

# 論文内容要旨

Non-deacetylated poly-*N*-acetylglucosamine-hyperproducing *Staphylococcus aureus* undergoes immediate autoaggregation upon vortexing

(非脱アセチル化ポリ-N-アセチルグルコサミンを過剰生産する黄色ブドウ球菌は、高速旋回を伴う攪拌によりすぐに自己凝集を引き起こす)

Frontiers in Microbiology, 2022, in press.

主指導教員：菅井 基行 客員教授

(医系科学研究科 細菌学)

副指導教員：酒井 規雄 教授

(医系科学研究科 神経薬理学)

副指導教員：大毛 宏喜 教授

(医系科学研究科 感染症学)

杳野 祥子

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

研究背景および目的：

黄色ブドウ球菌は様々な感染症を引き起こすが、その中でもバイオフィーム感染症としてカテーテル血流感染症や骨髄炎、心内膜炎といったが挙げられる。バイオフィームとは、生成した細胞外高分子物質のマトリックスに細胞が埋め込まれ、互いまたは表面に付着した微生物群集のことである。黄色ブドウ球菌のバイオフィームは、多糖類であるポリ-Nアセチルグルコサミン (PNAG) が主成分である。PNAG を合成し、細胞外に分泌する主要な機構は *icaADBC* オペロン由来のタンパク質で構成されている。IcaB は PNAG を部分的に脱アセチル化することで正に帯電させ、負に帯電した細胞表面と相互作用することでバイオフィーム形成に寄与する。Yu らは以前、バイオフィームの新しい制御因子 (Rob) を報告し、Rob が *icaA-icaR* 間の遺伝子間領域に存在する固有の 5-bp モチーフ、TATTT に結合することを明らかにした (mBio 8:e02282-16, 2017)。5-bp モチーフの欠失は、過剰な付着性バイオフィームの形成を誘導するが、5-bp モチーフの真の機能はまだ不明である。5-bp モチーフ欠失変異体 ( $\Delta 5bp$ ) を作成する過程で、いくつか付着性バイオフィームを産生しない株 (非付着性変異体) を単離した。これらは、振とう培養で正常に増殖したが、高速旋回を伴う攪拌により自己凝集し、塊として沈降し、上清は透明化した。全ゲノム解析の結果、非付着性変異体は、5-bp モチーフの欠失に加え、*icaB* 遺伝子にも変異があることを見出し、この株を  $\Delta 5bpBm$  と名付けた。本研究では FK300 $\Delta 5bpBm$  の凝集メカニズムの解明を主な目的とした。

研究方法および成果：

FK300 を標準株 (WT) として、5-bp モチーフやバイオフィーム抑制因子 (*icaR*, *rob*) と *icaB* の二重欠損株を作成したところ、 $\Delta 5bp\Delta icaB$  では  $\Delta 5bpBm$  と同様の凝集現象が確認されたが、 $\Delta icaR\Delta icaB$  や  $\Delta rob\Delta icaB$  変異体では凝集現象は観察されなかった。real time PCR による *ica* オペロンの発現量比較の結果、 $\Delta 5bp$  における *ica* オペロンの発現量が、 $\Delta rob$  や  $\Delta icaR$  における発現量よりもはるかに高かったことから、今回観察された凝集現象には、多量の PNAG の産生が必要であることが示唆された。各バイオフィーム抑制因子の欠損による PNAG の産生量の差は、抗 PNAG 血清ドットプロットにて培養上清中の PNAG 生産量を調べた結果とも一致した。

次に凝集の原因物質の所在を明らかにするため、培養上清と菌体を入れ替えての培養攪拌実験と電子顕微鏡像の撮影を行った。WT、 $\Delta 5bp$ 、または  $\Delta 5bp\Delta icaB$  の各培養上清と菌体を入れ替えて再懸濁し、攪拌凝集実験を実施した結果、 $\Delta 5bp\Delta icaB$  の培養上清を用いたもののみで自己凝集が確認できた。透過型電子顕微鏡を用いて、自己凝集体の超微細構造を検討したところ、 $\Delta 5bpBm$  の周囲には、WT にはないひも状の物質が多数観察された。

凝集原因物質の成分を明らかにするため、培養上清中の凝集原因物質について解析を行った。まず  $\Delta 5bp\Delta icaB$  の培養上清から得られた自己凝集体の元素分析を行った結果、炭素、酸素、窒素の比率が PNAG と類似していることが示唆された。またこの凝集体の形成は、アセチルグルコサミンポリマーの  $\beta$ -1,6-グリコシド結合を特異的に加水分解する Dispersin B により阻害されることが明らかになった。このことは、FK300 $\Delta 5bp\Delta icaB$  の自己凝集にはアセチルグルコサミンポリマーが主要な因子であることを強く示唆した。次に、HPLC を用いて採取した WT と

$\Delta 5bp\Delta icaB$  上清の各分画で、アミノ糖の比色定量と抗 PNAG 血清ドットブロットを行った。 $\Delta 5bp\Delta icaB$  の加水分解サンプルにおいてのみアミノ糖の幅広いピークが確認され、 $\Delta 5bp\Delta icaB$  上清中にアミノ糖ポリマーが含まれていることが明らかになった。またこのピークは抗 PNAG 血清ドットブロットの強いシグナルが観察された  $\Delta 5bp\Delta icaB$  上清の HPLC 分画のピークと一致していた。最後に  $\Delta 5bp\Delta icaB$  の自己凝集に関与するポリマーが脱アセチル化されているかどうかを質量分析 (MS) を行うことで検討した。バイオフィーム産生株の表層にある PNAG を抽出し、比較対象とした。結果、バイオフィーム産生株から採取した PNAG では、*N*-アセチルグルコサミン分子に対応する一定間隔の MS シグナルの他に部分脱アセチル化ポリマーに対応するシグナルがいくつか観測された。一方、 $\Delta 5bp\Delta icaB$  の培養上清から回収したポリマーは、*N*-アセチルグルコサミンに対応するシグナルは示したが、脱アセチル化断片に対応するシグナルは認められなかった。この結果は、FK300 $\Delta 5bp\Delta icaB$  の上清中の非脱アセチル化 PNAG が凝集の原因物質であることを明確に示した。

結論：

PNAG を大量に生産するが *IcaB* 機能を欠く株が、高速旋回を伴う攪拌処理により培養上清中に分泌された非脱アセチル化 PNAG による自己凝集を起こし、塊を形成することを明らかにした。バイオフィーム形成株では PNAG が脱アセチル化されることで陽性電荷が生じて菌体表面に留まるが、*IcaB* の機能不全になると、PNAG は脱アセチル化されず、菌体表面に定着できず、固着性バイオフィームが形成されなかったと推察された。この凝集現象は、黄色ブドウ球菌が菌体に付着しないバイオフィームを形成する可能性を示唆しており、黄色ブドウ球菌の非付着性バイオフィーム形成のメカニズムとして提案する。