

学位論文

モエノマイシンとバンコマイシンの感受性に影響する
黄色ブドウ球菌の因子に関する研究

学位申請者 西 裕美

広島大学大学院・医歯薬学総合研究科
展開医科学専攻・顎口腔頸部医科学講座
(口腔外科学第二講座)

(主任：石川 武憲教授)

2003 年度

謝辞

本研究に際し、終始御懇親なる御指導ならびに御校閲を賜りました広島大学大学院医歯薬学総合研究科展開医科学専攻顎口腔頸部医科学講座 石川武憲教授ならびに終始懇篤なる御指導を賜りました同大学院探索医科学講座教授 菅井基行教授に心より感謝いたします。また、本論文作成上、御助言、御校閲を賜りました同大学院病態探求医科学講座 土肥敏博教授に深謝いたします。

本研究遂行上および本論文作成上、終始御助言と御鞭撻を戴きました同大学院探索医科学講座 小松澤均助教授に厚くお礼申し上げます。

また、研究遂行上および本論文作成上、御指導および御助言を戴いた川崎医科大学微生物学講座 山田作夫助教授、同大学院顎口腔頸部医科学講座 杉山勝助教授、井上伸吾博士、および同大学院探索医科学講座 小原勝博士、藤原環博士、山口隆之博士を始めとする広島大学歯学部探索医科学講座（細菌学）関係者各位に厚く御礼申し上げます。

さらに、多大なる御支援御協力を戴きました本講座口腔外科学第二教室関係者各位に厚くお礼申し上げます。

最後に常に私を支えてくれた両親ならびに家族に感謝します。

本論文の要旨は以下の学会および研究会において発表した。

- 第 21 回 日本歯科薬物療法学会 (2002 年 2 月、広島)
- 第 75 回 日本細菌学会総会 (2002 年 4 月、横浜)
- 第 50 回 日本化学療法学会 (2002 年 5 月、神戸)
- 第 10 回 国際ブドウ球菌研究会 (2002 年 10 月、筑波)
- 第 23 回 感染症研究会 (2002 年 11 月、広島)
- 第 22 回 西日本化学療法学会 (2002 年 12 月、広島)
- 第 22 回 日本歯科薬物療法学会 (2003 年 2 月、岡山)
- 第 76 回 日本細菌学会総会 (2003 年 4 月、熊本)
- 第 51 回 日本化学療法学会 (2003 年 5 月、横浜)
- 第 49 回 ブドウ球菌研究会 (2003 年 9 月、広島)

本論文の一部は以下の雑誌に掲載された。

Hiromi Nishi, Hitoshi Komatsuzawa, Sakuo Yamada, Tamaki Fujiwara, Masaru Ohara, Kouji Ohta, Masaru Sugiyama, Takenori Ishikawa, and Motoyuki Sugai. (2003)

Moenomycin-resistance is associated with vancomycin-intermediated susceptibility in *Staphylococcus aureus*.

Microbiology and Immunology : 179, 1197-1202.

目次

	ページ
序論 1
本論	
第 1 章 モエノマイシン低感受性突然変異株の分離と性状解析 7
第 1 節 概要 7
第 2 節 材料および方法 8
第 1 項 使用菌株と培養	
第 2 項 突然変異株の分離	
第 3 項 各種細胞壁合成阻害剤の MIC	
第 4 項 各種細胞壁合成阻害剤の population 解析	
第 5 項 透過型電子顕微鏡による形態観察	
第 6 項 増殖速度の測定	
第 7 項 ライソスタフィンの感受性試験	
第 8 項 ペプチドグリカンの精製方法および細胞壁の構造解析	
第 9 項 TGase 領域をもつ蛋白および全 PBP の発現量の比較	
第 10 項 遺伝子のクローニング、形質導入を用いた PBP2 の転写活性測定	
第 11 項 染色体 DNA の調整	
第 12 項 TGase 領域のシーケンス	
第 13 項 モエノマイシン結合能の測定	
第 14 項 抗菌ペプチドの感受性試験	
第 3 節 結果 16
第 1 項 各種細胞壁合成阻害剤の MIC および population 解析	
第 2 項 透過型電子顕微鏡による形態観察	
第 3 項 増殖速度の測定	
第 4 項 ライソスタフィン感受性試験	
第 5 項 細胞壁構造解析	
第 6 項 TGase 領域をもつ蛋白および全 PBP の発現量の比較	
第 7 項 PBP2 の転写活性	
第 8 項 TGase 領域のシーケンス	
第 9 項 モエノマイシン結合能の測定	
第 10 項 抗菌ペプチドの感受性試験	
第 4 節 考察ならびに小括 19

第2章	<i>S. aureus</i> の TGase 領域をコードする遺伝子と蛋白の機能解析 と PBP の機能解析 35
第1節	概要 35
第2節	材料および方法 36
第1項	使用菌株と培養	
第2項	His-tag 組換蛋白の精製	
第3項	抗体作製法	
第4項	モエノマイシンおよびペニシリンビーズの作製	
第5項	モエノマイシン/ペニシリン結合実験	
第6項	抗血清による交差反応試験	
第7項	<i>sgtB</i> 変異株の作製	
第8項	形質導入	
第9項	各種細胞壁合成阻害剤の MIC	
第10項	RP-HPLC を用いた細胞壁構造解析	
第11項	<i>sgtA</i> , <i>sgtB</i> 変異株のライソスタフィン感受性試験	
第12項	<i>sgtB</i> 変異株の全 PBP 発現量の比較	
第13項	<i>pbp3</i> (<i>pbp2B</i>) 変異株の作製	
第14項	<i>pbp</i> 変異株の作製	
第15項	<i>pbp</i> 変異株の MIC	
第16項	<i>pbp3</i> (<i>pbp2B</i>) 変異株の細胞壁構造解析	
第3節	結果 42
第1項	モエノマイシン/ペニシリン結合実験	
第2項	抗血清による交差反応試験	
第3項	各種細胞壁合成阻害剤の MIC	
第4項	細胞壁構造解析	
第5項	作製した <i>sgtA</i> , <i>sgtB</i> 変異株の確認	
第6項	<i>sgtA</i> , <i>sgtB</i> 変異株のライソスタフィン感受性試験	
第7項	<i>sgtB</i> 変異株の全 PBP の発現量の比較	
第8項	<i>pbp3</i> (<i>pbp2B</i>) 変異株の各種細胞壁合成阻害剤の MIC	
第9項	<i>pbp3</i> (<i>pbp2B</i>) 変異株の細胞壁構造解析	
第4節	考察ならびに小括 45
第3章	Tn551 挿入モエノマイシン低感受性変異株の分離 と性状解析 65

第1節	概要 65
第2節	材料および方法 66
第1項	使用菌株と培養	
第2項	Tn551 挿入変異株の分離	
第3項	各種細胞壁合成阻害剤の MIC	
第4項	Backcross 株、Genetic outcross 株の作製	
第5項	各種細胞壁合成阻害剤の population 解析	
第6項	Tn551 挿入領域の遺伝子同定	
第7項	増殖速度の測定	
第8項	抗菌ペプチドの感受性試験	
第9項	<i>lysC</i> 変異株(genetic outcross 株)の作製と解析	
第10項	<i>lysC</i> 相補株の作製と解析	
第11項	細胞膜の脂質解析	
第12項	細菌細胞の荷電測定試験ならびに RP-HPLC を用いた細胞壁構造解析	
第13項	モエノマイシンおよびバンコマイシン結合能の測定	
第3節	結果 72
第1項	モエノマイシン低感受性変異株の分離	
第2項	各種細胞壁合成阻害剤の MIC および population 解析	
第3項	Tn551 挿入領域の遺伝子同定	
第4項	増殖速度の測定	
第5項	抗菌ペプチドの感受性試験	
第6項	細胞膜の脂質解析	
第7項	細胞壁構造解析	
第8項	モエノマイシンおよびバンコマイシン結合能	
第9項	菌体の電位測定	
第4節	考察ならびに小括 75
第4章	Tn551 挿入ライソスタフィン低感受性変異株の分離 と性状解析 90
第1節	概要 90
第2節	材料および方法 91
第1項	使用菌株と培養	
第2項	Tn551 挿入変異株の分離	
第3項	各種細胞壁合成阻害剤の MIC	
第4項	Backcross 株の作製	

第5項	各種細胞壁合成阻害剤の population 解析	
第6項	Tn551 挿入領域の遺伝子同定	
第7項	透過型電子顕微鏡による形態観察	
第8項	バクテリオファージ 80 α 感受性試験	
第9項	バンコマイシン耐性変異株の出現頻度	
第10項	細胞壁構造解析	
第11項	MALDI-TOF/MS を用いた質量分析	
第12項	バンコマイシン結合能の測定試験	
第13項	ライソスタフィン感受性試験	
第14項	ライソスタフィン結合能試験	
第15項	campbell type integration による <i>gff</i> 変異株の作製	
第16項	抗菌ペプチドの感受性試験	
第17項	タイコ酸定量	
第3節	結果 96
第1項	ライソスタフィン低感受性変異株の分離	
第2項	各種細胞壁合成阻害剤の MIC および population 解析	
第3項	Tn551 挿入領域の遺伝子同定	
第4項	透過型電子顕微鏡による形態観察	
第5項	バクテリオファージ 80 α 感受性試験	
第6項	バンコマイシン耐性変異株の出現頻度	
第7項	細胞壁構造解析	
第8項	MALDI-TOF/MS を用いた質量分析	
第9項	バンコマイシン結合能試験	
第10項	ライソスタフィン感受性試験	
第11項	ライソスタフィン結合能試験	
第12項	campbell type integration 変異株のライソスタフィン感受性試験	
第13項	抗菌ペプチドの感受性試験	
第14項	タイコ酸定量	
第4節	考察ならびに小括 101
総括	 117
参考文献	 119

序論

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) はヒトの鼻腔や口腔に常在し、口腔感染症においては顎骨髄炎や膿瘍などの起炎菌として知られている。この治療には β -ラクタム剤が多用されてきたが、外来性に *mecA* 遺伝子を獲得することでメチシリンに耐性を示す黄色ブドウ球菌 (MRSA) が出現し、院内感染の主要な原因菌として問題にされている[30][52][56]。また現在までに、MRSA 感染症に有効とされているバンコマイシンに低感受性を示す菌も日本、アメリカ、ヨーロッパ各国において確認され [7][9][36][53][75][77]、さらに *vanA* 遺伝子の変異によりバンコマイシンに高度耐性を示す菌も出現し[12][13]、感染症対策は深刻化している。

細胞壁合成阻害剤であるメチシリンやバンコマイシンなどの抗生物質は、細胞壁の主要成分であるペプチドグリカンの合成を阻害し抗菌力を発揮している。一般に *S. aureus* のペプチドグリカンは、2種類の糖である *N*-アセチルグルコサミンと *N*-アセチルムラミン酸が交互に β -1,4 グリコシド結合したグリカン鎖と、グリカン鎖の *N*-アセチルムラミン酸に4つのペプチド *L*-alanyl-*D*-glutamyl-*L*-lysyl-*D*-Alanine がアミド結合したペプチド鎖が基本構造を形成し、さらに、ペプチド鎖の *L*-lysine のアミノ基と、隣り合うペプチド鎖の *D*-Alanine のカルボキシル基末端との間を5つの glycine が架橋した網目状構造をとっており (図 0-1)、その架橋度は 90%程度である。

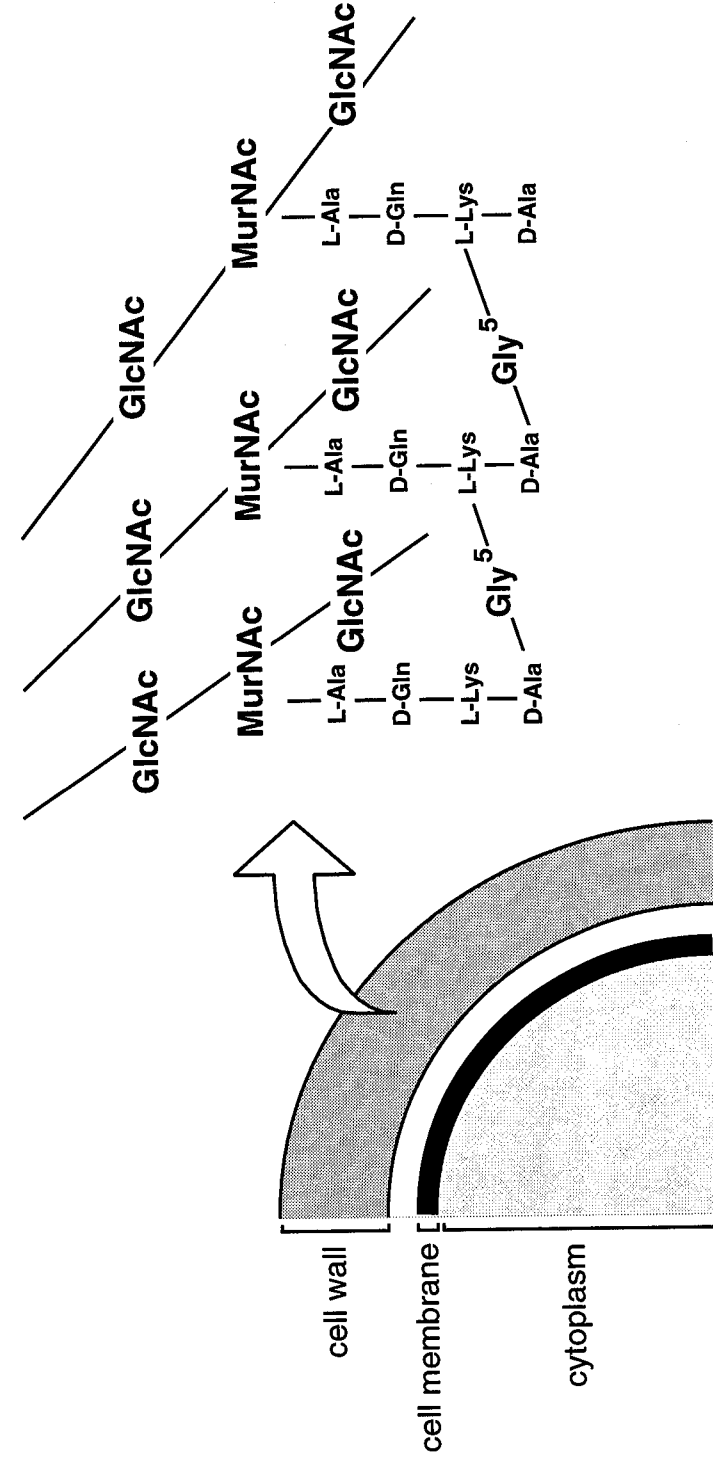
細胞壁ペプチドグリカンは細胞外から取り込んだ糖を材料として、細胞質内で種々の反応を経て、細胞膜上でペプチドグリカンの前駆体が形成される。バンコマイシンはこの新しく作られた前駆体が既存のペプチドグリカンに組み込まれる過程を阻害し [8]、 β ラクタム剤はペプチドグリカンの架橋形成を担う酵素であるトランスペプチダーゼ (TPase) を阻害し、抗菌力を発揮する[67]。

図 0-2 にバンコマイシンの作用機序の詳細を示す。バンコマイシンは、テトラペプチド鎖末端の *D*-alanine-*D*-alanine を認識して結合する。このテトラペプチド鎖末端の *D*-alanine-*D*-alanine は細胞壁ペプチドグリカンと細胞膜ペプチドグリカン前駆体に存在するが、バンコマイシン本来の抗菌力は新しく作られたペプチドグリカン前駆体の *D*-alanine-*D*-alanine に結合して、既存のペプチドグリカンへの組込を阻害することで抗菌力を発揮する [21]。このテトラペプチド鎖末端の *D*-alanine-*D*-alanine はグリシン 5 量体による架橋形成をする際、*D*-alanine を一つ消失し構造が変化するため、架橋形成部位にはバンコマイシンは結合不能となる。図 0-3 は、バンコマイシンの低感受性の獲得機序を示す。バンコマイシン低感受性菌では感受性菌に比べ、細胞壁が肥厚し、ペプチドグリカンの架橋度が減少していることが報告されている[17][18][32]。このため細胞壁の *D*-alanine-*D*-alanine の数が増加し、細胞壁にトラップされるバンコマイシン量が増加するため、バンコマイシンは本来の作用点である細胞膜のペプチドグリカン前駆体にまで到達が困難となり、低感受性になるとされている[9][17][44][75]。が、細胞壁の肥厚に関与する因子などは未だ不明である。

小松澤らは、MRSA 株である COL 株から実験的に分離したバンコマイシン低感受性突然変異株は、細胞壁が肥厚することに加えて、モエノマイシンという細胞壁合成阻害剤にも低感受性を示したことを報告している[44]。このモエノマイシンは、図 0-4 に示すように、細胞膜上で新しく作られたペプチドグリカンの前駆体同士の結合や、ペプチドグリカン前駆体の既存のペプチドグリカンへの組込を担う酵素であるトランスグリコシラーゼ (TGase) に作用し、それらの反応を阻

害する作用をもつ細胞壁合成阻害剤の一種である[2] [28] [37] [54]。バンコマイシンもモエノマイシンと同様にペプチドグリカン前駆体の組込を阻害する薬剤であるが、バンコマイシンは基質に、モエノマイシンは酵素に作用するという点で異なっている。

本研究では、バンコマイシンに対する低感受性に影響を与える因子を解明することを目的とし、バンコマイシンの低感受性にモエノマイシンの感受性に影響を与える因子が関与している可能性を考え、突然変異のモエノマイシン低感受性変異株と Tn551 挿入モエノマイシン低感受性変異株を分離してバンコマイシンの感受性との関連性を検討し、性状解析を行って両薬剤の感受性に影響する因子を検討した。また、モエノマイシンの標的である TGase の解析、および細胞壁の肥厚に関わる因子を同定、その機能について検討を行った。



黄色ブドウ球菌

図0-1 黄色ブドウ球菌の構造と細胞壁ペプチドグリカン

GlcNAc, N-acetylglucosamine; MurNAc, N-acetylmuramic acid; L-Ala, L-alanine; D-Ala, D-alanine; D-Gln, D-glutamine; L-Lys, L-lysine; Gly, glycine

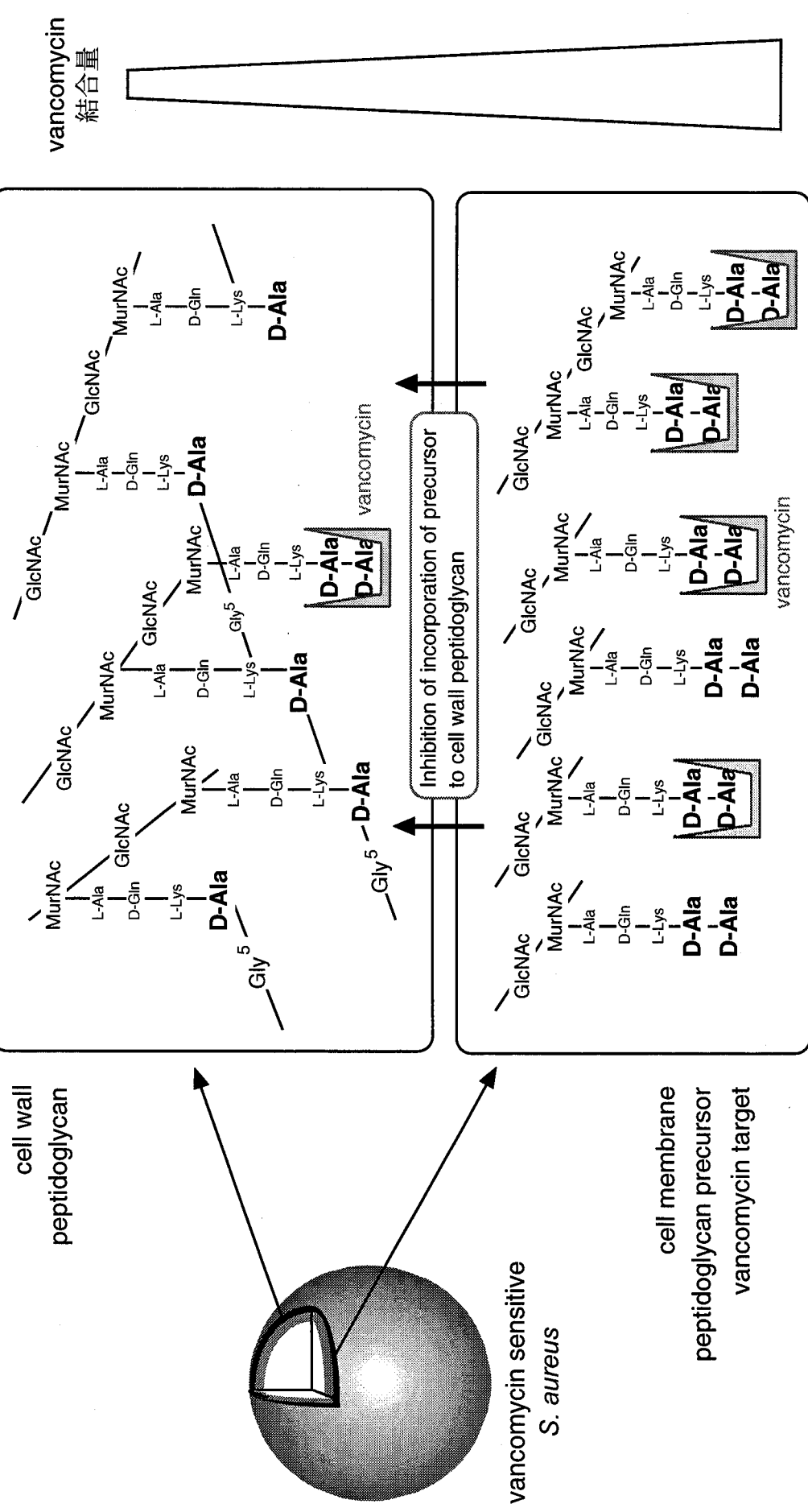


図0-2 バンコマイシンの作用機序

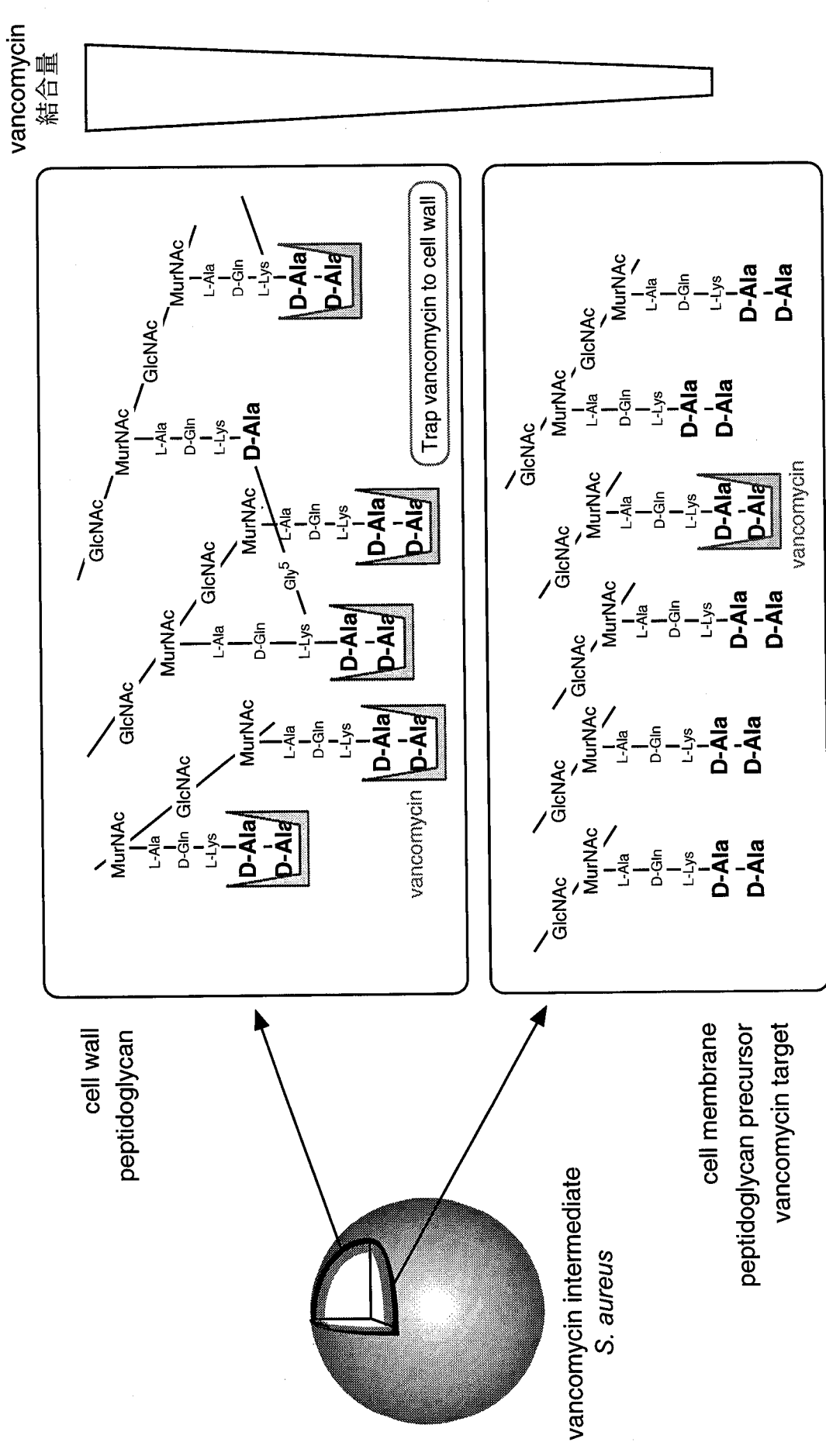


図0-3 バンコマイシンの低感受性獲得機序

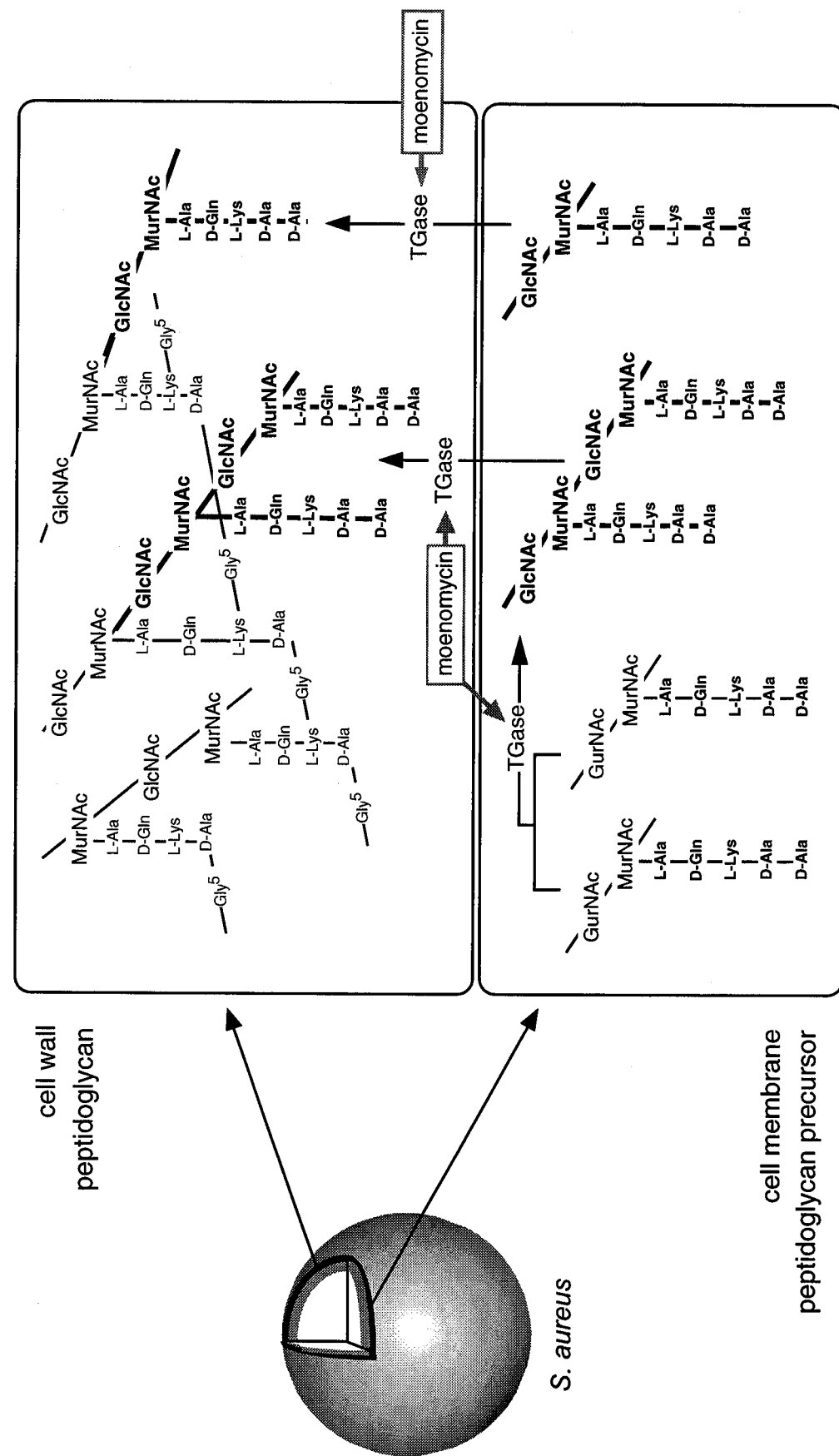


図0-4 モエノマイシンの作用機序

本論

第1章 モエノマイシン低感受性突然変異株の分離と性状解析

第1節 概要

バンコマイシン低感受性機序にモエノマイシンの感受性に影響を与える因子が関与している可能性を考え、モエノマイシンに対する感受性に影響する因子を解明し、バンコマイシン低感受性化機序を解析することにした。このため、第1章ではモエノマイシンに低感受性となる突然変異株を実験的に作製し、その性状解析を行った。

MRSA 5 株とメチシリン感受性黄色ブドウ球菌 (MSSA) 2 株から分離した変異株 7 株の薬剤感受性を測定したところ、バンコマイシンおよびバンコマイシンと同じ作用をもつグリコペプチド系抗生物質であるテイコプラニンには 8 倍感受性が低下した。また、β-ラクタム剤であるメチシリン、オキサシリンの感受性は 4 倍増大した。分離した突然変異株が全てバンコマイシンにも低感受性を示したことから、変異株の性状をさらに解析した。実験的に分離したバンコマイシン低感受性突然変異株は親株に比べ細胞壁に肥厚が見られたことから、今回分離した MRSA 2 株と MSSA 1 株を透過型電子顕微鏡で観察した結果、全ての変異株で細胞壁の肥厚が観察された。さらに、親株と変異株の増殖速度およびライソスタフィンの感受性を検討した結果、親株に比べ増殖速度は遅延し、ライソスタフィンの感受性は減少した。細胞壁の構造変化について検討するため、精製した細胞壁ペプチドグリカンを用いて構造解析を行った結果、グリカン鎖長の増大が観察された。細胞壁の構造に変化を来したことから、モエノマイシン低感受性化にはモエノマイシンの標的である TGase 活性が関与している可能性が示唆されたため、TGase 領域をもつ *pbp2* と monofunctional TGase 領域をコードする *sgtA*, *sgtB* のプロモーター領域を含む全塩基配列を調べたところ、親株と変異株とで違いは認められなかった。また、実験的に分離したバンコマイシン低感受性突然変異株は PBP2 の発現量が増加するという報告があるため、全てのPBPについて発現量およびPBP2 のプロモーター活性を検討したが、親株と変異株とで違いは認められなかった。

以上より、突然変異株のモエノマイシンおよびバンコマイシンの感受性に影響を与える因子は TGase 自体には変化がなかったことから、TGase に影響をする別の因子が感受性に関与していると示唆された。

第2節 材料および方法

第1項 使用菌株と培養

菌株は MRSA である COL、BB270、KSA8、NCTC10443、BCL1 とメチシリン感受性黄色ブド

ウ球菌(methicillin-susceptible *S. aureus*:MSSA)である BCL3 と RN450 を使用した。培地は Trypticase soy broth (TSB, Becton and Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA) に 37℃ にて振とう培養を行った。必要なときにはクロラムフェニコール (CP; Sigma chemical Co.) 10 µg/ml を添加して培養し、実験に用いた。

第2項 突然変異株の分離

MRSA 株 5 株、MSSA 株 2 株を TSB で OD=1.0 (吸光光度計波長 ;660nm, Hitachi Engineering Co., Ltd, Yokohama, Japan) (10^9 cells/ml) に達するまで 37℃ で培養した。その後、親株では増殖不可能な濃度である 10 MIC (0.3 µg/ml) もしくは 8 MIC (0.24 µg/ml) のモエノマイシン A (Aventis Pharma, Frankfurt-M, Germany) を含む TSB-agar (TSA) に被検菌を 100 µl (10^8 cells/100 µl) 接種し 37℃ にて 24 時間静置培養した。生育したコロニーを TSB にうえつぎ、OD₆₆₀=1.0 に達するまで 37℃ で培養後、再び MRSA 株は 10 MIC、MSSA 株は 8 MIC のモエノマイシンを含む TSA に被検菌を 100 µl 播いた。この操作を 3 回繰り返し、生育したコロニーにおけるモエノマイシンの MIC を微量液体希釈法にて測定した。すなわち、96 well plate (Nalge Nunc International, MD, USA) を用い 1 µg/ml 濃度より 2 倍系列希釈のモエノマイシンを含む TSB に、培養した被検菌を最終濃度 10^7 cells/ml となるように接種し、37℃ 24 時間静置培養後に肉眼的に増殖が完全に阻害された最低濃度を MIC とした。コロニーのうちで、モエノマイシンの MIC がそれら親株と比べ 8 倍以上上昇した株について、TSB にて 37℃ 24 時間振とう培養後、さらに 2 回継代培養を行った。培養した被検菌のモエノマイシンの MIC を測定し、モエノマイシンの感受性に変化がないことを確認した株をモエノマイシン低感受性突然変異株として第3項からの実験に用いた。

第3項 各種細胞壁合成阻害剤の MIC

分離したモエノマイシン低感受性突然変異株 17 株 (HN022~HN038) とそれら親株のモエノマイシン以外の細胞壁合成阻害剤の感受性を検討するため、種々の化学療法剤の MIC (最小発育阻止濃度; minimum inhibitory concentration) を微量液体希釈法により測定した[46]。化学療法剤は、β-ラクタム剤であるメチシリン (DMPPC; Sigma chemical Co.)、オキサシリン (MPIP; Sigma chemical Co.)、セフトゾキシム (CZX; Merck sharp and Dohme research laboratories, MD, USA)、β-ラクタム剤以外の細胞壁合成阻害剤であるホスホマイシン (FOM; WAKO Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka)、バシトラシン (BC; Sigma chemical Co.)、バンコマイシン (VCM; Sigma chemical Co.)、およびテイコプラニン (TP; Sigma chemical Co.) を用いて測定した。

第4項 各種細胞壁合成阻害剤の population 解析

変異株の薬剤感受性をさらに検討するために、population 解析を行った[45]。種々の濃度のメチシリン、バンコマイシン、モエノマイシンを含む TSB 寒天培地に、TSB で被検菌を OD_{660nm} =1.0

に達するまで培養し、 10^2 倍、 10^4 倍、 10^6 倍希釈した検体を 100 µl 播いて、37℃ で 48 時間培養後、コロニー数を測定し、 10^9 個の菌を播いたときの生菌数をグラフに表した。

第5項 透過型電子顕微鏡による形態観察

被検菌を TSB 3 ml にて 37℃、24 時間振とう培養を行い、遠心 ($10,000 \times g$, 10 min, 4℃) して集菌した。その後、菌体をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.2 g, KH_2PO_4 0.14 g, NaCl 8.0 g, KCl 0.2 g per liter) にて 3 回洗浄し、3% 細菌用寒天にて氷上で固定、包埋した。固定した後、スパーテルにて細分化し、2.5% グルタルアルデヒドで 4℃、2 時間固定した。PBS にて洗浄後、さらに 1% OsO_4 にて 2 時間氷上で固定した。その後、エタノール系列希釈後 (50%、70%、90%、95%) 15 分毎に脱水し、Spirr's Epon にて包埋した。これをダイヤモンドナイフおよびウルトラミクロトームにて超薄切片を作製し、JEM-2000 EX-II electron microscope (日本電子, 東京), 80 kV あるいは 100 kV により透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察を行った。

第6項 増殖速度の測定

分離したモエノマイシン低感受性突然変異株 7 株 (HN023: COL-MM, HN024: BB270-MM, HN027: KSA8-MM, HN029: NCTC10443-MM, HN033: BCL1-MM, HN035: BCL3-MM, HN038: RN450-MM) とそれら親株を合わせた計 14 株を、37℃ で OD_{660nm} =1.0 まで培養した被検菌を 50 µl ずつ TSB 10ml にうえつぎ、経時的に濁度の増加を吸光光度計で 660 nm の波長で測定した。

第7項 ライソスタフィン感受性試験

分離したモエノマイシン低感受性突然変異株 7 株とそれら親株を合わせた計 14 株を TSB にて一晩 37℃ で培養後遠心 ($9,000 \times g$, 10 min, 4℃) し、得られた菌体を 50 mM Tris-HCl バッファー (pH 7.4) にて洗浄後、同バッファーに OD_{660nm} =0.8 となるように懸濁した。その 6 ml にライソスタフィン (Sigma chemical Co.) を最終濃度 0.005 mg/ml になるように加え、37℃ で反応させた。経時的に濁度の減少を吸光光度計により、660 nm の波長で測定した。

第8項 ペプチドグリカンの精製方法および細胞壁構造解析

S. aureus のペプチドグリカンの精製は Fuqua らの方法[25]に準じて行った。被検菌を TSB 800 ml で OD_{660nm} =0.8 に達するまで 37℃ で培養し、遠心 ($9,000 \times g$, 10 min, 4℃) 後、得られた菌体を 0.1M リン酸バッファー (pH 6.8) にて洗浄後、1M NaCl 10ml に懸濁し、精製水で 3 回洗浄した glass beads 10 g (B. Braun Biothec. Int., Melsungen, Germany) を加え 1 M NaCl にて計 25 ml となるようメスアップ後、CO₂ 冷却下で cell homogenizer (B. Braun Biothec. Int.) にて 1 分間、7 回菌体を破碎した。破碎画分を遠心 ($2,000 \times g$, $9,000 \times g$, 15 min, 4℃) 後、上清を 0.1 M リン酸バッファー (pH 6.8)

で洗浄し遠心 (9,000 x g, 15 min, 4°C) した沈渣を、さらに精製水で6回洗浄して SDS を可及的に除いた。これを 1 M Tris-HCl (pH 7.0) 10 ml に懸濁後、トリブシン (最終濃度 200 µg/ml) (Nacal Tesque, Kyoto, Japan)、1 M CaCl₂ (最終濃度 10 mM) を添加し、37°C で 18 時間処理してペプチドグリカンに強固に結合している ProteinA などの蛋白を除いた。遠心 (9,000 x g, 15 min, 4°C) 後、1 M Tris-HCl (pH 7.0)、1 M NaCl 含有 1 M Tris-HCl (pH 7.0)、1 M Tris-HCl (pH 7.0) にて順次洗浄し、最後にイオン交換水で 3 回洗浄した。得られた沈渣を 300 µl ずつ分注し、40 % フッ化水素水 1 ml を加え 4 °C で 18 時間振とうしてタイコ酸を除いた。イオン交換水で 4 回洗浄後、得られたペプチドグリカンを凍結乾燥 (タイテック, 東京) して精製したペプチドグリカンを以下の実験に用いた。

構造解析までの方法は図 1-5 に示した。精製したペプチドグリカン 1.3 mg を 4 mM MgCl₂ 含有 10 mM Sodium citrate (pH 7.0) 300 µl または 4 mM MgCl₂ 含有 10 mM リン酸バッファー (pH 6.8) に懸濁し、10 mg/ml ムタノリシン (Sigma chemical Co.) 50 µl または 10 mg/ml ライソスタフィン (WAKO Pure Chemical Industries.) を添加したものに、10 mg/ml sodium azide 5 µl を添加して、37°C、18 時間処理しペプチドグリカンを完全に可溶化した。その後 20% リン酸 (WAKO Pure Chemical Industries, Ltd.) で pH 4.0 に調整し、100°C 5 分間加熱して酵素を失活させた。その後、1.5 M ホウ酸ナトリウムバッファー (pH 9.0) にて pH 7.5 に調整後、水酸化ホウ素ナトリウム 10 mg を添加し、室温で 15 分間反応させ糖を還元させた。その後過剰の還元剤を中和するために 20% リン酸を添加し pH 4.0 に調整後、4 M NaOH を添加し pH 11.5~12.5 に調整して 37°C 1.5 時間反応させ、O-アセチル基を OH 基に変換した。その後 4 M HCl で pH 2.5 に調整後、遠心 (15,000 x g, 5 min, 4°C) した。その上清をセルロースメンブレンフィルター (pore size, 0.22µm; Nihon Millipore Kogyo K.K., Yonezawa, Japan) にて濾過し、サンプルとした。調整したサンプルは deJonge らの方法で構造解析を行った [19] [27]。すなわちサンプルを逆相カラム (Hypersil ODS 5 µm, 4.6 x 250 mm, Supelco Inc., Aigma Aldrich, USA) を用いて逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) にて 5 % (vol/vol) メタノール含有 50 mM リン酸バッファー (pH 2.5) から 30 % (vol/vol) メタノール含有 50 mM リン酸バッファー (pH 2.8) になるように、210 分間のリニアグラディエントを行い、UV_{206nm} でモニタリングした。45°C にて流速は 0.5 ml/min で行ない、ムロペプチド分析、ペプチドグリカンの架橋度の算出およびグリカン鎖長解析を行った。

第9項 TGase 領域をもつ蛋白および全 PBP の発現量の比較

TSB にて OD_{660nm} = 0.8 に達するまで 37°C で培養した菌体を遠心 (8,500 rpm, 10 min, 4°C) し、PBS にて洗浄後 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) にて懸濁し、ライソスタフィン (最終濃度 100 µg/ml) を添加後 37°C 15 分処理し菌体を破壊した。これを遠心 (10,000 rpm, 25 min, 4°C) して菌体を取り除き、上清をさらに超遠心 (100,000 x g, 1 hr, 4°C) して、得られた沈渣を 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) で懸濁して細胞質膜画分として使用した。

タンパク質濃度は BCA protein assay reagent (Pierce, Rockford, IL, USA) を使用して決定した [76]。SDS-PAGE は Laemmli の方法 [50] に従い、12 % のポリアクリルアミドゲルを使用した。サンプル

をサンプル緩衝液 [50 mM Tris-HCl (pH 6.5), 2 % SDS, 2 % 2-mercaptoethanol (Katayama Chemical, Osaka, Japan), 10 % glycerol (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), 0.1 % bromophenol blue 溶液 (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)] と等量混和し沸騰水中で 5 min 処理し、ウェルに注入した。Western 解析はミニトランスプロット (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) を用いて行い、転写されたニトロセルロースメンブレン (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) を TBS バッファー (Tween 20 0.5ml, Tris 6.06 g, NaCl 8.76 g, HCl にて pH 8.0 に調整) にて洗浄した。skim milk 溶液 (skim milk 1 g を TBS 50 ml に溶解) 中にてブロッキング後、1 次抗体として skim milk (1 %) 溶液にて 1,000 倍希釈した抗 PBP1, 2, 3, 4, 2A, SgtA, SgtB 血清と human IgG (Zymed Laboratories, Inc., South San Francisco, CA, USA) を最終濃度 42 µg/ml で加え 37°C にて 1 時間反応させた。TBS にて洗浄後、2 次抗体として TBS にて 1,000 倍希釈した peroxidase 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham Life Science, Buckinghamshire, United Kingdom) と human IgG を最終濃度 42 µg/ml で加え 37°C にて 1 時間反応させた。発色は Renaissance ウエスタンプロット化学発光試薬 (Dupont NEN, Boston, MA, USA) を用いてバンドを検出した。

第10項 遺伝子クローニング、形質導入を用いた PBP2 の転写活性測定

図 1-8 に示すように、PBP2 は ORF 直前に位置するプロモーターに加え、ORF の上流およそ 600 bp の位置にもプロモーターを有しており、転写は 2 種類のプロモーターによって制御されている [64]。PBP2 の転写活性を測定するために、promoterless *xylE* gene をコードするベクター pSL24 [14] に PBP2 のプロモーターをクローニングして作製した。

クローニングはまず、表 1-2 に示すこれらのプライマーを用いて、*S. aureus* COL 株の染色体 DNA を鋳型として Expand™ High Fidelity PCR System (Roche, Mannheim, Germany) を用いた PCR 反応により各遺伝子の増幅を行った。この PCR 産物を pGEM-T Easy Vector System (Promega Co., Madison, WI, USA) に TA クローニングを行い、2 種類のプロモーター領域を有するフラグメントを HK4616 (PBP2 promoter-dual type)、PBP2 の ORF の直前のプロモーター領域を有するフラグメントを HK4617 (PBP2 promoter-single type) として分離した。

クローニングした HK4616 および HK4617 の DNA 断片を、制限酵素および shrimp alkaline phosphatase (Roche) 処理したクローニングベクター pSL24 に回収した DNA 断片を加え、T4 ligase (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan) を用いて 16°C で一晩反応し、ライゲーションを行った。その後エタノール沈澱処理したライゲーションサンプル 2 µl に *E. coli* XLII のコンピテントセル 40 µl を混合し、129 Ω、2.0 kV の条件で Electro cell manipulator 600 (BTX Electroporation system, BTX Inc., San Diego, Calif., USA) を用いて Electroporation を行った。直後に LB broth を加え 1 時間 37°C で静置し、その後アンピシリン (100 µg/ml) 含有 LB 寒天培地にまき、一晩 37°C で培養後生育したコロニーを分離した (表 1-1)。

目的遺伝子が pSL24 に再クローニングされていることを確認し、求めるインサートを持つ株を HK4618 (PBP2 promoter-dual type)、HK4619 (PBP2 promoter-single type) として分離した。そこで、得られた HK4618, HK4619 についてプラスミドの精製を plasmid miniprep kit (Bio-Rad) を用いて

行い、精製プラスミドにコンピテントセル用に調整した RN4220 40 μ l を混合し、72 Ω 、2.2 kV の条件で Electroporation を行った。直後に 1.1 M スクロース含有 TSB を加え 1 時間 37°C で静置し、その後 CP 10 μ g/ml 含有 TSA にまき、一晚 37°C で培養後生育したコロニー HK10030 (PBP2 promoter-dual type)、HK10031 (PBP2 promoter-single type) を分離した (表 1-1)。作製した PBP2 プロモーター活性測定用菌株 2 株の持つプラスミドを、親株と突然変異株 COL-MM に形質導入した。

形質導入とはすなわち、HK10030、HK10031 を CP 10 μ g/ml 含有 TSB で一晚培養し、培養液 10 ml を遠心 (9,000 x g, 10 min, 4°C) した後、1 ml の TSB で懸濁した。その菌液 100 μ l、バクテリオファージ 80 α [78] 10 μ l と phage top agar (casamino acid 3.0 g, yeast extract 3.0 g, NaCl 5.9 g, agar 5.0 g per liter) 4 ml を混合し、あらかじめ作製しておいた phage bottom agar (casamino acid 3.0 g, yeast extract 3.0 g, NaCl 5.9 g, agar 15.0 g per liter) 上に播き、37°C で 24 時間培養した。その後 phage top agar のみをかきとり、2 ml の phage buffer (0.1 M MgSO₄ 10.0 ml, 0.4 M CaCl₂ 10.0 ml, 2.5 M Tris-HCl (pH 7.8) 20 ml, NaCl 5.9 g, gelatin 1.0 g per liter) を加え 2 時間 4°C で静置後、遠心 (9,000 x g, 10 min, 4°C) し、上清を 0.2 μ m のセルロースメンブレンで濾過した溶液を phage lysate とした。TSB で一晚培養した *S. aureus* COL および BB270 の培養液 10 ml をそれぞれ遠心 (9,000 x g, 10 min, 4°C) した後、1 ml の TSB で懸濁し、その菌液 100 μ l と作製した phage lysate 20 μ l と phage buffer 100 μ l を混合し、37°C で 20 分間振とうさせた後、0.3 GL top agar (casamino acid 3.0 g, yeast extract 3.0 g, NaCl 5.9 g, 60 % sodium lactate 3.3 ml, glycerol 2.0 ml, trisodium citrate dihydrate 0.5 g, agar 7.5 g per liter) 3 ml を加え、あらかじめ作製しておいた CP 10 μ g/ml 含有 0.3 GL bottom agar (casamino acid 3.0 g, yeast extract 3.0 g, NaCl 5.9 g, 60 % sodium lactate 3.3 ml, glycerol 2.0 ml, trisodium citrate dihydrate 0.5 g, agar 15.0 g) に播き、生育したコロニー HN009, HN010, HN011, HN012 を分離した。

xyIE 遺伝子はカテコールを分解し、発色させる酵素である catechol 2,3-dideoxygenase をコードしている。Zukowski らの方法に従い、プロモーター欠失 *xyIE* 遺伝子をコードするベクター pSL24 を用いて catechol 2,3-dideoxygenase assay によるプロモーター活性の測定を行った [92]。OD_{660nm} = 1.0 に達するまで 37°C で培養した菌体を遠心 (9,000 x g, 5 min, 4°C) 後、PBS にて洗浄した。その後、菌体を 1 ml APE バッファー (100 mM KPO₄ バッファー (pH 7.5) (K₂HPO₄ 1.2 g, KH₂PO₄ 0.45 g per 100 ml)、20 mM EDTA、10 % acetone) に懸濁し、ライソスタフィン (最終濃度 30 μ g/ml) 添加後、37°C で 30 分間静置した。遠心 (15,000 x g, 10 min, 4°C) した上清をサンプルとして用いた。*xyIE* 用に作製したサンプルのタンパク定量を行って、タンパク量を等しく調整した。*XyIE* assay はサンプル 0.20 ml と 2.8 ml 100 mM KPO₄ バッファー (pH 7.5) に 5 μ l カテコール溶液 (55 mg/ml) を加え 37°C の恒温槽におき、1 分ごとの濁度の測定を吸光光度計 OD₃₇₅ にて 5 分間行った。同様の操作を 3 回行い、1 分間に 12 OD₃₇₅ の増加を 1 unit とし、miliunits/miligram でプロモーター活性の検出を行った。

