

# 学 位 論 文 要 旨

氏 名 川田 逸人



論 文 題 目

「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」

指 導 教 授 承 認 印

北里 英郎



*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

氏名 川田 逸人

## 【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  $\text{Ca}^{2+}$  と結合し、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。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、近年の使用率増加に伴い、低感受性株が増加傾向にある。DAP 低感受性は multiple peptide resistant factor (MprF) に生じる変異が原因とされている。MprF は細胞膜の phosphatidylglycerol (PG) に陽性荷電物質であるリジンを付加し、lysyl-PG (L-PG) を合成する機能、外側に転移する機能をもつ二機能タンパクで、膜電位を維持していることから、変異によって細胞膜の荷電が変化することによる電的反発が低感受性の通説として報告されている。しかし、近年 DAP は細胞膜の合成起点に特異的に結合することが重要であることが明らかになり、細胞膜の流動性が変化することによって合成起点でミセルを形成することができず、感受性が低下するとの報告もある。さらにこのほかにも菌株によって様々なフェノタイプが報告されており、DAP 低感受性機序は一定のコンセンサスが得られていない。そこで本研究は実際に病院から検出された DAP 低感受性 MRSA のシーケンス解析を行い、mprF より検出された変異を、MRSA の標準株である *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) N315 株に導入し、MprF の機能及び DAP 低感受性メカニズムについて解析を行った。

## 【方法】

### 臨床分離株の解析

臨床検体から分離された MRSA 計 7 株 (内 3 株、4 株がそれぞれ同一患者由来) の minimum inhibitory concentration (MIC) 及び MprF のシーケンスを解析した。なお、シーケンス解析は Blast に掲載されている *S. aureus* N315 株の塩基配列を用いて比較した。

### 遺伝子導入株の樹立

*S. aureus* N315 株に対し、pIMAY を用いて臨床分離株から検出された 3 つの変異を導入し MprF 変異株を作成した。また、ネガティブコントロールとして MprF 欠損株を作成した。

### 遺伝子導入株の解析

作成した菌株の薬剤感受性を微量液体法で測定した。測定にはドライプレート (栄研化学

社) を用いた。さらに低感受性機序を明らかにするため菌体表面の膜電位を cytochrome C 吸着率にて測定した。さらに細胞膜の組成を薄層クロマトグラフィー (thin layer chromatography: TLC) にて解析した。展開溶媒など TLC に必要な情報は Avanti Polar Lipids 社のテクニカルサポートを参照した。加えて、細胞膜の流動性を、蛍光色素 Laurdan を用いて generalized polarization (GP) を測定し、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 株と比較した。

### 【結果及び考察】

臨床分離株 7 株を解析したところ、4 株で MIC が上昇しており、DAP 低感受性を獲得していることがあきらかになった。また、DAP 低感受性を獲得している株からそれぞれ Ans450\_Ile451 ins Ile (ins Ile)、Thr345Pro (T345P)、Thr345Ile (T345I) および Ler341Ser (L341S) が検出された。また、これらの変異を *S. aureus* N315 株に導入したところすべての株において DAP の MIC が上昇した。以上より、今回臨床分離株より検出された変異は DAP 低感受性の原因であることがあきらかになった。

遺伝子導入を行なった N315 株の膜電位を測定したところ、ins Ile 以外の変異株で有意に上昇しており、MprF 欠損株では有意に低下していた。しかし、TLC にて L-PG を解析したところ、細胞膜における総 L-PG 量に有意な変化はなく、細胞膜外膜の L-PG 量も有意に低下しており、膜電位の変化と MprF 変異との相関は得られなかった。また、通説では機能が上昇すると言われていた MprF 変異だが、今回の研究で MprF 変異が生じると L-PG 転移機能が低下することが明らかになった。*S. aureus* の細胞膜は PG、L-PG 及び cardiolipin (CL) で構成されており、DAP は細胞膜を障害する抗菌薬であるため、低感受性に細胞膜の組成変化が関係していると考え、TLC による CL の解析を行った。すると、MprF 変異を導入した株では CL が有意に低下しており、欠損株では有意に上昇していることが明らかになった。CL は PG が二つ結合した構造をしており、細胞膜の構造維持に関与していることが報告されている。またその構造から流動性に深く関与していることが予想されるため細胞膜の流動性を評価したところ、T345P 株で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 株と欠損株では有意に低下していることが明らかになった。以上、本研究の結果より、MprF 変異によって CL が低下することで流動性が低下し、DAP 低感受性を獲得する新たな低感受性機序が示唆された。一方で今回、すべての低感受性メカニズムを明らかにすることはできなかった。CL は細胞膜の構造維持や膜タンパクの機能に深く関与しており、そのすべては明らかになっていない。DAP 低感受性の詳細を明らかにするためにはさらなる解析が必要であると考ええる。