定量と流動性の解析

Bleigh-Dyer 法にて抽出した *S. aureus* のリン脂質から TLC を用いて CL を分離し、Dittmer 試薬にて検出した (A)。また、細胞膜を Laurdan にて染色し、GP 値から、細胞膜の流動性を評価した (B)。この実験は独立した 3 回の試験にて再現性を確認しており、Student t-test にて統計学的処理を行った。*P < 0.05 vs MprF-WT.

A.



B.



C.

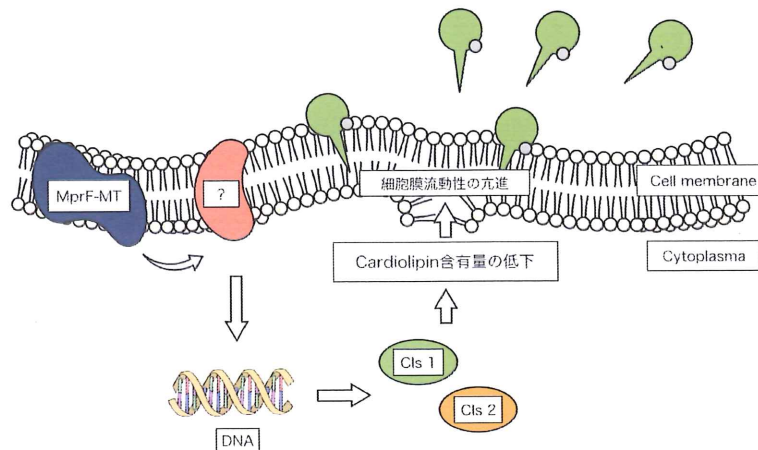


Fig 6. MRSA における DAP 低感受性機序

DAP は細胞膜の電位を利用して細胞膜に結合し、脱分極を誘導することで殺菌する。しかし、MprF 変異によって膜電位が変化することで DAP を電氣的に反発し、低感受性を獲得する (A。一方で近年、DAP は細胞膜合成起点に特異的に結合し殺菌することが明らかになった (B。本研究の結果より、MprF 変異によって細胞膜における CL 含有量が間接的に変化することが明らかになり、CL が DAP 低感受性に寄与している可能性が示唆された (C。