第 11 項 染色体 DNA 調整

分離した突然変異株 7 株とそれら親株の染色体 DNA を抽出した。すなわち 5 ml の TSB で OD_{660nm} = 1.0 に達するまで 37°C で培養した 14 株を遠心 (9,000 x g, 10 min, 4°C) し、得られた菌体

を 1 ml の CS バッファー (100 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 10 mM EDTA) で洗浄し、700 μ l の CS バッファーに懸濁し、ライソスタフィンを 50 μ g/ml になるように添加し、37°C で 30 分間処理した。その後氷上で 5 分間冷却後、さらに protenase K (最終濃度 0.1 mg/ml)、SDS (最終濃度 1 %) を加え 50°C、120 分間 (~24 時間) 静置した。次に等量の飽和フェノールにシリコンを適量加え、30 秒間ボルテックスミキサーにて強く懸濁後、遠心 (15,000 x g, 10 min, 4°C) して上清を回収した。さらに、等量のクロロホルムにシリコンを適量加え、30 秒間ボルテックスミキサーにて強く懸濁後、遠心 (15,000 x g, 10 min, 4°C) して上清を回収し、そこに 2.5 倍量の冷 99.5 % エタノールを加え、析出した染色体 DNA を冷 70 % エタノールで洗浄乾燥後、TE バッファー (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 1 mM EDTA) に溶解して実験に用いた。

第 12 項 TGase 領域のシーケンス

S. aureus のゲノム解析により明らかとなっている TGase 領域をコードする遺伝子である *pbp2*、*sgtA* および *sgtB* および *mecA* のプロモーター領域を含むように (ORF より 1,000 bp 前方かつ 200 bp 後方)、プライマーを設計した (accession number : NC002745, Y14051, AP004827, NC003923)。調整した被検菌 14 株の染色体 DNA は、*Taq* DNA polymerase (Takara) を用い、Gene Amp PCR system 9700 (Perkin-Elmer Applied Biosystems, CA, USA) にて PCR を行い、増幅、精製して用いた。本研究で使用したプライマーは表 1-2 に示した。

PCR 産物を MicroAmp 96-Well Reaction Plate (Perkin-Elmer Applied Biosystems) に 25 μ l ずつ分注し 0.1 μ l Exonuclease I (Amersham pharmacia biotech) (最終濃度 1 unit / sample)、0.2 μ l Shrimp alkaline phosphatase (SAP, Amersham pharmacia biotech) (最終濃度 0.2 unit / sample)、1.7 μ l TE バッファーを加え、37°C 20 分間、80°C 30 分間静置する操作を 2 回繰り返した。この 96-Well Reaction Plate を遠心 (3,000 x g, 1min, 4°C) 後、これをシーケンス PCR 反応の鋳型とした。シーケンス反応は BigDye Terminator v 3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing kit (AB applied Biosystems, Japan)、各プライマーを用いて PCR (96°C 1 min, [96°C 10 sec, 50°C 5 sec, 60°C 4 min] を 25 cycle, 60°C 2 sec, 4°C) した後、室温で一晩かけてエタノール沈殿を行った。その後、遠心 (3,000 x g, 30 min, 4°C) して析出した DNA を沈殿させ、逆向きに遠心 (400 x g, 1min, 4°C) して 99.5 % エタノールを取り除いた。150 μ l 冷 70 % エタノールを加え遠心 (3,000 x g, 15 min, 4°C) 後、逆向きに遠心 (400 x g, 1min, 4°C) して 70 % エタノールを取り除いた。これを乾燥後、30 μ l Hi Di Formamide (Amersham pharmacia biotech) を加え、ボルテックスミキサーにて 5 分間室温で混和した。遠心 (3,000 x g, 1 min, 4°C) し、95°C 2 分間変性後、サンプルをすぐに氷上で 5 分以上冷却し、遠心 (3,000 x g, 1 min, 4°C) して、ABI 3100 sequencer (AB applied Biosystems) にてシーケンスを行った。

得られた DNA シーケンスデータは Sequencher™ DNA sequencing software (Hitachi Software Engineering Co., Ltd, Yokohama, Japan) を用い、アッセンブルを行い全塩基配列を決定した。

第 13 項 モエノマイシン結合能の測定

被検菌 COL と COL-MM を 2 ml TSB にて $OD_{660nm} = 1.0$ に達するまで 37°C で培養後遠心 (15,000 x g, 3 min, 4°C) し、沈渣にモエノマイシン濃度が 10 µg/ml, 1 µg/ml となるように調整した薬液を 2 ml 加え、室温で 15 分間処理した。これを遠心 (15,000 x g, 5 min, 4°C) し、得られた上清をセルロースメンブレンフィルター (pore size, 0.22 µm) にて濾過し、サンプルとした。96 穴 microtiter plate を用いサンプルを 1/8 倍系列希釈した TSB に、培養した COL を最終濃度 10^7 cells/ml となるように接種し、37 °C で 24 時間静置培養し、微量液体希釈法にて MIC を測定した。被検菌と作用させていないモエノマイシン溶液を用いた COL 株の MIC と作用させたモエノマイシン溶液を用いた COL 株の MIC を比較し、被検菌と結合したモエノマイシン量を測定した。

第 14 項 抗菌ペプチドの感受性試験

抗菌ペプチドは defensin および CAP18 を用いた。defensin は、システインを 6 つ有する構造を持っている。また、cathelicidin family に属する抗菌ペプチドはヒトでは唯一 CAP18 のみ報告されている。CAP18 は、18KDa の蛋白として分泌されその後プロセッシングをうけ、C 末端側 37 個のペプチドが抗菌活性を有している。これらの抗菌ペプチドのうち、ヒト上皮細胞が産生する human-β-defensin-1, 2, 3 (hBD1, hBD2, hBD3) [21] [33] [71] [84] およびヒト好中球が産生する cathelicidin family に属する cationic anti microbial protein (hCAP18) [91] を各々合成したペプチドを用いた (表 1-7)。分離した突然変異株 7 株とそれら親株の 14 株を培養後、最終濃度 10^7 cells/ml となるように調整した。10 mM リン酸バッファー (pH 6.8) にて hBD1 および hBD2 は 10, 25, 50 µg/ml に、hBD3 および hCAP18 は 0.5, 1, 2, 5, 10 µg/ml に調整した 200 µl リン酸緩衝液中で 10^5 個の被検菌と作用させ、37 °C で 2 時間静置培養した。これを TSA にまき 37 °C で 24 時間培養し、生育したコロニー数を計測して判定を行った。

第 3 節 結果

第 1 項 各種細胞壁合成阻害剤の MIC および population 解析

MRSA 5 株、MSSA 2 株からモエノマイシンに低感受性となる突然変異株を、各々の菌株から 3 株ずつ分離した (HN022~HN038)。この 3 株の種々の細胞壁合成阻害剤に対する薬剤感受性は、同じ傾向を示したため、このうちの 1 株をモエノマイシン低感受性突然変異株とした (表 1-1)。

これらの変異株のモエノマイシンの MIC は各々の親株に比べ、RN450-MM が 4 倍、BCL1-MM および BCL3-MM が 8 倍、BB270-MM、KSA8-MM、NCTC10443-MM が 16 倍、COL-MM が 32 倍上昇し、耐性を示した (表 1-3)。また、バンコマイシンおよびテイコプラニンの MIC も各々の親株に比べ、1.5~4 倍上昇して耐性を示した。しかし、β-ラクタム剤であるメチシリン、オキサシリンの各種変異株の MIC は各親株に比べ逆に低下し、感受性が上昇した。また、ホスホマイシンの MIC は菌株により感受性に違いが認められ、MRSA 5 株では、親株と変異株とで感受性に違い

が見られなかったものの、MSSA 株である RN450-MM、BCL3-MM の MIC は親株に比べ低下し、感受性が上昇した。population 解析の結果は MIC の結果と同様の傾向が認められた (図 1-1)。すなわち、MRSA 4 株 (BB270-MM を除く) の変異株において、モエノマイシンおよびバンコマイシンのポピュレーションカーブは、変異株の方が親株に比べ右側 (耐性側) に移行し、メチシリンは逆に左側 (感受性側) に移行した。しかし、BB270-MM のモエノマイシンのカーブは親株に比べ右側に移行したが、バンコマイシンおよびメチシリンのカーブは親株と同じ耐性パターンを示した。MSSA 2 株のモエノマイシンおよびバンコマイシンのカーブは、変異株の方が親株に比べ右側に移行したが、メチシリンは親株と同じ耐性パターンを示した。

第 2 項 透過型電子顕微鏡による形態観察

MRSA 2 株 (COL, KSA8)、MSSA 1 株 (RN450) の親株と変異株の透過型電子顕微鏡による形態観察を行った (図 1-2)。結果、3 株の変異株全てが親株に比べ、細胞壁の肥厚が観察された。

第 3 項 増殖速度の測定

以前の報告に、実験的に分離したバンコマイシン低感受性突然変異株の多くは、親株に比べ増殖速度が遅くなるという報告がある [17]。そこで、今回分離したモエノマイシン低感受性突然変異株 7 株についても、増殖速度の測定を行った (図 1-3)。その結果、7 株全ての変異株が親株に比べ増殖速度が若干遅延した。増殖開始から 4 時間後の増殖率は、7 時間後を 100% としたとき、親株 COL が 77%、変異株 COL-MM が 55% であった。他の株も 4 時間後の変異株の増殖率は、親株に比べ 10~25% 程度低下していた。

第 4 項 ライソスタフィン感受性試験

分離した変異株の細胞壁に肥厚が観察されたことから、細胞壁ペプチドグリカンの 5 つのグリシンによる架橋部位を消化する酵素であるライソスタフィンの感受性試験を行った (図 1-4, 表 1-4)。その結果、7 株全ての変異株が親株に比べライソスタフィン添加後の濁度の減少に遅延がみられ、変異株のライソスタフィン感受性が減少した。

第 5 項 細胞壁構造解析

分離した変異株は細胞壁の肥厚やライソスタフィンの感受性に違いが見られたため、変異株は細胞壁の合成系に支障を来している可能性を考え、細胞壁の構造解析を 2 種類の方法で行った (図 1-5)。横軸に溶出された時間、縦軸に溶出量を示すクロマトグラムとして得られる (図 1-6)。

1) ムロペプチド分析：最小基本構造物であるモノマーから順にダイマー、トリマーと、徐々に大きな構造のムロペプチドが溶出される。COL-MM (図 1-6) と KSA8-MM (データ示さず) およ

び各親株のムロペプチドのクロマトグラムを比較すると、2種類の変異株と親株は非常によく似たピークパターンを示した。また溶出時間でおよそ150分以降に得られる oligomeric mucopeptide の量にも違いがなかったことから、ペプチドグリカンの架橋度にも違いは認められなかった。

2) グリカン鎖長解析：短いグリカン鎖から、順に長いグリカン鎖が溶出され、長いグリカン鎖が多いほど、得られるクロマトグラムのピークの山が後方に移行する。COL-MM のグリカン鎖長はCOLに比べ、ピークの山が後方に移行しグリカン鎖長が増大した。

第6項 TGase 領域をもつ蛋白および全 PBP の発現量の比較

以前の報告に、実験的に分離したバンコマイシン低感受性突然変異株は、PBP2 の発現量が増加するという報告がある[59]。そこで、TGase 領域をもつ蛋白 (SgtA, SgtB, PBP2) および *S. aureus* のもつ他の全 PBP (PBP1, 3, 4, 2A) の発現量を抗 PBP および SgtA, SgtB 抗体を用いて Western 解析を行った (図 1-7)。しかし、これら全ての蛋白発現量 (SgtA を除く) は、親株と変異株とで違いが認められなかった。SgtA は *S. aureus* の膜蛋白には検出されず、また、膜蛋白以外の全画分においても検出されなかった。*E. coli* で SgtA を過剰発現させた株では SgtA は検出可能であったことから、*S. aureus* では SgtA は発現していない可能性が考えられた。

第7項 PBP2 の転写活性

PBP2 の発現量に違いは認められなかったが、合わせてプロモーター活性に変化があるか、COL と COL-MM の PBP2 のプロモーター領域の解析を行った (図 1-9)。結果、PBP2 promoter - single type の転写活性は、親株が 12 mU/mg、変異株が 14 mU/mg で有意な差は認められなかった。また、PBP2 promoter - dual type も親株が 110 mU/mg、変異株が 107 mU/mg で有意な差は認められなかった。

第8項 TGase 領域のシーケンス

モエノマイシンは TGase に結合し、その活性を阻害すると考えられている[2] [28] [37] [54]。変異株はこの TGase 領域に変異がある可能性が考えられるため、*S. aureus* の TGase 領域をコードする遺伝子 (*sgtA*, *sgtB*, *pbp2*) および PBP2A をコードする *mecA* の DNA シーケンスを行った (表 1-5)。しかし、親株と変異株とで塩基配列に違いは認められなかった。

第9項 モエノマイシン結合能の測定

変異株はモエノマイシンの感受性が低下したことから、親株に比べモエノマイシンが本来の標的以外の部位に捕そくされているもしくはモエノマイシンと菌体との親和性が変化している可能性が考えられるため、モエノマイシンと菌体との結合量を測定した (表 1-6)。

被検菌と未作用のモエノマイシンを用いた COL の MIC と、被検菌 (COL, COL-MM とモエノマ

イシンを作用させ、菌体にモエノマイシンを結合させた残りのモエノマイシンを用いた COL の MIC を比べると、前者が 0.016 $\mu\text{g/ml}$ 、後者が 0.125 $\mu\text{g/ml}$ で後者の MIC が減少した。よって、被検菌とモエノマイシンが結合していることは確認された。しかし、親株と変異株に結合したモエノマイシン量は両株共に 24 時間で 0.109 $\mu\text{g}/10^9$ cells、48 時間で 0.219 $\mu\text{g}/10^9$ cells であり、結合量に違いは認められなかった。

第10項 抗菌ペプチドの感受性試験

バンコマイシンの感受性に影響を与える因子として抗菌ペプチドの感受性にも影響を与える *S. aureus* の *mprF* が報告されている [69]。そこで、分離した突然変異株においても抗菌ペプチドの感受性に影響を及ぼしている可能性が考えられるため、抗菌ペプチドの感受性を測定した (表 1-8)。結果、分離した 7 株の変異株全て、親株と感受性に違いは認められなかった。

第4節 考察ならびに小括

本実験で、MRSA 5 株、MSSA 2 株から分離したモエノマイシン低感受性突然変異株のバンコマイシンの感受性は、親株に比べ、全て 2~16 倍耐性を示した。また、population 解析の結果も同様に、バンコマイシンの感受性が変異株では親株に比べ耐性側に移行した。実験的に分離したバンコマイシン低感受性突然変異株 COL-VM はモエノマイシンにも耐性を示したという報告がある [44]。これらのことから、バンコマイシンの低感受性に影響を与える因子には、モエノマイシンの低感受性に影響を与える因子が関係している可能性が示唆された。

バンコマイシンとモエノマイシンは共に細胞壁合成阻害剤であるが、その作用機序は異なっている。バンコマイシンは細胞壁ペプチドグリカンのペプチド鎖末端の D-alanine-D-alanine を認識して結合する。この D-alanine-D-alanine は細胞壁と細胞膜に存在するが、バンコマイシン本来の抗菌力は、新しく作られたペプチドグリカン前駆体の D-alanine-D-alanine に結合して、新規のペプチドグリカン前駆体が既存のペプチドグリカンに組込まれるのを阻害することで抗菌力を発揮する [8]。またモエノマイシンは、細胞壁合成酵素であるトランスグリコシラーゼ (TGase) すなわち、細胞膜上で新しく作られたペプチドグリカンの前駆体同士を結合したり、前駆体を既存のペプチドグリカンに組み込み、グリカン鎖同士を結合する酵素である TGase に作用し、結合や組込を阻害する事で抗菌力を発揮する [2]。両薬剤共にペプチドグリカン前駆体の組込を阻害する薬剤であるが、その標的となるのが、バンコマイシンは基質、モエノマイシンは酵素という点で異なっている。しかし、バンコマイシンの形をかえた誘導体で、モエノマイシンに近いものは D-alanine-D-alanine に結合するより TGase 阻害が主要な作用であり、またバンコマイシンに近いものは D-alanine-D-alanine に結合しつくと、TGase 作用をもつという報告がある [22] [26]。このことから、両薬剤は非常に類似した構造を有しており、モエノマイシンとバンコマイシンの感受性に影響をおよぼす共通の因子が存在している可能性が強く示唆される。

また、今回分離したモエノマイシン低感受性突然変異株7株の薬剤に対する感受性は各菌株により若干異なっており、モエノマイシンのMICはRN450-MMが4倍、BCL1-MMおよびBCL3-MMが8倍、BB270-MM、KSA8-MM、NCTC10443-MMが16倍、COL-MMが32倍上昇し、耐性を示した。また、バンコマイシンのMICはBB270-MM以外の菌株は2~4倍上昇して耐性を示したが、BB270-MMはほとんど変化がなかった。これらより、モエノマイシンもしくはバンコマイシンの低感受性獲得に関わる因子は各菌株間で同じ挙動を取らないことから低感受性に関与する因子は必ずしも一つではないことが考えられる。

今回分離したモエノマイシン低感受性突然変異株と、バンコマイシン低感受性突然変異株に共通してみられる表現型として、親株に比べ細胞壁の肥厚、グリカン鎖長の増大が観察されている。この細胞壁の肥厚は、バンコマイシン低感受性の獲得メカニズムに強く関与している。すなわち、肥厚した細胞壁においてはペプチドグリカンのD-alanine-D-alanineの数が増加するため、細胞壁に捕そくされるバンコマイシン量が増加する。このため、バンコマイシンは本来の作用点である細胞膜上のペプチドグリカン前駆体にまで到達しにくくなり、低感受性になるとされている[9][17][44][73]。変異株での細胞壁の肥厚は、細胞壁合成のバランスが崩れている事が考えられる。細胞壁の合成は細胞壁合成酵素であるTPaseとTGaseによって担われている。一般にバンコマイシン低感受性変異株は架橋度が減少することが知られているが[9][17][18][32]、今回分離した変異株は架橋度には著明な変化が認められなかった。しかし、 β -ラクタム剤に対する感受性の上昇をおこしたことから、細胞壁合成に支障を来していることが考えられる。

また、変異株にはグリカン鎖長の増大が認められた。グリカン鎖長に影響を及ぼす因子として、合成に関わるTGaseと分解に関わるペプチドグリカン加水分解酵素がある。グリカン鎖の分解には様々な溶菌酵素が関与している可能性が考えられるが、*S. aureus*の産生する主要溶菌酵素のATLの発現量には、親株と違いはなかった。そこで、もう一つの因子であるペプチドグリカンのグリカン鎖を結合する酵素TGaseに着目した。*S. aureus*のゲノム解析により明らかとなっているTGase領域をコードする遺伝子には*pbp2*、*sgtA*、*sgtB*がある[49][88]。そこで、TGase領域をもつSgtA、SgtB、PBP2と、他の全PBPの発現量を検討したが、親株と変異株における全てのPBPとSgtBの発現量に違いはなく、また膜タンパクにおいてSgtAは検出できなかった。発現量の測定では蛋白の構造の違いまでは検出できないため、さらにTGase領域のDNAシーケンスを行ったが、親株と変異株でのTGase領域の塩基配列にも違いは認められなかった。これらのことより、両薬剤の感受性の変化に影響を与える因子は、TGase自体には変化がなかったことから、TGaseに影響をする別の因子すなわち、グリカン鎖長を増大させる因子もしくは前述の細胞壁の肥厚をもたらす因子が関与している可能性が高いことが示唆された。

小括

1. MRSA 5株、MSSA 2株から分離したモエノマイシン低感受性突然変異株のバンコマイシンの感受性は、親株に比べ、全て1.5~4倍耐性を示した。
2. 検討したMRSA 2株、MSSA 1株の変異株は全て細胞壁の肥厚が観察された。

3. 変異株の増殖速度は親株に比べ遅延していた。
4. 変異株のライソスタフィンの感受性は親株に比べ減少していた。
5. 変異株のムロペプチド構造に変化は認められなかったが、グリカン鎖長は親株に比べ増大していた。
6. 親株と変異株とで、TGase領域をもつ蛋白および他の全PBPにおける発現量に違いは認められなかった。
7. 親株と変異株とで、PBP2のプロモーター活性に違いは認められなかった。
8. 親株と変異株とで、TGase領域をコードする遺伝子および、*mecA*の塩基配列に違いは認められなかった。
9. 親株と変異株とで、モエノマイシンと菌体との結合量に違いは認められなかった。
10. 親株と変異株とで、抗菌ペプチドの感受性に違いは認められなかった。

表 1-1 使用した菌株

Strain	Relevant characteristics	Source or reference
<i>S. aureus</i>		
COL	COL <i>mec</i>	A. Tomasz
BB270	NCTC8325 <i>mec</i>	B. Berger-Bächi
NCTC10443	NCTC10443 <i>mec</i>	R. Novick
KSA8	clinical MRSA strain	clinical isolate
BCL-1	clinical MRSA strain	clinical isolate
RN450	NCTC8325-4	R. Novick
BCL-3	clinical MSSA strain	clinical isolate
HN009	HK10030 transduce to COL	This study
HN010	HK10030 transduce to COL-MM (HN023)	This study
HN011	HK10031 transduce to COL	This study
HN012	HK10031 transduce to COL-MM (HN023)	This study
HN022	moenomycin spontaneous resistant mutant of COL	This study
HN023 (COL-MM)	moenomycin spontaneous resistant mutant of COL	This study
HN024 (BB270-MM)	moenomycin spontaneous resistant mutant of BB270	This study
HN025	moenomycin spontaneous resistant mutant of BB270	This study
HN026	moenomycin spontaneous resistant mutant of NCTC10443	This study
HN027 (NCTC10443-MM)	moenomycin spontaneous resistant mutant of NCTC10443	This study
HN028	moenomycin spontaneous resistant mutant of NCTC10443	This study
HN029 (KSA8-MM)	moenomycin spontaneous resistant mutant of KSA8	This study
HN030	moenomycin spontaneous resistant mutant of KSA8	This study
HN031	moenomycin spontaneous resistant mutant of KSA8	This study
HN032	moenomycin spontaneous resistant mutant of MRSA BCL-1	This study
HN033 (BCL1-MM)	moenomycin spontaneous resistant mutant of MRSA BCL-1	This study
HN034	moenomycin spontaneous resistant mutant of MRSA BCL-1	This study
HN035 (BCL3-MM)	moenomycin spontaneous resistant mutant of MSSA BCL-3	This study
HN036	moenomycin spontaneous resistant mutant of MSSA BCL-3	This study
HN037	moenomycin spontaneous resistant mutant of MSSA BCL-3	This study
HN038 (RN450-MM)	moenomycin spontaneous resistant mutant of RN450	This study
HK10030	electroporation pHK4618 / RN4220 (PBP2 promoter dual type)	This study
HK10031	electroporation pHK4619 / RN4220 (PBP2 promoter single type)	This study
<i>E. coli</i>		
XLII-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac f'ZΔM15 Tn10 (Tet)</i> Amy Cam]	Bullock et al.
HK4616	pHK4616 / XLII-Blue	This study
HK4617	pHK4617 / XLII-Blue	This study
HK4618	pHK4618 / XLII-Blue	This study
HK4619	pHK4619 / XLII-Blue	This study

表 1-2 使用したプライマーおよびプラスミド

Gene	Primer	Sequence (5' to 3')	Positions
	PBP2-PISac	GGGAGCTCCAACACATACTTGTAC	412-437
	PBP2-P3Sac	GGGAGCTCTATTCATGACCATCAA	1070-1096
	PBP2-P2Bam	GGGGATCCGATCCTTTGTTTTTC	1360-1386
	nPBP2-1	ATTGTAATGAGTATTCAT	495-512
PBP2	nPBP2-4	CGTACACCTTCAACAACCTG	976-996
	nPBP2-5	TTGCATTTTTCGTTGTTTC	1475-1493
	nPBP2-6	GCTGCTGCTAAGTATTAC	1969-1987
	nPBP2-2	TCAACATCATTTTGTAAAT	2379-2396
	nPBP2-7	CCAACACAATTACATCA	2867-2885
	nPBP2-8	CCTACGTCAGTAAGTGGT	3349-3367
	nPBP2-3	AGTAGAAAATACCACCT	3604-3621
	PBP2-2L	AGGGATCCTTTGTAAGAGAAG	3665-3682
	nPBP2A-1	TATATAGAGCATTCTCAC	818-835
	nPBP2A-4	TACGGTAACATTGATCGC	1313-1340
PBP2A	nPBP2A-5	GGCTATAAAGATGATGCAG	1811-1829
	nPBP2A-3	GGACTCGTTACAGTGTC	2309-2326
	nPBP2A-2	TCTTGGGGTGGTTACAAC	3126-3142
SgtA	nSgtA-1	ACTCTAGAACAGCGACCACTAGCTCT	1913-1938
	nSgtA-2	TGGAGCTCTGGCTTTCCTTTAGAGTA	3081-3106
	nMGT-1	CGTTTCAAATGAAATATG	821-837
SgtB	nMGT-5	GCGGATCCATGAAAAGAAGCGATAGG	1113-1138
	nMGT-3	CACGCGATAATGTGGATG	1317-1333
	nMGT-4	AAGTCAATGCACCTAGCG	1785-1802
	nMGT-2	GAAAGTGTGATTACAAGC	2039-2055
	nMGT-6	TTGAGCTCTAAGCCACTTCCTATAGC	2118-2144
Plasmids Vector Cloning site Relevant properties			
pHK4616	pGEM <i>SacI/BamHI</i>	pGEM containing 970bp fragment [PBP2-P1 <i>SacI</i> + P2 <i>BamHI</i>	
pHK4617	pGEM <i>SacI/BamHI</i>	pGEM containing 312bp fragment [PBP2-P3 <i>SacI</i> + P2 <i>BamHI</i>]	
pHK4618	pSL24 <i>SacI/BamHI</i>	pSL24 containing 970bp fragment with two promoter regions [PBP2-P1 <i>SacI</i> + P2 <i>BamHI</i>]	
pHK4619	pSL24 <i>SacI/BamHI</i>	pSL24 containing 312bp fragment with promoter region upstream of <i>prfA</i> [PBP2-P3 <i>SacI</i> + P2 <i>BamHI</i>]	

表 1-3 親株と分離した突然変異株の種々の細胞壁合成阻害剤のMIC

Strain	Relevant properties	MIC (µg / ml)										
		MPIPC	DMPPC	CZX	VCM	TP	FOM	BC	MM *			
COL	wild type	128	512	4000	2	0.5	128	128	0.031			
COL-MM	spontaneous mutant	64	256	4000	8	2	128	256	1			
BB270	wild type	128	512	<1024	2	0.25	128	128	0.031			
BB270-MM	spontaneous mutant	128	256	<1024	3	0.25	128	256	1			
KSA8	wild type	256	512	<1024	2	0.25	32	128	0.063			
KSA8-MM	spontaneous mutant	64	256	1024	4	1	32	128	1			
N10443	wild type	128	512	<1024	1	0.25	64	128	0.063			
N10443-MM	spontaneous mutant	32	64	<1024	4	1	64	128	1			
BCL1	wild type	<16	<128	<512	2	1	256	128	0.063			
BCL1-MM	spontaneous mutant	0.08	2	0.5	4	1	32	256	0.5			
BCL3	wild type	0.5	16	16	2	0.25	32	128	0.016			
BCL3-MM	spontaneous mutant	0.25	8	16	4	1	32	256	0.125			
RN450	wild type	0.5	4	4	1	0.25	64	128	0.016			
RN450-MM	spontaneous mutant	0.125	2	2	2	1	8	128	0.125			

* MPIPC, oxacillin; DMPPC, methicillin; CZX, ceftizoxime; VCM, vancomycin; TP, teicoplanin; FOM, fosfomycin; BC, bacitracin; MM, moenomycin

表 1-4 ライソスタフィンの感受性

Strains	60min 濁度減少率 *1	
	S	R *2
COL	77%	63%
BB270	83%	63%
KSA8	57%	48%
NCTC10443	58%	48%
BCL-1	78%	50%
BCL-3	59%	69%
RN450	76%	46%

*1 ライソスタフィンを添加した0分の濁度を100%として、60分後の濁度の減少率を示す。

*2 S, sensitive:感受性菌(親株); R, resistant:耐性菌(変異株)を示す。

表 1-5 TGase領域の塩基配列

	領域		
	TGase 領域	TPase 領域	未知領域
PBP1	unknown	TPase	
PBP2	TGase	TPase	
PBP2A	unknown	TPase	
PBP3	unknown	TPase	
PBP4		TPase	
SgtA	TGase		
SgtB	TGase		

	TGase 領域	TPase 領域	未知領域
PBP2	親株との塩基配列に違いなし	親株との塩基配列に違いなし	(-)*
PBP2A	(-)	親株との塩基配列に違いなし	親株との塩基配列に違いなし
SgtA	親株との塩基配列に違いなし	(-)	(-)
SgtB	親株との塩基配列に違いなし	(-)	(-)

* 領域が存在していないことを示す。

(A) TGaseおよびTPase領域を持つ蛋白 (B) 親株と分離した突然変異株計14株のTGase, TPaseおよび未知領域の全塩基配列を比較した。

表 1-6 モエノマイシン結合実験

A

モエノマイシン	MIC of COL ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	
	24h	48h
モエノマイシン原液 *1	0.016	0.031
COLと作用させた 残りのモエノマイシン *2	0.125	0.25
COL-MMと作用させた 残りのモエノマイシン	0.125	0.25

*1 被検菌と作用させていないモエノマイシンを用いて、COL株のMICを測定した。

*2 モエノマイシンと菌体 (COL, COL-MM) を室温で15分間作用させ、得られた上清を濾過した薬液を用いて、COLのMICを測定した。

B

	モエノマイシン結合量 * ($\mu\text{g}/10^9$ cells)	
	24h	48h
COL	0.109	0.219
COL-MM	0.109	0.219

* Aで得られたMIC値から、被検菌と結合したモエノマイシン量を測定した。

表 1-7 使用した抗菌ペプチド

defensin	cathelicidin
human β -defensin 3 (hBD-3) cationic cysteine rich peptide	CAP-18 cationic anti-microbial protein
GIINTLQKYYCRVRGGRC AVLSC LPKEEQIGKCSRGRKCCRKK	LLGDFFRKSKEKIGKEFKRIVQRI KDFLRNLVPR

表 1-8 抗菌ペプチドの感受性

Bacterial survival (% of viable cells)	hBD-3		CAP-18	
	S	R	S	R *
COL	48%	45%	29%	30%
BB270	52%	53%	20%	22%
KSA8	47%	52%	27%	29%
NCTC10443	32%	35%	16%	15%
BCL-1	40%	38%	24%	23%
BCL-3	42%	36%	21%	18%
RN450	17%	22%	8%	11%

* S, sensitive:感受性菌 (親株); R, resistant: 低感受性菌 (変異株) を示す。

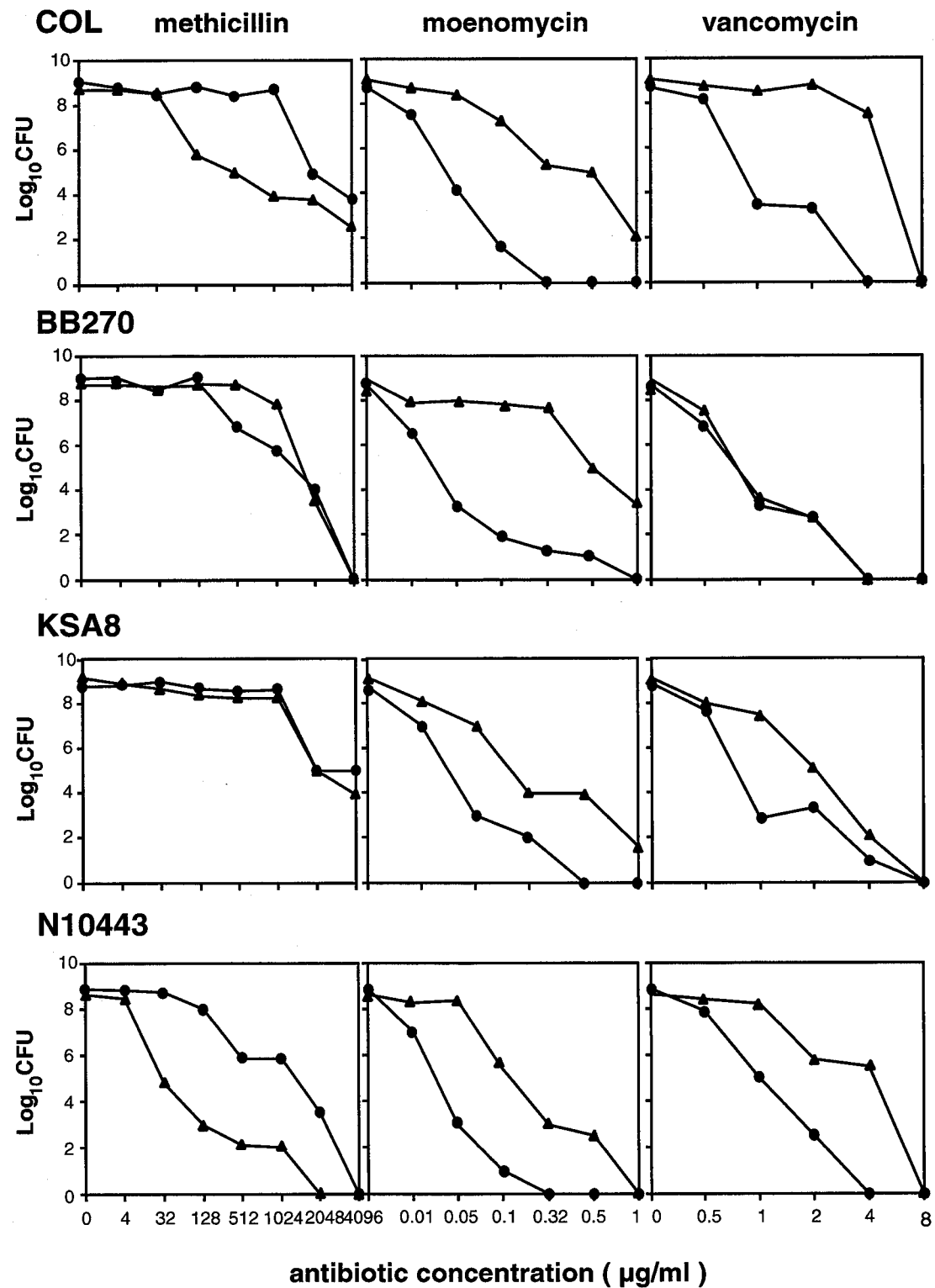


図 1-1 親株と分離した突然変異株のpopulation 解析 (1)

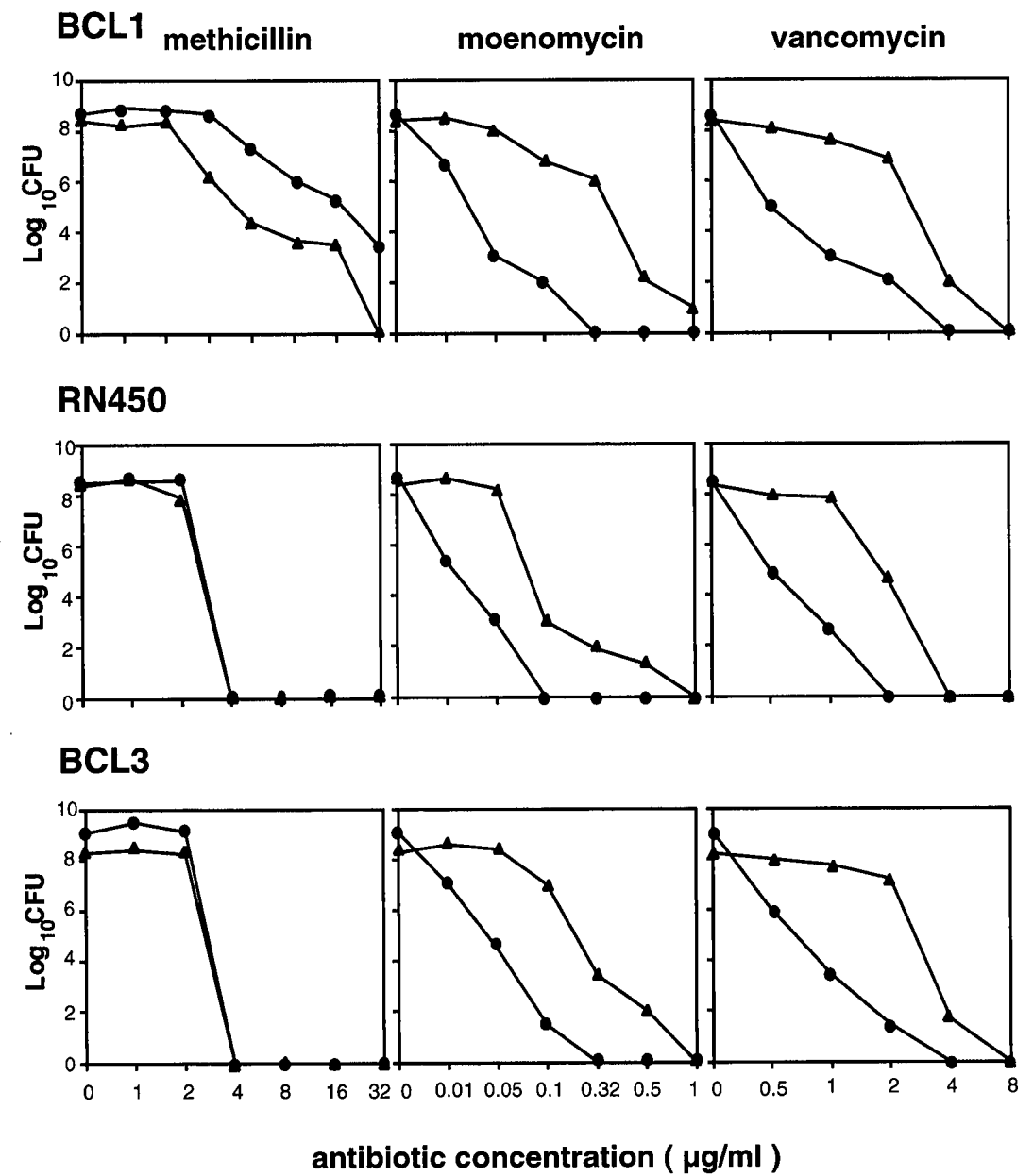


図 1-1 親株と分離した突然変異株のpopulation 解析 (2)

種々の濃度の薬剤を含むTSB寒天培地に、TSBで被験菌をOD660=1.0に達するまで培養し、 10^2 倍、 10^4 倍、 10^6 倍希釈した検体を100 µl接種し、37°Cで48時間培養後、コロニー数を測定し、 10^9 個の菌を接種したときの生菌数をグラフに表した。●, 親株; ▲, 変異株をそれぞれ示す。

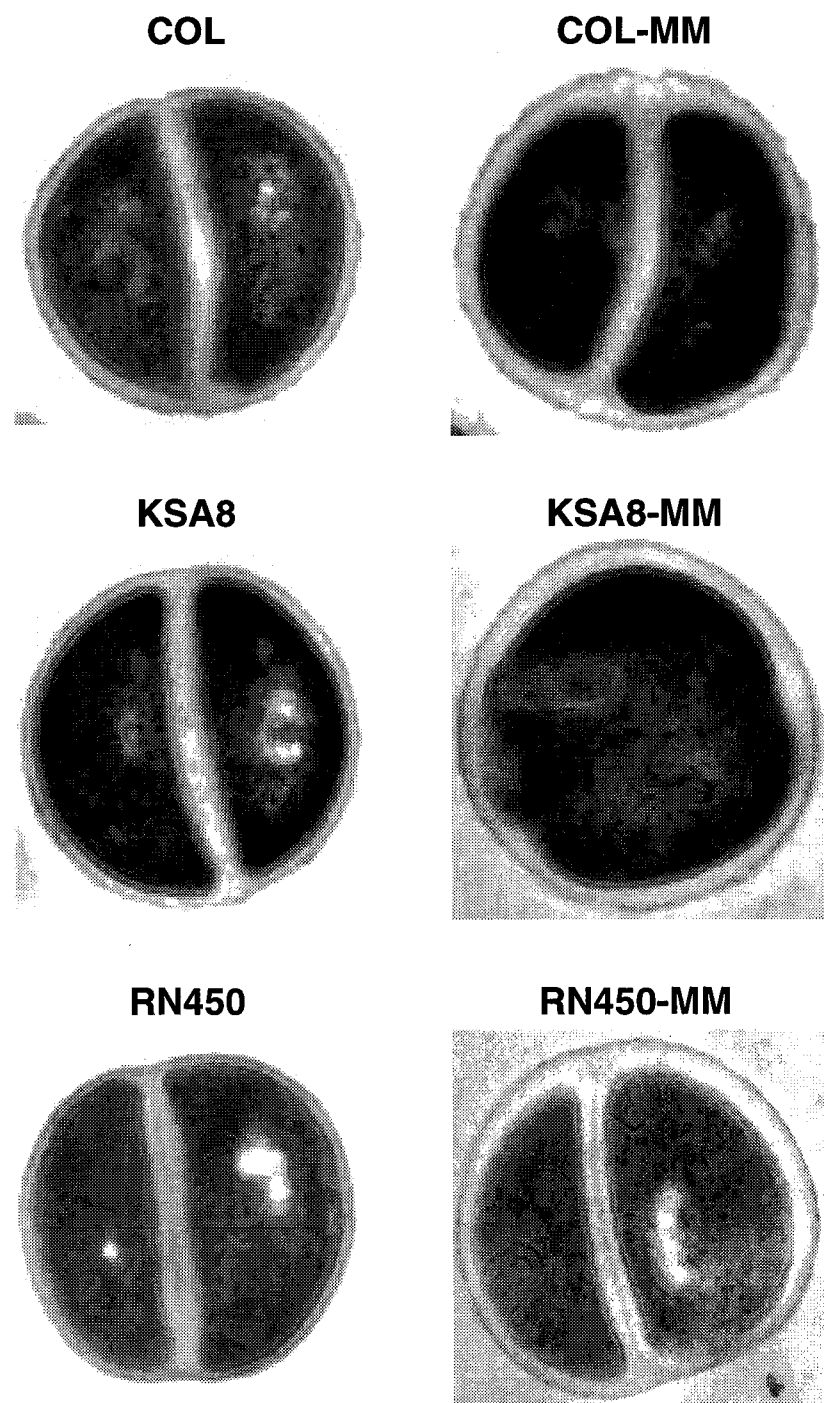


図 1-2 親株と分離した突然変異株の電子顕微鏡像

PBSにて洗浄した菌体を3%細菌用寒天にて固化した後、2.5% glutaraldehydeで4℃、2時間固定した。洗浄後、さらに1%OsO₄にて2時間固定した。エタノール系列希釈後、15分毎に脱水し、Spir's Eponにて包埋した。これをダイヤモンドナイフおよびウルトラミクロームにて超薄切片を作製し、JEM-2000 EX-II electron microscopeにより透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察を行った。

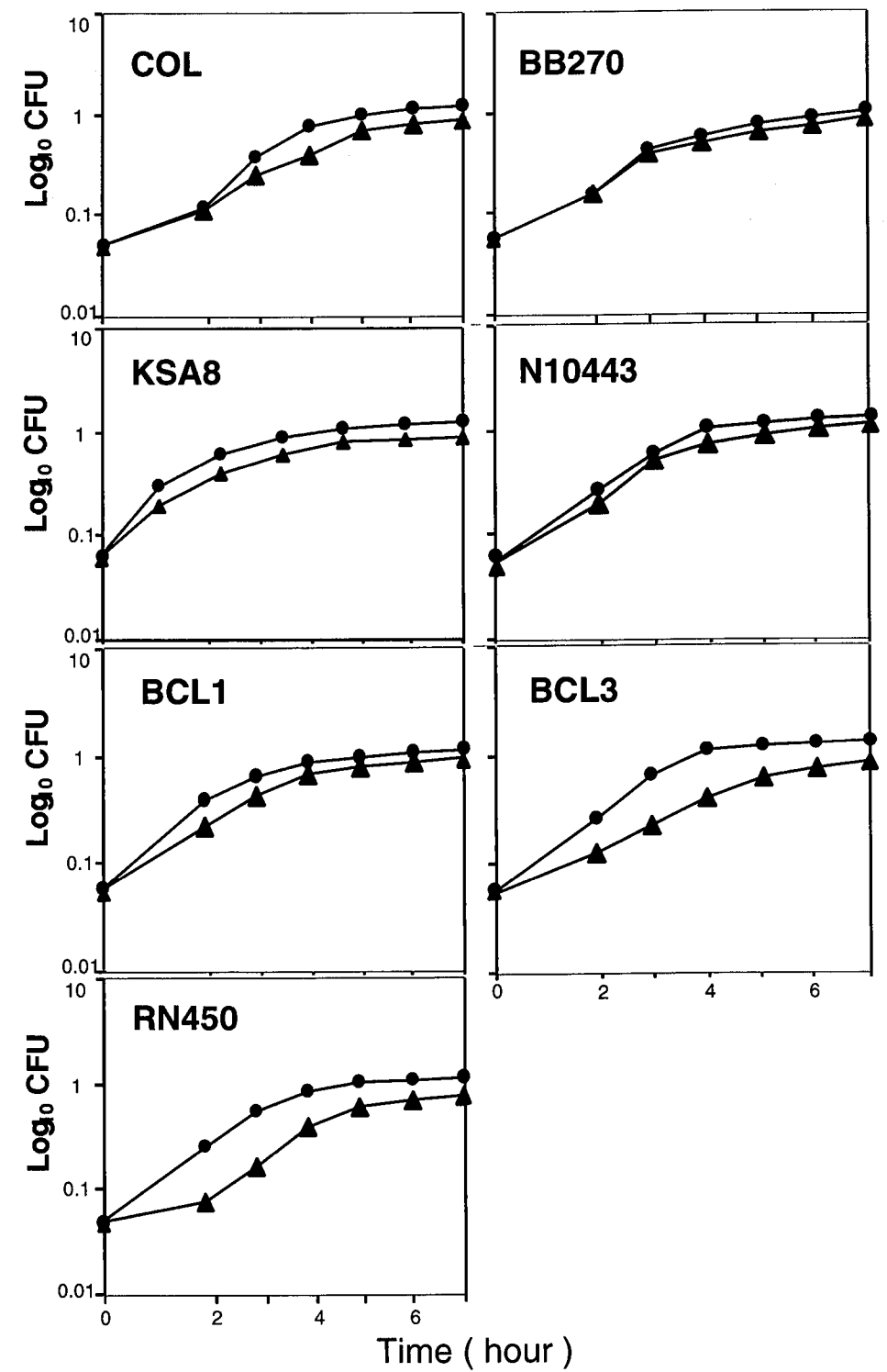


図 1-3 親株と分離した突然変異株の増殖速度

OD_{660nm}=1.0に達するまで37℃で培養した被検菌を50 μlずつTSB 10 mlにうえつぎ、37℃で振とう培養して経時的に濁度の増加を測定した。●, 親株; ▲, 変異株をそれぞれ示す。

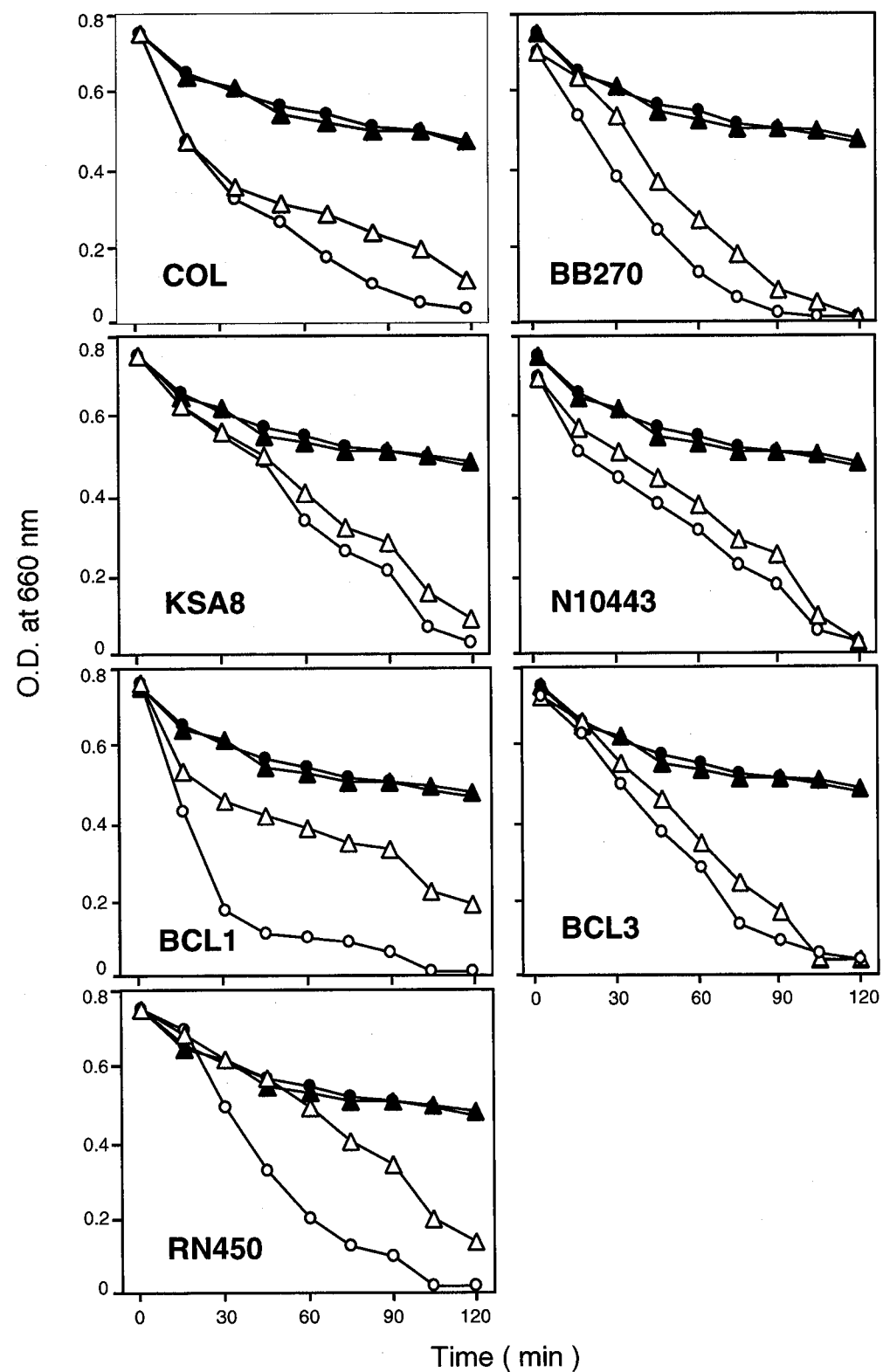


図 1-4 親株と分離した突然変異株のライソスタフィン感受性

50 mM Tris-HClバッファー (pH 7.4) にOD_{660nm}=0.8となるように菌体を懸濁し、うち6 mlにライソスタフィンを最終濃度0.005 mg/mlになるように加え、37°Cでインキュベートした。○, ライソスタフィン 0.005 mg/ml添加親株 △, ライソスタフィン 0.005 mg/ml添加変異株; ●, 非添加親株 ▲, 非添加変異株を示す。

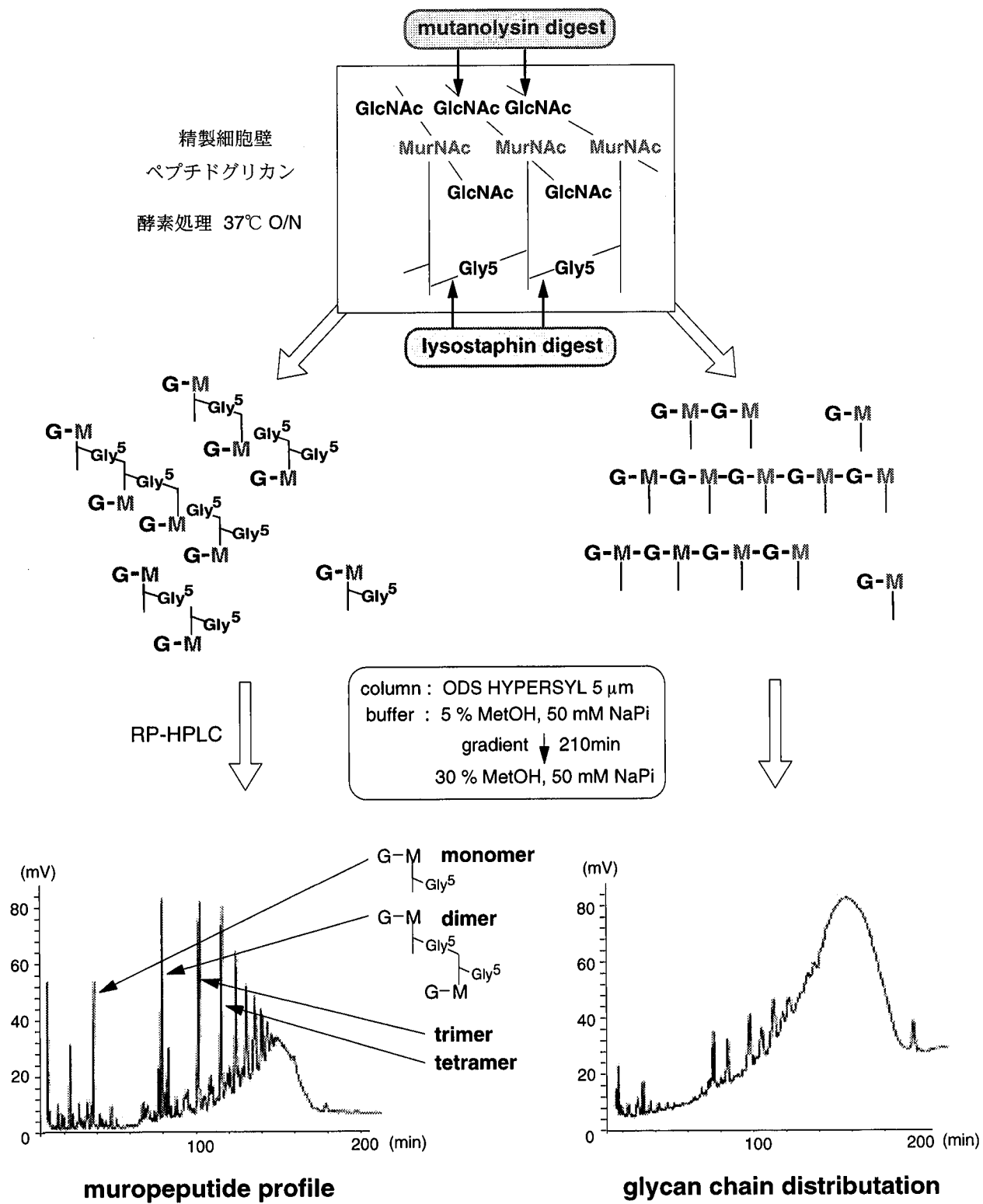


図 1-5 RP-HPLCを用いた細胞壁構造解析

精製したペプチドグリカン をムタノリシンまたはライソスタフィンにて完全に可溶化して調整したサンプルを、逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) にて5% (vol/vol) methanol含有 50 mM NaPi (pH 2.5) から30% (vol/vol) メタノール含有 50 mM NaPi (pH 2.8) に、210分間のリニアグラデーションを行い、ムロペプチド分析、ペプチドグリカンの架橋度の算出とグリカン鎖長解析を行った。

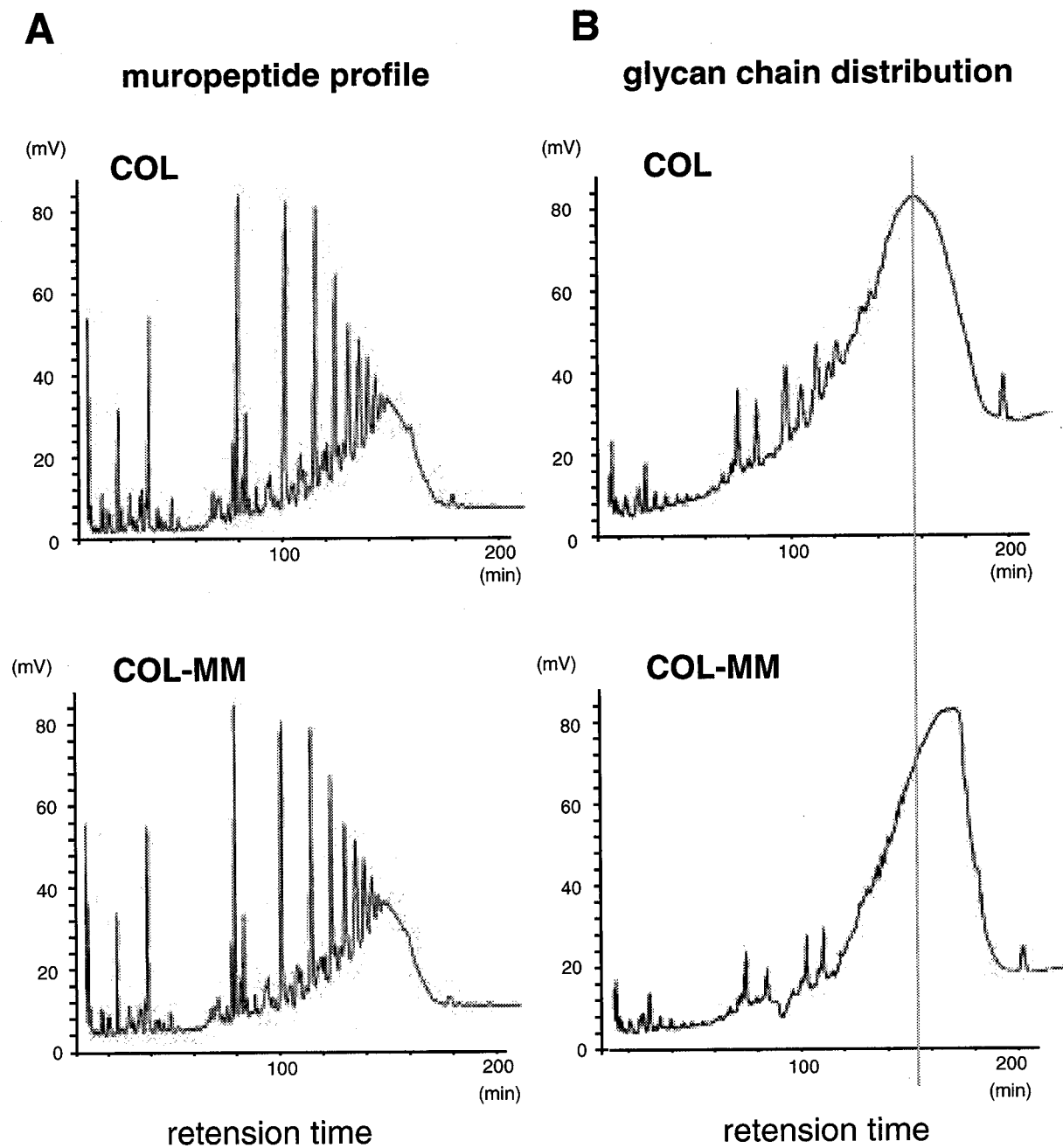


図 1-6 細胞壁の構造解析

(A) ムロペプチド分析：最小基本構造物であるモノマーから順にダイマー、トリマー、テトラマーと、徐々に大きな構造のムロペプチドが溶出される。(B) グリカン鎖長解析：短いグリカン鎖から、順に長いグリカン鎖が溶出され、長いグリカン鎖が多いほど、得られるクロマトグラムのピークの山が後方に移行する。

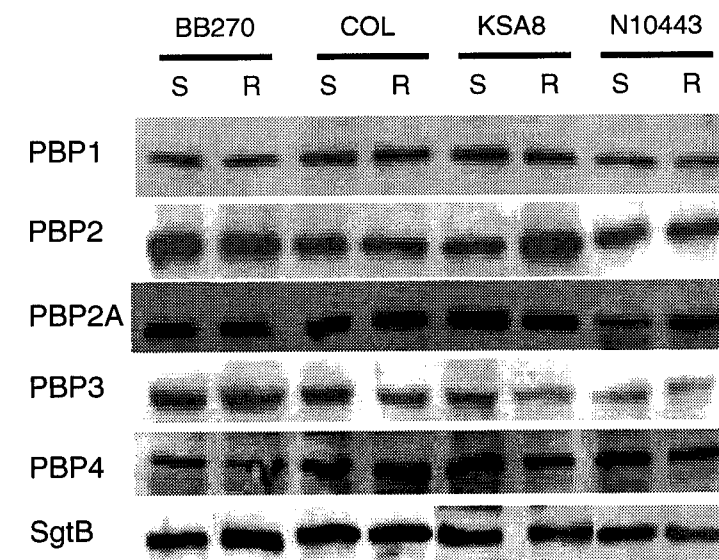


図 1-7 TGase領域をもつ蛋白および全PBPの発現量の比較

被検菌の細胞質膜画分を調整し、タンパク量を合わせてSDS-PAGEにて分離した。その後、抗PBP1, 2, 3, 4, 2A, SgtA, SgtB血清を1次抗体としてWestern解析を行った。S, sensitive:感受性菌(親株); R, resistant:低感受性菌(変異株)を示す。

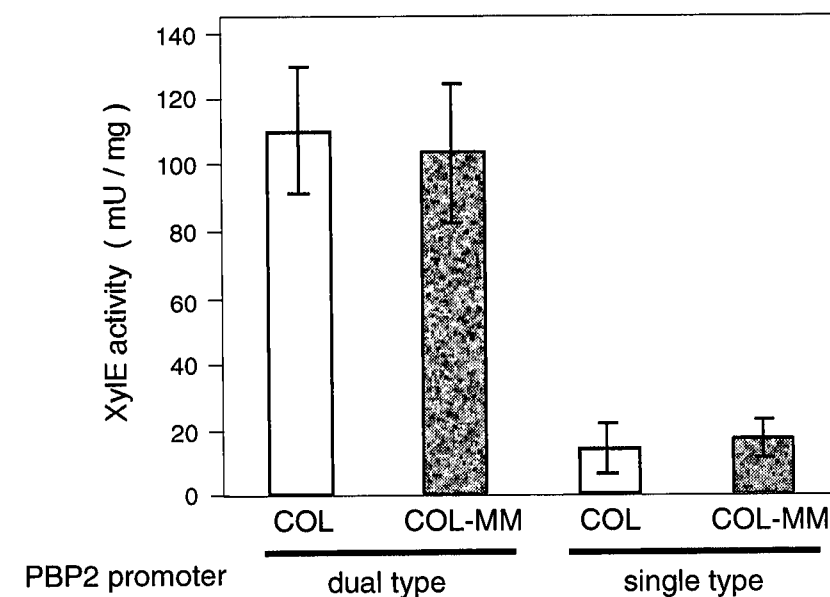


図 1-9 親株と分離した突然変異株の転写活性

被検菌をAPEバッファーに懸濁し、ライソスタフィンを追加後、37°Cで30分間静置した上清をサンプルとした。サンプルと100 mM KPO₄バッファー (pH 7.5) にカテコールを加え37°Cで1分ごとに、カテコールが発色することによる濁度の増加からプロモーターの活性を検討した。

菌株は *S. aureus* COL、バンコマイシン低感受性突然変異株 COL-VCM^r[44]、*E. coli* XLII-Blue [11] を使用した (表 2-1)。*S. aureus* は TSB を用いて、*E. coli* は Luria-Bertani (LB) broth (yeast extract 5 g, polypeptone 10 g, NaCl 10 g per liter (pH 7.2)) を用いて 37°C で振とう培養を行った。また、菌株は必要なときにはクロラムフェニコール (CP) 10 µg/ml、テトラサイクリン (TC: Boehringer Mannheim) 10 µg/ml、アンピシリン (Sigma chemical Co.) 100 µg/ml を添加した培地で培養した。

第 2 項 His-tag 組換蛋白の精製

すべての領域を含んだ SgtB (full SgtB) (図 2-3)、疎水性の強い N 末端 67 アミノ酸配列を除いた SgtB (Δ N-term SgtB) の His-Tag 融合タンパク質を作製するために、pQE 30 expression vector (Qiagen) の His \times 6-tag sequence とフレームが合うようにプライマーを設計した。

表 2-2 に示すこれらのプライマーを用いて、*S. aureus* COL 株の染色体 DNA を鋳型として pGEM-T Easy Vector System (Promega Co., Madison) に TA クローニングを行い、HN707 (full sgtB)、HN703 (Δ N-term sgtB) として分離した。クローニングした HN707 および HN703 の DNA 断片を、制限酵素、shrimp alkaline phosphatase (Roche) 処理したクローニングベクター pQE 30 に回収した DNA 断片とライゲーションし、第 1 章、第 2 節、第 10 項の方法を用いて HN701 (full sgtB)、HN704 (Δ N-term sgtB) を分離した (図 2-4)。得られた HN701、HN704 についてプラスミドを plasmid miniprep kit (Bio-Rad) を用いて精製し、前述のクローニング法により *E. coli* M15 (pREP4) に形質転換した。

それぞれのプラスミドを形質転換した *E. coli* M15 (pREP4) を LB broth 500 ml で 37°C で OD₆₆₀=0.5 になるまで振とう培養し His-tag 組換蛋白を発現させるために IPTG (Wako Pure Chemical Industries) を 1 mM になるように添加し、4 時間培養した。尿素を用いる精製は以下の方法で行った。すなわち、培養菌体を遠心 (9,000 x g, 10 min, 4°C) し、菌体を溶解バッファー B (8 M 尿素, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0) 10 ml で懸濁し、20 ml までメスアップ後、Ultrasonic disruptor (0.5 pulse, output 4, タイテック, さいたま) で、30 分間氷上で菌体を破碎した。遠心 (9,500 x g, 15 min, 4°C) 後、上清に Ni-NTA Agarose 2 ml (使用前に精製水で洗浄後、溶解バッファーで平衡化した)

(500 µl bed vol. Qiagen) を加え、室温で 30 分間振とうして結合させた後、オープンカラム (15 mm i.d. \times 90 mm long) に添加し、カラムを通過した素通りを回収した。溶解バッファー 10 ml で平衡化後、Ni-NTA Agarose を 5 倍量の洗浄バッファー (8 M 尿素, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl, pH 6.3) で洗浄した。結合した His-tag 組換タンパク質の溶出は溶出バッファー (8 M 尿素, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl, pH 4.5) で行った。得られた溶出画分は 4 M 尿素含有 0.1 M リン酸バッファー (pH 6.8) で一晩透析し、その後段階的に 8M, 4M, 2M と尿素的濃度を落とした 0.1 M リン酸バッファー (pH 6.8) で透析し、最終的に尿素を除いた 0.1 M リン酸バッファー (pH 6.8) で透析して実験に用いた。尿素を用いない精製はバッファーを以下に変えて同様の方法で行った。すなわち、溶解バッファー (50 mM NaH₂PO₄; pH 8.0, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole)、洗浄バッファー (50 mM NaH₂PO₄; pH 8.0, 300 mM NaCl, 20 mM imidazole)、溶出バッファー (50 mM NaH₂PO₄; pH 8.0, 300 mM NaCl, 250 mM imidazole) を用いる精製を行った。得られた溶出画分は 0.1 M リン

酸バッファー (pH 6.8) で一晩透析して実験に用いた。

第 3 項 抗体作製法

精製した N 末端 67 アミノ酸配列を除いた SgtB (Δ N-term SgtB) 100 µl (100 µg) に 400 µl PBS を加え、Freund's complete adjuvant (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) 500 µl と混合しエマルジョン化した後、日本白色ウサギ (体重 2 kg) の皮下に数カ所注射した。2 週間後および 4 週間後に 100 µg の精製した Δ N-term SgtB を 400 µl の PBS を添加後 incomplete adjuvant と混合し再度注射し、3 回目投与以降、抗体価を Western 解析を用いて測定した。目標とする抗体価 0.01 µg を認識した時点でウサギに精製蛋白標品 100 µl (100 µg) の静脈内投与を行った。投与 2 日後に 22 G サーフロー留置針 (テルモ、東京) を用いて耳下静脈より静脈血 (80 ml) を採取した。採取した静脈血は 37°C、一時間静置後遠心 (3,000 x g, 30 min, 4°C) し上清画分を抗血清として以後の実験に用いた。抗血清は最初の注射から 5 週間後に採取した (図 2-4)。

第 4 項 モエノマイシンおよびペニシリンビーズの作製

モエノマイシンあるいはペニシリンビーズの作製は Vollmer の方法[86]に従った。すなわち、モエノマイシンあるいはペニシリン G (Meiji Seika Industries, Ltd.) 200 mg をメタノール 5ml に溶解し、メタノールで 5 回洗浄した Affi-Gel 10 Gel 10ml (5 ml bed vol. : Bio-Rad Laboratories) と混合して 5 日間、4°C でインキュベートした。その後メタノールで 5 回洗浄後、TG バッファー (10mM Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 150mM NaCl, 0.2 % Triton X-100 : pH 7.5) にて 3 回洗浄した。TG バッファー 10 ml にて懸濁した後、2 日間、4°C で処理した。これを TG バッファー 10 ml で 5 回洗浄後、総計 10 ml となるように TG バッファーを加え懸濁した。

第 5 項 モエノマイシン/ペニシリン結合実験

被検菌の細胞質膜画分の調整は第 1 章、第 2 節、第 9 項に準じて行った。*S. aureus* のもつ PBP1, 2, 3, 2A は全て TPase 領域を C 端側に有し、TPase 領域のみ有する PBP4 以外はほぼ同じ大きさである。PBP2 は N 端側に TGase 領域を有しているが (図 2-1)、他の PBP の N 端側の領域についてはその機能が明らかとなっていないため、モエノマイシンとの結合を検討するために各組換蛋白を精製した。以前に作製した各種組換蛋白を用いた[44]。すなわち、GST 融合蛋白 PBP1 (HK4457) は PBS で透析してグルタチオンを可及的に取り除いて、HisTag 融合蛋白 PBP2A (HK4476, HK4475, HK4477)、SgtA の融合蛋白は PBS で透析して尿素を可及的に取り除いて実験に用いた。PBP2, PBP3 の融合蛋白は、HisTag 融合蛋白として作製し、Qiagen manipulative protocol に従って塩酸グアニジンで精製を行った。精製蛋白 50 µl に精製水 500 µl、0.15 % sodium deoxycholate 50 µl を加え、室温で 5 分間静置後、これに 20 % TCA 600 µl 添加し氷上で 5 分間静置して冷却し、遠心 (15,000 x g, 5 min, 4°C) した沈渣に 0.2 M NaOH で溶解して中和した後、2 % SDS 8 µl を添加して実験に

用いた。結合実験の際はイオン交換水で希釈し、0.1% SDS 溶液としてから実験に用いた。また、PBP4 の融合蛋白は、FLAG 融合蛋白として作製された株 (HK4385, HK4386) を実験に用いた。

精製した各組換蛋白 (PBP1, PBP2, PBP3, PBP4, PBP2A, SgtA, SgtB) の蛋白質濃度は BCA protein assay reagent を使用して決定し、図 2-6 に示す方法でモエノマイシン/ペニシリンビーズとの結合実験を行った。すなわち TG バッファー (pH 7.5) 中にて、各薬剤ビーズと被検タンパクを 4°C で一晩処理し、ビーズと蛋白を結合させた。これを遠心 (3,000 x g, 1 min, 4°C) 後、上清を素通りとして回収し、沈渣は TG バッファー (pH 7.5) にて 5 分間、室温で振とうして洗浄する操作を 3 回繰り返し、さらに 30 分間、4°C で振とうして洗浄を行った。遠心 (3,000 x g, 1 min, 4°C) した沈渣に、1/2 量の 2x サンプルバッファーを加えた。沸騰水浴中で 5 分間処理した後、遠心 (3,000 x g, 5 min, 4°C) した各上清を、12% のポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE にて分離した。この時先に回収した素通り画分も同様に、2x サンプルバッファーを加え沸騰水浴中で 5 分間処理した遠心上清を SDS-PAGE にて分離した。各被検蛋白の抗体 (1,000 倍希釈) と human IgG (最終濃度 42 µg/ml) (Zymed Laboratories, Inc.) を 1 次抗体として、peroxidase 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (1,000 倍希釈) (Amersham Life Science) と human IgG を 2 次抗体として Western 解析を行い、モエノマイシンあるいはペニシリンビーズと結合する蛋白を検出した。

第 6 項 抗血清による交差反応試験

精製した各組換蛋白 (PBP1, PBP2, PBP3, PBP4, PBP2A, SgtA, SgtB) を等モルに調整して、12% のポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE にて分離した。各タンパクに対する各抗血清 7 種 と human IgG (最終濃度 42 µg/ml) を 1 次抗体として、peroxidase 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体と human IgG を 2 次抗体として Western 解析を行い、各抗血清に交差反応する各蛋白を検出した。

第 7 項 *sgtB* 変異株の作製

図 2-7 に変異株の作製方法を示す。*sgtB* の過剰発現株の作製に必要な DNA フラグメントを得るため、S.D. を包含する *sgtB* 全長を増幅するプライマーを設計した (表 2-2)。また *sgtB* の欠失株の作製に必要な DNA フラグメントを得るため、*sgtB* の ORF を一部増幅するプライマーを設計した (表 2-2)。これらプライマーと、*S. aureus* COL 株のプラスミド DNA を鋳型として第 2 章、第 2 節、第 2 項に準じて PCR 法により DNA フラグメントを得た後、pGEM-T Easy Vector System に TA クローニングを行い、HN712, HN714 として分離した。

クローニングした HN712, HN714 の 1 kb もしくは 600 bp の DNA 断片を制限酵素で消化後、第 2 章、第 2 節、第 2 項に準じて、IPTG 添加により発現に誘導のかかる過剰発現用クローニングベクター pCL15[3] もしくは欠失株作製用クローニングベクター pCL52.1 にクローニングした。pCL52.1 は 42°C にすることで、インテグレーションがおこり、目的遺伝子内にベクターが挿入され、遺伝子を欠失することのできるベクターである [90]。このようにして得られた HN713 (overexpress *sgtB*)、HN715 (knockout *sgtB*) についてプラスミドを精製し、コンピテントセル用に調整した RN4220

40 µl を混合し、第 1 章、第 2 節、第 10 項の方法を用いてエレクトロトランスフォーメーションを行った。一晩 37°C で培養後生育したコロニー HN041 (overexpress *sgtB*)、HN050, HN051 (knockout *sgtB*) を分離した。

第 8 項 形質導入

分離した HN041 および *sgtA* 過剰発現株である HK9818 を第 1 章、第 2 節、第 10 項の方法を用いて形質導入により *S. aureus* RN4220 から MRSA 株である COL, BB270 および KSA8 に移した。得られたコロニーを CP 10 µg/ml 含有 TSA に播き、生育したコロニー HN047~049 (COL)、HN055~058 (BB270)、HN088~089 (KSA8) を分離した。分離した変異株について、抗 SgtA, SgtB 血清を用いて Western 解析により各遺伝子産物の確認を行った。

第 9 項 各種細胞壁合成阻害剤の MIC

第 1 章、第 2 節、第 3 項の方法を用いて、親株と分離した TGase 領域をもつ遺伝子の過剰発現株および欠失株のモエノマイシンを含めた各種細胞壁合成阻害剤の感受性を測定した。

第 10 項 RP-HPLC を用いた細胞壁構造解析

第 1 章、第 2 節、第 8 項の方法を用いて、親株と分離した TGase 領域をもつ遺伝子の過剰発現株および欠失株の細胞壁の構造解析を行った。

第 11 項 *sgtA*, *sgtB* 変異株のライソスタフィン感受性試験

第 1 章、第 2 節、第 7 項の方法を用いて、親株と monofunctional TGase 領域を持つ *sgtA*, *sgtB* 遺伝子の過剰発現株および欠失株のライソスタフィンの感受性を測定した。

第 12 項 *sgtB* 変異株の全 PBP の発現量の比較

第 1 章、第 2 節、第 9 項の方法を用いて、親株と *sgtB* 遺伝子の過剰発現株および欠失株の全 PBP の発現量を測定した。

第 13 項 *pbp3* (*pbp2B*) 変異株の作製

PBP3 (PBP2B) の解析を行うために第 2 章、第 2 節、第 7 項の方法を用いて、*pbp3* 過剰発現株 HN077 を作製した。また、*pbp3* 欠失株は、染色体上の *pbp3* 遺伝子を完全に欠失させた変異株を作製するために、以下の方法を用いた (図 2-13)。

まず、*pbp3* 全長をコードする遺伝子を組み込んだ pHK4247 より 5.5kb の *EcoRI-EcoRI* 断片を切り出し、DNA 断片を pCL95 に挿入しプラスミド pTF488 を得た。その後、pTF488 より *EcoRI-EcoRI* 断片を切り出し、pGEM-T easy-vector に挿入しプラスミド pHK4300 とした後、*cat* 遺伝子を含むプラスミド pLI50 [60]より *cat* 遺伝子を切り出し、pHK4300 の *BglIII* 切断部位に *cat* 遺伝子を挿入したプラスミド pHK4303 を作製した。さらに pHK4303 の 6.8kb の *EcoRI-EcoRI* 断片を温度感受性シャトルベクター pCL52.1 に挿入したプラスミド pHK4306 を作製した。この *pbp3* 遺伝子欠失用プラスミド pHK4306 を第 1 章、第 2 節、第 8 項の方法に従って RN4220 株に形質転換し、CP 10 µg/ml, TC 3 µg/ml 含有 TSB 寒天平板にて 30°C で培養した。その後、シングルコロニーを採取し、ベクター部分を含めたプラスミドを染色体 DNA 上にインテグレーションさせるために、再度 CP 10 µg/ml, TC 3 µg/ml 含有 TSB 寒天平板に塗抹後、42°C で一晚培養し、寒天平板上に生育したコロニーより、再度シングルコロニーを採取した。

次に染色体 DNA からベクター部分を除く目的で、CP 10 µg/ml 含有 TSB にて 30°C で一晚培養後、CP 10 µg/ml 含有 TSB 寒天平板に塗抹した。37°C で一晚培養後、生育したシングルコロニーを CP 10 µg/ml, TC 3 µg/ml 含有 TSB 寒天平板あるいは CP 10 µg/ml 含有 TSB 寒天平板に塗抹し、TC に感受性で CP に耐性のコロニーを採取した。その結果、*cat* 遺伝子が *pbp3* 遺伝子と置換された株 TF5351 (HN083) を得た。この株について、*cat* 遺伝子が挿入されて、*pbp3* 遺伝子および *tet* 遺伝子が欠失していることを *pbp3* のプローブを用いた Southern 解析および PCR にて確認した。作製した *pbp3* 変異株を、第 1 章、第 2 節、第 10 項の方法を用いて、MRSA COL に形質導入して HN081 (overexpress *pbp3*) , HN084 (knockout *pbp3*) を分離した。

第 14 項 *pbp* 過剰発現変異株の作製

PBP3 の解析と合わせて他の全 PBP 領域を持つ過剰発現株の解析を行うために、第 2 章、第 2 節、第 7 項の方法を用いて、*pbp1*, 2, 4 過剰発現株 HN075, 076, 078 を作製した。遺伝子マップを図 2-1, 2 に示す。作製した変異株を第 1 章、第 2 節、第 10 項の方法を用いて、MRSA COL に形質導入して HN079 (overexpress *pbp1*)、HN080 (overexpress *pbp2*)、HN082 (overexpress *pbp4*) を分離した。使用したプライマーは表 2-2 に示した。

第 15 項 *pbp* 変異株の MIC

第 1 章、第 2 節、第 3 項の方法を用いて、親株と *pbp3* 過剰発現変異株、*pbp3* 欠失株および他の全 PBP 領域を持つ遺伝子の過剰発現変異株の各種細胞壁合成阻害剤の感受性を測定した。

第 16 項 *pbp3* (*pbp2B*) 変異株の細胞壁構造解析

第 1 章、第 2 節、第 8 項の方法を用いて、親株と分離した変異株の細胞壁構造解析を行った。

第 3 節 結果

第 1 項 モエノマイシン/ペニシリン結合試験

作製、精製したそれぞれの組換蛋白 (PBP1, PBP2, PBP2A, PBP3, PBP4, SgtA, SgtB) を図 2-5 に示す。また、モエノマイシン/ペニシリン結合試験の結果を図 2-6-2 に示す。モエノマイシンは TGase を、ペニシリンは TPase との結合能を有する。各薬剤ビーズと親和性のある蛋白は溶出画分に、親和性のない、ビーズに結合しない蛋白は素通り画分に検出される。

S. aureus COL 株の膜タンパクと各薬剤ビーズとの結合実験の結果、ペニシリンビーズには TPase 領域を有する PBP1, 2, 3, 4, 2A は結合を認めたが、TGase 領域のみ有する SgtB は結合しなかった。モエノマイシンビーズには TGase 領域を有する PBP2, SgtB は結合を認めたが、同時に PBP2A の N 端にもこの実験系では結合を認めた。しかし、TGase 領域を有しない PBP1, 3, 4 は結合しなかった。また *S. aureus* COL 株の膜タンパクでは SgtA は検出できず、膜蛋白では発現していない可能性が考えられた。

また精製した組換蛋白と各薬剤ビーズとの結合実験の結果、ペニシリンビーズには TPase 領域を有する PBP1, 2, 3, 4, 2A は結合を認めたが、同時に TGase 領域のみ有する SgtB もこの実験系では結合を認めた。このため、薬剤処理していないビーズを用いて SgtB との binding assay を行ったが、このビーズとも結合を認めた。また TGase 領域のみ有する SgtA はペニシリンビーズと結合しなかった。またモエノマイシンビーズには TGase 領域を有する PBP2, SgtA, SgtB は結合を認めた。しかし、TGase 領域を有しない PBP1, 3, 4 は結合しなかった。

第 2 項 抗血清による交差反応試験

精製した各組換蛋白 (PBP1, PBP2, PBP3, PBP4, PBP2A, SgtA, SgtB) を等モルに調整した各組換蛋白と各抗血清に交差反応する蛋白を検出した (図 2-8)。結果、抗 PBP4 では全ての組換蛋白に対して交差反応する蛋白はなかった。抗 PBP1 は PBP2, PBP2A, SgtB と、抗 PBP2 は PBP1, SgtA, SgtB と、抗 PBP3 は PBP2, SgtB と、抗 PBP2A は SgtB と、抗 SgtA は PBP2, PBP3, SgtB と、抗 SgtB は PBP2, PBP2A と交差反応した。

第 3 項 各種細胞壁合成阻害剤の MIC

MSSA RN4220 から作製した TGase 領域を持つ遺伝子の過剰発現株および欠失株の種々の細胞壁合成阻害剤に対する薬剤感受性を測定した結果、モエノマイシンの MIC は各々の親株に比べて、*sgtA*, *sgtB* とも過剰発現株では 4~8 倍上昇し耐性を示したが、*sgtB* 欠失株では逆に 4 倍低下し、*sgtA* 欠失株では変化がなかった。バンコマイシンおよびテイコプラニンの MIC は親株と比べて、*sgtA*, *sgtB* 共に過剰発現株では 1.5 倍上昇し耐性を示したが、欠失株では共に変化がなかった。これら変異株のうち過剰発現株の MRSA 株への形質導入株も同様の傾向が認められ、モエノマイシ

の MIC は各々の親株に比べて *sgtA*, *sgtB* 共に過剰発現株では 4 倍上昇し耐性を示し、さらにバンコマイシンおよびテイコプラニンの MIC も親株と比べ共に 1.5 倍上昇し耐性を示した。しかし、 β -ラクタム剤であるメチシリンの MIC は各親株と変化がなかった (表 2-3)。

第 4 項 細胞壁の構造解析

分離した変異株はモエノマイシンのターゲットである細胞壁合成酵素 TGase を過剰発現あるいは欠失させることで、細胞壁の合成系に支障を来し、グリカン鎖長に変化が起こる可能性が考えられたため、細胞壁のグリカン鎖長解析を行った (図 2-9)。結果、HN051 (knockout *sgtB*) では親株 RN4220 に比べピークの山が前方に移行し、グリカン鎖長が短くなった。しかし、HK9818 (overexpress *sgtA*) , HN041 (overexpress *sgtB*) では違いが認められなかった。

第 5 項 作製した *sgtA*, *sgtB* 変異株の確認

作製した変異株の *sgtA*, *sgtB* の発現を Western 解析で確認した。結果、MSSA 株である RN4220 で作製した変異株のうち、HN041 は *sgtB* を過剰発現し、HN050, HN051 は *sgtB* が欠失していた (図 2-10-A)。また、HK4415 は *sgtA* を過剰発現していることを確認したが (データ示さず)、*S. aureus* に形質導入した株である HK9818 では過剰発現を確認できず、*S. aureus* では発現していない可能性が考えられた。また HK9835 は *sgtA* 欠失株として作製したが、*S. aureus* では発現していないため、Western 解析で発現を確認できなかった。これらの変異株のうち過剰発現株を MRSA 株である COL, KSA8 に形質導入した株も同様に、*sgtA* 変異株は発現を確認できず、*sgtB* 変異株で HN049, HN089 は過剰発現していた (図 2-10-B)。

第 6 項 *sgtA*, *sgtB* 変異株のライソスタフィン感受性試験

分離した変異株のうち、HN051 (knockout *sgtB*) のグリカン鎖長は親株に比べて短くなったことから、細胞壁ペプチドグリカンの消化酵素ライソスタフィンに感受性が上昇している可能性が考えられたため、ライソスタフィン感受性試験を行った (図 2-11)。結果、変異株を SDS 加熱処理し、タイコ酸等が結合した状態である未精製のペプチドグリカンに対する感受性は親株と比べ違いがほとんど認められなかった。しかし、生菌を用いた結果、*sgtA*, *sgtB* の過剰発現株および欠失株共に親株に比べライソスタフィン添加後の濁度の減少に遅延がみられライソスタフィンの感受性が減少した。*sgtB* 変異株も同様に過剰発現株の方が欠失株に比べて感受性が減少した。

第 7 項 *sgtB* 変異株の全 PBP の発現量の比較

分離した変異株のうち、HN051 (knockout *sgtB*) はグリカン鎖長が減少したため、細胞壁の構造変化が起こっている可能性を考え、架橋形成に関与する TPase に着目し、組み込まれたペプチ

ドグリカンの架橋形成を担う PBP4、合わせて他の全 PBP の発現量の Western 解析を行った (図 2-12)。しかし、これら蛋白の発現量は、親株と変異株とで違いが認められなかった。

第 8 項 *pbp* 変異株の各種細胞壁合成阻害剤の MIC

MSSA RN4220 から作製した *pbp3* 過剰発現株および欠失株の種々の細胞壁合成阻害剤に対する薬剤感受性を測定した結果、モエノマイシンの MIC は各々の親株に比べて、*pbp1*, *pbp2*, *pbp3*, *pbp4* とも過剰発現株では 2~4 倍上昇し耐性を示したが、*pbp3* 欠失株では逆に 8 倍低下した。バンコマイシンおよびテイコプラニンの MIC は親株と比べて、*pbp1*, *pbp2*, *pbp3*, *pbp4* 全ての過剰発現株で変化がなかったが、*pbp3* 欠失株ではテイコプラニンにのみ 4 倍上昇し耐性を示した。これら変異株を MRSA COL 株に形質導入した株も同様の傾向が認められ、モエノマイシンの MIC は *pbp1*, *pbp3*, *pbp4* の過剰発現株で 2 倍上昇し耐性を示し、*pbp3* 欠失株では逆に 4 倍低下した。バンコマイシンおよびテイコプラニンの MIC は親株と比べ過剰発現株、欠失株共に変化がなかった。しかし、 β -ラクタム剤であるメチシリンの MIC はほとんど変化がなかった (表 2-4)。

第 9 項 *pbp3* (*pbp2B*) 変異株の細胞壁構造解析

分離した *pbp3* 変異株はモエノマイシンの感受性に変化を来したため、モエノマイシンの標的であるグリカン鎖を結合する TGase を過剰発現あるいは欠失させることで、細胞壁の合成系に支障を来し、グリカン鎖長に変化が起こる可能性を考え、細胞壁のグリカン鎖長解析を行った (図 2-14)。結果、HN083 (knockout *pbp3*) では親株 RN4220 と違いが認められなかった。しかし、HN077 (overexpress *pbp3*) は親株に比べピークの山が前方に移行し、グリカン鎖長が短くなった。

第 4 節 考察ならびに小括

モエノマイシンの標的である TGase は *B. subtilis* や *E. coli* など様々な菌種で明らかにされており [1] [20] [23]、グリカン鎖の結合に関与する酵素として活性部位に広く保持された領域 (GXSTIXQQRKXXE, EDXXFXXHXG, KXXIXXXYXN) を有している。*S. aureus* でもこの consensus 領域を有する遺伝子が 3 つ、ゲノム解析により明らかとなっており [49] [88]、本実験で TGase 領域をコードする遺伝子である *pbp2*, *sgtA*, *sgtB* の産物とモエノマイシンとが親和性をもつことを明らかとした。すなわち、ペニシリンビーズには TPase 領域が、モエノマイシンビーズには TGase 領域を有する PBP2, SgtA, SgtB が結合を認めた。しかし、*S. aureus* の SgtA は膜蛋白および膜蛋白以外の画分である細胞質画分、全菌体破碎画分においても検出できなかったため、発現していない可能性が示唆された。

第 1 章より、バンコマイシンおよびモエノマイシンの感受性に影響を与える因子として、グリカン鎖長を増大させる因子の関与を指摘した。グリカン鎖長は TGase の担う合成系と、ペプチドグリカン加水分解酵素で担う分解系により決定されていると考えられる。分解活性については、

S. aureus の主要な溶菌酵素 ATL に違いがなかったことから、TGase に着目した。そこで、TGase 領域を過剰発現させた変異株は、グリカン鎖長が増大するか、ひいてはそのことがモエノマイシンおよびバンコマイシンの感受性に影響を与えるかを検討したところ、モエノマイシンには 4~8 倍耐性を示し、さらにバンコマイシンには 2 倍耐性を示した。しかし、細胞壁のグリカン鎖長に変化は認められなかった。TGase の過剰発現によりバンコマイシンの感受性が低下する理由として 2 つのことが示唆された。すなわち、増加した TGase により TGase の基質となる細胞膜上のペプチドグリカン前駆体量が増加するため、バンコマイシンの標的が増加し、耐性化した可能性が考えられる。もう一つの考え方として、増加した TGase により細胞膜上のペプチドグリカン前駆体を既存のペプチドグリカンに組み込む活性が増大し、バンコマイシンの作用である組み込み阻害に拮抗作用を持つことが考えられる。一方で、モエノマイシンの感受性が低下するのは、モエノマイシンの標的である TGase が増加することにより耐性化した可能性が示唆された。また、*sgtB* を欠失させた変異株は、グリカン鎖長が短くなった。変異株は細胞壁の構造に変化が起こっている可能性を考え、架橋度に影響を与える因子 TPase に着目した。*S. aureus* は架橋反応を担う酵素 PBP を 5 つ (PBP1, 2, 3, 4, PBP2A) 有しており [32] [45] [64] [87]、PBP2A 以外は β -ラクタム剤と親和性の高い TPase 領域を持つ [51] [66] [83]。PBP4 以外大きさはほぼ同じであり、N 末端には PBP2 が TGase 領域を持ち、PBP1, PBP3, PBP2A は未知領域を有している。このうち、PBP4 は Post-TPase といわれ、一旦組み込まれた細胞壁ペプチドグリカンの架橋形成を充実させる。しかし PBP4 を含めた全 PBP 蛋白の発現量に違いはなかった。このことから、グリカン鎖長や架橋には TGase や TPase が直接関与するだけではなく、他の因子も関与している可能性が示唆された。*S. aureus* の持つ PBP3 は TGase のコンセンサス領域を有さないためモエノマイシンビーズと親和性を持たないが、*pbp3* 欠失株はモエノマイシンの感受性が上昇したため、N 端の未知領域が TGase 様蛋白である可能性が考えられた。*B. subtilis* でも TGase 様のモチーフを持った PBP が 4 つ存在しており、その全ての欠失株ではモエノマイシンの感受性が上昇したという報告がある [55]。そこで、グリカン鎖長解析を行ったところ、*pbp3* 欠失株では親株と違いが見られなかったが、過剰発現株ではグリカン鎖長が短くなった。したがって、*pbp3* は何らかの理由でグリカン鎖長に影響を及ぼすことが示唆された。*B. subtilis* で TGase 領域をもつ PBP を欠失させた変異株が生存可能であるという報告 [55] から、monofunctional TGase および TGase 様蛋白が TGase 領域をもつ PBP の代替として作用している可能性が示唆される。*S. aureus* でも同様に、*pbp2*, *sgtA*, *sgtB* 以外に TGase のコンセンサス領域を持つ遺伝子が存在しないことを考慮すると、SgtB の TGase および TGase 様蛋白が代替として作用していることが示唆される。また、MRSA のもつ PBP2 の TGase と PBP2A のもつ TPase が調和してメチシリン耐性に寄与している可能性があるという報告 [65] から、SgtB は PBP2 や PBP2A と共にメチシリン耐性に寄与している可能性が考えられた。

小括

1. ペニシリンビーズは TPase 領域を有する PBP1, 2, 3, 4, 2A と結合し、モエノマイシンビーズは TGase 領域を有する PBP2, SgtB のみと結合した。

2. 精製した各リコンビナント蛋白と各抗血清において、SgtA は PBP2 と、SgtB は PBP2A と交差反応した。
3. TGase 領域の過剰発現株は、モエノマイシンの感受性が 4~8 倍耐性を示したが、*sgtB* 欠失株では 4 倍低下し、*sgtA* 欠失株では変化がなかった。グリコペプチド系の感受性は過剰発現株では 2 倍耐性を示したが、欠失株では変化がなかった。
4. *sgtB* 欠失株では親株に比べグリカン鎖長が短くなり、架橋度が増加した。
5. monofunctional TGase 領域の過剰発現株の方が欠失株に比べてライソスタフィンの感受性が減少した。
6. *sgtB* 変異株の全 PBP 蛋白の発現量は、親株と違いがなかった。
7. *pbp1*, *pbp2*, *pbp3*, *pbp4* とも過剰発現株は、モエノマイシンの感受性が 2~4 倍耐性を示したが、*pbp3* 欠失株では逆に 8 倍低下した。グリコペプチド系の感受性は全ての過剰発現株で変化がなかったが、*pbp3* 欠失株ではテイコプラニンにのみ 4 倍耐性を示した。
8. *pbp3* 過剰発現株ではグリカン鎖長が短くなったが、欠失株では親株と違いがなかった。

表 2-1-1 使用した菌株

Strain	Relevant characteristics	Source or reference
<i>S. aureus</i>		
COL	COL <i>mec</i>	A. Tomasz
BB270	NCTC8325 <i>mec</i>	B. Berger-Bächli
KSA8	clinical MRSA strain	clinical isolate
RN4220	8325-4 r ⁻	R. Novick
HN041	pHN713 / RN4220	This study
HN047	HK9818 transduce to MRSA COL	This study
HN049	HN041 transduce to MRSA COL	This study
HN050	pHN715 / RN4220 (1) (moneomycin MIC : 0.008 µg/ml)	This study
HN051	pHN715 / RN4220 (2) (moneomycin MIC : 0.002 µg/ml)	This study
HN075	pHK4498 / RN4220	This study
HN076	pHK4499 / RN4220	This study
HN077	pHK4504 / RN4220	This study
HN078	pHK4503 / RN4220	This study
HN079	HN075 transduce to MRSA COL	This study
HN080	HN076 transduce to MRSA COL	This study
HN081	HN077 transduce to MRSA COL	This study
HN082	HN078 transduce to MRSA COL	This study
HN083	pHK4506 / RN4220	This study
HN084	HN083 transduce to COL	This study
HN088	HK9818 transduce to MRSA KSA8	This study
HN089	HN041 transduce to MRSA KSA8	This study
HK9783	COL (<i>sgtA</i> :: <i>cat</i>)	This study
HK9818	pHK4415 / RN4220	This study
HK9835	HK9783 transduce to RN4220	This study
HN055	HK9818 transduce to BB270	This study
HN056	HK9818 transduce to BB270	This study
HN057	HN041 transduce to BB270	This study
HN058	HN041 transduce to BB270	This study

表 2-1-2 使用した菌株

Strain	Relevant characteristics	Source or reference
<i>E. coli</i>		
XLII-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F ⁺ <i>proAB lac f'ZΔM15 Tn10 (Tet)</i> Amy Cam]	Bullock et al.
BL21	pFLAG MACF <i>ompT hsdS_B (r_B M_B) gal dcm met</i> (DE3)	Novagen
HN701	pHN701 / XLII-Blue	This study
HN703	pHN703 / XLI-Blue	This study
HN704	pHN704 / XLII-Blue	This study
HN707	pHN707 / XLII-Blue	This study
HN712	pHN712 / XLII-Blue	This study
HN713	pHN713 / XLII-Blue	This study
HN714	pHN714 / XLII-Blue	This study
HN715	pHN715 / XLII-Blue	This study
HN720	pHN720 / XLII-Blue	This study
HN731	pHN731 / XLII-Blue	This study
HN732	pHN732 / XLII-Blue	This study
HN736	pHN736 / XLII-Blue	This study
HN737	pHN737 / XLII-Blue	This study
HK4385	pHK4383 / BL21	This study
HK4386	pHK4384 / BL21	This study
HK4457	pHK4457 / XLI-Blue	This study
HK4475	pHK4475 / M15	This study
HK4476	pHK4476 / M15	This study
HK4477	pHK4477 / M15	This study
HK4496	pHK4496 / XLII-Blue	This study
HK4497	pHK4497 / XLII-Blue	This study
HK4498	pHK4498 / XLII-Blue	This study
HK4499	pHK4499 / XLII-Blue	This study
HK4501	pHK4501 / XLII-Blue	This study
HK4502	pHK4502 / XLII-Blue	This study
HK4503	pHK4503 / XLII-Blue	This study
HK4504	pHK4504 / XLII-Blue	This study

表 2-2 使用したプラスミドおよびプライマー

Plasmids	Vector	Cloning site	Relevant properties	Reference or source
pGEM-T Easy			<i>E. coli</i> cloning vector for PCR products	Promega
pQE30			<i>E. coli</i> expression vector	QIAGEN
pFLAG MAC			<i>E. coli</i> expression vector	SIGMA
pCL8			Shuttle vector ; Amp ^r in <i>E. coli</i>	C. Lee
pCL15			Cloning vector ; Amp ^r in <i>E. coli</i> , CP ^r in <i>S. aureus</i>	C. Lee
pCL52.1			thermosensitive vector ; spectinomycin ^r in <i>E. coli</i> , TC ^r in <i>S. aureus</i>	C. Lee
pTF488	pCL95	<i>EcoRI/EcoRI</i>	pCL95 / 5.5 kbp <i>EcoRI</i> fragment of pHK4247 in XLII-blue	This study
pHK4247	pCR2.1	<i>EcoRI/EcoRI</i>	pOSA115 A1 e.p. to XL-II blue	Dr. Choi
pHK4300	pGEM	<i>EcoRI/EcoRI</i>	pGEM / <i>EcoRI</i> fragment of pTF488 in XLII-blue	This study
pHK4303	pGEM	<i>EcoRI/EcoRI</i>	pGEM / <i>Bgl</i> II fragment of pHK4300 + <i>cat</i> gene in JM109	This study
pHK4306	pCL52.1	<i>EcoRI/EcoRI</i>	pCL52.1 / 6.8 kbp <i>EcoRI</i> fragment of pHK4303 in JM109	This study
pHK4383	pFLAG	<i>Hind</i> III/ <i>Bgl</i> II	pFLAG containing PCR fragment [PBP4-R1H + 2BG] of ΔC-term <i>pbp4</i>	This study
pHK4384	pFLAG	<i>Hind</i> III/ <i>Bgl</i> II	pFLAG containing PCR fragment [PBP4-R1H + R3BG] of <i>pbp4</i>	This study
pHK4415	pLI50	<i>EcoRI/EcoRI</i>	pLI50 containing PCR fragment [FPR2 + LL5]+fntA promoter from [FPR2 + OSA116B] + [OSA116A + LL5] of <i>sgtA</i>	This study
pHK4457	pQE30	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	pQE-30 containing PCR fragment [PBP2A-1B + 2H] of N-term <i>pbp2A</i>	This study
pHK4475	pQE30	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	pQE-30 containing PCR fragment [PBP2A-1B + 2H] of N-term <i>pbp2A</i>	This study
pHK4476	pQE30	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	pQE-30 containing PCR fragment [PBP2A-1B + 4H] of <i>pbp2A</i>	This study
pHK4477	pQE30	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	pQE-30 containing PCR fragment [PBP2A-3B + 4H] of C-term <i>pbp2A</i>	This study
pHK4496	pGEM	<i>EcoRI/Pst</i> I	pGEM containing PCR fragment [PBP1U- <i>Pst</i> I +PBP1-ASN] of <i>pbp1</i>	This study
pHK4497	pGEM	<i>Sph</i> I/ <i>Bam</i> HI	pGEM containing PCR fragment [PBP2U- <i>Sph</i> I +PBP2U- <i>Bam</i> HI] of <i>pbp2</i>	This study
pHK4498	pCL15	<i>EcoRI/Pst</i> I	pCL15 containing PCR fragment [PBP1U- <i>Pst</i> I +PBP1-ASN] of <i>pbp1</i>	This study
pHK4499	pCL15	<i>Sph</i> I/ <i>Bam</i> HI	pCL15 containing PCR fragment [PBP2U- <i>Sph</i> I +PBP2U- <i>Bam</i> HI] of <i>pbp2</i>	This study
pHK4501	pGEM	<i>Sca</i> I/ <i>Sph</i> I	pGEM containing PCR fragment [F4-1 + PBP4-R3BG] of <i>pbp4</i>	This study
pHK4502	pGEM	<i>Sca</i> I/ <i>Sph</i> I	pGEM containing PCR fragment[F2B-1 + PBPLH-6] of <i>pbp3</i>	This study
pHK4503	pCL15	<i>Sca</i> I/ <i>Sph</i> I	pCL15 containing PCR fragment [F2B-1 + PBPLH-6] of <i>pbp3</i>	This study
pHK4504	pCL15	<i>Sca</i> I/ <i>Sph</i> I	pCL15 containing PCR fragment [F4-1 + PBP4-R3BG] of <i>pbp4</i>	This study
pHN701	pQE30	<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I	pQE-30 containing PCR fragment [nMGT-5 + 6] of <i>sgtB</i>	This study
pHN703	pGEM	<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I	pGEM containing PCR fragment [nMGT-7 + 6] of ΔN-term <i>sgtB</i>	This study
pHN704	pQE30	<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I	pQE-30 containing PCR fragment [nMGT-7 + 6] of ΔN-term <i>sgtB</i>	This study
pHN707	pGEM	<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I	pGEM containing PCR fragment [nMGT-5 + 6] of <i>sgtB</i>	This study
pHN712	pGEM	<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I	pGEM containing PCR fragment [nMGT-6 + 8] of ΔN-term <i>sgtB</i>	This study
pHN713	pCL15	<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I	pCL15 containing PCR fragment [nMGT-6 + 8] of <i>sgtB</i>	This study
pHN714	pGEM	<i>EcoRI/EcoRI</i>	pGEM containing PCR fragment [nMGT-7 + 11] of <i>sgtB</i>	This study
pHN715	pCL52.1	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	pYT1 containing PCR fragment [nMGT-7 + 11] of <i>sgtB</i>	This study
pHN720	pCL8	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	pCL8 containing PCR fragment [nMGT-7 + 11] of <i>sgtB</i>	This study
pHN731	pGEM	<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I	pGEM containing PCR fragment [nPBP3-1 + 3] of <i>pbp3</i>	This study
pHN732	pGEM	<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I	pGEM containing PCR fragment [nPBP3-2 + 3] of ΔN-term <i>pbp3</i>	This study
pHN736	pQE30	<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I	pQE-30 containing PCR fragment [nPBP3-1 + 3] of <i>pbp3</i>	This study
pHN737	pQE30	<i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I	pQE-30 containing PCR fragment [nPBP3-2 + 3] of ΔN-term <i>pbp3</i>	This study

Gene	Primer	Sequence (5' to 3')	Positions
<i>sgtB</i>	pQEUV	CGGATAACAATTTACACAG	
	pQERV	GTTCTGAGGTCATTAAGG	
	nMGT-5	GCGGATCCATGAAAAGAAGCGATAGG	1114-1140
	nMGT-6	TTGAGCTCTAAGCCACTTCTATAGC	2118-2144
	nMGT-7	ATGGATCCGATAATGTGGATGAACTAAG	1545-1576
<i>pbp3</i>	nMGT-8	GTGGATCCAGAAGGAGCAAACGCATG	1098-1138
	nMGT-11	TTTCTAGAGTTCGTGCTTACACGTTGCGT	2090-2121
	nPBP3-1	GTGGATCCCAAATCGCACAAGGCTCA	118-144
	nPBP3-2	CTGGATCCATGGCTATTACATATACT	663-689
	nPBP3-3	TTGAGCTCTATCATTTCTAAATACGA	2619-2645

表 2-3 親株と作製した変異株の種々の細胞壁合成阻害剤のMIC

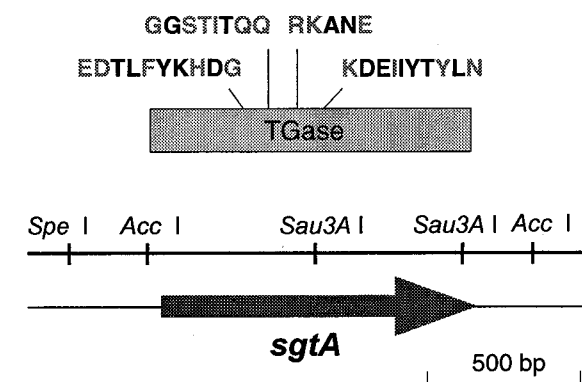
strains	relevant properties	MIC (μg / ml)			
		methicillin	teicoplanin	vancomycin	moenomycin
RN4220	wild type	1	0.5	0.5	0.008
HN041	4220 (<i>sgtB</i> / pCL15)	2	1	1	0.031
HN051	4220 (<i>sgtB</i> / pYT1)	1	0.5	0.5	0.002
HK9818	4220 (<i>sgtA</i> / pCL15)	1	1	1	0.063
HK9835	4220 (<i>sgtA</i> / pYT1)	1	0.5	0.5	0.008
COL	wild type	512	1	2	0.031
HN047	COL (<i>sgtA</i> / pCL15)	512	2	3	0.125
HN049	COL (<i>sgtB</i> / pCL15)	1024	2	3	0.125
HN076	COL (<i>pbp2</i> / pCL15)	512	2	3	0.125
BB270	wild type	512	2	2	0.031
HN055	BB270 (<i>sgtA</i> / pCL15)	512	3	3	0.063
HN057	BB270 (<i>sgtB</i> / pCL15)	512	3	3	0.125
KSA8	wild type	512	2	2	0.063
HN088	KSA8 (<i>sgtA</i> / pCL15)	512	3	3	0.25
HN089	KSA8 (<i>sgtB</i> / pCL15)	256	3	3	0.25

表 2-4 親株と作製した変異株の種々の細胞壁合成阻害剤のMIC

strains	relevant properties	MIC (µg / ml)				
		methicillin	teicoplanin	vancomycin	moenomycin	
RN4220	wild type	1	0.5	0.5	0.008	
HN075	RN4220 (<i>pbp1</i> / pCL15)	2	0.5	0.5	0.031	
HN076	RN4220 (<i>pbp2</i> / pCL15)	1	0.5	0.5	0.031	
HN077	RN4220 (<i>pbp3</i> / pCL15)	1	0.5	0.5	0.125	
HN078	RN4220 (<i>pbp4</i> / pCL15)	2	0.5	0.5	0.016	
HN083	RN4220 (<i>pbp3</i> / pYT1)	1	0.5	0.5	0.004>	
COL	wild type	512	1	2	0.031	
HN079	COL (<i>pbp1</i> / pCL15)	512	1	2	0.063	
HN080	COL (<i>pbp2</i> / pCL15)	1024	1	2	0.031	
HN081	COL (<i>pbp3</i> / pCL15)	512	2	4	0.125	
HN082	COL (<i>pbp4</i> / pCL15)	1024	1	2	0.063	
HN084	COL (<i>pbp3</i> / pYT1)	512	0.5	2	0.004	

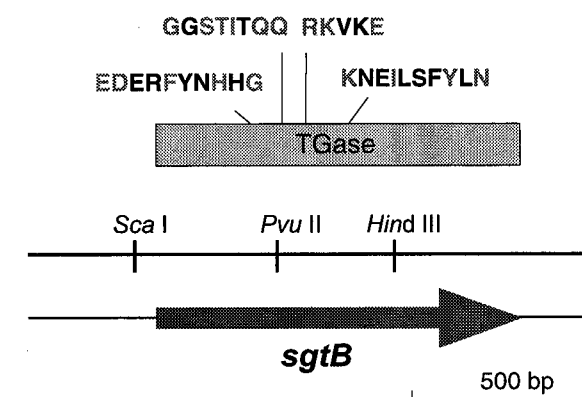
SgtA

membrane protein
TGase consensus region
M.W.= 34.5 kDa



SgtB

membrane protein
TGase consensus region
M.W.= 32.1 kDa



PBP2

membrane protein
TGase and TPase consensus region
M.W.= 74 kDa

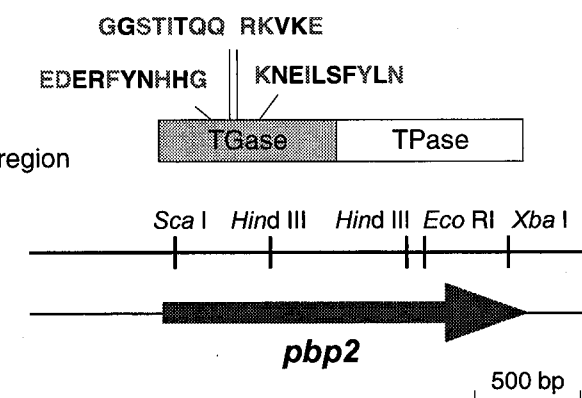


図 2-1 ゲノム上でTGaseドメインを有する遺伝子マップ

sgtA, *sgtB*はTGaseドメインをもつ領域を、*pbp2*はN端にTGaseドメインをもつ領域とC端にTPaseドメインをもつ領域を有している。TGaseドメインのコンセンサス領域をグレーで、下に制限酵素サイトを示した。

PBP3

membrane protein
TPase consensus region
penicillin binding affinity
M.W.= 72 kDa

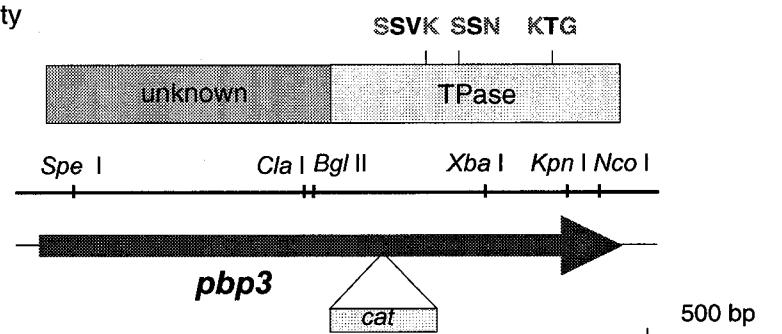


図 2-2 ゲノム上の *pbp3* 領域の遺伝子マップ

pbp3 は C 端に TPase ドメインをもつ領域を有している。TPase ドメインのコンセン領域をグレーで、下に制限酵素サイトを示した。 *cat* は欠失株作製時の遺伝子挿入部位を示す。

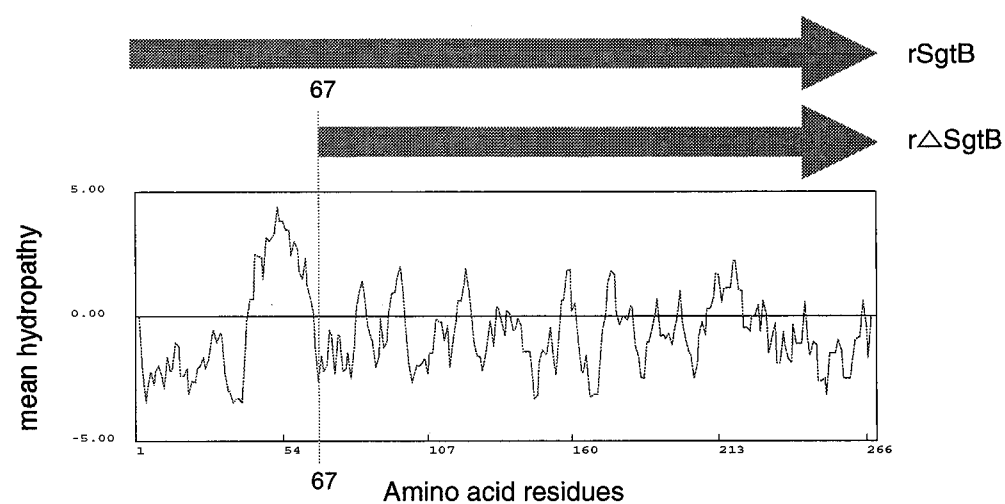


図 2-3 SgtB 蛋白の疎水性パターン

SgtB は N 末端 67 アミノ酸配列部分が疎水性に富んでいる。このため、シグナル配列を除く全ての領域を含む SgtB (full SgtB) の His-Tag 融合組換蛋白は精製できなかった。そこで、この N 末端 67 アミノ酸配列を除いた SgtB (Δ N-term SgtB) の His-Tag 融合組換蛋白を作製し、精製した。

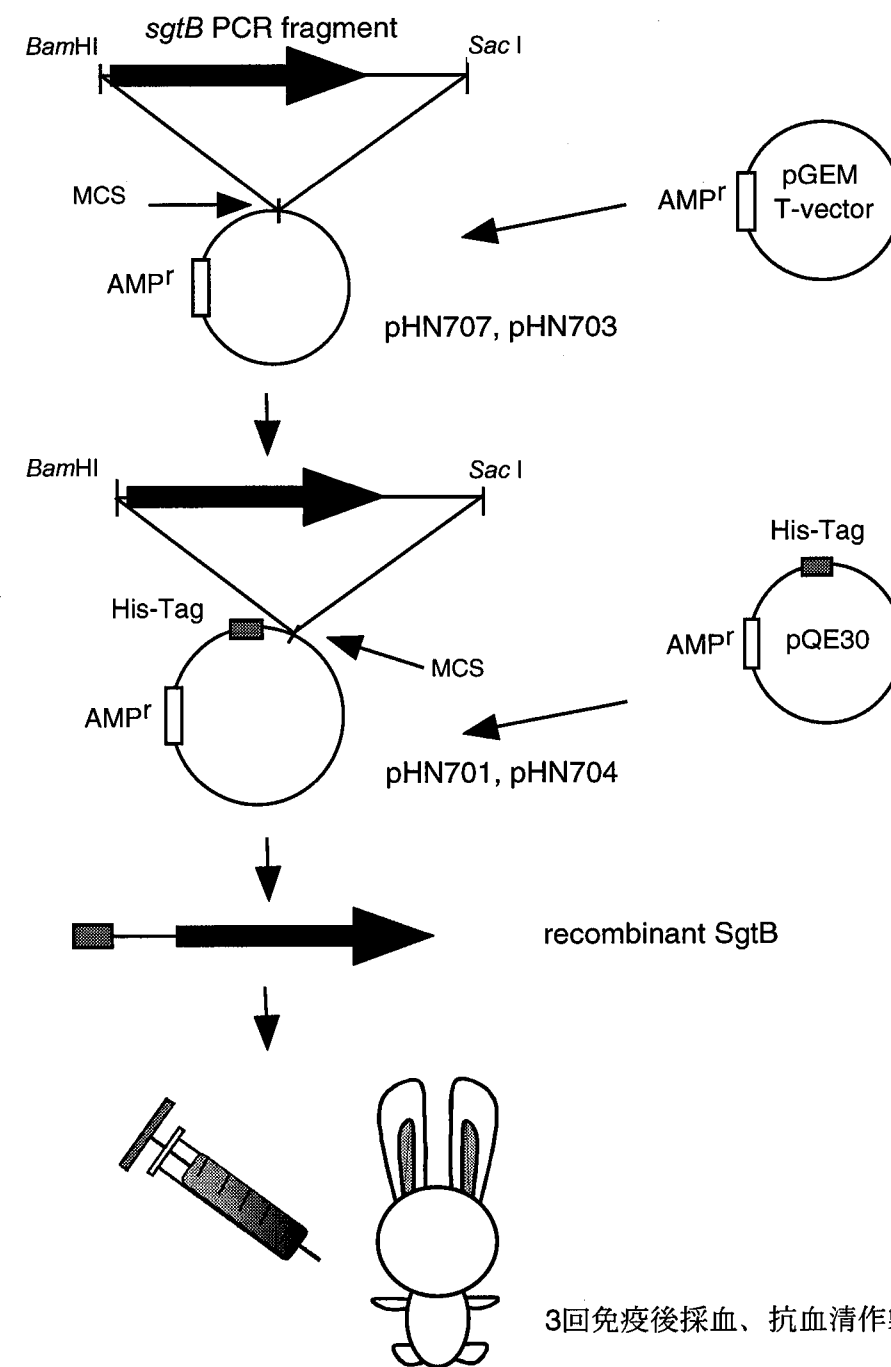
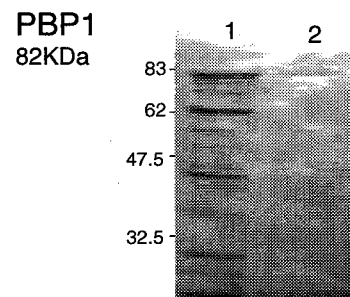


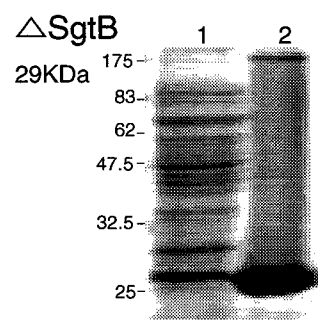
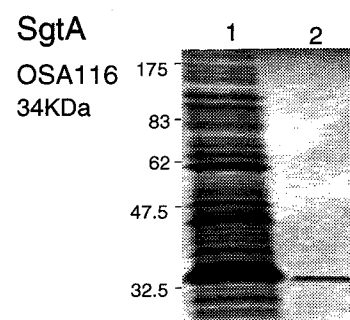
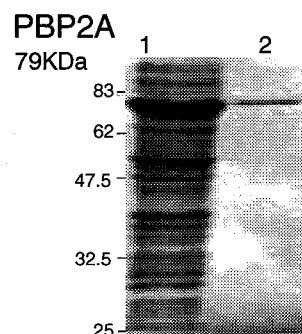
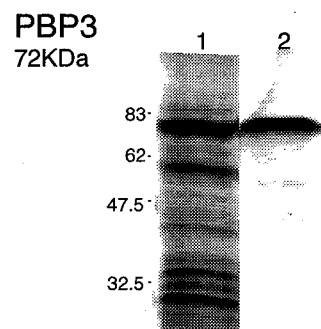
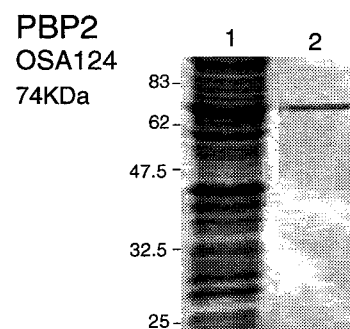
図 2-4 His-Tag SgtB 融合組換蛋白および抗体の作製

pGEM-T Easy Vector にシグナルペプチド領域を除いた *sgtB* フラグメントをクローニングし (pHN707, pHN703)、 *Bam*HI, *Sac* I で *sgtB* フラグメントを切り出した後、His-Tag 融合組換蛋白発現ベクターである pQE30 にクローニングした (pHN701, pHN704)。これをウサギに 3 回免疫し、得られた血清を抗体として使用した。

GST fusion protein



His-Tag fusion protein



FLAG fusion protein

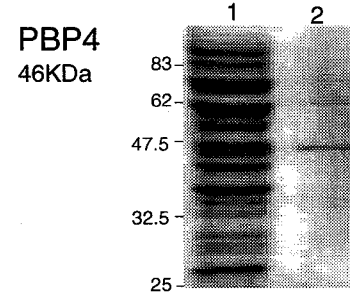


図 2-5 各種組換蛋白の精製

GST融合蛋白はPBSで透析してグルタチオンを可及的に取り除いて、HisTag融合蛋白 PBP2A, SgtAはPBSで透析して尿素を可及的に取り除いて実験に用いた。PBP2, PBP3は、HisTag融合蛋白として作製し、塩酸グアニシジンで精製を行ったため、塩酸グアニシジンを可及的に取り除いて実験に用いた。FLAG融合蛋白は中和して実験に用いた。lane 1: 全菌破碎画分, lane 2: 精製組換蛋白を示す。

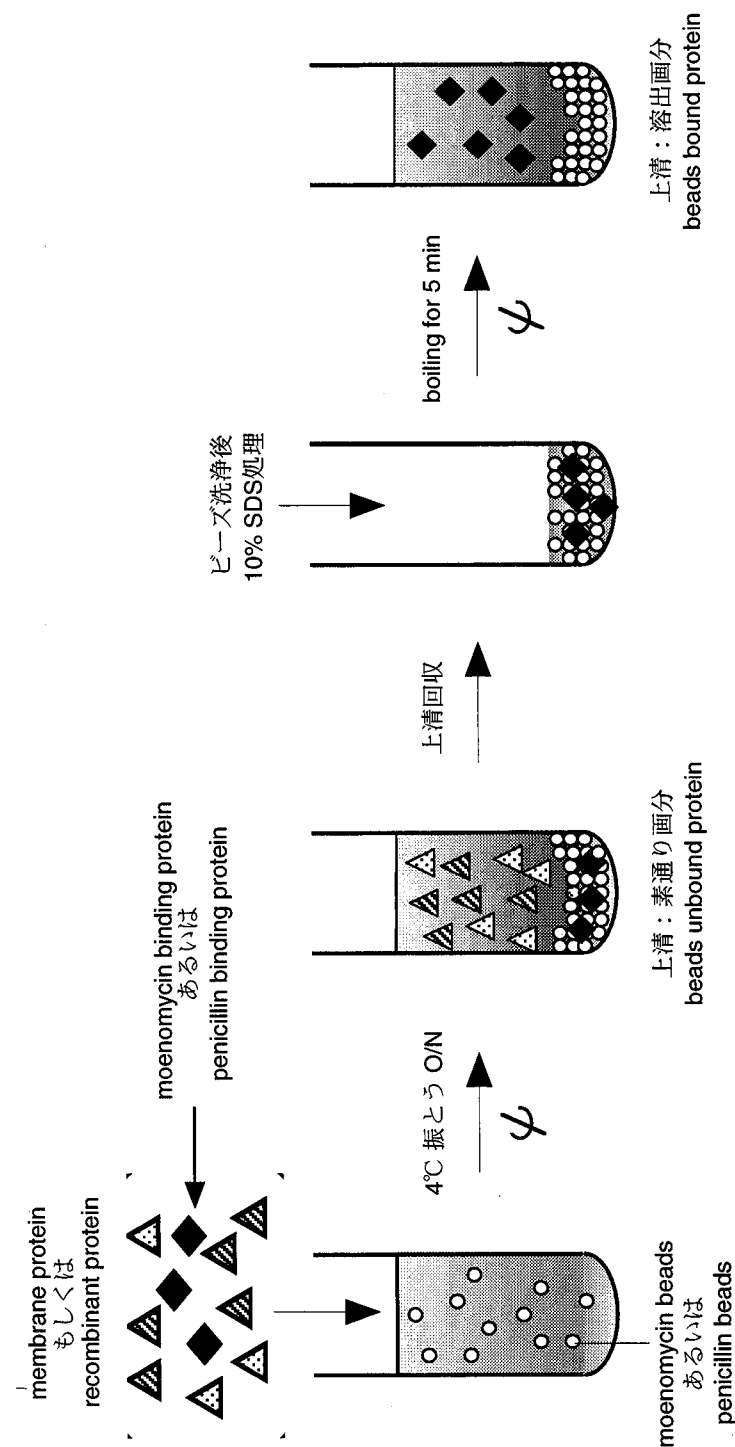
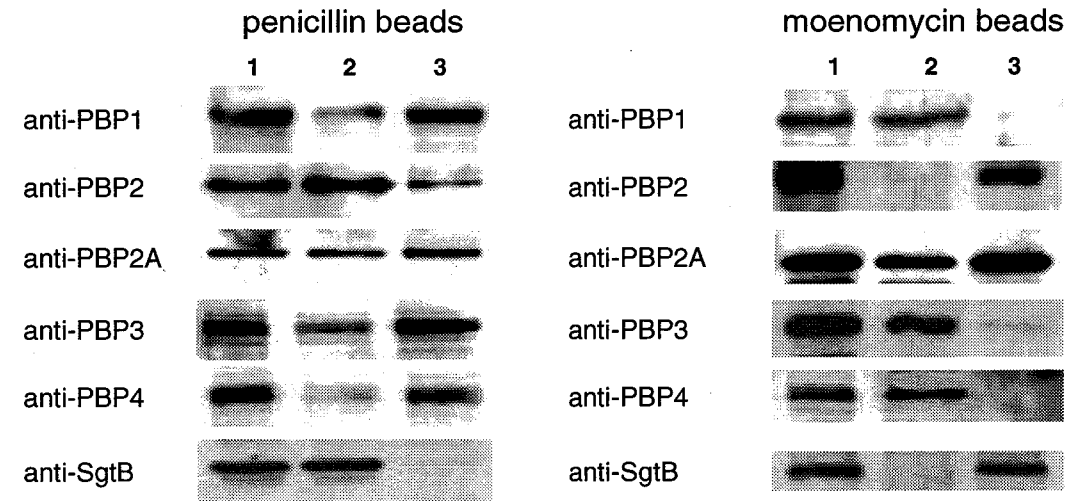


図 2-6 モエノマイシン/バンコマイシン結合実験 (1)

各薬剤ビーズと被検蛋白を4°Cで一晩反応させ、ビーズと蛋白を結合させた上清を素通りとして回収し、ビーズと結合していない蛋白を除いた。沈渣はサンプルバッファー (10% SDS含有) にて沸騰水浴中で溶出させ、得られた上清をビーズと結合する蛋白として回収し、これをSDS-PAGEにて分離した。各被検蛋白の抗体を1次抗体としてWestern解析を行い、モエノマイシンあるいはペニシリンビーズと結合する蛋白を検出した。

membrane protein



recombinant protein

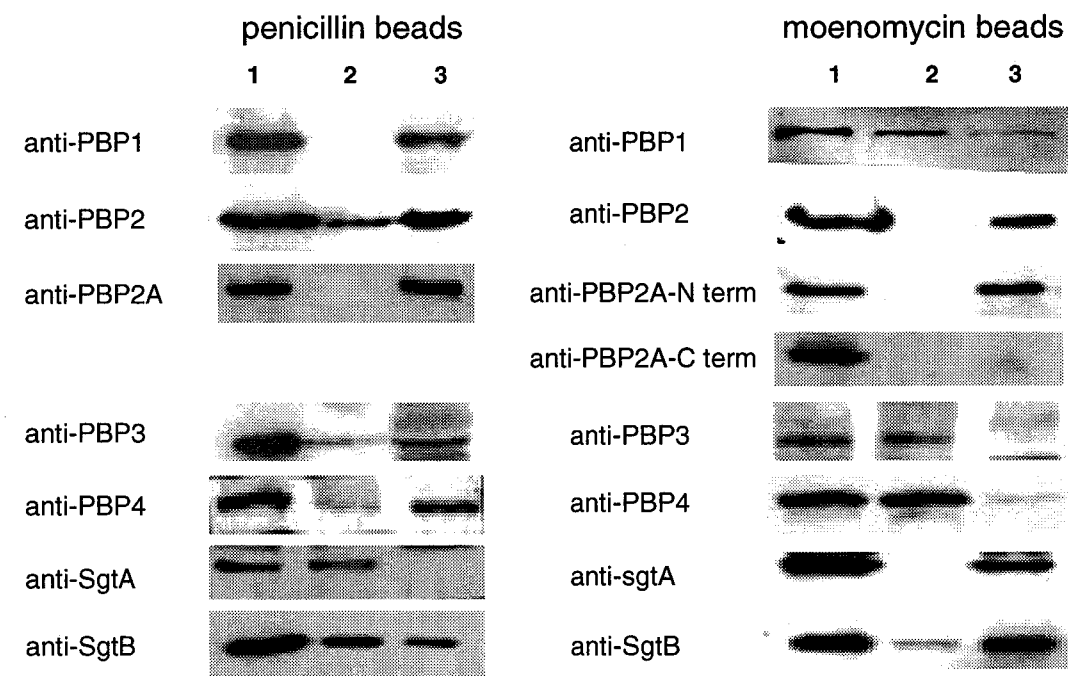
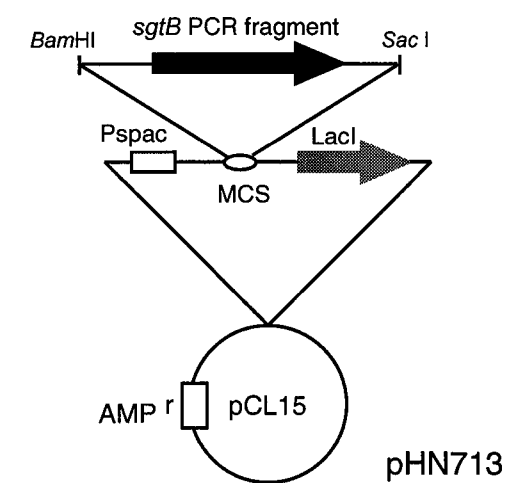


図2-6 モエノマイシン/バンコマイシン結合実験 (2)

調整した被検菌の細胞質膜画分と、精製した各組換蛋白を用いた。GST融合蛋白PBP1はPBSで透析してグルタチオンを可及的に取り除いて、HisTag融合蛋白 PBP2A, SgtA はPBSで透析して尿素を可及的に取り除いて実験に用いた。PBP2, PBP3は、HisTag融合蛋白として作製し、塩酸グアニシジンで精製を行ったため、塩酸グアニシジンを可及的に取り除いて実験に用いた。各薬剤ビーズと親和性のある蛋白は、溶出画分に検出される。lane 1 : pre binding画分, lane 2 : 素通り画分, lane 3 : 溶出画分を示す。

A



B

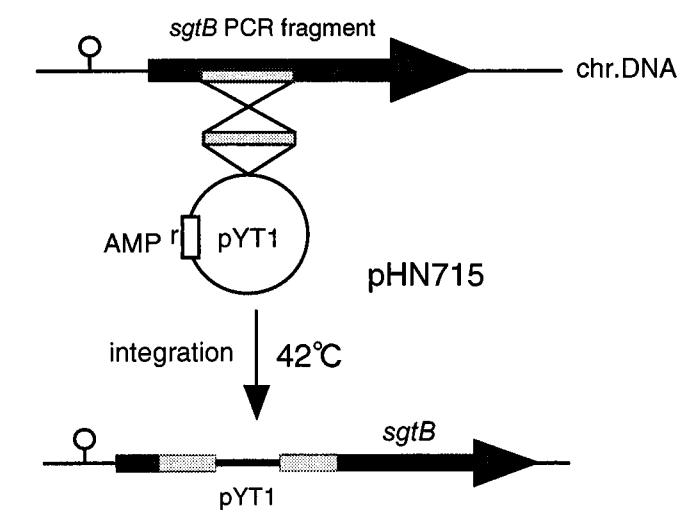


図2-7 *sgtB* 変異株の作製

*sgtB*の変異株の作製は、*S. aureus* COL株の染色体DNAを鋳型としてpGEM-T Easy Vector SystemにTAクローニングを行い、クローニングしたDNA断片を、IPTG添加により発現に誘導のかかる過剰発現用クローニングベクターpCL15もしくは欠失株作製用クローニングベクターpYT1にさらにクローニングした。得られた株のプラスミドを精製し、コンピテントセル用RN4220にエレクトロトランスフォーメーションを行い、薬剤選択培地で分離した。(A) 過剰発現株用ベクターpCL15、(B) 欠失株作製用ベクターpYT1へのクローニングをそれぞれ示す。

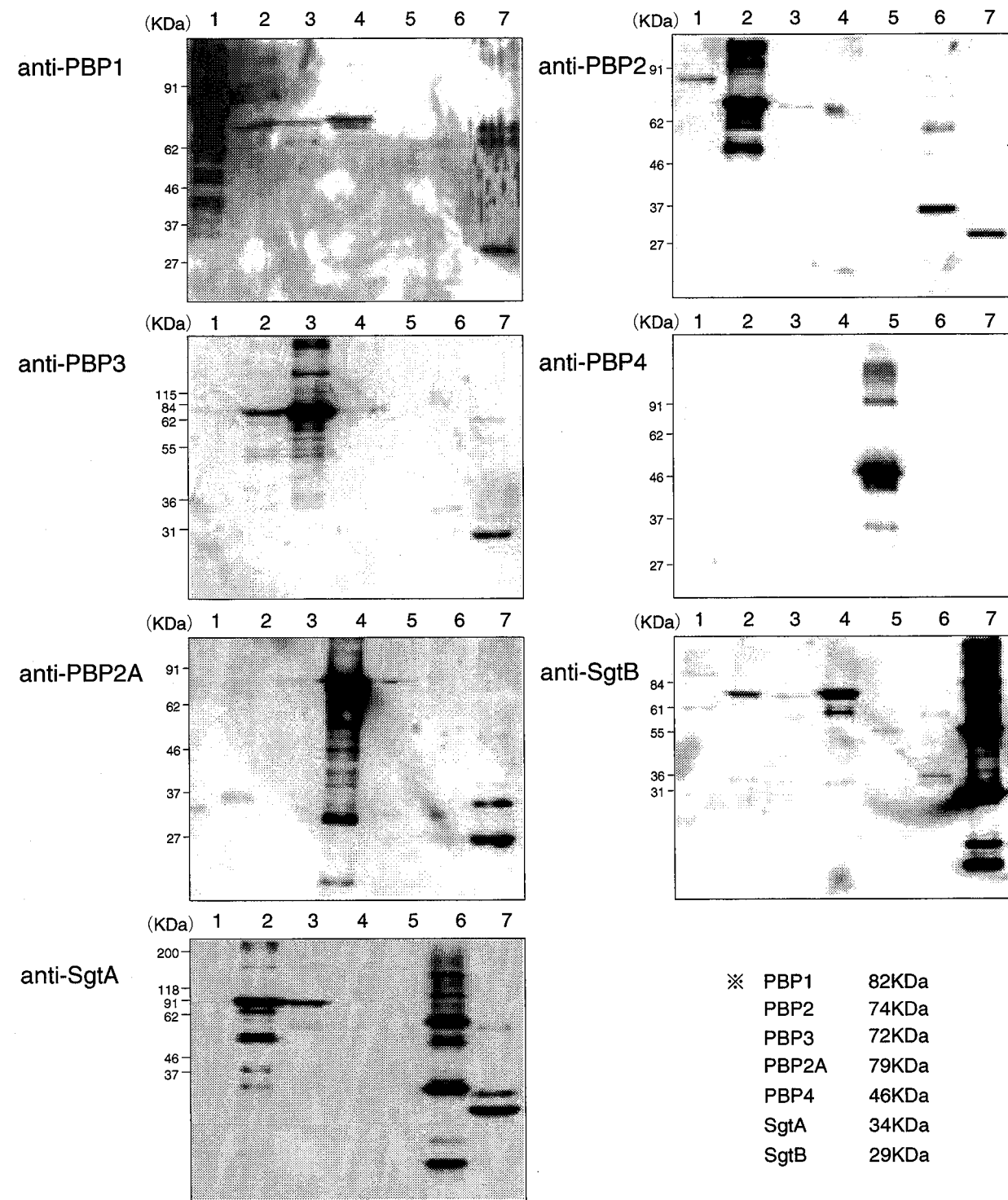


図 2-8 各種組換蛋白の交差反応

精製した各組換蛋白 (PBP1, PBP2, PBP3, PBP4, PBP2A, SgtA, SgtB) を等モルに調整した各組換蛋白をSDS-PAGEにて分離した。各蛋白に対する各抗血清7種を1次抗体として、Western解析をし、各抗血清に交差反応する各蛋白を検出した。lane 1 : PBP1, lane 2 : PBP2, lane 3 : PBP3, lane 4 : PBP2A, lane 5 : PBP4, lane 6 : SgtA, lane 7 : SgtBの組換蛋白を示す。

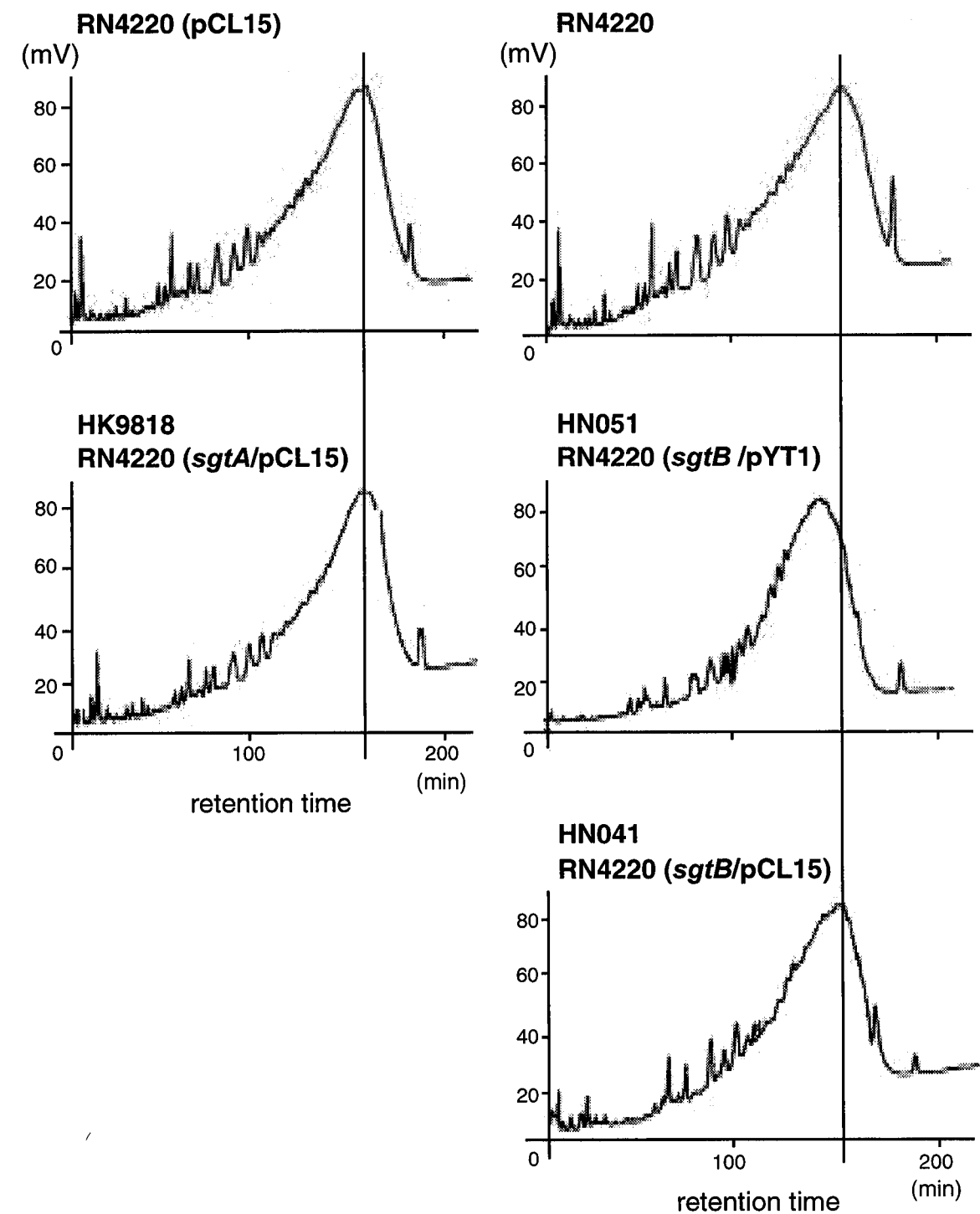


図 2-9 細胞壁の構造解析

精製したペプチドグリカンライソスタフィンにて完全に可溶化して調整したサンプルを、逆相高速液体クロマトグラフィーにて210分間のリニアグラディエントを行い、グリカン鎖長解析を行った。上段には、親株であるRN4220と、RN4220にpCL15vectorのみ導入した株をコントロールとして示した。

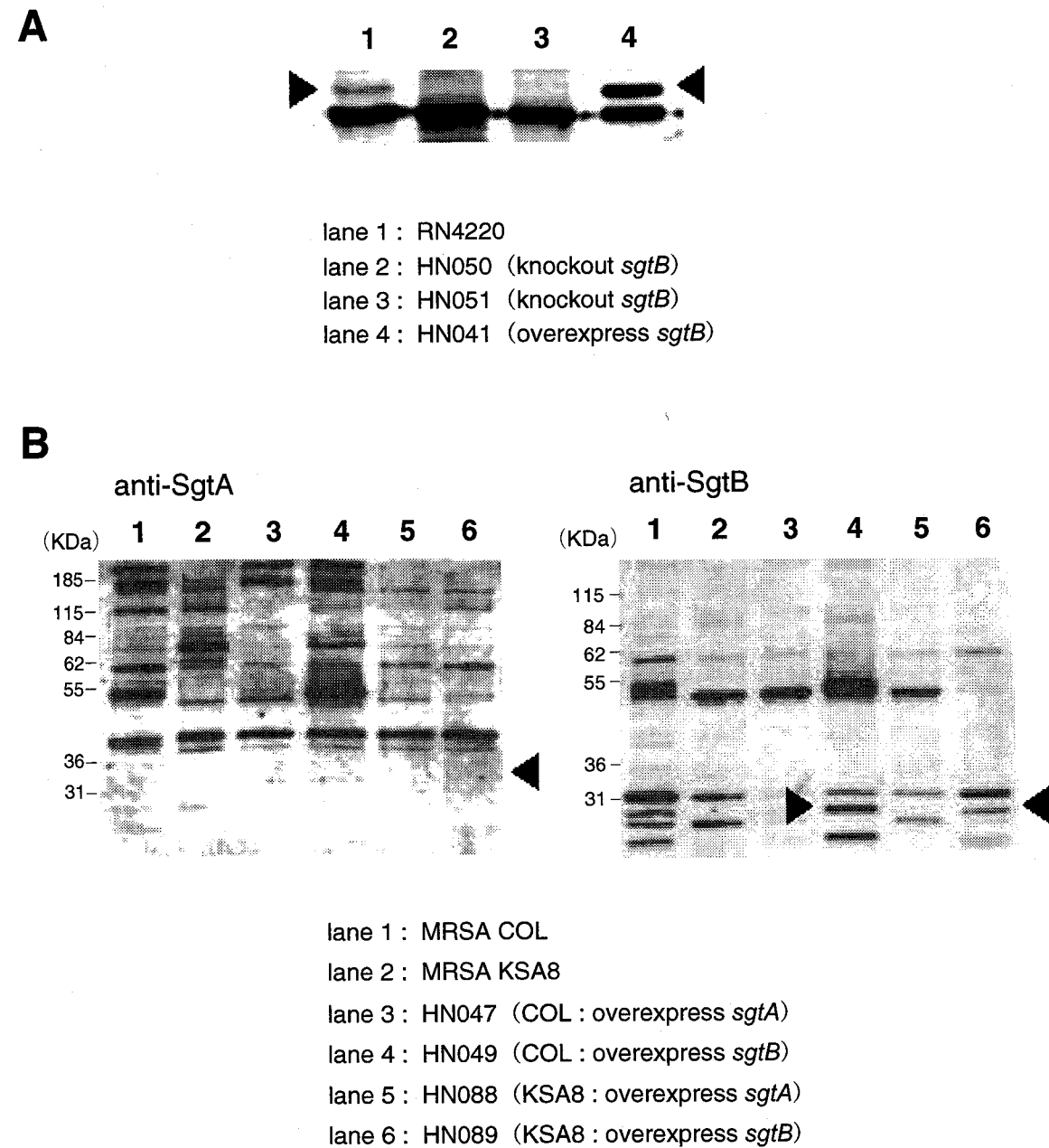


図 2-10 作製 *sgtA*, *sgtB* 変異株の確認

- (A) pCL15とpYT1 vector を用いて作製した*sgtB* 変異株である HN041(overexpress), HN050, HN051 (knockout)の膜蛋白を800ml culture から抽出し、遺伝子の発現を確認した。SgtAはWestern解析により検出できなかった。
- (B) 作製した変異株のうち、過剰発現株をMRSA COLおよびMRSA KSA8株に形質導入して得られたHN0047, HN049, HN088, HN089の遺伝子の発現を確認した。

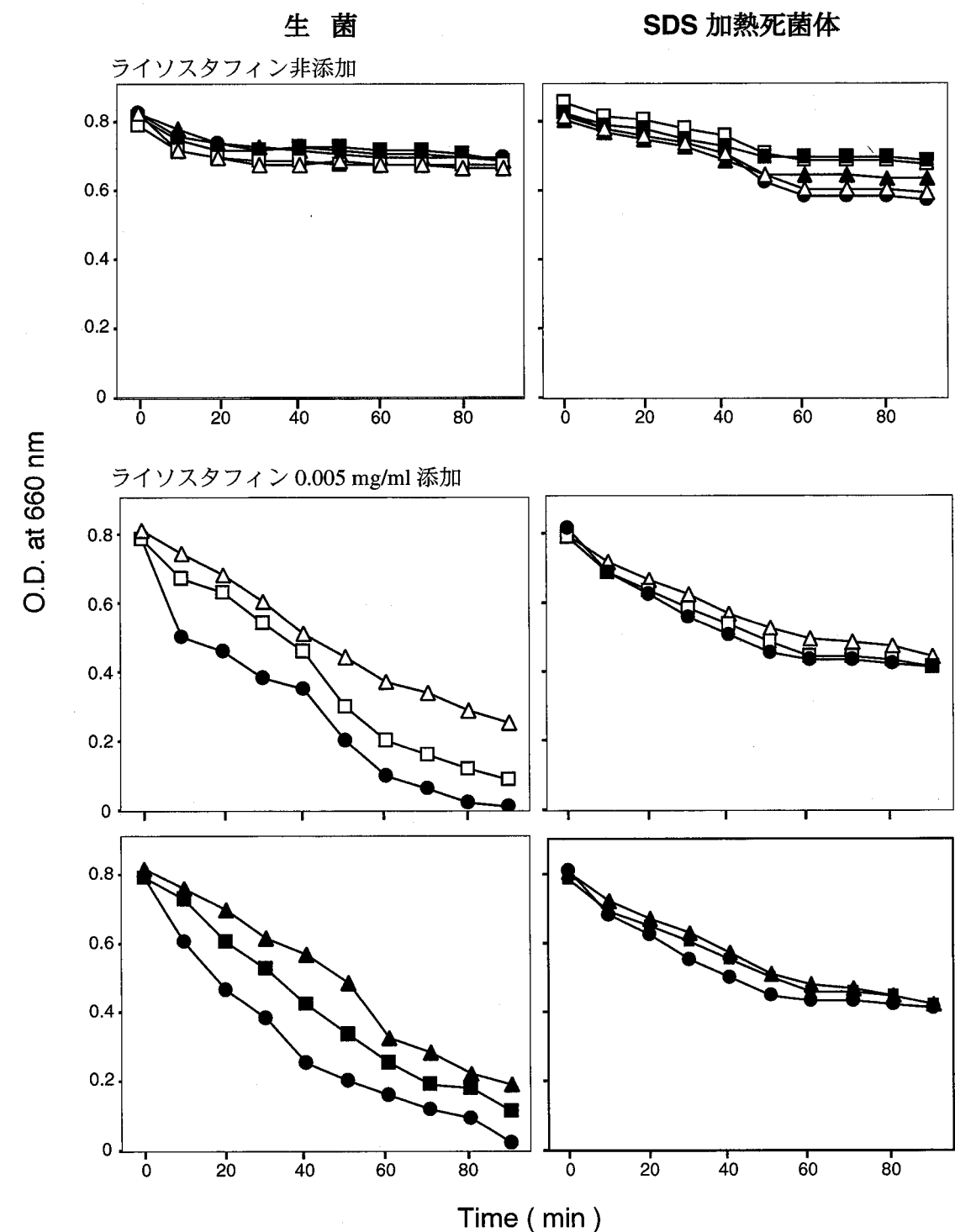


図 2-11 *sgtA*, *sgtB* 変異株のライソスタフィン感受性

- , 親株; ▲, △, *sgtA* 欠失株; □, *sgtA* 過剰発現株; ▲, *sgtB* 欠失株; ■, *sgtB* 過剰発現株をそれぞれ示す。

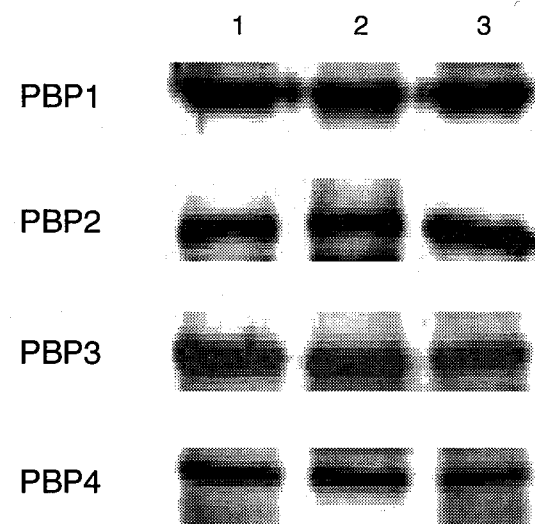


図 2-12 作製 *sgtB* 変異株の全PBP発現量

lane 1 : RN4220, lane 2 : HN051 (knockout *sgtB*) , lane 3 : HN041 (overexpress *sgtB*) を示す。

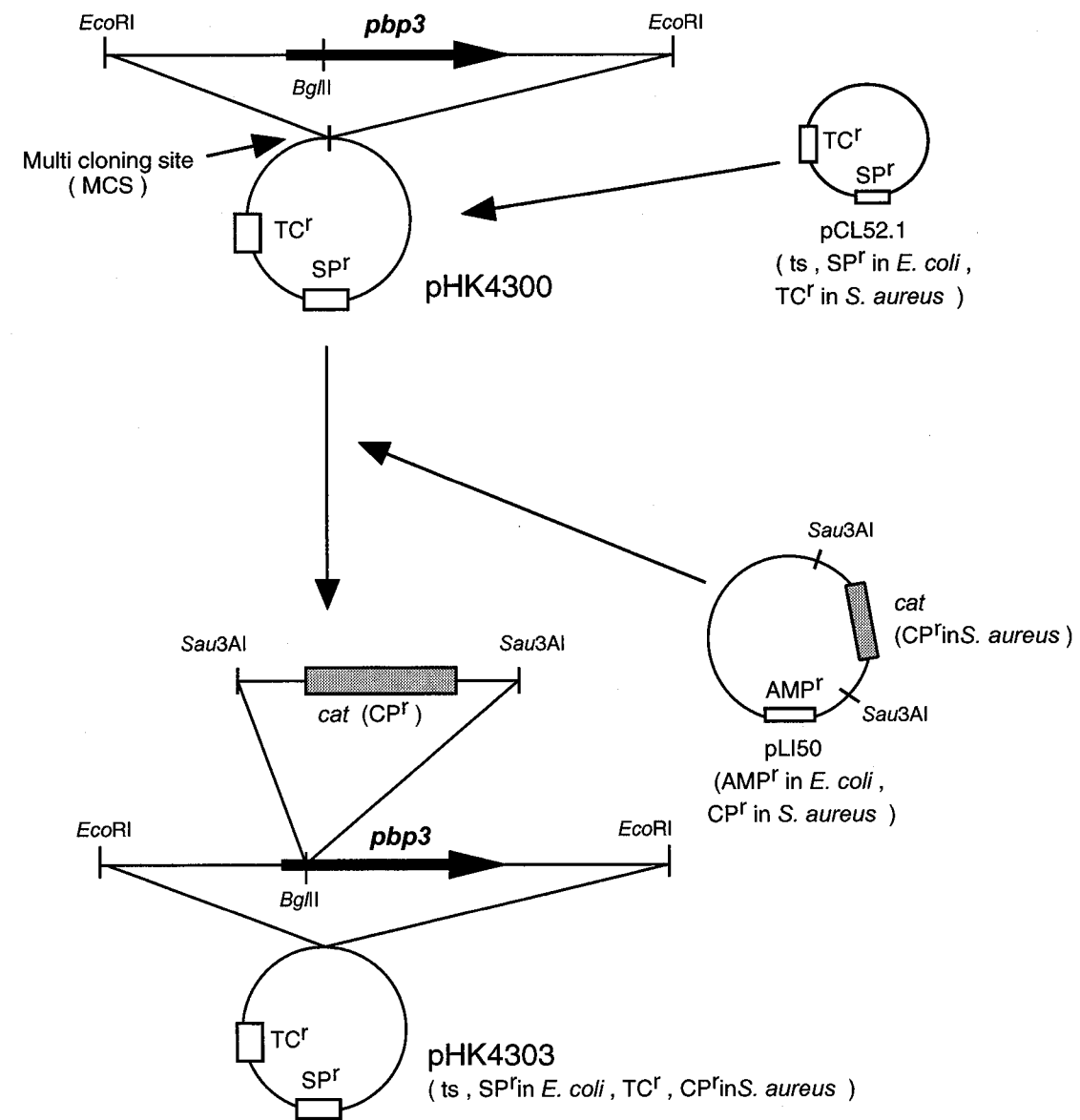
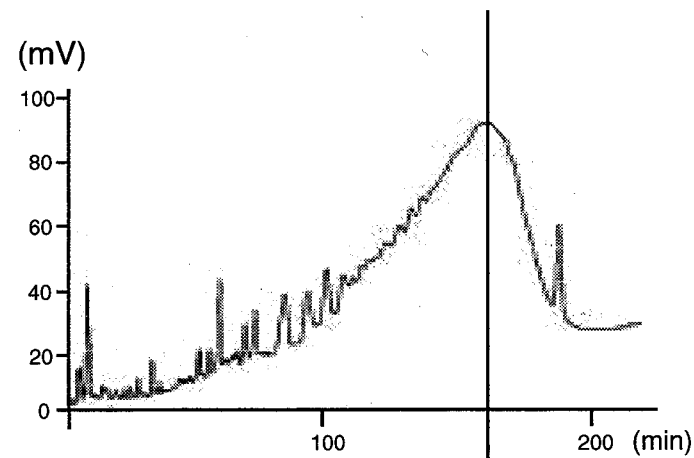


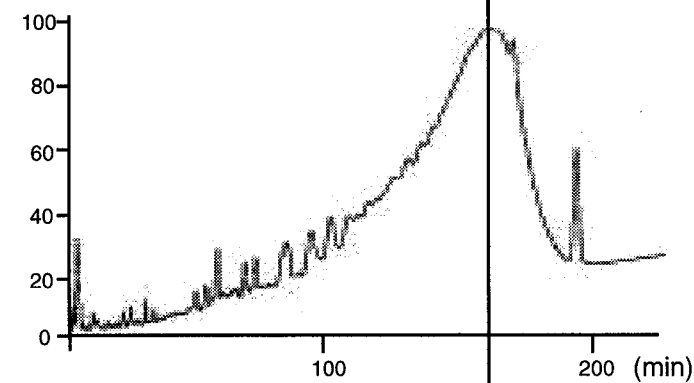
図 2-13 プラスミドHK4303の作製法 (*pbp3* 欠失株作製)

まず、*pbp3*のDNAフラグメントをインテグレーションベクターであるpCL52.1に挿入後、*pbp3*上の*BglIII*サイトに*cat* geneを挿入した。

RN4220



HN083
RN4220 (*pbp3* /*pYT1*)



HN077
RN4220 (*pbp3* /*pCL15*)

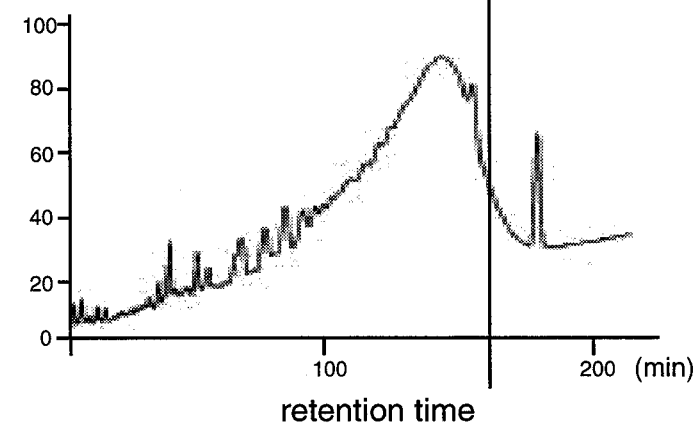


図 2-14 細胞壁の構造解析

精製したペプチドグリカンライソスタフィンにて完全に可溶化して調整したサンプルを、逆相高速液体クロマトグラフィーにて5% (vol/vol) メタノール含有 50 mM NaPi (pH 2.5) から30% (vol/vol) methanol含有 50 mM NaPi (pH 2.8) で210分間リニアグラディエントを行い、グリカン鎖長解析を行った。

第3章 Tn551 挿入モエノマイシン低感受性変異株の分離と性状解析

第1節 概要

第1章、第2章では、バンコマイシン低感受性機序にモエノマイシンの感受性に影響を与える因子が関与していることが示された。このため、第3章でモエノマイシンの感受性に関わる因子をさらに検討するために、Tn551の手法を用いて変異株を分離し、性状解析を行った。

Tn551 遺伝子を持つ温度感受性のプラスミドを導入した株を用いて COL 株の染色体 DNA に Tn551 がランダムに挿入された 4,000 株のライブラリーを作製した。このうちモエノマイシンの感受性が 8 倍以上耐性化した株 4 株 HN001~004 を分離した。これらの薬剤感受性を測定したところ、バンコマイシンおよびテイコプラニンには 1.5~2 倍耐性化した。そこで変異株の Tn551 挿入領域の遺伝子を同定したところ、HN001, 003 は同じ遺伝子領域内の異なる位置で、細胞膜成分であるリジルフオスファチジルグリセロール (LPG) の合成遺伝子である *fmcC* に、HN002 はリジン生合成系オペロンの最初の遺伝子である *lysC* に、HN004 は β -ラクタム剤の耐性に関与する遺伝子である *fmcB* に Tn551 の挿入を認めた。これらはモエノマイシンおよびバンコマイシン両薬剤の感受性に関わる新規の遺伝子であることが示された。分離した変異株のうち *lysC* 変異株である HN002 はリジン生合成系に支障を来しているためリジンおよびリジン合成系に必須であるアスパラギン酸も欠失させた培地では、増殖不能であった。分離した変異株のうち HN001, 003 は細胞膜の脂質成分 LPG 合成遺伝子に Tn551 の挿入を認めたことと、HN002 はリジン生合成系に支障を来し細胞膜脂質成分であるフォスファチジルグリセロールにリジンを添加できず LPG 量が減少している可能性を考え、細胞膜の脂質成分解析を行ったところ、HN001, 002 は親株に比べ LPG 量が減少した。LPG は陽性荷電であるため、LPG の減少により両変異株の陰性荷電がより強くなる可能性が示唆された。細胞膜の荷電変化は種々の抗菌ペプチドの感受性に影響することが報告されている[Peschel, 2002 #69]ことから、hBD3, CAP18 の両抗菌ペプチドの感受性を測定したところ、親株に比べ両変異株 HN001, 002 共に感受性が増加した。また、*fmcC*, *lysC* に Tn551 の挿入を認めたことで、細胞壁合成系に影響を及ぼす可能性を考え、細胞壁構造解析を行ったところ、共にムロペプチド構造およびグリカン鎖長に変化はなかった。また、荷電変化により、モエノマイシンおよびバンコマイシンと変異株との親和性に变化が起こる可能性を考え、両薬剤の菌体への結合量を測定した。生菌を用いた場合、両変異株 HN001, 002 は親株に比べ、共にモエノマイシンおよびバンコマイシンとの結合量は増加した。SDS 加熱処理死菌体には、両変異株と親株全ての株においてモエノマイシンはほとんど結合せず、また、バンコマイシンの結合量は、両変異株と親株とで違いは認められなかった。

以上のことより、Tn551 で分離した変異株は LPG 合成阻害により細胞膜の陰性荷電が強くなり、モエノマイシンおよびバンコマイシンは本来の標的以外の部位に捕そくされたため、これがモエノマイシンひいてはバンコマイシンの感受性に影響していることが示唆された。

第2節 材料および方法

第1項 使用菌株と培養

菌株は臨床分離の MRSA である COL、また Tn551 遺伝子をもつ温度感受性プラスミド pRN3208 を COL に導入した株である COL (pRN3208)、MSSA である RN4220 を使用した。培地は TSB にて 37 °C で振とう培養した。また、得られた Tn551 挿入変異株は 30 µg/ml の濃度を添加したエリスロマイシン (EM ; WAKO Pure Chemical Industries, Ltd.) を含む TSB にて 37 °C で培養を行った。

第2項 Tn551 挿入変異株の分離

Tn551 遺伝子を染色体 DNA に挿入することによる変異株作製法は Kornblum らの方法に従った (図 3-1) [48]。すなわち、EM 耐性遺伝子を Tn551 内にコードし、Tn551 外にカドミウム (Cd) 耐性遺伝子を含む温度感受性プラスミド pRN3208 を MRSA COL に導入した株である COL (pRN3208) を EM 30 µg/ml 含有 TSA に播き、30°C で 18 時間培養した。生育したコロニーを EM 30 µg/ml 含有 TSB にうえつぎ、再び 30°C で 18 時間振とうを行った。その培養液のうち 500 µl を EM 30 µg/ml 含有 TSB 10 ml にうえつぎ、30°C で振とう培養を行い、OD₆₀₀ = 0.2 に達したところで、42°C に温度を上げ、18 時間振とう培養した。この培養液を EM 30 µg/ml 含有 TSA および EM 30 µg/ml と Cd (Nacalai Tesque, Inc. Ltd) 30 µg/ml 含有 TSA に同時に播いた。42°C で 24 時間培養した後、Cd を添加した TSA には生育せず、EM のみを添加した TSA に生育したコロニー、すなわちプラスミドが壊れ、Tn551 が染色体 DNA にランダムに挿入された変異株のライブラリー 4,000 株を作製した。作製した染色体 DNA にランダムに Tn551 が挿入された 4,000 株の変異株を EM 含有 TSA から採取 (約 > 10⁷ cells) し、親株では増殖不可能な 10 MIC (0.31 µg/ml) のモエノマイシン含有 TSA にうえつぎ、37°C、24 時間静置培養した後、生育した株 39 株を分離した。これら 39 株のモエノマイシンの感受性を測定し、親株と比べ 8 倍以上感受性の低下した 4 株を Tn551 挿入モエノマイシン低感受性変異株 HN001~004 として第3項からの実験に用いた。

第3項 各種細胞壁合成阻害剤の MIC

第1章、第2節、第3項の方法を用いて分離した Tn551 挿入モエノマイシン低感受性変異株 4 株 (HN001~004) と親株の種々の化学療法剤の MIC を第1章、第2節、第3項の方法を用いて測定した。化学療法剤は、細胞壁合成阻害剤と蛋白合成阻害剤であるゲンタマイシン (GM ; Schering-Plough Corporation, Kenilworth, USA) を用いて測定した。

第4項 Backcross 株、Genetic outcross 株の作製

親株と形質の異なる Tn551 変異株を分離した際、再度親株に Tn551 を戻し (backcross)、その

変異株も形質が親株と異なることを確かめる必要がある。(backcross の場合、親株の DNA と相同性組換えを起こし、EM 耐性遺伝子の乗った Tn551 も同じ位置に組換えられる。) もしもその変異株の変異が Tn551 によらない誘発突然変異によるものであるならば、変異株から親株に Tn551 を戻した株 (backcross 株) は親株と同じ形質を示す。つまり分離した Tn551 変異株の形質の変化は Tn551 によるものではないことが示される。EM 耐性で分離した株 (backcross 株) が変異株と同じ形質を持てば Tn551 による変異株であることが証明できる。得られた変異株の Tn551 をもとの親株の同じ遺伝子領域に挿入するため、第1章、第2節、第10項の方法を用いて形質導入を行った。また他の MRSA に形質導入により変異株を作製した (genetic outcross 株) (図 3-2)。

得られた backcross 株 (HN019, HN039, HN040) の種々の化学療法剤の MIC を測定して、分離した Tn551 挿入変異株の性状確認を行った。

第5項 各種細胞壁合成阻害剤の population 解析

変異株の薬剤感受性をさらに検討するために、第1章、第2節、第4項の方法を用いてメチシリン、バンコマイシン、モエノマイシンの population 解析を行った。

第6項 Tn551 挿入領域の遺伝子同定

図 3-4 に示す方法でクローニングを行った。すなわち、分離したモエノマイシン低感受性変異株の Tn551 の挿入部位の遺伝子を同定するため、第1章、第2節、第11項の方法を用いてモエノマイシン低感受性変異株の染色体 DNA を抽出した。染色体 DNA 5 µg を制限酵素 *Hind* III 2 µl を用いて計 20 µl に調整して 37°C で一晩消化した。TE バッファーで 50 µl にメスアップしてフェノールクロロホルム処理をし、上清をエタノール沈澱により濃縮、これを 20 µl 滅菌水に溶解した。制限酵素処理された染色体 DNA を T4 ligase (Toyobo Co., Ltd.) を用いて 16°C で一晩反応し、セルフライゲーションにより閉環した。既知の遺伝子である Tn551 の DNA 断片内に逆向きに設計されたプライマー pTNR6 と pTNR8 (表 3-1) [72] を用いて、その両外側の Tn551 が挿入された未知の領域を Expand™ High Fidelity PCR System (Roche) を用いた PCR 反応により増幅した。得られた PCR 産物を 1% アガロースゲル電気泳動を行い、DNA 断片を Gene-clean Kit II (BIO 101) を用いてアガロースゲルから抽出した。回収した DNA 断片を pGEM-T Easy Vector System に加え、第2章、第2節、第2項の方法を用いて遺伝子クローニングを行い、HN705, HN706, HN716, HN725 を分離した (表 3-1)。得られた 4 株について第1章、第2節、第2項の方法を用いて煮沸法により少量のプラスミドを抽出し、*Eco*RI で消化後、1% アガロースゲル電気泳動を行い、UV 照射下において ATTO densitograph (ATTO) で泳動結果を撮影し、目的遺伝子が pGEM-T Easy Vector にクローニングされていることを確認した。そこで、これらの株からプラスミドを plasmid miniprep kit (Bio-Rad) を用いて抽出した。

得られたプラスミドを鋳型として、Thermo sequence fluorescent labelled primer cycle sequencing kit (Amersham pharmacia biotech) を用いてシーケンス反応を行った。シーケンス反応 PCR には ddNTP

含有ヌクレオチド混合試薬各 2 μ l、鋳型 DNA (1 μ g/ μ l) 1 μ l、Cy-5 標識 10 μ M primer (10 pmol/ μ l) 1 μ l、滅菌イオン交換水 5 μ l を用いた。Cy-5 標識 10 μ M primer は pGEM-T Easy Vector の *lacZ* 領域のマルチクローニングサイトの両端にアニールする Cy5 標識した universal primer 5'-CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3' と reverse primer 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' を用いた。シーケンス反応用 PCR は 95 $^{\circ}$ C 2 min, [95 $^{\circ}$ C 30 sec, 60 $^{\circ}$ C 30 sec, 60 $^{\circ}$ C 2 sec] を 25 cycle, 60 $^{\circ}$ C 2 sec, 4 $^{\circ}$ C の条件で行った。PCR 反応終了後サンプルに Loading dye 5 μ l 添加し 90 $^{\circ}$ C 2 min 処理を行って反応を停止した。その後 DNA を 1 本鎖にするために 95 $^{\circ}$ C 1 hr 処理し、作製したシーケンス用ゲルに各 7.5 μ l を泳動した。シーケンス用ゲルは、UREA ALF grade 27 g (Amersham), Long Ranger gel solution 9 ml (Takara), 10 X TBE 7.5 ml, イオン交換水 75 ml を加え混和し、10% APS (Amersham) 350 μ l, TEMED (Amersham) 35 μ l を加え重合させた。泳動には ALFred DNA sequencer (Amersham) を使用した。塩基配列決定、解析には ALF winTM Sequence Analyser (Amersham)、GENE WORKS 2.5.1 (IntelliGenetics, CA, USA) を用いた。相同性検索は TIGR Microbial Data Base (<http://www.tigr.org/index.html>) において公開されている *S. aureus* COL 株完全塩基配列データベースを用いて行った (図 3-4)。

第 7 項 増殖速度の測定

分離したモエノマイシン低感受性変異株 HN002 : COL (*lysC* ::Tn) と親株 COL を、Chemically defined medium (CDM) で OD_{660nm} = 1.0 に達するまで 37 $^{\circ}$ C で培養した。CDM とは化学的組成が明らかとなっている *S. aureus* 用に作製された培地 [19] で、Solution 1 (Na₂HPO₄·12H₂O, 20.1 g; KH₂PO₄, 3 g; L-aspartic acid, L-glutamic acid, L-isoleucine, L-leucine, L-proline, L-threonine and L-valine, 各 150 mg; L-alanine, L-arginine, glycine, L-histidine, L-lysine, L-methionine, L-phenylalanine, L-serine, L-tryptophan and L-tyrosine, 各 100 mg; L-cystine 50 mg; イオン交換水 700 ml に溶かして pH 7.2 に調節したもの)、Solution 2 (biotin, 0.1 mg; nicotinic acid, 2mg; D-pantothenic acid, 2 mg; pyridoxal, 4 mg; pyridoxamine dihydrochloride, 4 mg; riboflavin, 2 mg; thiamin hydrochloride, 2 mg; イオン交換水 100 ml に溶かす)、Solution 3 (adenine sulphate, 20 mg; guanine hydrochloride, 20 mg; 0.1 M HCl に溶かして、イオン交換水 50 ml までメスアップ)、Solution 4 (CaCl₂·6H₂O, 10 mg; MnSO₄, 5 mg; (NH₄)₂SO₄·FeSO₄·6H₂O, 3 mg; 0.1 M HCl 10 ml で溶解)、Solution 5 (glucose, 10 g; MgSO₄·7H₂O, 500 mg; イオン交換水 100 ml に溶解)、Solutions 1~4 すなわち CDM を混合して 900 ml までイオン交換水でメスアップした。CDM 10 ml に対し、Solution 5 を 1 ml を添加した。この被検菌を 50 μ l ずつ 3 種類の培地、CDM 10 ml, L-aspartic acid 非含有 CDM 10 ml, L-lysine, L-aspartic acid 非含有 CDM 10 ml にうえつぎ、37 $^{\circ}$ C で振とう培養して経時的に濁度の増加を吸光光度計で測定した。

第 8 項 抗菌ペプチドの感受性試験

抗菌ペプチドはヒト上皮細胞が産生する human- β -defensin-3 (hBD3) [21] [33] [71] [84] およびヒト好中球が産生するカテリシジンファミリーに属する cationic anti-microbial protein (hCAP18) [91]

を各々合成したペプチドを用いて、第 1 章、第 2 節、第 14 項の方法を用いて抗菌ペプチドの感受性を測定した。

第 9 項 *lysC* 変異株 (genetic outcross 株) の作製と解析

分離した *lysC* 変異株である HN002 を第 1 章、第 2 節、第 10 項の方法を用いて形質導入により MRSA 株である COL 株から MRSA KSA8 および NCTC10443 に移した。得られたコロニーを EM 30 μ g/ml 含有 TSA に播き、生育したコロニー HN053 (KSA8), HN054 (NCTC10443) を分離した。分離した 2 株について、各種細胞壁合成阻害剤の MIC を第 1 章、第 2 節、第 3 項の方法を用いて、さらに抗菌ペプチドの感受性を第 1 章、第 2 節、第 13 項の方法を用いて測定した。

第 10 項 *lysC* 相補株の作製と解析

分離した *lysC* 変異株の *lysC* 遺伝子部分もしくはリジン生合成系オペロン全体を *lysC* 変異株である HN002 に戻した場合、形質が親株と同じ形質を示すか確認を行うため、プロモーター領域を包含する *lysC* 遺伝子の全長を増幅するプライマー、および lysine 生合成系オペロン全体を増幅するプライマーを設計した (表 3-1)。これらプライマーと、*S. aureus* COL 株の染色体 DNA を鋳型として第 2 章、第 2 節、第 2 項に準じて PCR 法により DNA フラグメントを得た後、pGEM-T Easy Vector System に TA クローニングを行った。結果としてリジン生合成系オペロン全長のクローニングは行えず、*lysC* のみ遺伝子をクローニングし、HN723 として分離した。

クローニングした HN723 の 2,430 bp の DNA 断片を、*EcoRI* で消化後、第 2 章、第 2 節、第 2 項に準じて、シャトルベクターである pCL8 にクローニングし、HN724 として分離した。HN724 についてプラスミドを精製し、コンピテントセル用に調整した RN4220 にエレクトロトランスフォーメーションを行って、HN052 を分離した。得られた HN052 を第 1 章、第 2 節、第 10 項の方法を用いて形質導入により移して HN061 を分離し、モエノマイシンおよびバンコマイシン、メチシリンの MIC を第 1 章、第 2 節、第 3 項の方法を用いて測定し、HN002 の形質が親株と同じ形質に戻っているか確認した。

第 11 項 細胞膜の脂質解析

脂質の分析、定量には二次元薄層クロマトグラフィーを用いた。試料の調整は、Bligh らの方法に準じて行った [6]。すなわち、分離したモエノマイシン低感受性変異株 2 株および、親株を 10 ml TSB にて OD_{660nm} = 1.0 に達するまで 37 $^{\circ}$ C で培養した菌体を再び 10 ml TSB にて OD_{660nm} = 1.0 に達するまで培養し、菌体の凍結保存の際含まれるグリセロールを除去した。この菌体を 10 ml TSB にて OD_{660nm} = 0.3 に達するまで培養し、[2-³H] グリセロール (37 MBq/ml) (Daiichi chemical Industries, Ltd., Tokyo, Japan) を 10 μ l 添加し、37 $^{\circ}$ C で 2 時間培養して遠心 (9,000 x g, 15 min, 4 $^{\circ}$ C) し、得られた菌体を PBS で洗浄し、3 ml のクロロホルム-メタノール (2 : 1 vol/vol) に懸濁した。これ

を氷上で5分間超音波にて菌体を破碎し、1 ml のイオン交換水を加え一晩室温にて静置した。下層の脂質を溶解したクロロホルム相を分取し、ロータリーエバポレーターにて濃縮した。この試料をシリカゲル G プレート (250 microns, Analtec, Inc., Newark, DE) にスポットし、Kanemasa らの方法に準じて二次元展開した[40]。展開溶媒は、一次元用にはクロロホルム-メタノール-イオン交換水 (70:25:4 vol/vol) を、二次元用にはクロロホルム-メタノール-7M アンモニア溶液 (60:35:35 vol/vol) を用いた。展開後ヨウ素染色し、分画された各スポットを掻き取って液体シンチレーションカウンター測定用試薬 Clear-sol III (Nacalai tesque Inc. Ltd.) にて計測した。

第12項 細菌細胞の荷電測定試験ならびに RP-HPLC を用いた細胞壁構造解析

分離したモエノマイシン低感受性変異株と親株の菌体の荷電を、ゼータ電位測定装置 Zeecom (Microtec, Niton, Funabashi, Japan) を用いて検討した。一晩培養した被検菌を 10 mM リン酸バッファー (pH 6.8) にて洗浄後、同緩衝液にて最終濃度 10^9 cells/ml となるように調整した。10 mM リン酸バッファー (pH 6.8) 10 ml に調整した菌体 3 μ l を加え 50 V でレーザーを照射して、各被検菌 100 粒子のレーザー光線による泳動を表 3-3 に示す Smoluchowski 方程式を用いて測定した[57]。

第13項 モエノマイシンおよびバンコマイシン結合能の測定

モエノマイシンおよびバンコマイシン結合能の測定の測定は Hanaki らの方法に従った[31]。分離したモエノマイシン低感受性変異株と親株を TSB にて $OD_{660nm} = 1.0$ に達するまで 37°C で培養した。この各菌体 1 ml に種々の濃度 (モエノマイシン: 0.125, 0.25, 0.5, 1, 4, 16, 32 μ g/ml、バンコマイシン: 16, 64, 128, 256, 512 μ g/ml) に調整したモエノマイシンおよびバンコマイシンの薬液を添加し、室温で 15 分振とうして、菌体と薬剤を結合させた。遠心 (9,000 x g, 15 min, 4°C) 後、上清 50 μ l を滅菌した直径 7mm のろ紙に浸透させ、 $OD_{660nm} = 0.8$ に達するまで 37°C で培養した MRSA COL 株を 0.5% LB-agar に対して 1/1000 量または Bacillus subtilis 株を 0.5% LB-agar に対して 3/1000 量添加し、15 ml / 1 plate で固めた菌体封入 0.5% LB-agar 上に置き、密着後 37°C で一晩培養した。また、コントロールとしてモエノマイシン: 0.063, 0.125, 0.25, 0.5, 1 μ g/ml、バンコマイシン: 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128 μ g/ml の薬液 50 μ l を同様に滅菌ろ紙に浸透させ、菌体封入 0.5% LB-agar 上に置き、密着後 37°C で一晩培養した。モエノマイシン浸透ろ紙は MRSA COL 株封入寒天平板上に、バンコマイシン浸透ろ紙は B. subtilis 株封入寒天平板上に置いた。得られた阻止円の直径を 2 方向から測定し、コントロールと比較して菌体に結合した薬剤量を測定した。

第3節 結果

第1項 モエノマイシン低感受性変異株の分離

4,000 株のランダムに染色体 DNA に Tn551 が挿入された COL の変異株の中から、親株では増

殖不可能な 10 MIC (0.31 μ g/ml) のモエノマイシン含有 TSA に増殖した変異株 39 株を分離し、そのうち、8 倍以上モエノマイシンの MIC が上昇し耐性を示した株 4 株を分離した。4 株の変異株の Tn551 を親株に backcross した結果、backcross 株は全て親株の形質は示さず (後述の第2項参照)、Tn551 変異株の形質を示したため、得られた 4 株の Tn551 挿入モエノマイシン低感受性変異株を HN001, 002, 003, 004 と名付けた。

第2項 各種細胞壁合成阻害剤の MIC および population 解析

分離した変異株 HN001~004 の種々の細胞壁合成阻害剤に対する薬剤感受性を測定した結果、モエノマイシンの MIC は、4~8 倍上昇し耐性を示し、バンコマイシンおよびテイコプラニンの MIC は、1.5~2 倍上昇し若干耐性を示した。また、 β -ラクタム剤であるメチシリン、オキサシリンの MIC は 2~8 倍低下した。ホスホマイシンに対しては親株と特に違いが認められず、バシトラシンの MIC は HN001 のみが 2 倍低下した。これらの株の backcross 株である HN019, 039, 040, 060 も同様の結果が認められ、分離した 4 株は、Tn551 挿入によるモエノマイシン低感受性変異株であることを確認した (表 3-2)。これら変異株のうち lysC 変異株である HN002 を MRSA KSA8 株、NCTC10443 株に形質導入して得られた株 HN053, 054 についても同様の傾向が認められた。また、 β -ラクタム剤であるメチシリン、オキサシリンの MIC は各親株と比べ 2 倍減少した (表 3-2)。population 解析の結果は MIC の結果と同様の傾向が認められた。すなわち、分離した Tn551 挿入モエノマイシン低感受性変異株 4 株は全て、モエノマイシンおよびバンコマイシンのポピュレーションカーブは、変異株の方が親株に比べ右側 (耐性側) に移行し、メチシリンは逆に左側 (感受性側) に移行した (図 3-3)。

第3項 Tn551 挿入領域の遺伝子同定

分離した 4 株の変異株の Tn551 挿入領域の遺伝子をクローニングおよびシーケンスを行って同源性検索をした結果、HN001 と HN003 は 840 個のアミノ酸からなる分子量 94.9 KDa の蛋白をコードする遺伝子である *fmtC* の C 端に Tn551 の挿入を認めた (図 3-5-A)。FmtC 蛋白の N 端は疎水性が強いことから (図 3-5-B)、膜蛋白の一種と考えられている。また *fmtC* は抗菌ペプチドの感受性に影響を与える因子である S. aureus の *mprF* と同一のものであった[62]。mprF は細胞膜成分であるホスファチジルグリセロールにリジン添加する酵素であり、この因子の不活性化は細胞膜をより陰性に荷電させる。陽性に荷電した抗菌ペプチドは陰性荷電の強い細胞膜に作用して抗菌力を発揮することから、細胞膜がより強く陰性荷電となることで抗菌力が增大するということが報告されている[47]。また、HN002 は 401 個のアミノ酸からなる蛋白をコードする遺伝子である *lysC* の N 端に Tn551 の挿入を認めた (図 3-5-C)。lysC とは、リジン生合成系オペロンの最初の因子であり、アスパラギン酸から β ホスホアスパラギン酸に転換するアスパラトキナーゼ II という酵素である[89]。最後に HN004 は 625 個のアミノ酸からなる分子量 191 KDa の蛋白をコードする遺伝子である *fmtB* に Tn551 の挿入を認めた。Tn551 は *fmtB* のスタートコドンから 1,102bp 離

れた位置に存在していた (図 3-5-D)。 *fntB* は β -ラクタム剤の耐性に関与する遺伝子であることが報告されている[43]。

第4項 増殖速度の測定

分離した変異株のうち HN002 は *lysC* に Tn551 挿入を認めたが、L-lysine が存在しなくても生存可能であるか、さらには L-lysine を作製する代替経路が存在するか確認するため、3種類の培地すなわち、L-asparatic acid 非含有培地、L-lysine, L-asparatic acid 非含有培地、L-lysine, L-asparatic acid 含有培地にて増殖速度の測定を行った (図 3-6)。結果、親株 COL では両成分が存在しなくても増殖した。これより、L-lysine もしくは L-asparatic acid どちらか一方の代替経路の存在が考えられた。また、変異株 HN002 は L-lysine が存在しなくても増殖速度は親株に比べ遅延するものの増殖は可能であったが、両成分が存在しないと増殖不能であった。これより、L-lysine 合成系に L-asparatic acid は必須であり、L-asparatic acid から *lysC* を介して作製される経路を主軸としていることが示された。同様に、L-asparatic acid が存在しなくても増殖は親株に比べ遅延するものの可能であったことから、L-asparatic acid の代替経路は存在することが示された。

第5項 抗菌ペプチドの感受性試験

分離した変異株のうち HN001, 003 は抗菌ペプチドの感受性に影響を与える因子である *S. aureus* の *mprF* と同一の *fntC* に Tn551 挿入を認めたため[62]、チャージの変化が起こり抗菌ペプチドの感受性が変化している可能性が考えられる[47]。そこで、抗菌ペプチドである hBD3 および CAP18 の感受性について変異株 2 株 HN001, 002 について検討した (図 3-7)。結果、両抗菌ペプチドに対して両変異株共に感受性が増加した。

第6項 細胞膜の脂質解析

fntC を欠失させると細胞膜の脂質成分であるリジルホスファチジルグリセロール (LPG) が消失することが報告されており[62]、分離した Tn551 挿入モエノマイシン低感受性変異株のうち、HN001, 003 は *fntC* に Tn551 の挿入を認めている。また HN002 はホスファチジルグリセロール (PG) にリジンを添加する酵素自体に変異はないが、リジン生合成系に支障を来してリジン自体が減少しているため、LPG 量が減少している可能性が考えられる。そこで、変異株の細胞膜脂質解析を二次元薄層クロマトグラフィーを用いて行った (図 3-8-A)。

結果、*fntC* 変異株である HN001 は LPG を検出できず、*lysC* 変異株である HN002 の LPG 量も親株に比べ 62% 減少していた。また、他の細胞膜脂質成分であるカルジオリピンは反対に、親株に比べ両変異株共に 2.8 倍増加していた (図 3-8-B)。

第7項 細胞壁の構造解析

分離した変異株は、*fntC*, *lysC* の変異と細胞壁合成系との関連性について検討するため、細胞壁構造解析を2種類の方法で行った (図 3-9)。ムロペプチド分析の結果、*fntC* 変異株、*lysC* 変異株および親株との得られたクロマトグラムを比較すると、両変異株と親株は非常によく似たピークパターンを示した。また溶出時間でおおよそ 150 分以降に得られる oligomeric mucopeptide の量にも違いがなかったことから、ペプチドグリカンの架橋度にも違いは認められなかった。また、グリカン鎖長のクロマトグラムを比較したが、親株と変異株とでピークの位置に違いはなかった。

第8項 モエノマイシンおよびバンコマイシン結合能

分離した Tn551 挿入モエノマイシン低感受性変異株のうち HN001, 002 はモエノマイシンに耐性化することで、菌体の荷電が変化し、モエノマイシンおよびバンコマイシンの結合能に変化が起こっている可能性が考えられるため両薬剤とターゲットとの親和性の検討を両薬剤の菌体への結合量を測定して行った (図 3-10)。結果、モエノマイシンと生菌との結合量は、両変異株共に親株と比較して 1.4~1.6 倍増加した。しかし SDS 加熱処理した死菌体すなわち細胞壁には、両変異株および親株全ての株において、モエノマイシンはほとんど結合せず、両変異株と親株とで結合量に違いは認められなかった。また、バンコマイシンと生菌との結合量はモエノマイシンと同様に両変異株共に親株と比較して 1.3~1.8 倍増加した。しかし SDS 加熱処理した死菌体には、両変異株と親株とで結合量に違いはなかった。

第9項 菌体の電位測定

分離した Tn551 挿入モエノマイシン低感受性変異株のうち HN001, 002 は抗菌ペプチドの感受性が親株と比較して減少したことと、両変異株は細胞膜脂質成分であり陽性荷電と考えられている LPG 量が親株と比較して減少したことから、両変異株の荷電に変化が起こっている可能性が考えられた。そこで、ゼータ電位測定装置を用いて、菌体の電位を測定した (表 3-3)。結果、*fntC* 変異株は陰性荷電が強くなっていたが、*lysC* 変異株は親株と荷電に変化はなかった。

第4節 考察ならびに小括

第1章においてバンコマイシンの低感受性に影響を与える因子には、モエノマイシンの低感受性に影響を与える因子が関係している可能性を指摘したが、両薬剤の感受性に影響を与える因子は未だ明らかとなっていない。そこで、両薬剤の感受性に関わる因子をさらに検討するために、Tn551 の手法を用いてモエノマイシンに 8 倍低感受性となる 4 株の Tn551 挿入変異株を分離した。分離した変異株は、バンコマイシンおよびテイコプラニンに対して、1.5~2 倍耐性を示した。

両薬剤に低感受性となる変異株の Tn551 挿入領域の遺伝子は、細胞膜脂質成分リジルホスファチジルグリセロール (LPG) の合成因子である *fntC*[62]と、リジン生合成系オペロンの最初の因

子である *lysC*[89]、 β -ラクタム剤の感受性に影響を与える因子である *fntB*[43]であった。*fntB* 変異株は、バンコマイシンの感受性に影響を与えることは示されたが、その詳細は未だ不明である。*lysC* 変異株は、リジン欠失下でも増殖可能でありリジン合成には代替経路が存在するが、増殖速度は親株に比べ遅延することから、*lysC* を介する生合成経路が主軸であることが示唆される。しかし、*lysC* を介するリジン合成系ではアスパラギン酸を欠失すると増殖不能であることから、リジン合成系にアスパラギン酸は必須であることが示された。また、リジン生合成系オペロンに Tn551 が挿入しているため、変異株は親株に比べリジン自体の量が減少することが考えられ、このことが細胞膜脂質成分である LPG 量の減少にも結果として関与していた。LPG 合成遺伝子に Tn551 の挿入を認めた *fntC* 変異株では LPG が欠失しており、両変異株は陽性に荷電した LPG 量の減少により親株に比べ、より陰性に荷電している可能性が示唆された。微量の LPG 量が荷電に影響を及ぼすか、ゼータ電位測定装置による菌電位の測定によって確認した。また、Peschel らは膜荷電の変化が種々の抗菌ペプチドの感受性に影響を与えることを報告している [61]。陽性に荷電した抗菌ペプチドは陰性に荷電した細菌細胞膜と電気的に結合し、膜障害を起して抗菌力を得る[82]。分離した両変異株の抗菌ペプチドの感受性は共に増加したことから、変異株の荷電は親株に比べより陰性に荷電していることが示された。分離した変異株は細胞壁構造には変化が認められなかった。両薬剤の構造は、中性である糖と糖アミノ基が結合しており、モエノマイシンとバンコマイシンで異なる構造を有するものの、共に陽性荷電である[85][34]。両薬剤と変異株との結合能は SDS 加熱死菌体では変化がなく、生菌では両変異株が親株に比べ増加した。変異株の荷電が陰性化し、両薬剤は本来の標的である細胞壁以外に捕そくされたことが示唆された。荷電以外の変化として、全菌体破碎画分の蛋白について検討したが、親株との違いは認められなかったため、膜荷電の陰性化で膜に引き寄せられる両薬剤の量が増加し、膜上に存在する本来の標的（バンコマイシンは細胞壁ペプチドグリカンの前駆体、モエノマイシンは TGase）以外の部分に捕そくされた可能性が考えられた。しかし、捕そくの量の多さに比べて感受性には大きな変化がなかったことから、荷電の変化により一部が細胞膜に捕そくされるものの本来の標的にも結合している可能性が考えられた。また陽性荷電を有するゲンタマイシンは [15]、親株より陰性化した変異株の膜内に強く引き寄せられ、逆に感受性が増加した。モエノマイシンとバンコマイシンの感受性に影響を及ぼす *fntC*、*lysC* の変異の有無を、第 1 章で分離したモエノマイシン低感受性突然変異株について検討したところ、抗菌ペプチドの感受性に変化が認められず変異はないことが示された。実際の臨床分離株において、今回同定した両薬剤の感受性に関わる新規の因子に変異が起こる可能性は多くはないと考えられる。しかし、このような内在性因子が薬剤耐性に関与するという報告は初めてのものであり、薬剤耐性機構に新しい知見が得られた。

小括

1. モエノマイシンの感受性が親株と比べて 8 倍耐性を示した Tn551 挿入モエノマイシン低感受性変異株を 4 株分離した。
2. 分離した変異株のバンコマイシンの感受性は、親株に比べ、全て 1.5~2 倍耐性を示した。

3. 分離した変異株の Tn551 挿入領域の遺伝子、HN001, 003 は細胞膜脂質合成因子である *fntC* に、HN002 はリジン生合成系オペロンの最初の因子である *lysC* に、HN004 は β -ラクタム剤の耐性に関与する因子である *fntB* に Tn551 の挿入を認めた。
4. 分離した変異株のうち *lysC* 変異株である HN002 はリジン欠失下でも増殖可能であるが、リジン合成系に必須のアスパラギン酸も欠失すると増殖不能であった。また、HN002 の増殖速度は親株に比べ遅延していた。
5. 分離した変異株のうち *fntC* 変異株である HN001 および *lysC* 変異株である HN002 は親株に比べ共に hBD3, CAP18 の両抗菌ペプチドに対して感受性が増加した。
6. 分離した変異株のうち HN001, HN002 は親株に比べ、共に細胞膜脂質成分である LPG 量が減少した。
7. 分離した変異株のうち HN001, HN002 は親株に比べ、共にムロペプチド構造およびグリカン鎖長に変化は認められなかった。
8. 分離した変異株のうち HN001, HN002 は親株に比べ、共にモエノマイシンおよびバンコマイシンと生菌との結合量は増加した。しかし SDS 加熱処理死菌体には、両変異株および親株全ての株においてモエノマイシンはほとんど結合せず、両変異株と親株とでモエノマイシンおよびバンコマイシンとの結合量に違いは認められなかった。
9. 分離した変異株のうち HN001 は親株に比べ陰性荷電が強くなっていたが、HN002 は親株と違いは認められなかった。

表 3-1 使用した菌株、プラスミドおよびプライマー

Strain	Relevant characteristics	Source or reference	
<i>S. aureus</i>			
COL	COL <i>mec</i>	A. Tomasz	
COL(pRN3208)	COL with pRN3208	B. Berger-Bächi	
NCTC10443	NCTC10443 <i>mec</i>	R. Novick	
KSA8	clinical MRSA strain	clinical isolate	
RN4220	8325-4 r ⁺	R. Novick	
HN001	COL (<i>fmtC</i> ::Tn551)	This study	
HN002	COL (<i>lysC</i> ::Tn551)	This study	
HN003	COL (<i>fmtC</i> ::Tn551)	This study	
HN004	COL (<i>fmtB</i> ::Tn551)	This study	
HN019	Backcross of HN001	This study	
HN039	Backcross of HN002	This study	
HN040	Backcross of HN003	This study	
HN060	Backcross of HN004	This study	
HN053	Genetic cross of HN002 (KSA8)	This study	
HN054	Genetic cross of HN002 (NCTC10443)	This study	
HN052	pHN724 / RN4220	This study	
HN061	HN052 transduce to HN002	This study	
<i>E. coli</i>			
XLII-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac f'ZΔM15 Tn10 (Tet)</i> Amy Cam]	Bullock et al.	
HN723	pHN723 / XLII-Blue	This study	
HN724	pHN724 / XLII-Blue	This study	
Plasmids	Vector Cloning site Relevant properties		
pHN723	pGEM <i>EcoRI/EcoRI</i> pGEM containing PCR fragment [nlysine -1+ 2]	This study	
pHN724	pCL8 <i>EcoRI/EcoRI</i> pCL8 containing PCR fragment [nlysine -1+ 2]	This study	
Gene	Primer Sequence (5' to 3')	Positions	
<i>lysC</i>	universal primer	CGACGTTGTAACGACGGCCAGT	
	reverse primer	CAGGAAACAGCTATGAC	
	nlysine-1	TGGGATCCGGCCGACCAACTTGCAC	672-698
	nlysine-2	CTAAGCTTCCTGCAGAACGTGCTGAT	3074-3099
Tn551	nlysine-3	CTAAGCTTGAGTATATGTCCAAGCAT	10037-10062
	pTNR-6	ACGGCGAAGGATCACTCATGG	
	pTNR-8	ATTTCTGATGCGAGGTTT	

表 3-2 親株と Tn 挿入変異株の種々の細胞壁合成阻害剤の MIC

strain	Relevant properties	MIC (μg / ml)									
		MPIPC	DMPPC	VCM	TP	FOM	BC	MM	GM		
COL	wild type	128	512	2	1	512	128	0.063	1		
HN001	COL(<i>fmtC</i> ::Tn)	32	32	4	2	512	64	0.25	0.125		
HN002	COL(<i>LysC</i> ::Tn)	64	128	4	2	256	128	0.25	1		
HN003	COL(<i>fmtC</i> ::Tn)	32	64	4	2	512	128	0.25	0.25		
HN004	COL(<i>fmtB</i> ::Tn)	16	64	4	2	512	32	0.25	1		
HN019	Backcross of HN001	64	64	3	2	256	64	0.25	0.125		
HN039	Backcross of HN002	64	128	3	2	256	128	0.25	1		
HN040	Backcross of HN003	64	64	3	2	512	64	0.25	0.125		
HN060	Backcross of HN004	32	64	2	2	512	64	0.25	1		
HN061	COL(<i>lysC</i> complement)	64	128	4	2	512	128	0.25	1		
KSA8	wild type	256	512	1	1	512	128	0.008	1		
HN053	Genetic cross of HN002	128	256	1	1	512	128	0.031	1		
NCTC10443	wild type	256	256	1	0.5	512	128	0.016	1		
HN054	Genetic cross of HN002	128	128	2	1	512	128	0.031	1		

* MPIPC, oxacillin; DMPPC, methicillin; CZX, ceftizoxime; VCM, vancomycin; TP, teicoplanin; FOM, fosfomycin; BC, bacitracin; MM, moenomycin; GM, gentamicin

表 3-3 Tn551 挿入変異株のゼータ電位測定

A

Smoluchowski の式

$$\text{ゼータ電位 (m)} = \frac{4\pi \times \text{液体の粘性 (poise)}}{\text{溶液の誘電率}} \times \text{電気泳動移動度} \times 9 \times 10^7$$

$$\text{電気泳動移動度} = \frac{\text{粒子の速度 (cm/sec)}}{\text{電圧 (volt)} / \text{電極間距離 (cm)}}$$

B

strain	Relevant properties	(mV)
COL	wild type	- 14.3055
HN001	COL(<i>fmtC</i> ::Tn)	- 16.2955
HN002	COL(<i>LysC</i> ::Tn)	- 15.3215

(A) 溶液の左右に+の電圧を加えると、電荷を持つサンプルは移動を始める。測定容器の中心からの静止層への距離でゼータ電位を測定する。この静止層に焦点を合わせるための計算式を示す。

(B) -の電圧値が大きい程陰性荷電が強いことを示す。

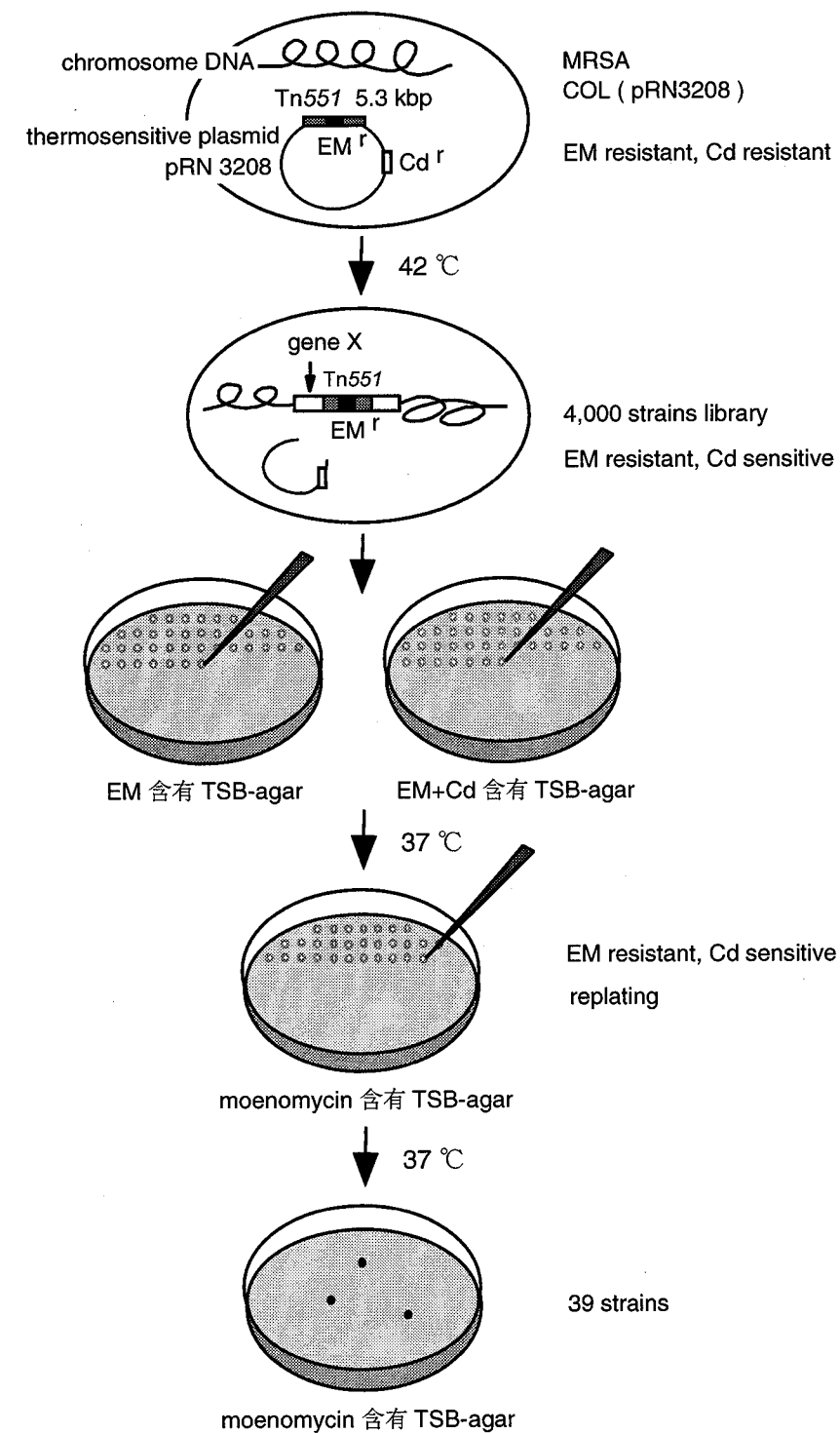


図 3-1 染色体 DNA に Tn551 がランダムに挿入された変異株ライブラリーの作製

COL (pRN3208) を 42 °C で培養すると、pRN3208 が壊れて染色体 DNA に Tn551 がランダムに挿入される。4000 株のライブラリーを作製後、2 種類の TSB-agar にうえつぎ、生育した EM 耐性 Cd 感受性コロニーをモエノマイシン含有 TSB-agar にうえつぎ、モエノマイシン耐性となる変異株 39 株を分離した。

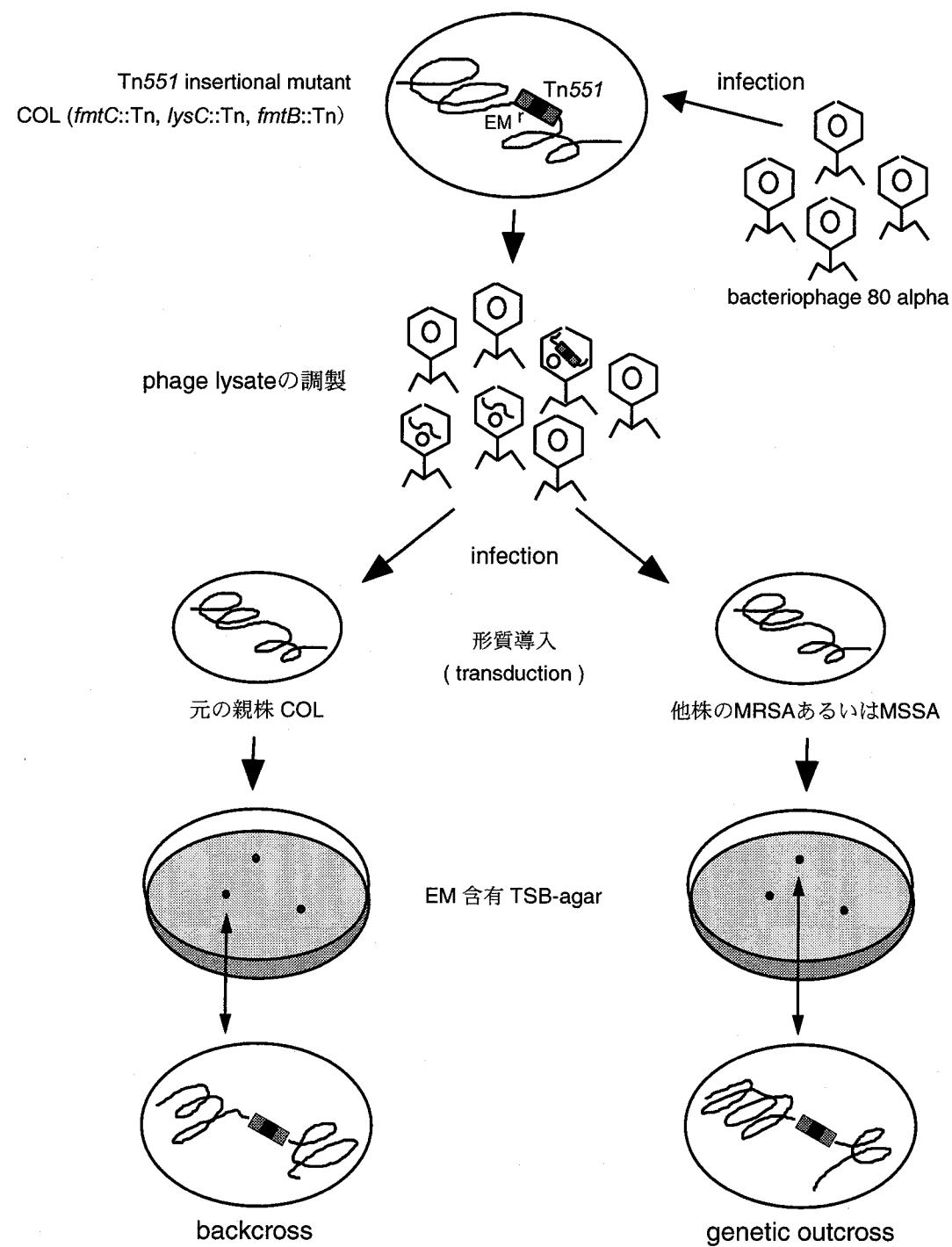


図3-2 形質導入 (transduction)

分離した Tn551 挿入モエノマイシン低感受性変異株の Tn551 挿入領域を親株、あるいは他の MRSA, MSSA の同じ遺伝子領域に挿入するため形質導入を行い、分離した変異株が Tn551 挿入によるものであることを確認した。

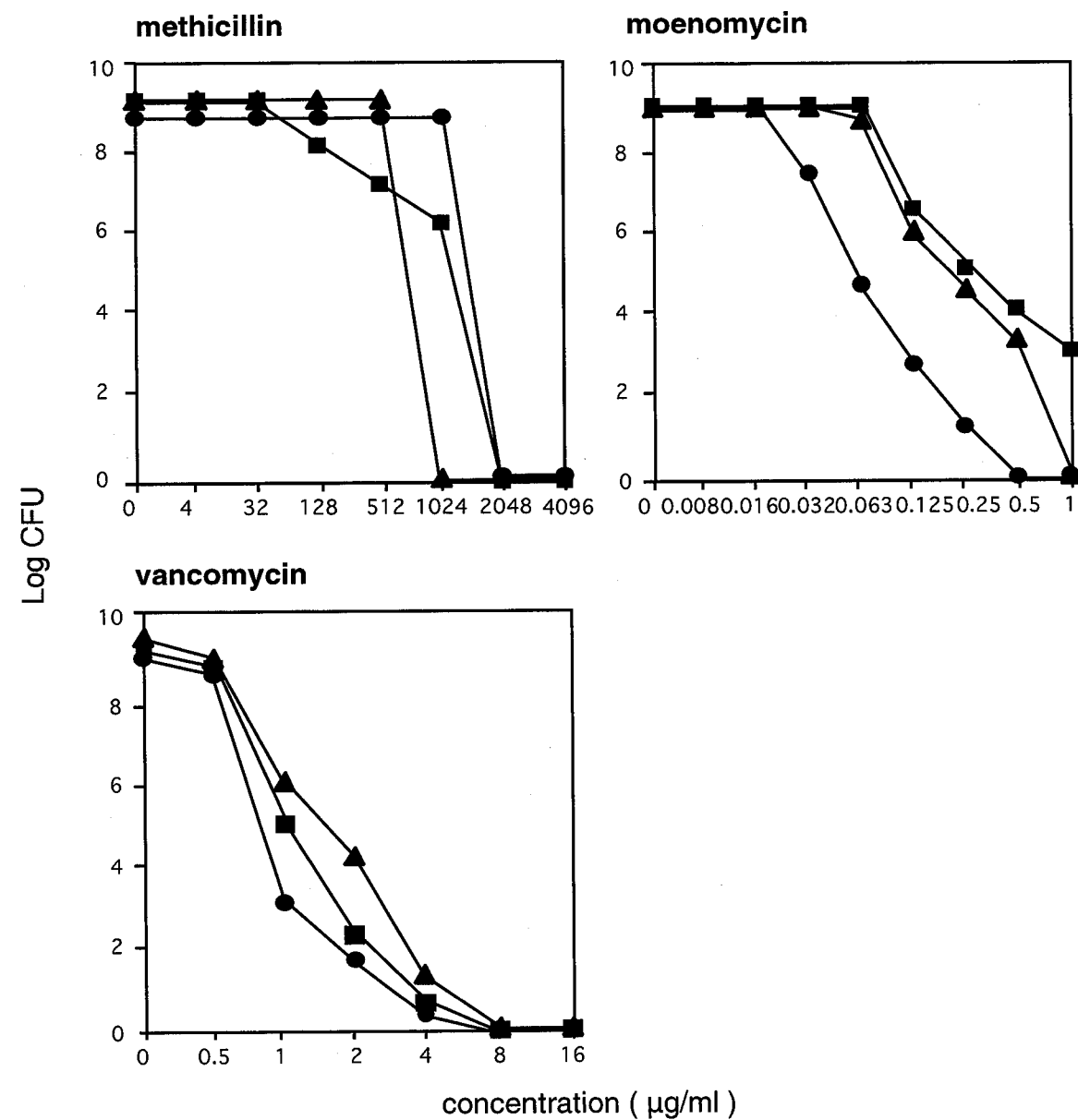


図3-3 親株とTn挿入変異株の population解析

種々の濃度の薬剤を含むTSB寒天培地に、TSBで被験菌をOD660=1.0に達するまで培養し、 10^2 倍、 10^4 倍、 10^6 倍希釈した検体を100 μl接種し、37℃で48時間培養後、コロニー数を測定し、 10^9 個の菌を接種したときの生菌数をグラフに表した。●, 親株 COL; ▲, 変異株 *fmtC::Tn*; ■, 変異株 *lysC::Tn*を示す。

Tn551 挿入変異株の染色体DNAの調整

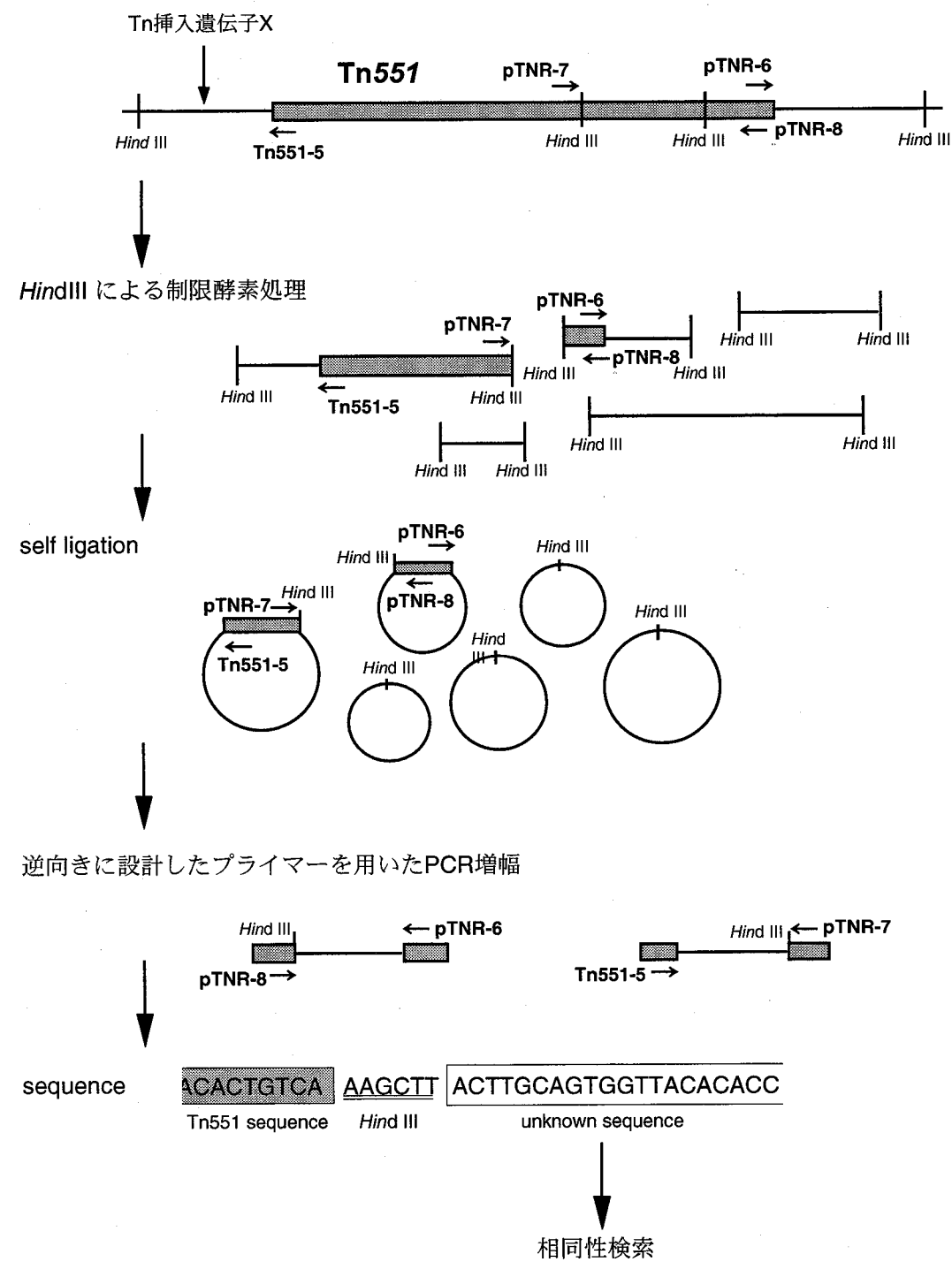


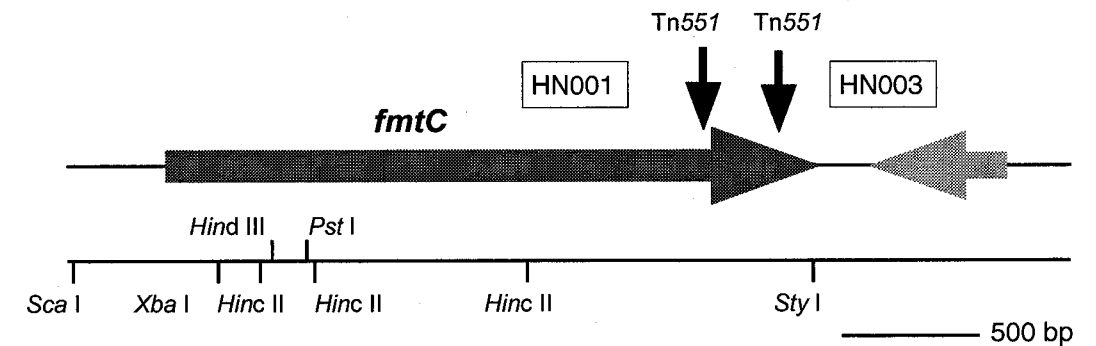
図3-4 Tn551 挿入領域の遺伝子の同定

変異株の染色体DNAを制限酵素処理し、セルフライゲーションにより閉環した。Tn551のDNA断片内に逆向きに設計されたプライマーを用いて、その両外側のTn551が挿入された未知の領域をPCR反応により増幅し、泳動後ゲルから回収したDNA断片をpGEM-T Easy Vectorにクローニングした。この株から精製したプラスミドを鋳型として、シーケンス反応を行い、相同性検索を行った。

A

FmtC

equal to *mprF* of *S. aureus*
 membrane protein
 M.W.= 96.9 kDa
 840 amino acid



B

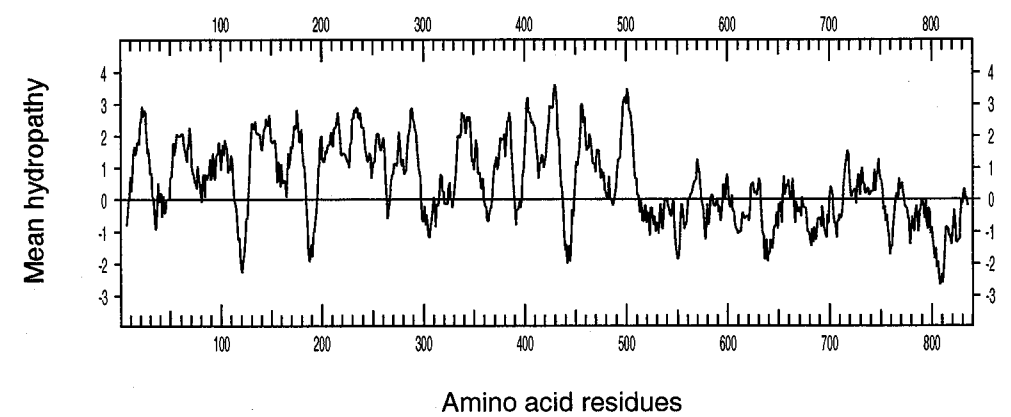
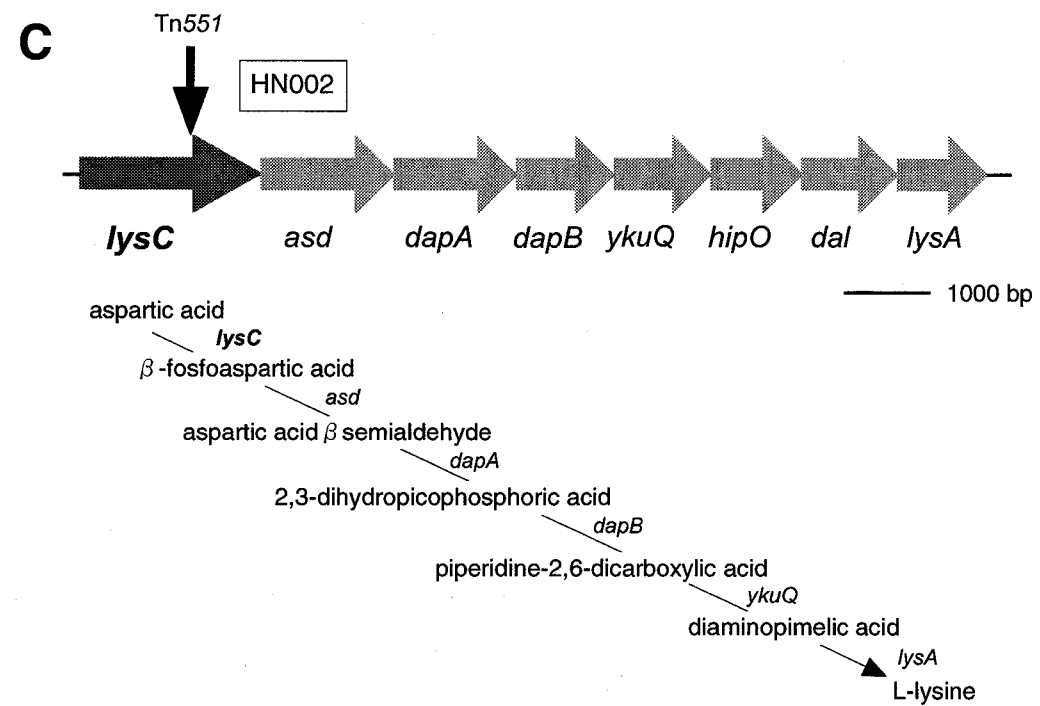


図3-5 Tn551挿入領域近傍の遺伝子マップ (1)

(A) HN001, HN003 のTn551挿入領域である*fmtC*の近傍のマップ、(B) FmtC蛋白の疎水性パターンを示す。▼はTn挿入部位、その下に制限酵素サイトを示した。



lysC とは lysine 生合成に関与する因子であり aspartic acid から β -fofospartic acid に転換する Aspartokinase II という酵素である。

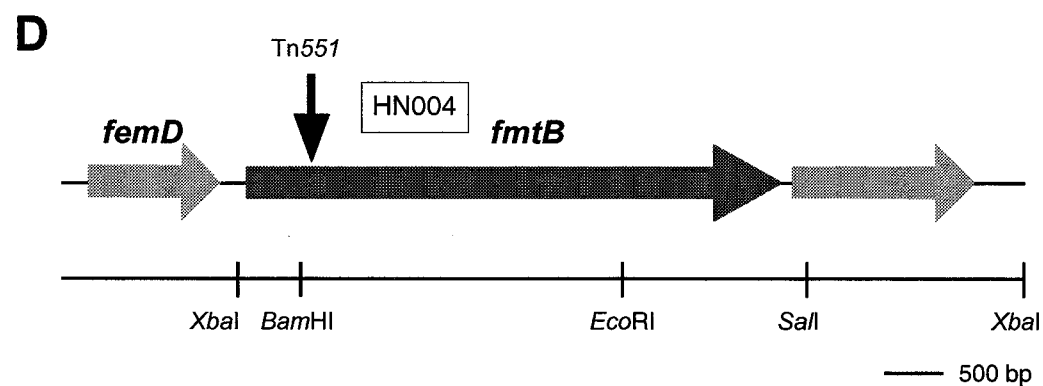
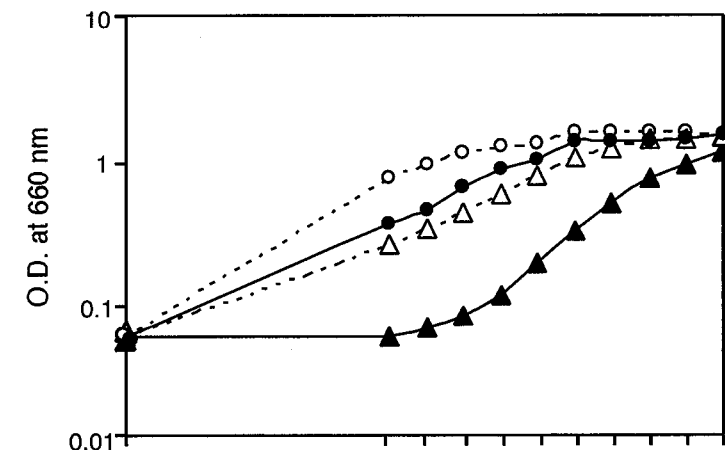


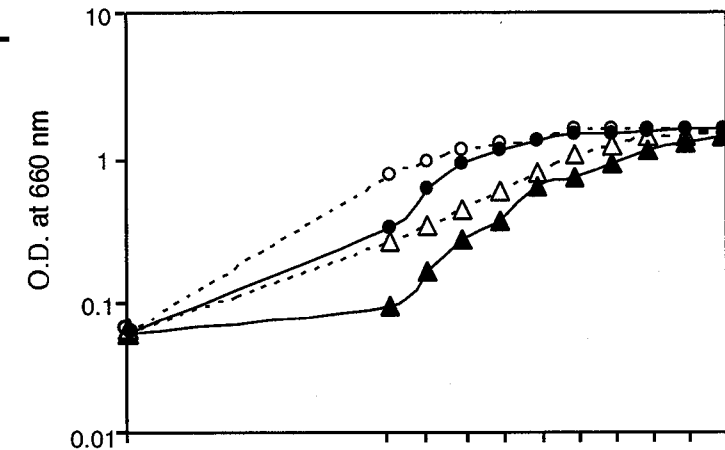
図 3-5 Tn551 挿入領域近傍の遺伝子マップ (2)

(C) HN002 の Tn551 挿入領域である *lysC* の近傍のマップ、(D) HN004 の Tn551 挿入領域である *femB* の近傍のマップを示す。▼は Tn 挿入部位、その下に制限酵素サイトを示した。

CDM lysine⁻



CDM aspartic acid⁻



CDM lysine⁻ and
aspartic acid⁻

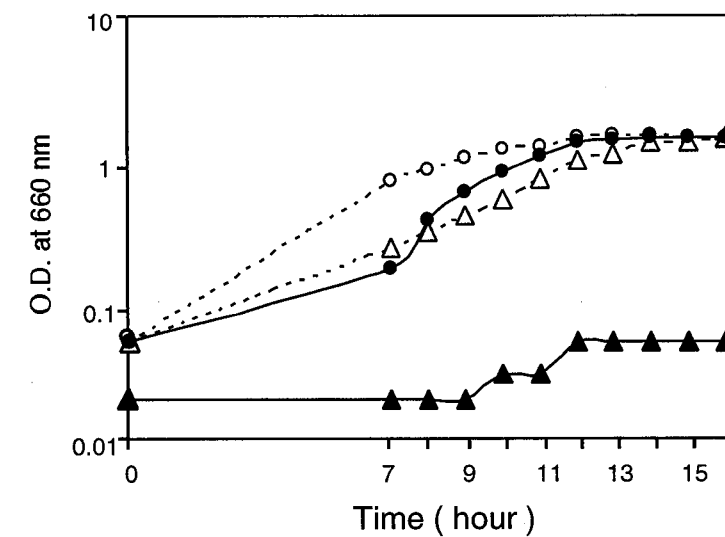
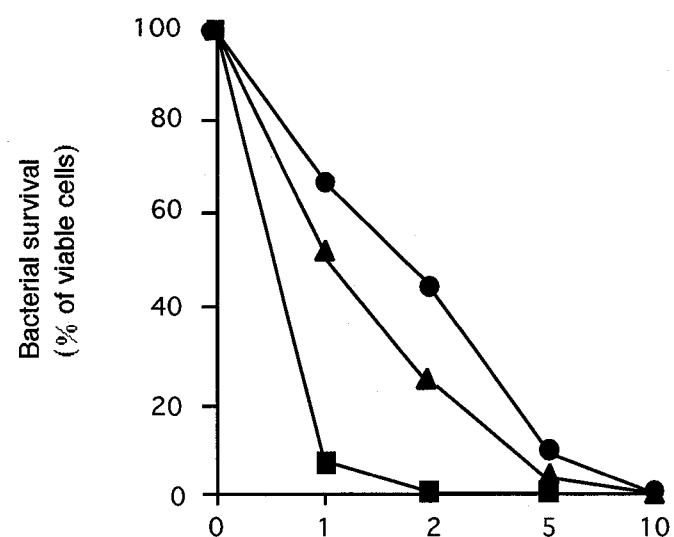


図 3-6 各種培地での増殖速度の測定

変異株 COL (*lysC*::Tn) と COL を、CDM で OD_{660nm} = 1.0 に達するまで培養した菌体を、4 種類の培地、CDM、L-lysine 非含有 CDM、L-aspartic acid 非含有 CDM、L-lysine、L-aspartic acid 非含有 CDM にうえつぎ、経時的に濁度の増加を測定した。○、CDM での COL；△、CDM での HN002:COL (*lysC*::Tn)；●、各種 CDM での COL；▲、各種 CDM での HN002:COL (*lysC*::Tn) を示す。

hBD3 (human- β -defensin-3)



CAP18 (cathelicidin antimicrobial protein)

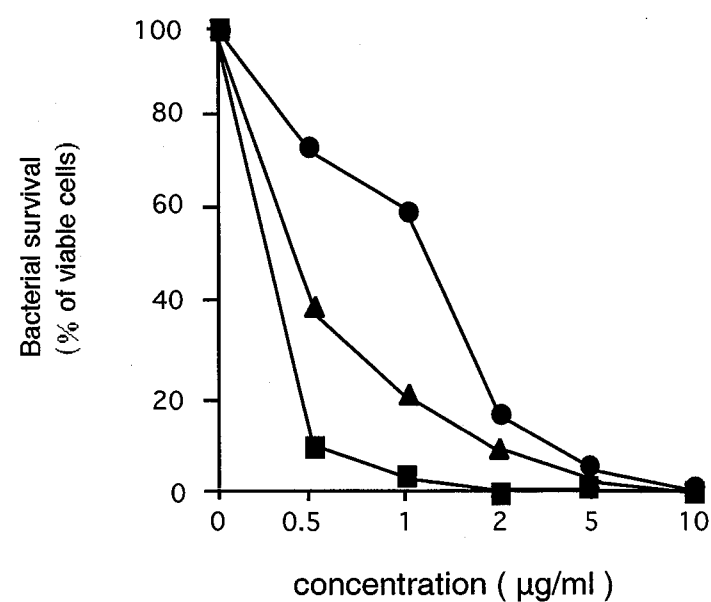
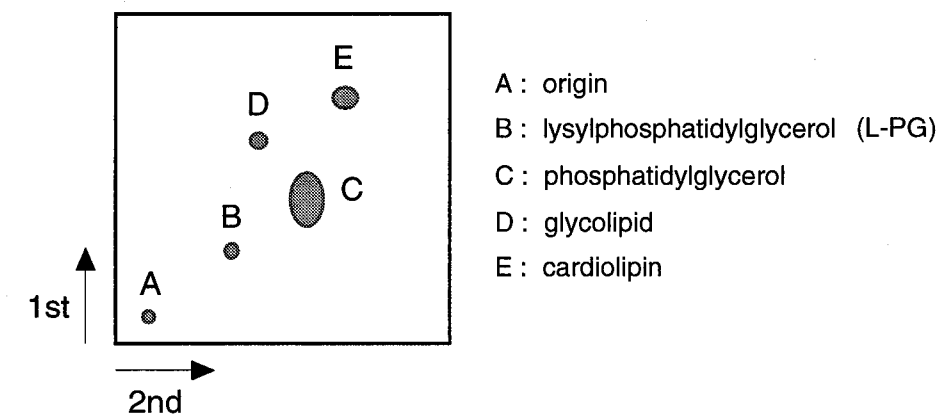


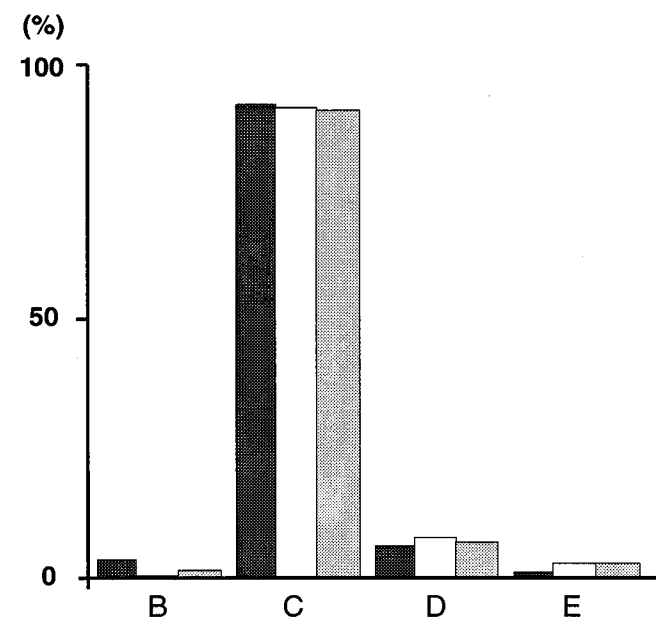
図3-7 抗菌ペプチドの感受性試験

被検菌をTSBにてOD660nm = 1.0に達するまで37℃で培養後、最終濃度 10^7 cells/mlとなるように調整した。10 mM リン酸バッファー (pH 6.8) にて各種濃度に調整した抗菌ペプチドと被検菌と作用させ、37℃で2時間静置培養した。これをTSB-agarにまき37℃で24時間培養し、生育したコロニー数を計測して判定を行った。●, 親株 COL; ▲, 変異株 *fmtC::Tn*; ■, 変異株 *lysC::Tn*をそれぞれ示す。

A



B



C

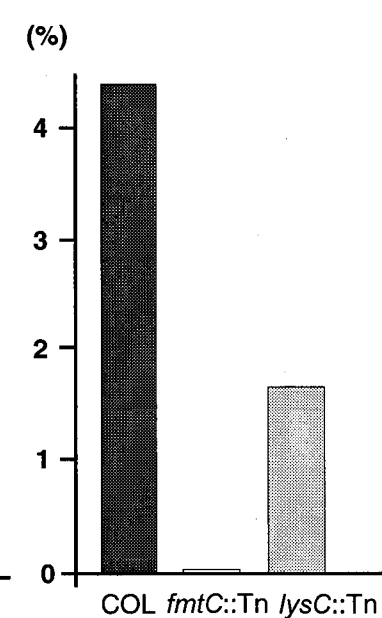


図3-8 細胞膜の脂質解析

被検菌体を ^3H -glycerolで37℃、2時間標識し、クロロホルムメタノール(2:1)溶液中で超音波破碎し、溶解した脂質と菌塊とを分離後、エバポレーターにて乾燥させた。シリカゲル上にこのサンプルをのせ、クロロホルムメタノールを充滿させた展開層で2次元展開を行った。さらに、乾燥させたゲル板をヨウ素染色し、染色スポットのRIラベル量を測定した。(A) 二次元薄層クロマトグラフィーによる脂質パターン、(B) RI放射活性量、■ COL, □ HN001 (COL[*fmtC::Tn*]), ▨ HN002 (COL[*lysC::Tn*])を示し、(C) lysylphosphatidylglycerolのみを拡大して示した。

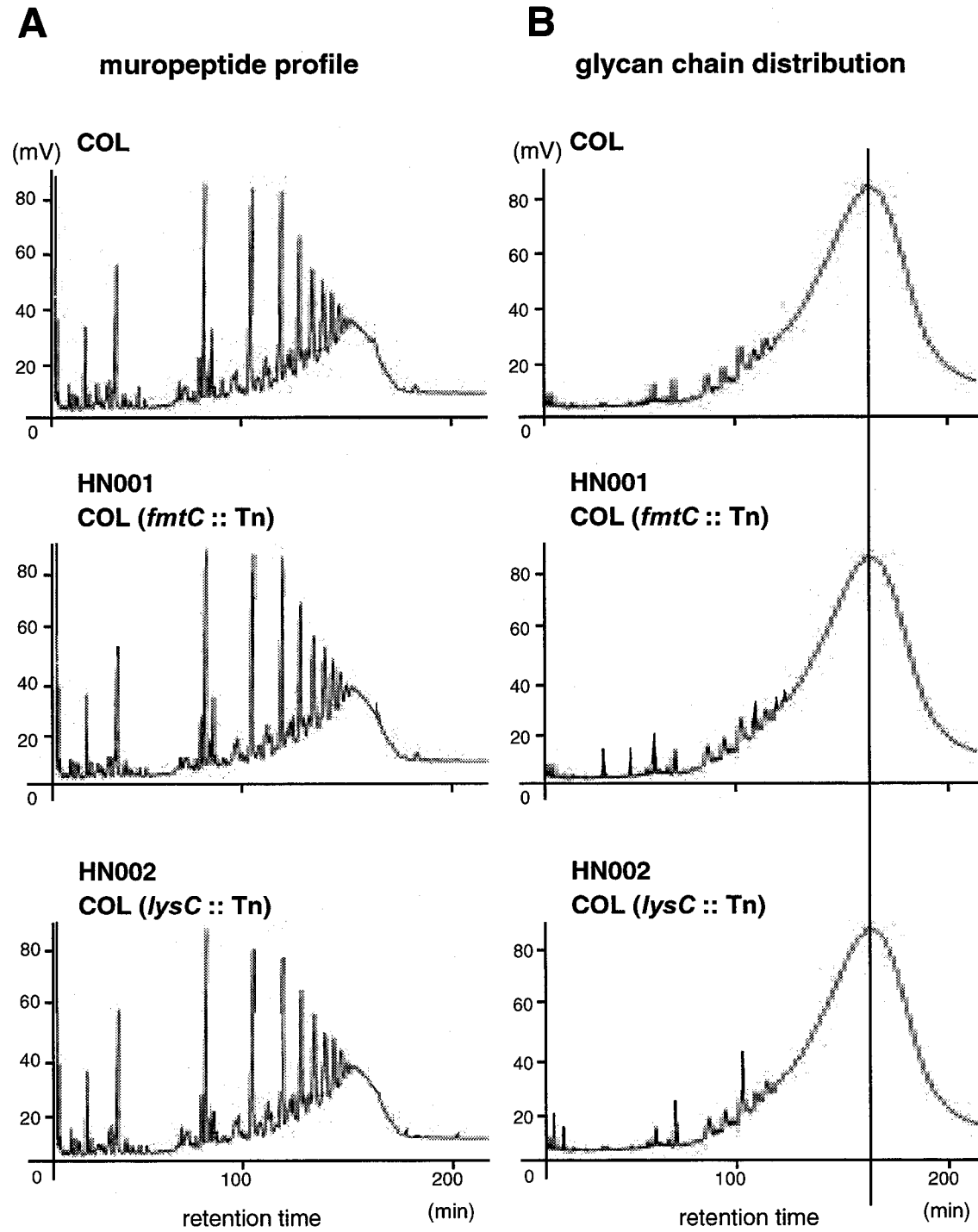


図3-9 細胞壁の構造解析

精製したペプチドグリカンをもタノリシンおよびライソスタフィンにて可溶化し調整したサンプルを、逆相高速液体クロマトグラフィーにて構造解析を行った。
(A) ムロペプチド分析 (B) グリカン鎖長解析を示す。

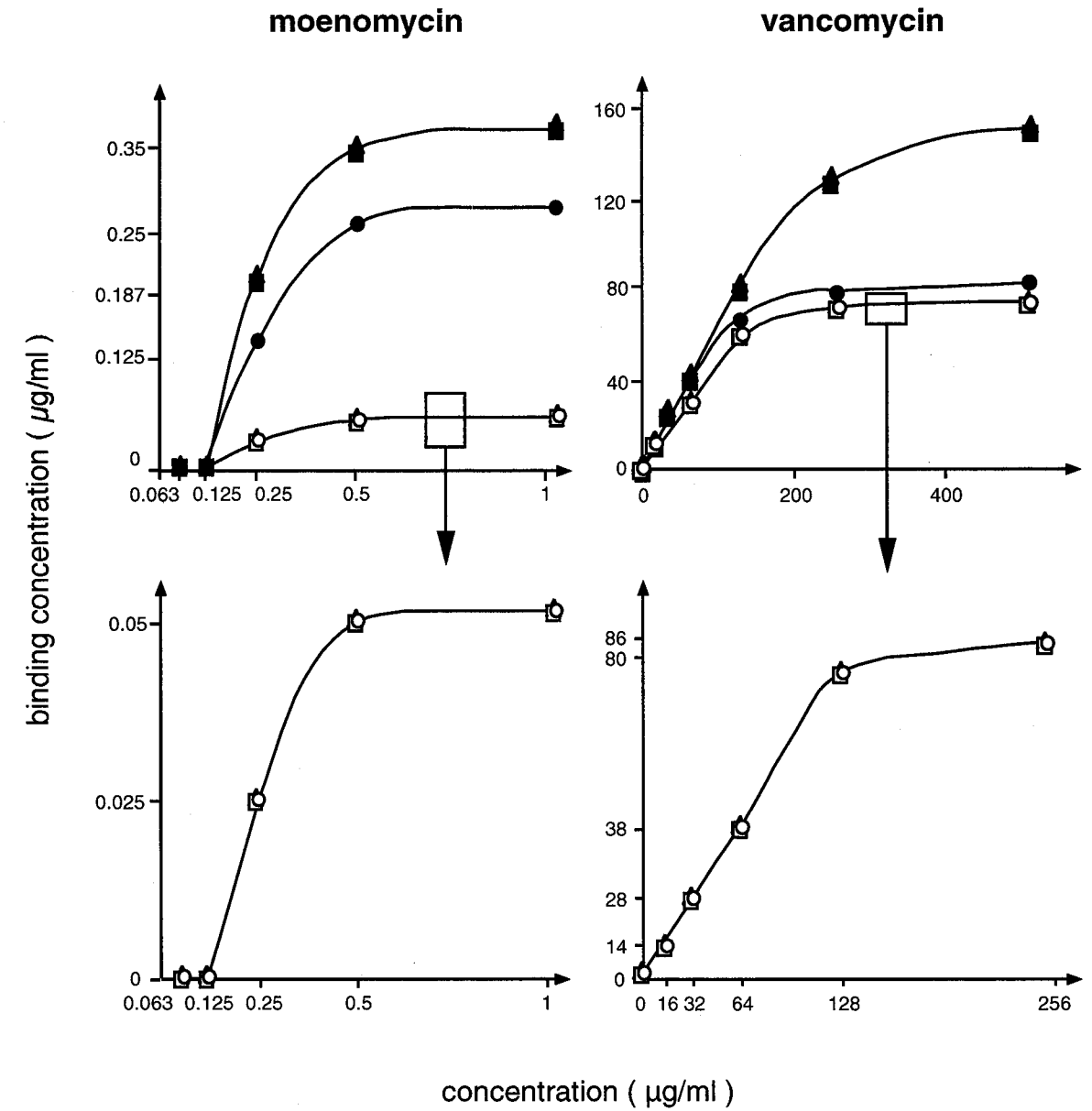


図3-10 モエノマイシンおよびバンコマイシンの結合能試験

●, 親株 COL 生菌; ▲, 変異株 *fmtC*::Tn 生菌; ■, 変異株 *lysC*::Tn 生菌; ○, 親株 COL SDS加熱死菌体; △, 変異株 *fmtC*::Tn SDS加熱死菌体; □, 変異株 *lysC*::Tn SDS加熱死菌体を示す。

第4章 Tn551 挿入ライソスタフィン低感受性変異株の分離と性状解析

第1節 概要

第1章で、バンコマイシン低感受性機序の解明を目的として分離したモエノマイシン低感受性突然変異株はバンコマイシンにも低感受性を示しており、この株は細胞壁の肥厚および細胞壁消化酵素であるライソスタフィンへの低感受性が認められた。そこで、第4章でバンコマイシンの感受性に関与する因子をさらに検討するために、細胞壁の肥厚を起こす因子とバンコマイシンの感受性との関連する可能性を考え、Tn551の手法を用いてライソスタフィンに低感受性となる変異株を分離し、性状解析を行った。

Tn551 遺伝子を持つ温度感受性のプラスミドを導入した株を用いて COL 株の染色体 DNA に Tn551 をランダムに挿入し、ライソスタフィン存在下で生育した 15 株のライソスタフィンの感受性を測定し、感受性の低下の大きい 2 株 HN044, 085 を分離した。これらの薬剤感受性を測定したところ、バンコマイシンおよびテイコプラニンには 1.5~2 倍上昇し耐性を示し、モエノマイシンの MIC は HN044 では 2 倍耐性を示したが、HN085 は変化がなかった。また、 β -ラクタム剤であるメチシリン、オキサシリンの MIC は 8~32 倍低下した。そこで変異株の Tn551 挿入領域の遺伝子を同定したところ、HN044 はタイコ酸合成系のオペロンの一つである β -グルコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子である *gff* に、HN085 は細胞分裂開始に関与する因子である *cdi* に Tn551 の挿入を認めた。これらはライソスタフィンの感受性に関わる新規の遺伝子であることが示された。そこで、変異株を透過型電子顕微鏡で観察したが、親株に比べ若干細胞壁の肥厚が観察された。また、親株と変異株のライソスタフィンの感受性を検討した結果、親株に比べ両変異株共にどちらの感受性も減少した。そこで、細胞壁の構造に変化が起こっているかを検討するため、精製した細胞壁ペプチドグリカンを用いて HPLC によるムロペプチド分析を行った結果、*cdi* 変異株には変化が認められなかったが、*gff* 変異株は親株と異なるクロマトグラムを得た。そこで、得られたピークの MALDI-TOF / MS による質量分析の結果、架橋構造のグリシンの数の異なるモノマーのピーク、およびダイマーのピークが分散して得られた。これらより *gff* はグリシンを添加する遺伝子である *femA*, *femB* との関連が考えられた。また親株と比べ *gff* 変異株の SDS 加熱死菌体にバンコマイシンは 1.5 倍結合したことから、細胞壁の構造変化によりバンコマイシンとの結合量に変化が起こったことが示唆された。同様にライソスタフィンとの結合能も *gff* 変異株は親株に比べ減少したが、*cdi* 変異株ではほとんど変化が認められず、結合能の違いは構造変化に起因するものと示唆された。*gff* 変異株はタイコ酸合成系のオペロンの一つに Tn551 挿入を認めたため、陰性荷電であるタイコ酸量の減少による荷電変化の可能性を考え、抗菌ペプチドの感受性を測定したところ、両変異株共に感受性が増加した。*gff* 変異株のタイコ酸に含まれるグリセロールと N アセチルグルコサミンの RI 放射活性を測定したところ親株と違いがなかったことから、*gff* の阻害によるタイコ酸の構造に大きな変化を起こさないことが分かった。

第2節 材料および方法

第1項 使用菌株と培養

菌株は臨床分離の MRSA である COL、また Tn551 遺伝子をもつ温度感受性プラスミド pRN3208 を COL に導入した株である COL (pRN3208)、MSSA RN4220、MRSA BB270、*E. coli* XLII-Blue を使用した。*S. aureus* は TSB、*E. coli* は LB を用いて 37℃ で振とう培養を行った。また、菌株は必要ときにはアンピシリン (Sigma chemical Co., Ltd.) 100 μ g/ml を添加した培地で培養を行った。また、得られた Tn551 挿入変異株は 30 μ g/ml EM を含む TSB にて 37℃ で振とう培養を行った。

第2項 Tn551 挿入変異株の分離

Tn551 遺伝子を染色体 DNA に挿入することによる変異株作製法は第3章、第2節、第2項の方法に準じて行った。42℃ で 18 時間振とう培養したものを、EM 30 μ g/ml 含有 TSB にうえついで 42℃ でさらに一晚培養し、これを再び EM 30 μ g/ml 含有 TSB 10 ml にうえついで OD₆₆₀ = 0.8 に達したところで 10 mg/ml ライソスタフィン (Sigma chemical Co., Ltd.) 5 μ l を添加して 37℃ で振とう培養した。15 分後に遠心 (9,000 x g, 15 min, 4℃) した菌体を PBS にて洗浄し、EM 30 μ g/ml 含有 TSB で懸濁後 EM 30 μ g/ml 含有 TSB にうえつぎ、これを 3 回繰り返した。2 回目、3 回目は 10 mg/ml ライソスタフィン 10 μ l を添加した。最後の培養液を OD₆₆₀ = 1.0 まで培養し、遠心 (9,000 x g, 15 min, 4℃)、菌体を PBS にて洗浄し、TSB に懸濁して OD₆₆₀ = 1.0 に調整した。この菌体を希釈後、EM 30 μ g/ml 含有 TSB-agar に播き、42℃ で一晚培養した。生育したコロニーを EM 30 μ g/ml、Cd 30 μ g/ml 含有 TSA および EM 30 μ g/ml 含有 TSA に 1 コロニーずつうえつぎ、42℃ で一晚培養した後、Cd 含有 TSA には生育せず、EM 含有 TSA に生育したコロニー、すなわちプラスミドが壊れ、Tn551 が染色体 DNA にランダムに挿入されたライソスタフィン低感受性変異株 15 株を作製した。作製した 15 株を EM 30 μ g/ml 含有 TSB にて 37℃ で OD₆₆₀ = 1.0 まで培養し、10 mg/ml ライソスタフィン 10 μ l 添加して 30 分後に OD₆₆₀ を測定した。親株に比べ OD₆₆₀ の減少の少ない 2 株を Tn551 挿入ライソスタフィン低感受性変異株 HN044, 085 として分離した。

第3項 各種細胞壁合成阻害剤の MIC

第1章、第2節、第3項の方法を用いて分離した Tn551 挿入ライソスタフィン低感受性変異株 2 株 (HN044, 085) と親株の種々の化学療法剤の MIC を第1章、第2節、第3項の方法を用いて測定した。

第4項 Backcross 株の作製

分離した Tn551 変異株の形質の変化は Tn551 によるものであることを、第3章、第2節、第4

項の方法を用いて backcross 株を作製し、得られた backcross 株 (HN059, HN090, HN091) の種々の化学療法剤の MIC を測定して、分離した Tn551 挿入変異株の確認を行った。

第 5 項 各種細胞壁合成阻害剤の population 解析

変異株の薬剤感受性をさらに検討するために、第 1 章、第 2 節、第 4 項の方法を用いて分離した Tn551 挿入変異株のメチシリン、バンコマイシン、モエノマイシンの population 解析を行った。

第 6 項 Tn551 挿入領域の遺伝子同定

分離した変異株の Tn551 の挿入部位の遺伝子を同定するため、第 1 章、第 2 節、第 11 項の方法を用いてライソスタフィン低感受性変異株の染色体 DNA を抽出した。得られた染色体 DNA 5 μ g を制限酵素処理し、第 3 章、第 2 節、第 4 項の方法に準じて Tn551 挿入領域の遺伝子同定を行った。Tn551 の DNA 断片内に逆向きに設計されたプライマー Tn551-5 と pTNR-7 (表 4-2) を用いて inverse PCR を用いたクローニング、gene walking 法によるシーケンスを行って、Tn551 挿入領域の塩基配列を決定し、ALF win™ Sequence Analyser (Amersham)、GENE WORKS 2.5.1 (IntelliGenetics) を用いて解析し TIGR Microbial Data Base (<http://www.tigr.org/index.html>) にて相同性検索を行って、挿入領域の遺伝子を同定した。

第 7 項 透過型電子顕微鏡による形態観察

分離した変異株 HN044 : COL (*gtf::Tn551*), HN085 : COL (*cdi::Tn551*) と親株 COL を、EM 30 μ g/ml 含有 TSB 3 ml にて 37°C、24 時間振とう培養を行い、第 1 章、第 2 節、第 5 項の方法を用いて透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察を行った。

第 8 項 バクテリオファージ 80 α の感受性試験

分離した変異株と親株を 10⁹ cells / ml に調整し TSB-agar に播いた。この寒天平板上に backcross 株作製時に特に感受性の低かったバクテリオファージ 80 α を原液、10、10²、10³、10⁴ 希釈で 10 μ l 播き、37 °C で一晚培養後、溶菌径および溶菌像を計測した。さらに使用したバクテリオファージ 80 α の力価を測定するために、3.5 ml phage top agar に MRSA COL 株 100 μ l を加えたものに 5、10、50、100、1000 倍希釈したバクテリオファージ 80 α 10 μ l を添加し、あらかじめ作製しておいた phage bottom agar に播いて、37 °C で 72 時間培養後に得られた溶菌斑 (プラーク) 数を計測した。

第 9 項 バンコマイシン耐性変異株の出現頻度

バンコマイシン 1, 2, 4 μ g/ml 含有寒天培地に分離した Tn551 挿入ライソスタフィン低感受性変

異株および親株を 10⁸, 10⁷, 10⁶ cells / ml に調整して播き、37 °C で一晚培養後生育したコロニー数を測定し、再びコロニーを生育した濃度のバンコマイシン含有 TSB にて培養した。これをさらにバンコマイシン 1, 2, 4, 6 μ g/ml 含有寒天培地に播き、生育したコロニー数を 1 回目に同濃度の寒天培地で生育したコロニー数と比較した。

第 10 項 細胞壁構造解析

分離した変異株 2 株と親株の細胞壁ペプチドグリカン第 1 章、第 2 節、第 8 項の方法を用いて精製して、細胞壁の構造解析を行った。

第 11 項 MALDI-TOF/MS を用いた質量分析

分離した変異株 2 株と親株の第 1 章、第 2 節、第 8 項の方法を用いて精製したペプチドグリカンをムタノリシンで消化したサンプルを、第 1 章、第 2 節、第 8 項の方法を用いてピーク分集を行った。凍結乾燥した分集サンプルを、B バッファー (0.1 % トリフルオロ酢酸 (TFA : Nacalai tesque Inc. Ltd.)、イオン交換水) 10 μ l に溶解した。Zip Tip C18 (TipSize : P10, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) を A バッファー (50 % アセトニトリル (WAKO Pure Chemical Industries, Ltd.)、イオン交換水) 10 μ l で 3 回洗浄して充填された逆相レジンを B バッファー 10 μ l でさらに 5 回洗浄した。サンプルをレジンに吸着させる目的で 2 回ピペッティングし、再び B バッファー 10 μ l で 5 回、不純物の洗浄を行った後 C バッファー (50 % アセトニトリル、0.1 % TFA、イオン交換水) 10 μ l にて溶出し、一連の操作で脱塩した。サンプル 2 μ l と飽和マトリックス溶液 (2, 5-Dihydroxy benzoic acid : DHB を C バッファーに溶解) を C バッファーに飽和した飽和溶液 2 μ l とを混和して MS target plate (Nihon Bruker Daltonics K.K., Tokyo, Japan) にのせ、MALDI-TOF MS reflex III (Nihon Bruker Daltonics K.K.) にて Reflector mode で質量を測定した。質量測定による構造解析は Labischinski らの方法に準じて行った[68]。

第 12 項 バンコマイシン結合能の測定試験

分離した変異株と親株を第 3 章、第 2 節、第 14 項の方法を用いて菌体に結合したバンコマイシン量を測定した。

第 13 項 ライソスタフィン感受性試験

分離した変異株 2 株と親株を、第 1 章、第 2 節、第 7 項の方法に準じて、ライソスタフィンは最終濃度 0.005 mg/ml で添加しライソスタフィン感受性試験を行った。SDS 加熱処理死菌体は被検菌を 4 % SDS で懸濁後 100 °C で 1 時間処理し、遠心 (9,000 x g, 15 min, 4°C) 後に PBS にて 6 回洗浄後用いた。バッファーは 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) 以外に、培地中での感受性を測定する

ために TSB, LB, Brain Heart Infusion broth (BHI, Becton and Dickinson Microbiology Systems) および、塩濃度の影響を検討するため 1% NaCl 含有 50 mM Tris-HCl (pH 7.5) の 5 種類で行った。

第 14 項 ライソスタフィン結合能試験

ライソスタフィン結合実験の基質として親株と変異株 2 株の菌体を用いた。被検菌は TSB にて $OD_{660nm}=1.0$ に達するまで培養した被検菌を 3 回 0.1 M リン酸バッファー (pH 7.0) で洗浄後、ライソスタフィンの活性阻害剤である 0.1 M iodoacetic acid を含有した 0.1 M リン酸バッファー (pH 7.0) で懸濁し、菌体を 2 mg に調整したものをを用いた。その 200 μ l にライソスタフィンを 5×10^{-6} , 10×10^{-6} M 添加し、4°C で 1 時間反応させた。その後、菌体を 0.1 M iodoacetic acid 含有 0.1 M リン酸バッファー (pH 7.0) で 3 回洗浄し、4% SDS で菌体に結合したライソスタフィンを溶出、遠心 (9,000 x g, 15 min, 4°C) した上清とコントロールとなるライソスタフィンを SDS-PAGE で分離し、クーマシーブルー染色した。結合したライソスタフィンの定量はイメージスキャナーを用いてコンピューターにゲルの像を取り込み、NIH image 1.52 で数値化した。

第 15 項 campbell type integration による *gtf* 欠失株の作製

gtf の欠失株の作製に必要な DNA フラグメントを得るため、*gtf* の ORF を一部増幅するプライマーを設計した (表 4-1)。これらプライマーと、*S. aureus* COL 株のプラスミド DNA を鋳型として第 2 章、第 2 節、第 2 項に準じて PCR 法により DNA フラグメントを得た後、pGEM-T Easy Vector System に TA クローニングを行い、HN717 として分離した。クローニングした HN717 の 730 bp の DNA 断片を、制限酵素消化後、第 2 章、第 2 節、第 2 項に準じて、シャトルベクター pCL8 にクローニングを行い、HN718 として分離した。さらに HN718 の 730 bp の DNA 断片を *EcoRI* で消化して欠失株作製用クローニングベクター pCL52.1 にクローニングし、HN719 として分離した。

得られた HN719 についてプラスミドを精製し、コンピテントセル用に調整した RN4220 40 μ l を用いて第 2 章、第 2 節、第 7 項の方法を用いてプラスミドを RN4220 に導入し HN045 を分離した。HN045 を $OD_{660}=0.2$ に達するまで 30°C で培養後、42°C に温度をあげ HN046 を分離し、*gtf* が欠失していることを PCR にて確認した。HN046 の pHN719 を第 1 章、第 2 節、第 10 項の方法を用いて形質導入により *S. aureus* RN4220 から MRSA 株である BB270 に移した。得られたコロニーを TC 10 μ g/ml 含有 TSA に播き、生育したコロニー HN095, 096 を分離した。

第 16 項 抗菌ペプチドの感受性試験

分離した変異株 HN044, HN085 と親株 COL、および campbell type integration による *gtf* 欠失株である HN046, 096 と各親株について、抗菌ペプチドは hBD3 および hCAP18 を各々合成したペプチドを用いて、第 1 章、第 2 節、第 13 項の方法を用いて抗菌ペプチドの感受性を測定した。

第 17 項 タイコ酸定量

タイコ酸の定量は Berger-Bachi らの方法に準じて、グリセロールとグルコサミンを放射性ラベルして行った [39]。試料の調整は、分離した変異株 2 株と親株を $OD_{660nm}=1.0$ に達するまで 37°C で培養した菌体を再び $OD_{660nm}=1.0$ に達するまで培養し、菌体の凍結保存の際含まれるグリセロールを除去した状態にした。この菌体を 10 ml TSB にて $OD_{660nm}=0.3$ に達するまで培養し、 $[2-^3H]$ グリセロール (37 MBq/ml) (Daiichi chemical Industries, Ltd.)、 $[2-^3H]$ グルコサミン (370~740 GBq/mmol) (Takaramachi chemical Industries, Ltd.) を各培養液に 10 μ l 添加し、37°C で 2 時間培養して遠心 (9,000 x g, 15 min, 4°C) し、得られた菌体を PBS で洗浄後 1 ml の 4% SDS に懸濁して 100°C で 1 時間処理し、脂質や LTA を除いた。遠心 (9,000 x g, 15 min, 4°C) し細胞膜成分を含む上清を回収し、沈渣を 2 回洗浄した一部を全成分とした。残りに 40% フッ化水素を添加し、室温で一晩静置しタイコ酸を除いた。遠心 (9,000 x g, 15 min, 4°C) 後、タイコ酸を含む上清とタイコ酸以外を含む沈渣と、先に回収した細胞膜成分と全成分の放射活性を計測した。

第 3 節 結果

第 1 項 ライソスタフィン低感受性変異株の分離

ランダムに染色体 DNA に Tn551 が挿入された変異株のうち、ライソスタフィンに低感受性となる変異株をライソスタフィン含有培地に 3 回継代培養後 EM 含有 TSB-agar に生育し、EM と Cd 含有 TSB-agar には生育しないコロニーとして 100 株分離した。作製した 15 株のライソスタフィンの感受性を測定し、より感受性の低下した 2 株の変異株の Tn551 を親株に backcross した結果、backcross 株は全て親株の形質は示さなかったため、得られた 2 株を HN044, 085 と名付けた。

第 2 項 各種細胞壁合成阻害剤の MIC および population 解析

分離した変異株 HN044, 085 の種々の細胞壁合成阻害剤の薬剤感受性を測定した結果、モエノマイシンの MIC は各々の親株に比べて、HN044 は 2 倍上昇し耐性を示したが、HN085 は変化がなかった。バンコマイシンおよびテイコプラニンの MIC は、1.5~2 倍上昇し若干耐性を示した。また、 β -ラクタム剤であるメチシリン、オキサシリンの MIC は 8~32 倍低下した。ホスホマイシンに対しては親株と特に違いが認められず、バシトラシンの MIC は HN044 のみが 2 倍低下した。これらの株の back cross 株である HN059, 090, 091 も同様の結果が認められ、分離した HN044, 085 は、Tn551 挿入によるライソスタフィン低感受性変異株であることを確認した (表 4-2)。

population 解析の結果は MIC の結果と同様の傾向が認められた。すなわち、分離した変異株 2 株は共に、バンコマイシンのポピュレーションカーブは、変異株の方が親株に比べ若干右側 (耐性側) に移行し、メチシリンは逆に左側 (感受性側) に移行した。モエノマイシンのカーブは HN044 は親株に比べ若干右側 (耐性側) に移行したが、HN085 は親株と変化がなかった (図 4-1)。

第3項 Tn551 挿入領域の遺伝子同定

分離した2株の変異株の Tn551 挿入領域の遺伝子をクローニングおよびシーケンスを行って相同性検索をした結果、HN044 の Tn551 は 573 個のアミノ酸からなる蛋白をコードするタイロシン合成系のオペロンの一つである β -グルコシルトランスフェラーゼのスタートコドンから 65bp 離れた位置に存在していた (図 4-2-A)。 β -グルコシルトランスフェラーゼはタイロシンへの糖の付加に参与する酵素であり、この遺伝子を *gtf* と名付けた。タイロシンは細胞壁の主要成分で、糖アルコールであるリビトール 36 個の重合体に 3 個のグリセロールと 1 個の N アセチルグルコサミンが結合した構造をとっている[41]。また、HN085 は 131 個のアミノ酸からなる細胞分裂開始に参与するタンパクの N 端に Tn551 の挿入を認めた (図 4-2-B) [10]。この領域については未だ報告例はなく、この遺伝子を *cdi* と名付けた。

第4項 透過型電子顕微鏡による形態観察

分離した変異株は細胞壁消化酵素であるライソスタフィンに低感受性となったことから、細胞壁に肥厚もしくはその他の変化が生じている可能性を考え、第1章、第2節、第5項の方法を用いて変異株の透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察を行った (図 4-3)。

結果、両変異株共に親株に比べ若干細胞壁が肥厚している像が観察された。

第5項 バクテリオファージ 80 α 感受性試験

backcross を行う際分離した変異株は親株と比べバクテリオファージに対して低感受性となっていたため、バクテリオファージ 11, 29, 52, 80 α , 85 の中で最も感受性の低かった 80 α の感受性を測定した。結果、 10^2 希釈した 80 α には親株では鮮明な溶菌像を得たが、両変異株は辺縁の不鮮明な溶菌像となった。また、 10^3 希釈した 80 α には親株では辺縁の不鮮明な溶菌像が観察されたのに対し、両変異株は溶菌像が観察されず、親株 COL に比べ両変異株は 80 α に対して 10 倍、感受性が低下していた。使用した 80 α の力価は 2×10^8 pfu/ml であった (データ示さず)。

第6項 バンコマイシン耐性変異株の出現頻度

Schaaff らの報告[70]で、DNA 修復に関わる因子に変異をもつ株はバンコマイシンに低感受性となる可能性が上昇し、さらにその変異株はバクテリオファージにも低感受性となったことが報告されている。今回分離した変異株もバクテリオファージ 80 α の感受性も減少していたことから、バンコマイシンに低感受性となる頻度が増加している可能性を考え、低感受性になる頻度を測定した。結果、1 回目の培養後に播種した菌体は 1, 2 μ g/ml バンコマイシン含有寒天培地でのみ生育したため、生育したコロニーを 2 μ g/ml バンコマイシン含有培地にて再培養した菌体を 2, 4, 6 μ g/ml バンコマイシン含有寒天培地に播種した。一晚培養後 2, 4 μ g/ml バンコマイシン含有寒天培

地に生育したコロニー数は、親株 COL が最多で HN044、HN085 の順に減少し、親株の方が変異株に比べ低感受性化の頻度が高かった (データ示さず)。

第7項 細胞壁構造解析

分離した変異株は、*gtf*, *cdi* に Tn551 の挿入を認めており、これらの因子が細胞壁の構造に影響する検討を行うため、細胞壁構造解析を行った。

ムロペプチド分析の結果、HN044, 085 および親株 COL と得られたクロマトグラムを比較すると、HN085 と親株は非常に似たピークパターンを示した。しかし溶出時間でおおよそ 150 分以降に得られる oligomeric muropeptide の量は HN085 の方が減少しており、ペプチドグリカンの架橋度は HN085 で低下していた。また、HN044 と親株は異なるクロマトグラムを得た (図 4-4)。

第8項 MALDI-TOF/MS による質量分析

細胞壁のムロペプチド分析の結果、*gtf* 変異株と親株は異なるクロマトグラムを得たことから、ピークの解析を行うため、ムタノリシンで消化したペプチドグリカンのモノマーおよびダイマーに相当するピークを分取し、MALDI-TOF/MS による質量分析を行った。

結果、親株のモノマーのピークは $m/z = 1275$ で $\text{GlcNAc} - \text{MurNAc} - (\text{L-Ala} - \text{D-Glu} - \text{L-Lys} - \text{D-Ala}) - (\text{Gly})^5$ の質量に付加された Na をあわせた質量と一致し、また、ダイマーのピークは $m/z = 2438$ で $[\text{GlcNAc} - \text{MurNAc} - (\text{L-Ala} - \text{D-Glu} - \text{L-Lys} - \text{D-Ala}) - (\text{Gly})^5]$ 質量に付加された Na をあわせた質量と一致し、トリマーのピークは $m/z = 3602$ でグリシンを 5 つ含有する主要なモノマーを 3 つ有する質量と一致した (図 4-5-A)。一方 HN044 のピークで親株のモノマーに相当する時間に溶出されたピークは主要なもので 3 本 (ピーク 5, 6, 7) 存在し、ピーク 5 は $m/z = 989$ で $[\text{GlcNAc} - \text{MurNAc} - (\text{L-Ala} - \text{D-Glu} - \text{L-Lys} - \text{D-Ala})] + \text{Na}$ の質量、ピーク 6 は $m/z = 1047$ で $[\text{GlcNAc} - \text{MurNAc} - (\text{L-Ala} - \text{D-Glu} - \text{L-Lys} - \text{D-Ala}) - (\text{Gly})^1] + \text{Na}$ の質量、ピーク 7 は $m/z = 1105$ で $[\text{GlcNAc} - \text{MurNAc} - (\text{L-Ala} - \text{D-Glu} - \text{L-Lys} - \text{D-Ala}) - (\text{Gly})^2] + \text{Na}$ の質量と一致し、グリシンの数によりモノマーのピークが分散していた。同様に、HN044 のピークで親株のダイマーに相当する時間に溶出されたピークは主要なもので 3 本 (ピーク 16, 17, 18) 存在し、ピーク 16 は $m/z = 2189$ で主要ダイマーからグリシン 4 つを欠失させた質量、ピーク 17 は $m/z = 2000$ で主要ダイマーからグリシン 7 つを欠失させた質量、ピーク 18 は $m/z = 2210$ で主要ダイマーからグリシン 1 つを欠失させた質量と一致し、グリシンの数によりダイマーのピークも分散していた (図 4-5-B)。

これらより *gtf* 変異株はグリシンを添加する遺伝子である *femA*, *femB* との関連が考えられ、同様の方法で、*femAB* 欠失株である BB586 の精製したペプチドグリカンをムタノリシン処理した消化物の MALDI-TOF/MS による質量分析を行った。結果、BB586 のピークで親株のモノマーに相当する時間に溶出されたピーク 2 本 (ピーク 1, 2) のうちピーク 2 は $m/z = 1048$ で主要モノマーからグリシンを 4 つ欠失させた質量と一致しており、親株のダイマーに相当する時間に溶出されたピーク 2 本のうちピーク 4 は $m/z = 1984$ で主要ダイマーからグリシンを 8 つ欠失させた質量と

一致していた。また、得られたクロマトグラムは *gtf* 変異株と類似していた (図 4-5-C) [79]。

第9項 バンコマイシン結合能試験

gtf 変異株は細胞壁の構造が変化していたため、細胞壁に結合するバンコマイシン量に変化が起こっている可能性が考えられるため結合量を測定した (図 4-6)。結果、バンコマイシンと SDS 加熱処理した死菌体すなわち細胞壁との結合量は、細胞壁構造の変化した *gtf* 変異株は親株と比較して 1.5~1.6 倍増加した。しかし *cdi* 変異株と親株とで結合量に違いは認められなかった。

第10項 ライソスタフィン感受性試験

細胞壁ペプチドグリカンの 5 つのグリシンによる架橋部位を消化する酵素であるライソスタフィンの感受性試験を行った (図 4-7)。結果、生菌では両変異株ともに親株に比べライソスタフィン添加後の濁度の減少に遅延がみられ、ライソスタフィンの感受性が減少した。また SDS 加熱死菌体では *gtf* 変異株は親株に比べライソスタフィンの感受性が減少した、*cdi* 変異株では若干感受性が減少した (図 4-7)。また、ライソスタフィンを作用させるバッファーを 3 種類の培地に替え同様に感受性試験を行った結果、TSB と LB では分離した変異株がライソスタフィン添加後と同程度、もしくは添加後以上に吸光度が増加した。しかし、BHI を用いた結果、*cdi* 変異株は吸光度が増加したが、*gtf* 変異株および COL は逆に減少し、両変異株共に親株より感受性は減少していた。また、培地に含まれる塩濃度がライソスタフィンの作用に影響を及ぼしている可能性を考え、LB 培地に含まれる 1% NaCl を添加した 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) で同様に実験を行ったが、NaCl 非添加の 50 mM Tris-HCl (pH 7.0) と同様の結果を示した。

第11項 ライソスタフィン結合能試験

分離した変異株のライソスタフィンの感受性が減少しており、感受性の変化を引き起こす因子として結合能の変化が起こっている可能性を考え、ライソスタフィンとの結合能を測定した (図 4-8)。結果、*gtf* 変異株のライソスタフィン結合能は親株と比べ 2 倍程度減少していた。一方 *cdi* 変異株は 1.3 倍減少していた。

第12項 campbell type integration 変異株のライソスタフィン感受性試験

HN044 の解析を行うため、Tn551 の挿入領域である *gtf* の欠失株を作製し、ライソスタフィンの感受性を測定した (図 4-9)。結果、親株に比べ *gtf* 欠失株である HN096 は感受性が減少し、ライソスタフィン添加後、10 分間 37℃でインキュベートすると、0 分を 100%としたときの濁度の減少率は、変異株 HN096 が 20%、親株 BB270 が 79%であった。

第13項 抗菌ペプチドの感受性試験

分離した変異株のうち *gtf* 変異株はタイコ酸合成系のオペロンに Tn551 挿入を認めたため、陰性荷電であるタイコ酸量が減少し、菌体が親株に比べ陽性に荷電している可能性がある [29]。そこで、荷電の変化を検討するために、分離した変異株 2 株と親株 COL、および campbell type integration による *gtf* 欠失株である HN046, 096 と各親株の抗菌ペプチド hBD3 および CAP18 の感受性を測定した (図 4-10)。結果、両抗菌ペプチドに対して両変異株共に感受性が増加した。また、campbell type integration による *gtf* 欠失株である HN046, HN096 は各親株と比べ、両抗菌ペプチドに対して感受性が増加した。hBD3 を 1 µg/ml 作用させた時の菌体の生存率は、RN4220 が 69%、BB270 が 80 %であるのに対し、HN046 は 52%、HN096 は 58 %であり、また、CAP18 を 1 µg/ml 作用させたときの生存率は RN4220 が 45%、BB270 が 68%であるのに対し、HN046 は 10%、HN085 は 20%であった。

第14章 タイコ酸定量

分離した *gtf* 変異株はタイコ酸の合成系に支障を来して、タイコ酸量が減少している可能性が考えられるため、グリセロールと N-アセチルグルコサミンのタイコ酸への取込みを放射活性を測定して検討した (図 4-11)。結果、グリセロール量、N-アセチルグルコサミン量共に親株と *gtf* 変異株で違いは認められなかった。

第4節 考察ならびに小括

バンコマイシン低感受性機序の解明を目的として、第 1 章で分離したモエノマイシン低感受性突然変異株はバンコマイシンにも低感受性を示しており、この株は細胞壁の肥厚および細胞壁消化酵素であるライソスタフィンへの低感受性が認められたことに着目し、細胞壁の肥厚を起こす因子とバンコマイシンの感受性との関連性を考え、Tn551 の手法を用いてライソスタフィンに低感受性となる変異株を分離した。分離した変異株は、バンコマイシンおよびテイコプラニンに対して、1.5~2 倍耐性を示した。また、β-ラクタム剤に対しては逆に 8~32 倍感受性が上昇した。バンコマイシンに低感受性となる変異株の Tn551 挿入領域の遺伝子は、タイコ酸合成系のオペロンの一つである β-グルコシルトランスフェラーゼをコードする *gtf*[41] と細胞分裂開始に関与する *cdi*[10]であった。*gtf* は *B. subtilis* で明らかにされている主要なタイコ酸合成系オペロンの一つである β-グルコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子 *tagA* とは相同性がなく、マイナーなタイコ酸合成因子である *ggaB* と相同性を有していた[83]。分離した変異株の細胞壁は親株と比べ若干肥厚していたことから、細胞壁の構造解析を行ったところ、*gtf* に Tn551 の挿入を認めた変異株のムロペプチドは、グリシンの数が異なるモノマーやダイマーを有しており、*gtf* とグリシンを添加する遺伝子である *femA*, *femB* との関連が考えられた[79]。*femA*, *femB* はペプチドグリカンのグリシン 5 量体による架橋部分における、2, 3, 4 番目のグリシンを添加する酵素であり[5]

[24]、*femA*, *femB* 変異株はライソスタフィンの感受性が減少する[79]。そこでライソスタフィンの感受性を検討したところ、生菌においても SDS 加熱死菌体においても感受性が減少した。このライソスタフィンの感受性の減少を引き起こす因子としてライソスタフィンとの結合能の変化が可能性として考え、検討した結果、結合能が 2 倍減少したことから、細胞壁構造に起因して結合能が変化したことが示唆された。さらに、バンコマイシンの細胞壁への結合能を測定したところ、結合能が 1.6 倍上昇し、バンコマイシンの標的である D-alanine-D-alanine が増加していることが示唆された。しかし、Tn551 の挿入領域の *gjf* は細胞壁ペプチドグリカンの合成系とは直接に関係のない因子であることから、細胞壁の構造変化は付随して引き起こされた現象である可能性を考え、直接因子を明らかにするために、変異株のタイコ酸の定量を行った [39]。しかしリピトール重合体に結合するグリセロールおよび N アセチルグルコサミンの放射活性に変化は認められなかった。また、タイコ酸が陰性荷電であるため [29]、*gjf* 変異株に荷電の変化が起こる可能性を考え、抗菌ペプチドの感受性を測定したところ、親株に比べ感受性が上昇した。タイコ酸に陽性荷電のアラニンを添加する酵素をコードする遺伝子である *dlt* 欠失変異株は抗菌ペプチドの感受性が上昇するという報告がある [63]。以上より、*gjf* の変異によりタイコ酸の構造あるいは構成成分に変化が起こり、抗菌ペプチドの感受性やペプチドグリカンの構造変化が生じたことが考えられる。しかし *gjf* の機能そのものについてはまだ不明である。また、タイコ酸合成系オペロンの一つでリピトールの転位酵素をコードする遺伝子 *tagF* は *S. epidermidis* では生存に必須であるのに対して *B. subtilis* では致死性ではないことから、*B. subtilis* においては *tagF* の機能を補う *ggaB* などの因子の存在が考えられる。今回同定した *gjf* も *ggaB* と相同性を認め、また *S. aureus* のゲノム上には *tagF* と相同性のある因子が存在することから、*gjf* 単独の変異ではタイコ酸の大きな変化を生じなかったことが考えられた。

また、*cdi* に Tn551 の挿入を認めた変異株の解析も *gjf* 変異株と同様の手法を用いて行った。細胞壁構造解析の結果、ムロペプチド構造に変化はなかった。ライソスタフィンの感受性は生菌では感受性が低下したが、SDS 加熱死菌体では変化がなかった *cdi* は単独でプロモーターを有しているため [10]、*cdi* の欠失のみでは細胞壁の構造に変化を来さない可能性が示唆された。*cdi* の機能も現在のところ明らかとなっておらず、ライソスタフィンの感受性の低下、バンコマイシンの感受性の変化などとの関連性は不明である。

小括

1. ライソスタフィンの感受性が親株と比べて低下した Tn551 挿入ライソスタフィン低感受性変異株を 2 株分離した。
2. 分離した変異株は共に親株に比べ、バンコマイシンの MIC は 1.5~2 倍耐性を示し、 β -ラクタム剤の MIC は 8~32 倍低下した。
3. 分離した変異株の Tn551 挿入領域の遺伝子は、HN044 はタイコ酸合成系のオペロンの一つである β -グルコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子 *gjf* に、HN085 は細胞分裂開始に関与する因子である *cdi* に Tn551 の挿入を認めた。

4. 分離した変異株は共に親株に比べ、若干細胞壁の肥厚が観察された。
5. 分離した変異株は共に親株に比べ、バクテリオファージ 80 α に 10 倍、感受性が低下した。
6. 分離した変異株のムロペプチド構造解析の結果、HN085 は架橋度が低下しており、HN044 は親株とは異なるクロマトグラムを得た。
7. 分離した変異株のうち HN044 のムロペプチドは、グリシンの数が異なるモノマーやダイマーを有していた。
8. 分離した変異株のうち HN044 の SDS 加熱死菌体にバンコマイシンは 1.5~1.6 倍結合したが、HN085 では変化がなかった。
9. 分離した変異株のうち HN044 のライソスタフィン結合能は 2 倍、HN085 では 1.3 倍減少した。
10. 分離した変異株は共に親株に比べ、hBD3, CAP18 の両抗菌ペプチドの感受性が増加した。また、作製した *gjf* 欠失株も、両抗菌ペプチドに対して感受性が増加した。
11. 分離した変異株のうち HN044 のタイコ酸量に違いがなかった。

表 4-1 使用した菌株、プラスミドおよびプライマー

Strain	Relevant characteristics	Source or reference	
<i>S. aureus</i>			
COL	COL <i>mec</i>	A. Tomasz	
COL(pRN3208)	COL with pRN3208	B. Berger-Bächi	
BB270	NCTC8325 <i>mec</i>	B. Berger-Bächi	
RN4220	8325-4 r'	R. Novick	
HN044	COL (<i>gff</i> ::Tn551)	This study	
HN085	COL (<i>cdi</i> ::Tn551)	This study	
HN059	Backcross of HN044	This study	
HN090	Backcross of HN085	This study	
HN091	Backcross of HN085	This study	
HN045	electroporation pHN719 / RN4220 (30 °C)	This study	
HN046	electroporation pHN719 / RN4220 (42 °C), <i>gff</i> ::pCL52.1	This study	
HN095	HN046 transduct to BB270	This study	
HN096	HN046 transduct to BB270	This study	
BB586	8325 <i>mec</i> Ω2003 (<i>femA</i> ::Tn551) pBBB31		
<i>E. coli</i>			
XLII-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac I'ZΔM15 Tn10</i> (Tet) Amy Cam]	Bullock et al.	
HN717	pHN717 / XLII-Blue	This study	
HN718	pHN718 / XLII-Blue	This study	
HN719	pHN719 / XLII-Blue	This study	
Plasmids	Vector Cloning site Relevant properties		
pHN717	pGEM <i>SphI/SalI</i> pGEM containing PCR fragment [nlysine -1+ 2]	This study	
pHN718	pCL8 <i>EcoRI/EcoRI</i> pCL8 containing PCR fragment [nlysine -1+ 2]	This study	
pHN719	pCL52.1 <i>EcoRI/EcoRI</i> pCL52.1 containing PCR fragment [nlysine -1+ 2]	This study	
Gene	Primer Sequence (5' to 3')	Positions	
<i>gff</i>	universal primer	CGACGTTGTAACGACGGCCAGT	
	reverse primer	CAGGAAACAGCTATGAC	
	nlyso-1	TTGAAGTGGTTGTAGTTG	3953-3970
	nlyso-2	TTAATCCATTGCGGTTGA	4402-4420
Tn551	nlyso-3	GAAGTTAATGATATACTG	5115-5132
	Tn551-5 pTNR-7	CTAAGCTTGAGTATATGTCCAAGCAT ATAAGCCGCTGTGCGAGT	

表 4-2 親株とTn挿入変異株の種々の細胞壁合成阻害剤のMIC

strain	Relevant properties	MIC (μg / ml)													
		oxacillin	methicillin	vancomycin	teicoplanin	fostomycin	bacitracin	moenomycin	oxacillin	methicillin	vancomycin	teicoplanin	fostomycin	bacitracin	moenomycin
COL	wild type	128	512	2	1	512	128	0.031							
HN044	COL(<i>gff</i> ::Tn551)	16	16	4	2	512	64	0.063							
HN085	COL(<i>cdi</i> ::Tn551)	16	32	3	1	512	128	0.031							
HN059	Backcross of HN044	32	32	4	4	256	128	0.031							
HN090	Backcross of HN085	8	16	3	1	256	128	0.031							
HN091	Backcross of HN085	16	32	3	1	256	128	0.063							
RN4220	wild type	0.5	1	0.5	0.5	64	128	0.008							
HN046	RN4220 (<i>gff</i> / pYT1)	0.5	0.5	0.5	0.5	64	128	0.008							
BB270	wild type	128	512	1	1	256	128	0.031							
HN095	BB270 (<i>gff</i> / pYT1)	128	512	1	1	256	128	0.063							
HN096	BB270 (<i>gff</i> / pYT1)	128	512	1.5	1	256	128	0.063							

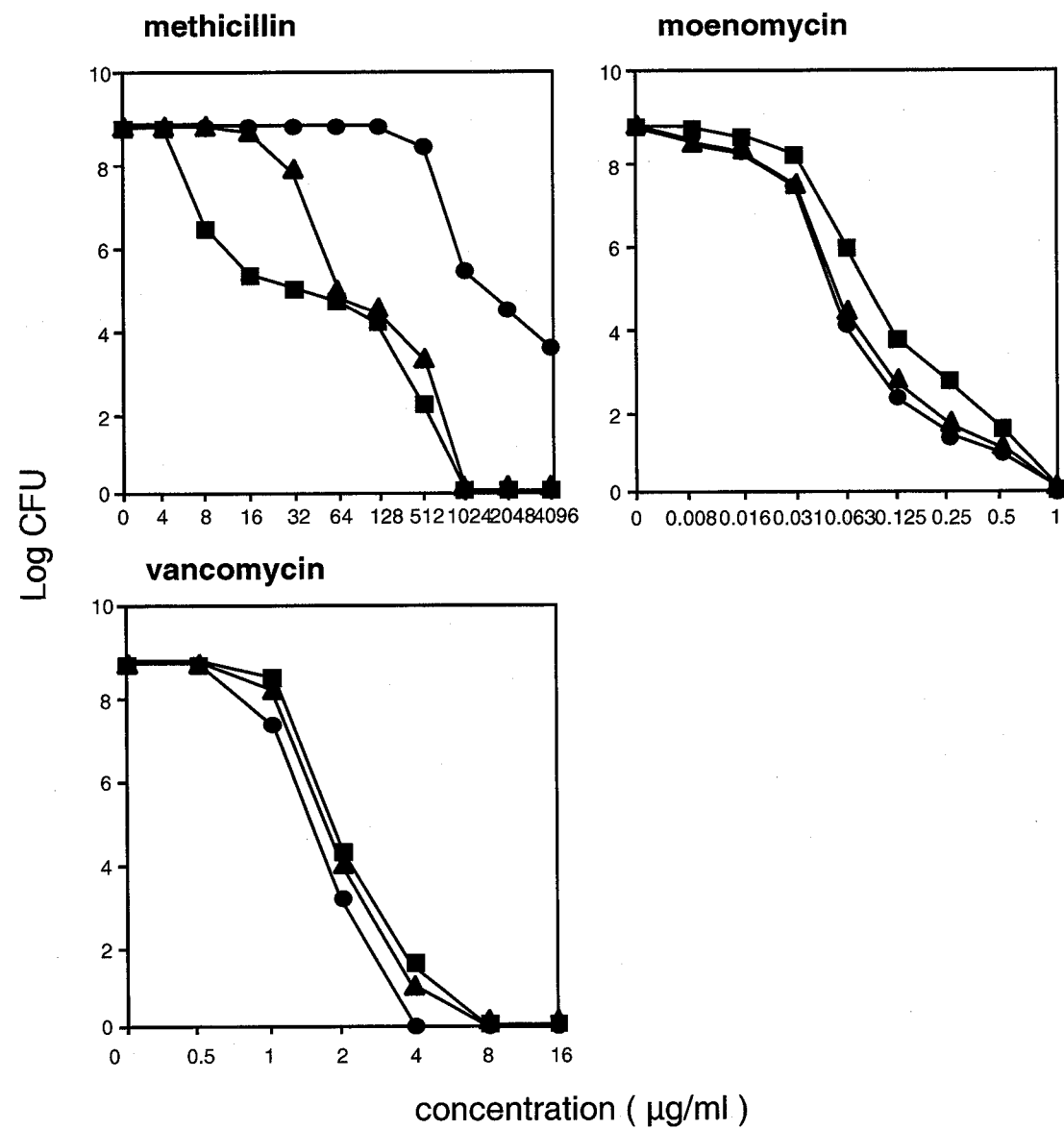


図4-1 親株とTn挿入変異株の population解析

種々の濃度の薬剤を含むTSB寒天培地に、TSBで被験菌をOD660=1.0に達するまで培養し、 10^2 倍、 10^4 倍、 10^6 倍希釈した検体を100 µl接種し、37°Cで48時間培養後、コロニー数を測定し、 10^9 個の菌を接種したときの生菌数をグラフに表した。●, 親株 COL; ■, 変異株 HN044; ▲, 変異株 HN085を示す。

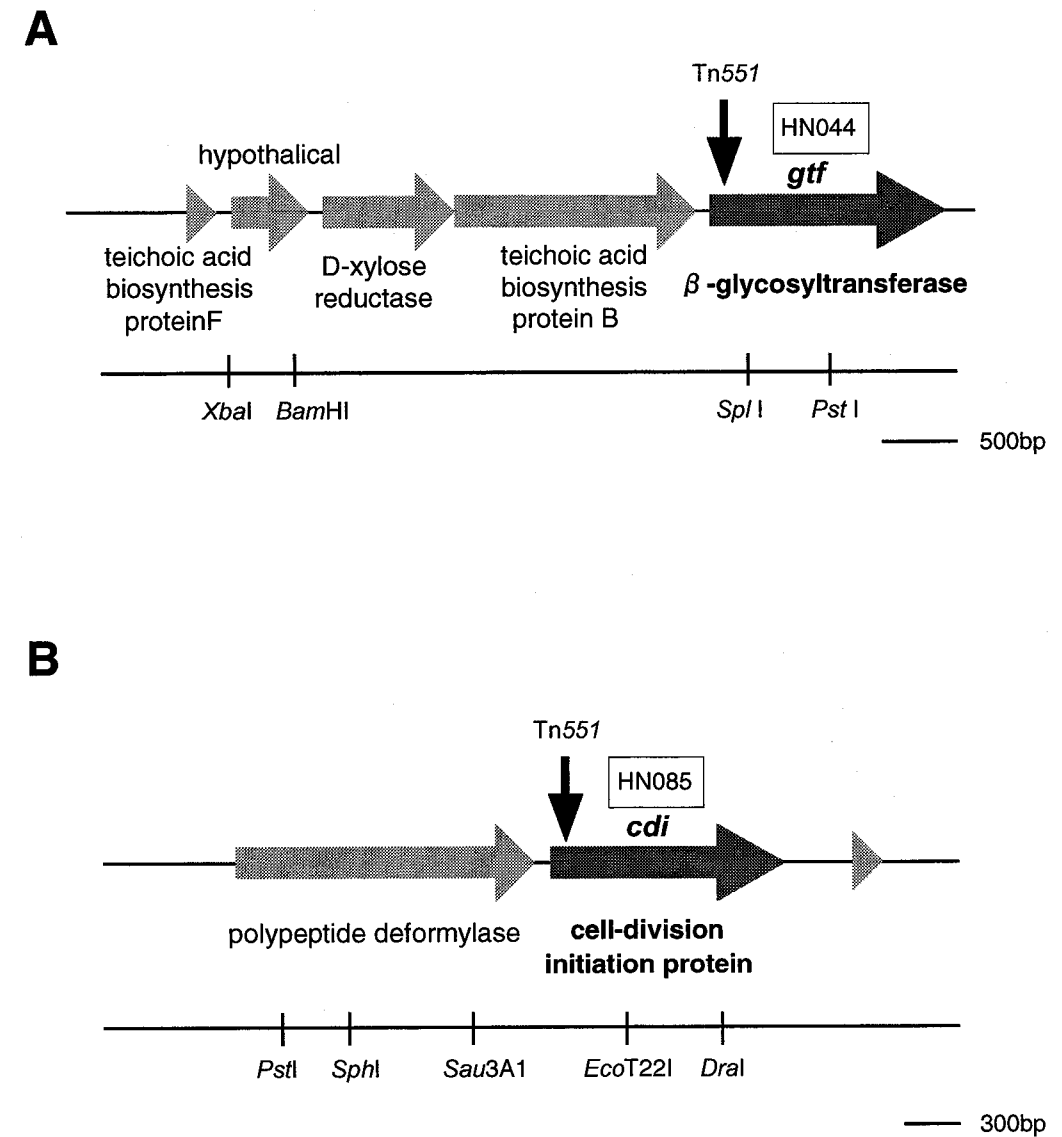
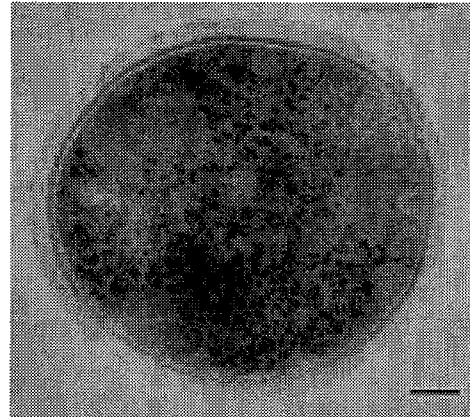


図4-2 Tn51挿入領域近傍の遺伝子マップ

(A) HN044 のTn51挿入領域である gtf の近傍のマップ、(B) HN085 のTn51挿入領域である cdi の近傍のマップを示す。▼はTn挿入部位、その下に制限酵素サイトを示した。

COL



HN044



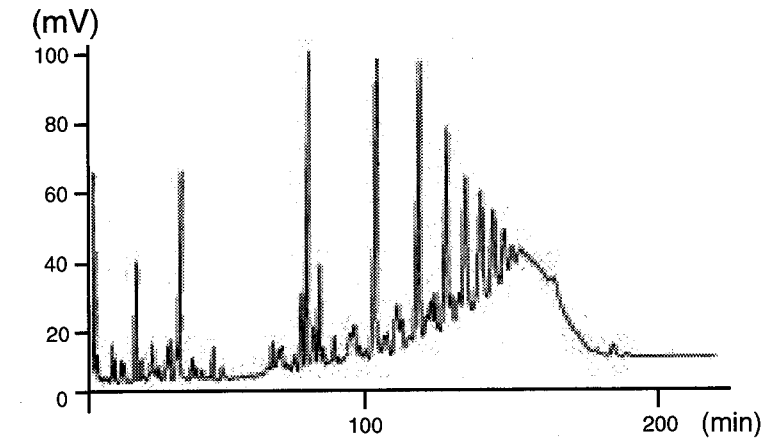
HN085



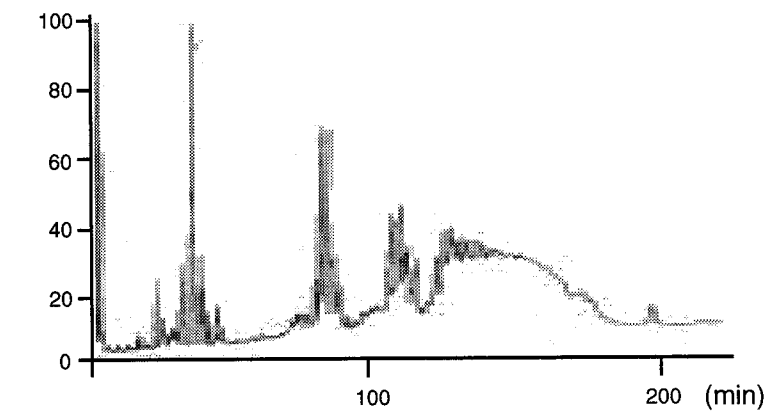
図 4-3 親株と分離した変異株の電子顕微鏡像

PBSにて洗浄した菌体を3%細菌用寒天にて固化した後、2.5% glutaraldehydeで4℃、2時間固定した。洗浄後、さらに1% OsO₄にて2時間固定した。エタノール系列希釈後、15分毎に脱水し、Spurr's Eponにて包埋した。これをダイヤモンドナイフおよびウルトラミクロトームにて超薄切片を作製し、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察を行った。

COL



HN044 COL (*gtf*::Tn551)



HN085 COL (*cdi*::Tn551)

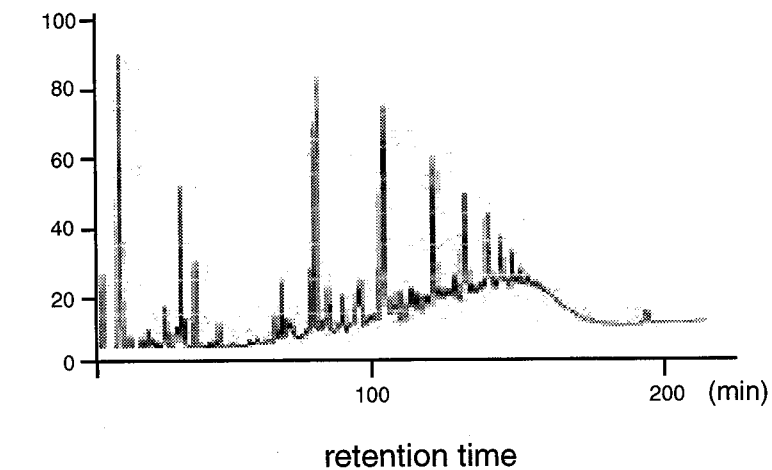


図 4-4 細胞壁の構造解析

精製したペプチドグリカンをもタノリシンにて完全に可溶化して調整したサンプルを、逆相高速液体クロマトグラフィーにて5% (vol/vol) メタノール含有 50 mM NaPi (pH 2.5) から30% (vol/vol) methanol含有 50 mM NaPi (pH 2.8) でリニアグラディエントを行い、グリカン鎖長解析を行った。

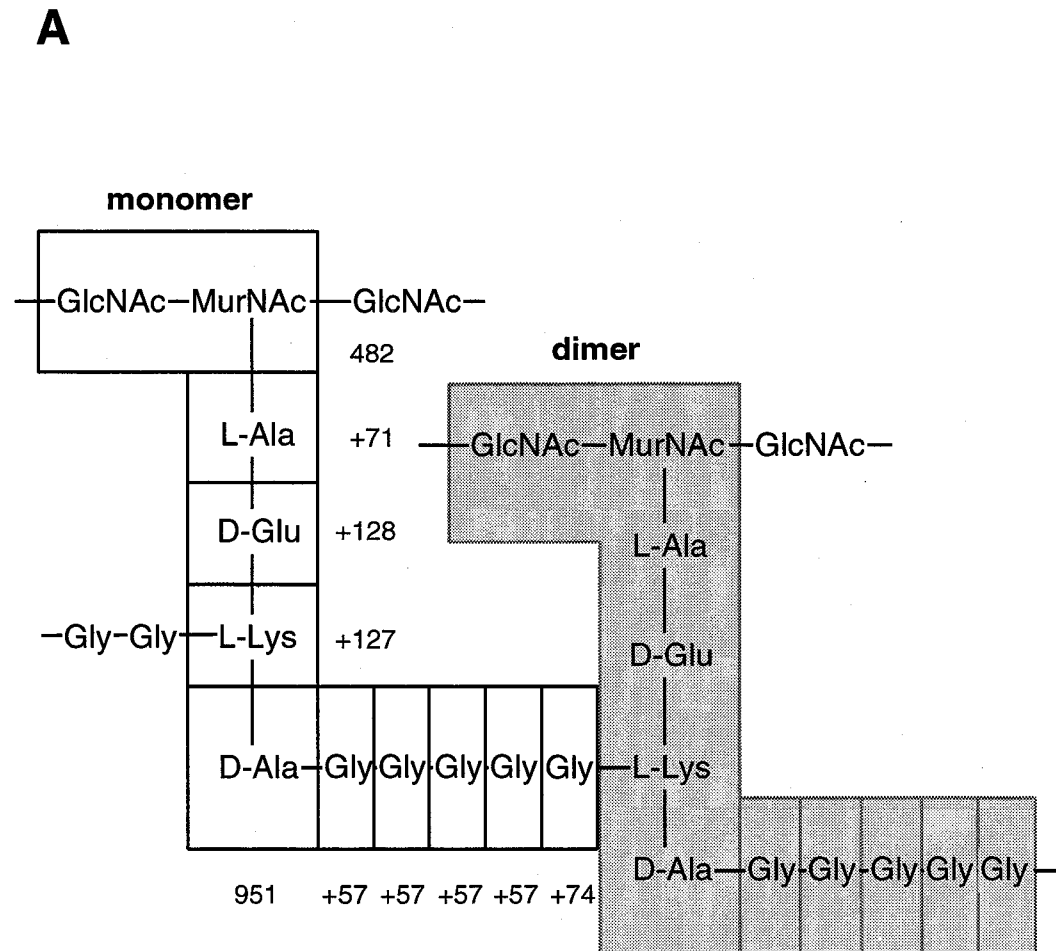


図4-5 MALDI-TOF/MSによる解析 (1)

(A) ペプチドグリカンの質量数、(B~D) 逆相高速液体クロマトグラフィーによりピーク分集を行ったサンプルをZip Tip C18単体と結合させ、再びBバッファーで洗浄後Cバッファー (50% アセトニトリル、0.1% TFA、イオン交換水) にて溶出し脱塩した。サンプルと飽和DHBとを混和してターゲットプレートにのせ、MALDI-TOF-MS reflex IIIにて測定した。

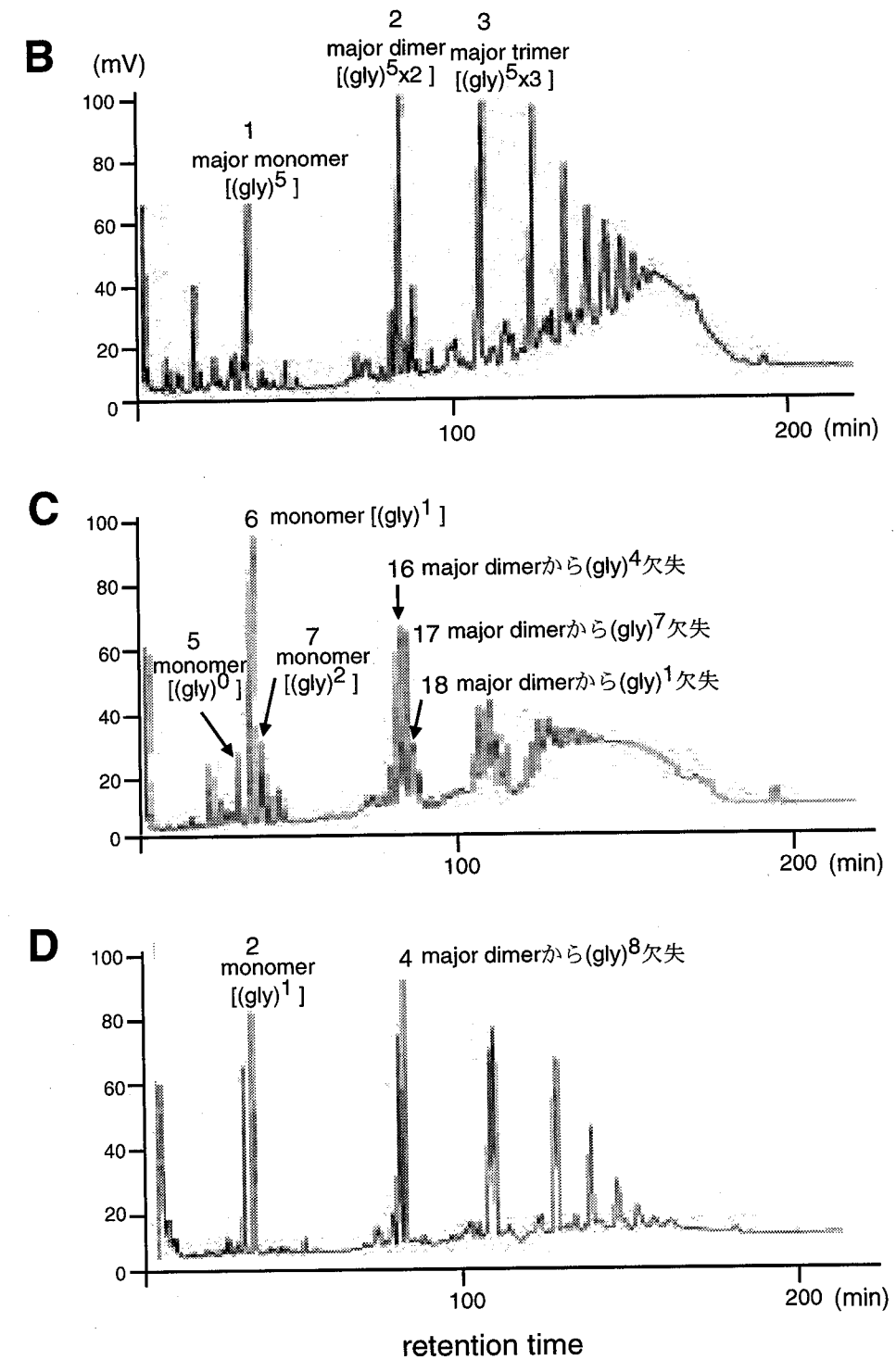


図4-5 MALDI-TOF/MSによる解析 (2)

(B) 親株COL (C) 変異株 HN044 (D) 変異株 COL (*femAB/pYT1*) のムタノリシンで消化したサンプルのクロマトグラムおよび分集したピークの質量数と構造を示す。

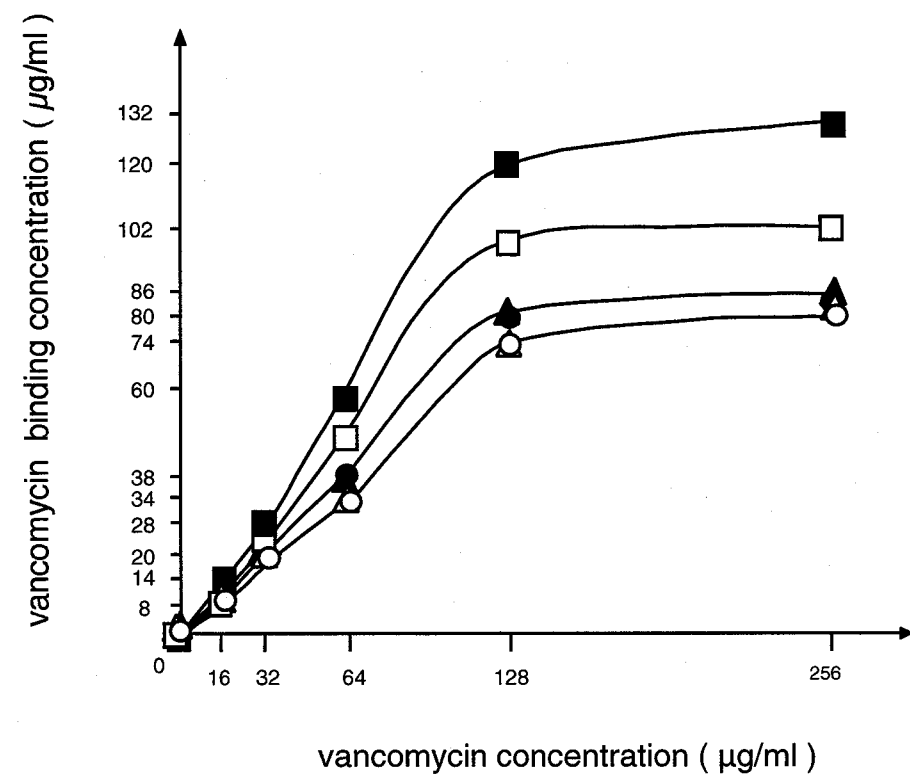


図 4-6 変異株のバンコマイシンの結合能試験

被検菌に種々の濃度に調整したバンコマイシンの薬液を添加し、菌体と薬剤を結合させた上清を滅菌したろ紙に浸透させ、Bacillus株を封入した0.5% LB-agar 上に置き、37°Cで一晩培養した。得られた阻止円の直径を2方向から測定して平均値を求め、コントロールと比較して菌体に結合した薬剤量を測定した。●, 親株 COL 生菌; ■, 変異株 HN044 生菌; ▲, 変異株 HN085 生菌; ○, 親株 COL SDS加熱死菌体; △, 変異株 HN044 SDS加熱死菌体; □, 変異株 HN085 SDS加熱死菌体をそれぞれ示す。

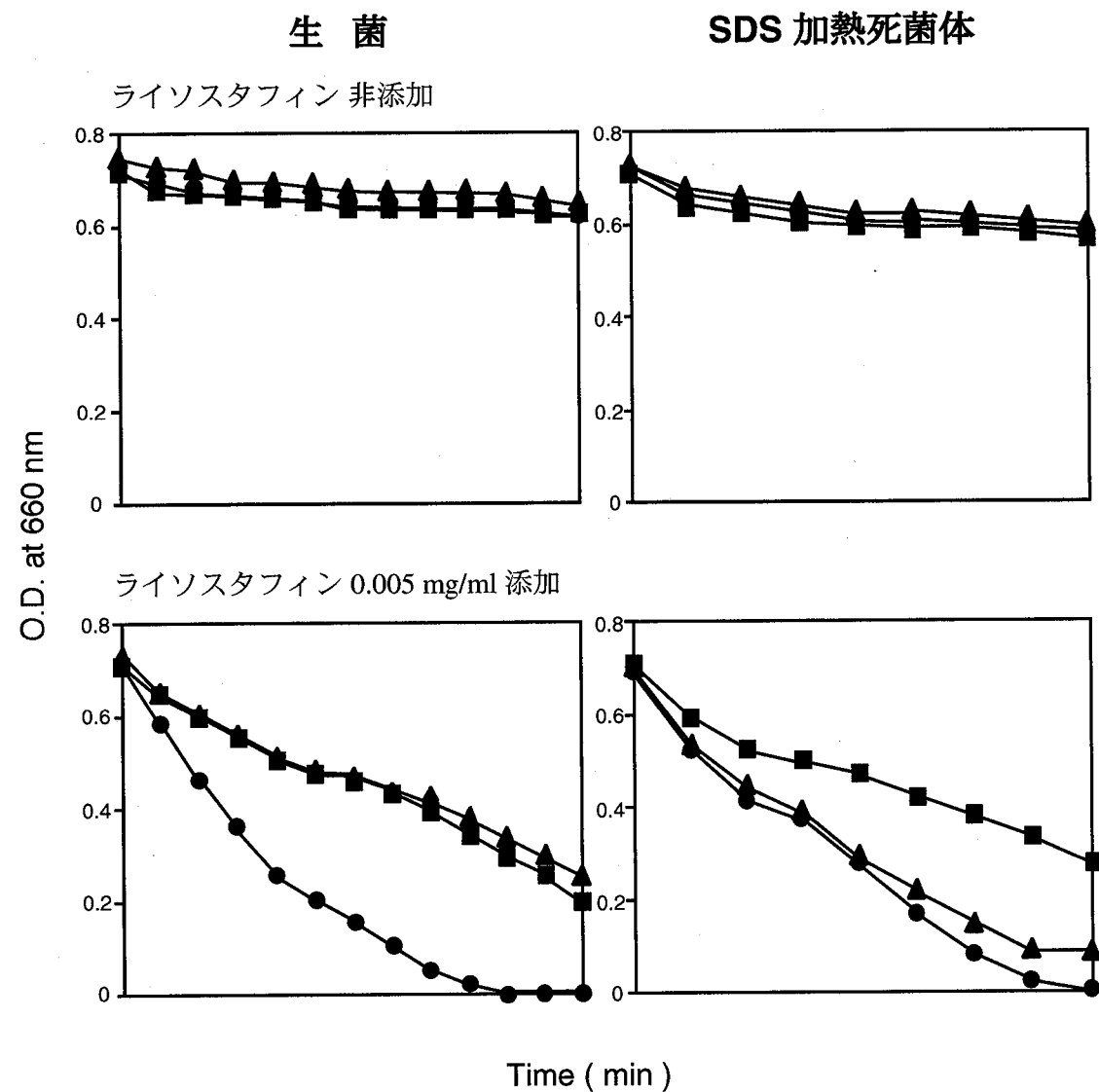


図 4-7 変異株のライソスタフィン感受性試験 (1)

50 mM Tris-HClバッファー (pH 7.4) にOD660nm =0.8となるように菌体を懸濁し、lysostaphin を最終濃度0.005 mg/mlになるように加え、37°Cでインキュベートした。SDS加熱処理死菌体は被検菌を4% SDSで懸濁後100°Cで1時間処理し洗浄後を用いた。●, 親株 COL; ■, 変異株 HN044; ▲, 変異株 HN085をそれぞれ示す。

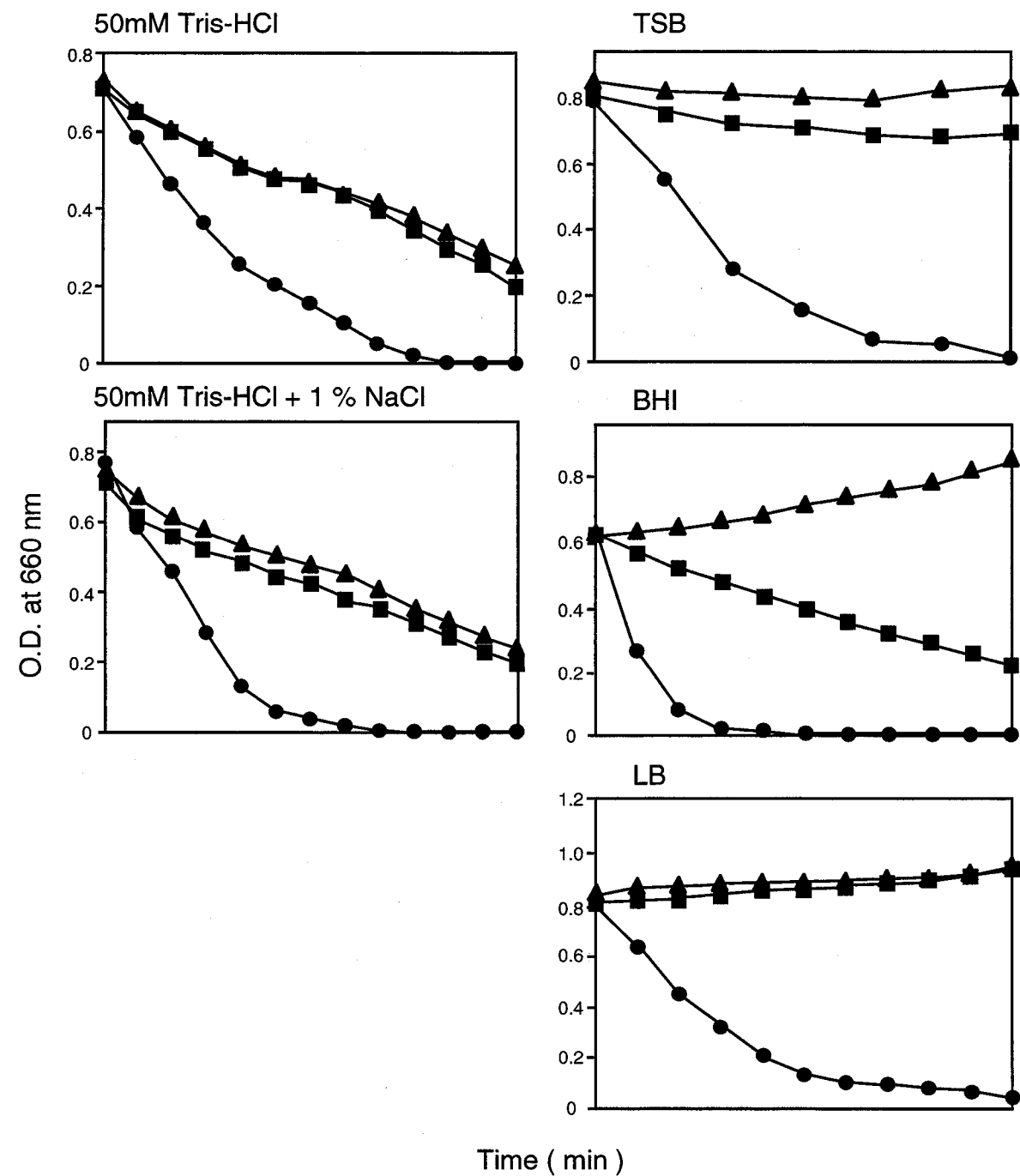


図4-7 変異株のライソスタフィン感受性試験(2)

バッファーは50 mM Tris-HCl (pH 7.4) 以外に、培地中での感受性を測定するためにTSB, LB, Brain Heart Infusion brothおよび、培地中の塩濃度の影響を考え1% NaCl含有50 mM Tris-HCl (pH 7.4) の5種類で行った。●, 親株 COL; ■, 変異株 HN044; ▲, 変異株 HN085を示す。

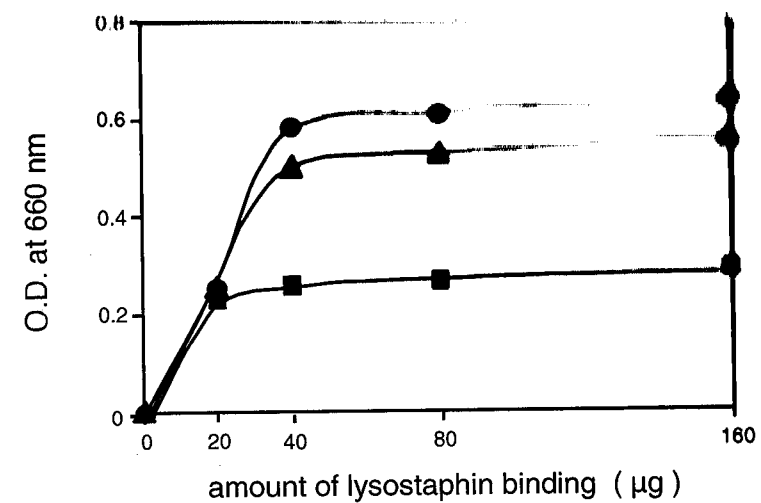


図4-8 変異株のライソスタフィン結合能

被検菌を0.1 M iodoacetic acid含有0.1 M リン酸バッファーで懸濁し、2 mgに調整してライソスタフィンを添加し、4℃で1時間反応させた。洗浄後、4% SDSでライソスタフィンを溶出した上清をSDS-PAGEし、イメージスキャナーにて定量した。●, 親株 COL; ■, 変異株 HN044; ▲, 変異株 HN085を示す。

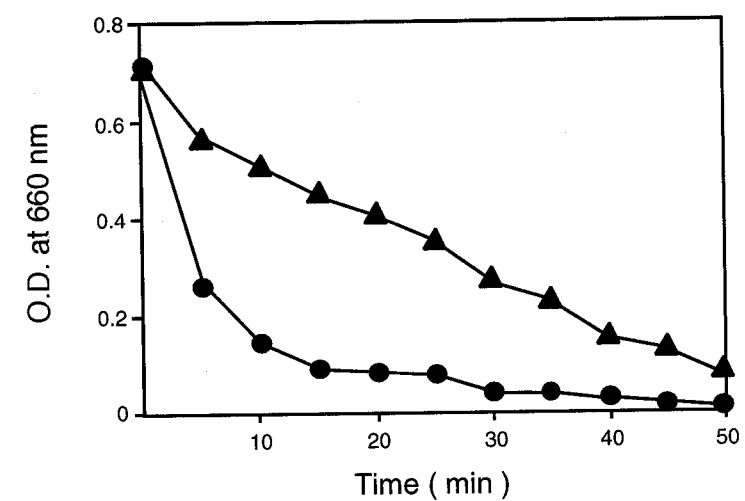
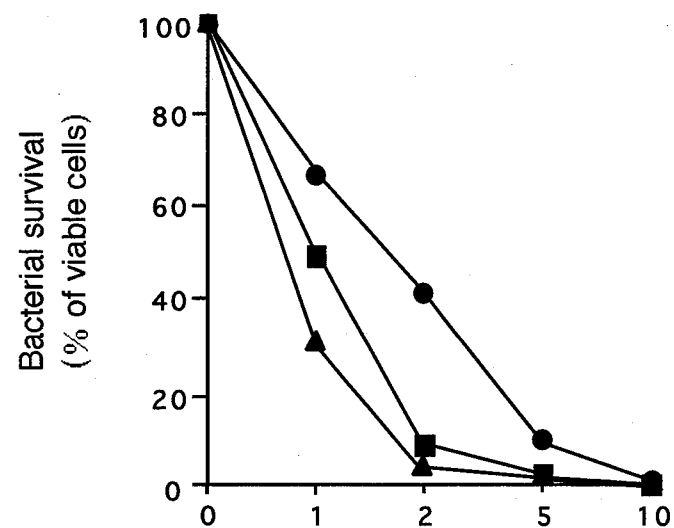


図4-9 *gtf* 欠失株のライソスタフィン感受性試験

50 mM Tris-HClバッファーにOD660nm = 0.8となるように菌体を懸濁し、ライソスタフィンを最終濃度0.005 mg/mlになるように加え、37℃で反応させた。●, 親株 COL; ▲, 変異株 *gtf* 欠失株を示す。

hBD3 (human- β - defensin-3)



CAP18 (cathelicidin antimicrobial protein)

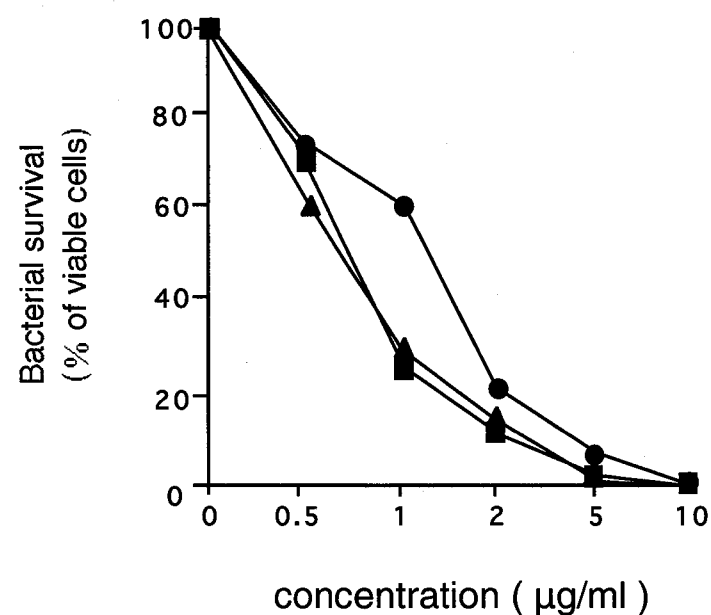


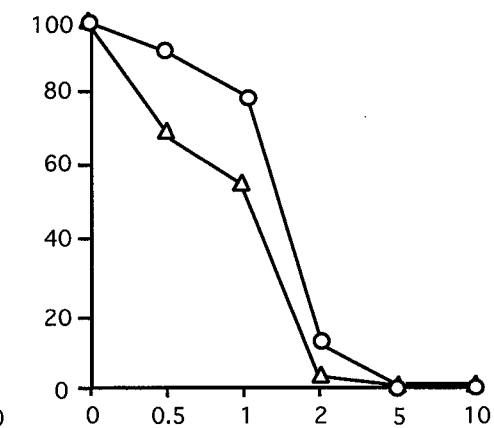
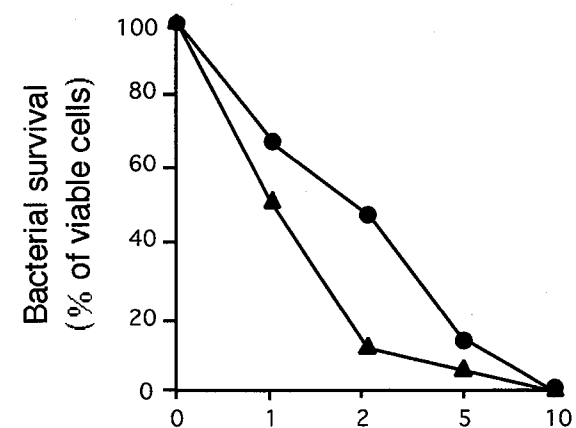
図4-10 抗菌ペプチドの感受性試験 (1)

10⁷ cells/mlとなるように調整した被検菌を各種濃度に調整した抗菌ペプチドと作用させ、37℃で2時間培養した。これをTSAにまき37℃で一晩培養し、生育したコロニー数を計測した。●, 親株 COL; ■, 変異株 HN044; ▲, 変異株 HN085を示す。

MSSA RN4220

MRSA BB270

hBD3 (human- β - defensin-3)



CAP18 (cathelicidin antimicrobial protein)

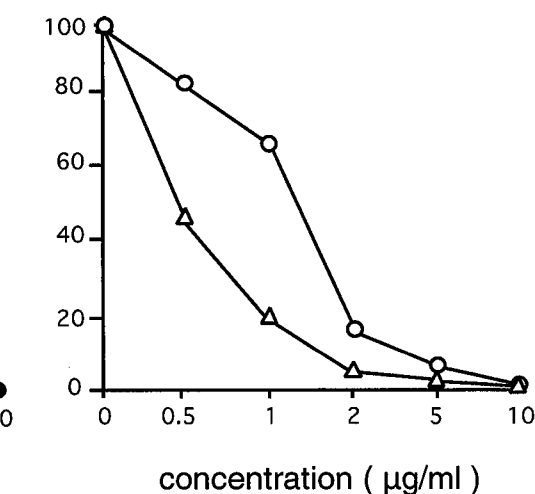
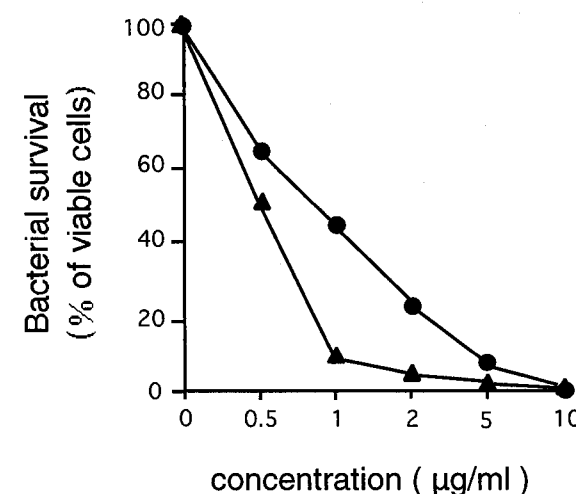


図4-10 抗菌ペプチドの感受性試験 (2)

●, 親株 RN4220; ▲, 変異株 HN046; ○, 親株 BB270; △, 変異株 HN096を示す。

総括

本研究では、*Staphylococcus aureus* のバンコマイシンに対する低感受性に影響を与える因子を解明することを主目的とし、バンコマイシンの低感受性にモエノマイシンの感受性に影響を与える因子が関与している可能性に着目し、突然変異のモエノマイシン低感受性変異株と Tn551 挿入モエノマイシン低感受性変異株を分離してバンコマイシンの感受性との関連性を検討し、性状解析を行って両薬剤の感受性に影響する因子を検討した。さらに、モエノマイシンの標的である TGase の解析、および細胞壁の肥厚に関わる因子を同定、その機能について検討を行った。

MRSA 5 株と MSSA 2 株から分離したモエノマイシン低感受性突然変異株 7 株は全て、バンコマイシンに 8 倍耐性化した。このうち MRSA 2 株と MSSA 1 株を透過型電子顕微鏡で観察した結果、全ての変異株で細胞壁の肥厚が観察された。分離した変異株は増殖速度が親株に比べ遅延し、lysostaphin の感受性は減少した。また細胞壁の構造解析の結果、グリカン鎖長の増大が観察された。しかしモエノマイシンの標的である TGase 領域をもつ *php2* と monofunctional TGase 領域をコードする *sgtA*, *sgtB* のプロモーター領域を含む全塩基配列に親株と違いは認められず、全 PBP の発現量および PBP2 のプロモーター活性にも違いは認められなかった。よって、突然変異株のモエノマイシンおよびバンコマイシンの感受性に影響を与える因子は TGase 自体には変化がなかったことから、TGase に影響をする別の因子すなわち、グリカン鎖長を増大させる因子もしくは前述の細胞壁の肥厚をもたらす因子が感受性に関与している可能性の高いことが示唆された。そこで、*S. aureus* のもつ TGase 領域の解析および PBP の解析を行った。*S. aureus* のもつ TGase とモエノマイシンとは親和性があることが明らかとなった。また、*S. aureus* の膜蛋白で Sgta は検出できず、発現していない可能性が考えられた。TGase 領域を過剰発現および欠失させた変異株の解析を行った結果、モエノマイシンの感受性は TGase 過剰発現株では 4~8 倍上昇し耐性を示したが、*sgtB* 欠失株では逆に 4 倍低下し、*sgtA* 欠失株では変化がなかった。バンコマイシンの感受性は過剰発現株では 2 倍上昇し耐性を示したが、欠失株では共に変化がなかった。また *sgtB* 欠失株ではグリカン鎖長の減少による細胞壁の脆弱化を、架橋度の増加で補填している可能性を考え、架橋形成に関与する TPase に着目したが、全 PBP 蛋白の発現量は、違いが認められなかった。以上より、モエノマイシンおよびバンコマイシンの感受性に TGase は関与していたが、グリカン鎖長は TGase のみならず他の因子（すなわち溶菌酵素等）を含めて決定されていることが示され、モエノマイシンおよびバンコマイシンの感受性とグリカン鎖長には直接的な関連がない可能性も示唆された。モエノマイシンの感受性に関わる因子をさらに検討するために、Tn551 挿入モエノマイシン低感受性変異株を分離し、性状解析を行った。分離した変異株 4 株はバンコマイシンに 1.5~2 倍耐性化した。Tn551 挿入領域の遺伝子は、2 株は細胞膜成分であるリジルフオスファチジルグリセロール (LPG) の合成遺伝子である *fmtC* に、1 株はリジン合成系オペロンの最初の遺伝子である *lysC* に、残り 1 株は β -ラクタム剤の耐性に関与する遺伝子である *fmtB* であった。これらはモエノマイシンおよびバンコマイシン両薬剤の感受性に関わる新規の遺伝子であった。分離した変異株のうち *fmtC*, *lysC* 変異株は細胞膜の脂質成分 LPG 合成阻害が起こっていた。LPG は陽性荷電である

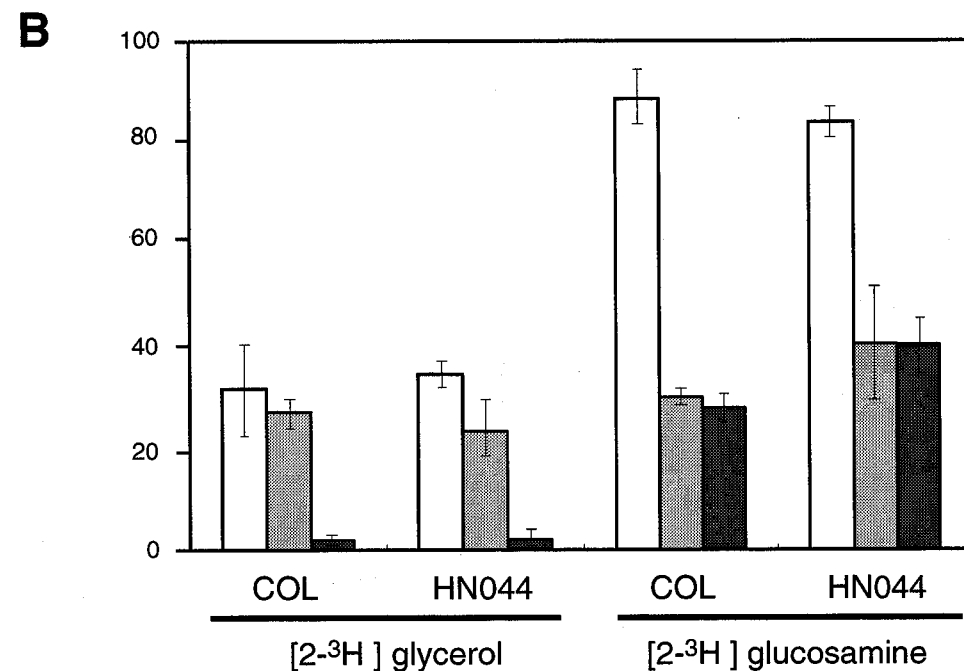
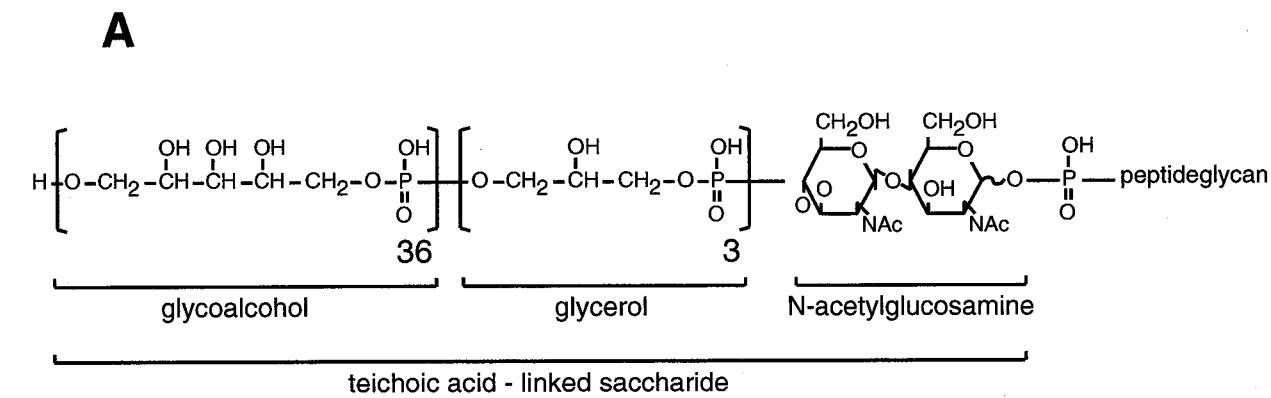


図 4-11 親株と Tn 挿入変異株のタイコ酸定量

(A) タイコ酸の構造、(B) グリセロールフリーの被検菌に RI を OD660nm = 0.3 で添加後、2 時間培養した菌体を 4% SDS に懸濁して 100℃ で 1 時間加熱処理を行った。上清を回収し、沈渣の一部を whole とした。残りに 40% フッ化水素を添加し、室温で一晩静置してタイコ酸を除いた。タイコ酸に結合した蛋白を含む上清と、タイコ酸以外を含む沈渣と、先に回収した細胞膜成分と被検菌体全ての RI 放射活性を計測した。□ 菌体に取り込まれた RI 量全体、▨ タイコ酸に取り込まれた RI 量、■ タイコ酸以外に取り込まれた RI 量を示す。

ため、LPGの減少により両変異株の陰性荷電がより強くなり、hBD3, CAP18の両抗菌ペプチドの感受性は、親株に共に増加した。荷電変化により、モエノマイシンおよびバンコマイシンと変異株の標的との親和性にも変化が起こり、両変異株は親株に比べ、共にモエノマイシンおよびバンコマイシンと生菌との結合量は増加した。変異株はLPG合成阻害により細胞膜の陰性荷電が強くなり、モエノマイシンおよびバンコマイシンは本来の標的以外の部位に捕そくされたため、これがモエノマイシンひいてはバンコマイシンの感受性に影響していることが示唆された。さらにバンコマイシンの感受性に関与する因子をさらに検討するために、細胞壁の肥厚を起こす因子とバンコマイシンの感受性とが関連する可能性を考え、Tn551挿入ライソスタフィン低感受性変異株を分離した。分離した2株はバンコマイシンには1.5~2倍上昇し耐性を示し、モエノマイシンのMICは1株は2倍耐性を示したが、残り1株は変化がなかった。これらのTn551挿入領域の遺伝子は、1株がタイコ酸合成系のオペロンの一つである β -グルコシルトランスフェラーゼをコードする遺伝子である*gtf*に、残り1株が細胞分裂開始に関与する因子*cdi*であった。これらはライソスタフィンの感受性に関わる新規の遺伝子であることが示された。これら変異株は親株に比べ若干細胞壁が肥厚していた。そこで細胞壁構造解析を行ったところ、*cdi*変異株は変化がなかったが、*gtf*変異株は変化しており、質量分析の結果、架橋構造を形成するグリシンの数に変化が起っていた。これらより*gtf*はグリシンを添加する遺伝子である*femA*, *femB*との関連が考えられた。しかし*gtf*変異株のタイコ酸に含まれるグリセロールとN-アセチルグルコサミンの放射活性を測定したところ親株と違いがなかった。*gtf*変異株のSDS加熱死菌体にはバンコマイシンは1.5倍結合し、ライソスタフィンとの結合能も違いが出たことに対し、*cdi*変異株ではバンコマイシンとライソスタフィン両結合能に変化がなかったことから、細胞壁の構造変化に起因してこれらの結合量に変化が起ったことが示唆された。

参考文献

1. Atrih A, Zollner P, et al. (1998). "Peptidoglycan structural dynamics during germination of *Bacillus subtilis* 168 endospores." *J Bacteriol.* **180**: 4603-12.
2. Baizman ER, Branstrom AA, et al. (2000). "Antibacterial activity of synthetic analogues based on the disaccharide structure of moenomycin, an inhibitor of bacterial transglycosylase." *Microbiology.* **146**: 3129-40.
3. Band L, Yansura DG, et al. (1983). "Construction of a vector for cloning promoters in *Bacillus subtilis*." *Gene.* **26**: 313-5.
4. Barna, J. C. J. and D. H. Williams (1984). "The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group." *Annu. Rev. Microbiol.* **38**: 339-357.
5. Berger-Bachi, B., L. Barberis-Maino, et al. (1989). "*FemA*, a host-mediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: Molecular cloning and characterization." *Molecular and general genetics* **219**: 263-269.
6. Bligh, E. G., and Dyer, W.J. (1959). "A rapid method of total lipid extraction and purification." *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911-917.
7. Bobin-Dubreux, S., M.-E. Reverdy, et al. (2001). "Clinical isolate of vancomycin-heterointermediate *Staphylococcus aureus* susceptible to methicillin and in vitro selection of a vancomycin-resistant derivative." *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**(1): 349-352.
8. Boger, D. (2001). "Vancomycin, teicoplanin, and ramoplanin: synthetic and mechanistic studies." *Med Res Rev.* **21**: 356-81.
9. Boyle-Vavra, S., H. Labischinski, et al. (2001). "A spectrum of changes occurs in peptidoglycan composition of glycopeptide-intermediate clinical *Staphylococcus aureus* isolates." *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**(1): 280-287.
10. Brunskill EW, de Jonge BL, et al. (1997). "The *Staphylococcus aureus scdA* gene: a novel locus that affects cell division and morphogenesis." *Microbiology.* **143**: 2877-82.
11. Bullock, W. O., J. M. Fernandez, et al. (1987). "XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA* *Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection." *BioTechniques* **5**: 376-379.
12. Chang S, Sievert DM, et al. (2003). "Infection with vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* containing the *vanA* resistance gene." *N Engl J Med.* **348**: 1342-7.
13. Chen L, Walker D, et al. (2003). "Vancomycin analogues active against *vanA*-resistant strains inhibit bacterial transglycosylase without binding substrate." *Proc Natl Acad Sci U S A.* **100**: 5658-63.
14. Chopra AK, Pham R, et al. (1994). "Cloning and expression of putative cytotoxic enterotoxin-encoding genes from *Aeromonas hydrophila*." *Gene.* **139**: 87-91.
15. Chung L, Kaloyanides G, et al. (1985). "Interaction of gentamicin and spermine with bilayer membranes containing negatively charged phospholipids." *Biochemistry.* **24**: 442-52.
16. Climo MW, Ehlert K, et al. (2001). "Mechanism and suppression of lysostaphin resistance in

- oxacillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother*. **45**: 1431-7.
17. Cui, L., H. Murakami, et al. (2000). "Contribution of a thickened cell wall and its glutamine nonamidated component to the vancomycin resistance expressed by *Staphylococcus aureus* Mu50." *Antimicrob Agents Chemother*. **44**(9): 2276-2285.
 18. Cui L, M. X., Sato K, Okuma K, Tenover FC, Mamizuka EM, Gemmell CG, Kim MN, Ploy MC, El-Solh N, Ferraz V, Hiramatsu K. (2003). "Cell wall thickening is a common feature of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*." *J Clin Microbiol*. **41**: 5-14.
 19. de Jonge BL, Chang YS, et al. (1992). "Peptidoglycan composition of a highly methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. The role of penicillin binding protein 2A." *J Biol Chem*. **267**: 11248-54.
 20. Di Guilmi AM, Mouz N, et al. (1998). "Identification, purification, and characterization of transpeptidase and glycosyltransferase domains of *Streptococcus pneumoniae* penicillin-binding protein 1a." *J Bacteriol*. **180**: 5652-9.
 21. Diamond, G., V. Kaiser, et al. (2000). "Transcriptional regulation of β -defensin gene expression in tracheal epithelial cells." *Infect Immun*. **68**: 113-119.
 22. Eggert US, Ruiz N, et al. (2001). "Genetic basis for activity differences between vancomycin and glycolipid derivatives of vancomycin." *Science* **294**: 361-4.
 23. Ehlert K, Holtje JV, et al. (1995). "Cloning and expression of a murein hydrolase lipoprotein from *Escherichia coli*." *Mol Microbiol*. **16**: 761-8.
 24. Ehlert K, Schroder W, et al. (1997). "Specificities of *FemA* and *FemB* for different glycine residues: *FemB* cannot substitute for *FemA* in staphylococcal peptidoglycan pentaglycine side chain formation." *J Bacteriol*. **179**: 7573-6.
 25. Fuqua WC and W. SC. (1994). "A *LuxR-LuxI* type regulatory system activates *Agrobacterium Ti* plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite." *J Bacteriol*. **176**: 2796-806.
 26. Ge M, Chen Z, et al. (1999). "Vancomycin derivatives that inhibit peptidoglycan biosynthesis without binding D-Ala-D-Ala." *Science* **284**: 507-11.
 27. Glauner, B. (1988). "Separation and quantification of muropeptides with high-performance liquid chromatography." *Anal Biochem*. **172**: 451-64.
 28. Goffin C and G. JM. (1998). "Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs." *Microbiol Mol Biol Rev*. **62**: 1079-93.
 29. Gross M, Cramton SE, et al. (2001). "Key role of teichoic acid net charge in *Staphylococcus aureus* colonization of artificial surfaces." *Infect Immun*. **69**: 3423-6.
 30. Haley, R. W., Hightower AW, et al. (1982). "The emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in United States hospitals. Possible role of the house staff-patient transfer circuit." *Ann Intern Med*. **97**: 297-308.
 31. Hanaki H, Kuwahara-Arai K, et al. (1998). "Activated cell-wall synthesis is associated with vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strains Mu3 and Mu50." *J Antimicrob Chemother*. **42**: 199-209.

32. Hanaki H, Labischinski H, et al. (1998). "Increase in glutamine-non-amidated muropeptides in the peptidoglycan of vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* strain Mu50." *J Antimicrob Chemother*. **42**: 315-20.
33. Harder, J., J. Bartels, et al. (2001). "Isolation and characterization of human β -defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic." *J Biol Chem*. **276**(8): 5707-5713.
34. Heijenoort, J. v. (2001). "Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan." *Glycobiology*. **11**: 25R-36R.
35. Henze UU and B.-B. B. (1995). "*Staphylococcus aureus* penicillin-binding protein 4 and intrinsic beta-lactam resistance." *Antimicrob Agents Chemother*. **39**: 2415-22.
36. Hiramatsu, K., N. Aritaka, et al. (1997). "Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin." *Lancet* **350**: 1670-1673.
37. Huber, G. and G. Neesemann (1968). "Moenomycin, an inhibitor of cell wall synthesis." *Biochem Biophys Res Commun*. **30**: 7-13.
38. Ishino F, Mitsui K, et al. (1980). "Dual enzyme activities of cell wall peptidoglycan synthesis, peptidoglycan transglycosylase and penicillin-sensitive transpeptidase, in purified preparations of *Escherichia coli* penicillin-binding protein 1A." *Biochem Biophys Res Commun* **97**: 287-93.
39. Jenni R and B.-B. B. (1998). "Teichoic acid content in different lineages of *Staphylococcus aureus* NCTC8325." *Arch Microbiol*. **170**: 171-8.
40. Kanemasa Y, Yoshioka T, et al. (1972). "Alteration of the phospholipid composition of *Staphylococcus aureus* cultured in medium containing NaCl." *Biochim Biophys Acta*. **280**: 444-50.
41. Kojima N, Araki Y, et al. (1985). "Structure of the linkage units between ribitol teichoic acids and peptidoglycan." *J Bacteriol*. **161**: 299-306.
42. Komatsuzawa H, Choi GH, et al. (1999). "Cloning and characterization of a gene, *pbpF*, encoding a new penicillin-binding protein, *PBP2B*, in *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother*. **43**: 1578-83.
43. Komatsuzawa H, Ohta K, et al. (2000). "Tn551-mediated insertional inactivation of the *fmtB* gene encoding a cell wall-associated protein abolishes methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*." *J Antimicrob Chemother*. **45**: 421-31.
44. Komatsuzawa, H., K. Ohta, et al. (2002). "Increased glycan chain length distribution and decreased susceptibility to moenomycin in a vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus* mutant." *Antimicrob Agents Chemother*. **46**: in press.
45. Komatsuzawa, H., M. Sugai, et al. (1995). "Triton X-100 alters the resistance level of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin." *FEMS Microbiology Letters* **134**: 209-212.
46. Komatsuzawa, H., J. Suzuki, et al. (1994). "The effect of Triton X-100 on the in-vitro susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to oxacillin." *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **34**: 885-897.
47. Koprivnjak T, Peschel A, et al. (2002). "Role of charge properties of bacterial envelope in bactericidal

- action of human group IIA phospholipase A2 against *Staphylococcus aureus*." *J Biol Chem*. 277: 47636-44.
48. Kornblum, J., B. J. Hartman, et al. (1986). "Conversion of a homogenously methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus* to heterogenous resistance by Tn551-mediated insertional inactivation." *European Journal of Clinical Microbiology* 5: 714-718.
 49. Kuroda M, Ohta T, et al. (2001). "Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Lancet*. 357: 1225-40.
 50. Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature (London)* 227: 680-685.
 51. Lim D and S. NC. (2002). "Structural basis for the beta lactam resistance of *PBP2a* from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *Nat Struct Biol*. 9: 870-6.
 52. Linnemann CC Jr, Mason M, et al. (1982). "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: experience in a general hospital over four years." *Am J Epidemiol*. 115: 941-50.
 53. Marchese, A., G. Balistreri, et al. (2000). "Heterogeneous vancomycin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated in a large Italian hospital." *J Clin Microbiol*. 38(2): 866-869.
 54. Matsushashi, M. and W. Park (1984). "*Staphylococcus aureus* and *Micrococcus luteus* peptidoglycan transglycosylases that are not penicillin-binding proteins." *J Bacteriol*. 157(2): 538-544.
 55. McPherson DC and P. DL. (2003). "Peptidoglycan synthesis in the absence of class A penicillin-binding proteins in *Bacillus subtilis*." *J Bacteriol*. 185: 1423-31.
 56. Melo Cristino JA, Pereira AT, et al. (1986). "Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: a 6-month survey in a Lisbon paediatric hospital." *J Hyg (Lond)* 97: 265-72.
 57. Miyake Y, Tsunoda T, et al. (1990). "Antifungal drugs affect adherence of *Candida albicans* to acrylic surfaces by changing the zeta-potential of fungal cells." *FEMS Microbiol Lett*. 57: 211-4.
 58. Mongodin E, Finan J, et al. (2003). "Microarray transcription analysis of clinical *Staphylococcus aureus* isolates resistant to vancomycin." *J Bacteriol*. 185: 4638-43.
 59. Moreira B, B.-V. S., deJonge BL, Daum RS. (1997). "Increased production of penicillin-binding protein 2, increased detection of other penicillin-binding proteins, and decreased coagulase activity associated with glycopeptide resistance in *Staphylococcus aureus*." *Antimicrob Agents Chemother*. 41: 1788-93.
 60. Ouyang S and L. CY. (1997). "Transcriptional analysis of type 1 capsule genes in *Staphylococcus aureus*." *Mol Microbiol*. 23: 473-82.
 61. Peschel, A. (2002). "How do bacteria resist human antimicrobial peptides?" *Trends Microbiol*. 10: 179-86.
 62. Peschel, A., R. W. Jack, et al. (2001). "*Staphylococcus aureus* resistance to human defensins and evasion of neutrophil killing via the novel virulence factor *mprF* is based on modification of membrane lipids with L-lysine." *J Exp Med*. 193: 1067-1076.
 63. Peschel, A., M. Otto, et al. (1999). "Inactivation of the *dlt* operon in *Staphylococcus aureus* confers sensitivity to defensins, protegrins, and other antimicrobial peptides." *J Biol Chem* 274: 4000-4004.
 64. Pinho MG, de Lencastre H, et al. (1998). "Transcriptional analysis of the *Staphylococcus aureus* penicillin binding protein 2 gene." *J Bacteriol*. 180: 6077-81.
 65. Pinho MG, de Lencastre H, et al. (2001). "An acquired and a native penicillin-binding proteins cooperate in building the cell wall of drug-resistant staphylococci." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 10886-91.
 66. Renolds, P. E. and C. Fuller (1986). "Methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus* possess an identical additional penicillin-binding protein in all strains examined." *FEMS Microbiol Lett*. 33: 251-254.
 67. Rogers HJ and F. CW. (1971). "Role of autolysins in the killing of bacteria by some bactericidal antibiotics." *J Bacteriol*. 108: 1235-43.
 68. Roos M, Pittenauer E, et al. (1998). "Improved high-performance liquid chromatographic separation of peptidoglycan isolated from various *Staphylococcus aureus* strains for mass spectrometry characterization." *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 705: 183-92.
 69. Ruzin A, Severin A, et al. (2003). "Inactivation of *mprF* affects vancomycin susceptibility in *Staphylococcus aureus*." *Biochim Biophys Acta*. 1621: 117-21.
 70. Schaaff F, Reipert A, et al. (2002). "An Elevated Mutation Frequency Favors Development of Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 46: 3540-3548.
 71. Schroder, J.-M. and J. Harder (1999). "Human beta-defensin-2." *Int J Biochem Cell Biol*. 31: 645-651.
 72. Shaw JH and C. DB. (1985). "Complete nucleotide sequence of macrolide-lincosamide-streptogramin B-resistance transposon Tn917 in *Streptococcus faecalis*." *J Bacteriol*. 164: 782-96.
 73. Sieradzki, K., R. B. Roberts, et al. (1999). "The development of vancomycin resistance in a patient with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection." *N. Engl. J. Med*. 340: 517-523.
 74. Sieradzki, K. and A. Tomasz (1997). "Inhibition of cell wall turnover and autolysis by vancomycin in a highly vancomycin-resistant mutant of *Staphylococcus aureus*." *J Bacteriol* 179(8): 2557-2566.
 75. Sieradzki, K. and A. Tomasz (1999). "Gradual alterations in cell wall structure and metabolism in vancomycin-resistant mutants of *Staphylococcus aureus*." *J Bacteriol*. 181(24): 7566-7570.
 76. Smith, P. K., R. I. Krohn, et al. (1985). "Measurement of protein bicinchoninic acid." *Analytical Biochemistry* 150: 76-85.
 77. Smith, T. L., M. L. Pearson, et al. (1999). "Emergence of vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*." *N. Engl. J. Med*. 340: 493-501.
 78. Stewart, P. R., H. G. Waldron, et al. (1985). "Molecular relationships among serogroup B bacteriophages of *Staphylococcus aureus*." *Journal of Virology* 55: 111-116.
 79. Strandén, A. M., K. Ehlert, et al. (1997). "Cell wall monoglycine cross-bridges and methicillin

- hypersusceptibility in a *femAB* null mutant of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*." *J. Bacteriol.* **179**: 9-16.
80. Sugai, M., T. Akiyama, et al. (1990). "Rapid purification method of lysostaphin for analysis of cell-wall proteins." *Journal of Microbiological Methods* **12**: 133-138.
 81. Sugai, M., H. Koike, et al. (1989). "Purification of a 51 kDa endo- β -*N*-acetylglucosaminidase from *Staphylococcus aureus*." *FEMS Microbiology Letters* **61**: 267-272.
 82. T.Ganz (1994). "Biosynthesis of defensins and other antimicrobial peptides." *Ciba Found. Symp.* **186**: 62-76.
 83. Ubukata, K., R. Nogorochi, et al. (1989). "Expression and inducibility in *Staphylococcus aureus* of the *mecA* gene which encodes a methicillin-resistant *S. aureus*-specific penicillin-binding protein." *J. Bacteriol.* **171**: 2882-2885.
 84. Valore, E. V., C. H. Park, et al. (1998). "Human β -defensin-1: an antimicrobial peptide of urogenital tissues." *J. Clin. Invest.* **101**(8): 1633-1642.
 85. Volke F, Waschipky R, et al. (1997). "Characterisation of antibiotic moenomycin A interaction with phospholipid model membranes." *Chem Phys Lipids.* **85**: 115-23.
 86. Vollmer W and H. JV. (2000). "A simple screen for murein transglycosylase inhibitors." *Antimicrob Agents Chemother.* **44**: 1181-5.
 87. Wada A and W. H. (1998). "Penicillin-binding protein 1 of *Staphylococcus aureus* is essential for growth." *J. Bacteriol.* **180**: 2759-65.
 88. Wang QM, Peery RB, et al. (2001). "Identification and characterization of a monofunctional glycosyltransferase from *Staphylococcus aureus*." *J. Bacteriol.* **183**: 4779-85.
 89. Wiltshire MD and F. SJ. (2001). "Identification and analysis of *Staphylococcus aureus* components expressed by a model system of growth in serum." *Infect Immun.* **69**: 5198-202.
 90. Wu TS, Skory CD, et al. (1996). "Cloning and functional analysis of a beta-tubulin gene from a benomyl resistant mutant of *Aspergillus parasiticus*." *Gene.* **182**: 7-12.
 91. Yang, D., O. Chertov, et al. (2001). "Participation of mammalian defensins and cathelicidins in antimicrobial immunity: receptors and activities of human defensins and cathelicidin (LL-37)." *J. Leuk. Biol.* **69**: 691-697.
 92. Zukowski, M. M., D. F. Gaffney, et al. (1983). "Chromogenic identification of genetic regulatory signals in *Bacillus subtilis* based on expression of a cloned *Pseudomonas* gene." *Proceeding National Academy Science USA* **80**: 1101-1105.