

# 論文内容要旨

Different CprABC amino acid sequences affect nisin A susceptibility in *Clostridioides difficile* isolates

(*Clostridioides difficile* 分離株のナイシン A 感受性に影響を及ぼす CprABC のアミノ酸配列の違いについて)

PLoS One, 2023 ,18(1):e0280676.

主指導教員：河口 浩之教授

(広島大学病院 歯科医学教育学)

副指導教員：小松澤 均教授

(医系科学研究科 細菌学)

副指導教員：太田 耕司教授

(医系科学研究科 公衆口腔保健学)

井手 規暁

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

## 【目的】

*Crostridioides difficile* は腸内細菌の一つであり、抗菌薬関連下痢症を惹起することで知られている。治療薬としてメトロニダゾールやバンコマイシンが用いられるが、耐性菌の出現が臨床的に確認されている。そのため、代替抗菌薬の開発が求められている。乳酸菌が生産するカチオン性抗菌性ペプチド（バクテリオシン）である Nisin A は、*C. difficile* に対して抗菌力を有することが報告されているが、詳細は明らかではない。そこで本研究では、*C. difficile* 11 株の Nisin A に対する感受性を評価し、Nisin A 感受性に影響を及ぼす因子の解明を検討することとした。

## 【方法】

### 1. 細菌株と培地

本研究で使用した *C. difficile* (CD) は 標準株 2 株および臨床分離株 9 株を使用した。CD 株は brain heart infusion (BHI) broth を用い、嫌気培養を行った。種々のバクテリオシン産生株である *Lactococcus lactis* (Nisin A, Lacticin Q)、*Staphylococcus epidermidis* (Epidermin)、*Streptococcus mutans* (Mutacin I, III, IIIb) および *Enterococcus mundtii* (Mundticin KS) は trypticase soy broth を用いて好気培養を行った。

### 2. 抗菌性物質感受性試験

Nisin A および各種抗菌薬の感受性の評価には微量液体希釈法による MIC 値の測定と、バクテリオシン産生菌を用いた抗菌活性評価（ダイレクト法）を用いた。

### 3. Nisin A 耐性遺伝子解析

Nisin A 耐性に関連することが報告されている Nisin A 排出に関与する *cprA-C* および細菌表層の電荷に影響を及ぼす *dltA-D* について、Nisin A 添加・非添加時の *cprA* および *dltD* の発現を、定量性 PCR 法により検証した。

### 4. 細菌表層電荷の測定

細胞表層の電荷を評価するために、陽性に帯電している Cytochrome c を用いた細菌への結合試験を行った。

### 5. 芽胞の発芽時における Nisin A の影響

Nisin A (32 または 512  $\mu\text{g/ml}$ ) の存在下または非存在下で 0.1% taurocholate (発芽誘導物質) を添加した BHI broth に芽胞 ( $10^5$  spores) を添加し、嫌氣的に 37°C で 30 分間反応後、0.1% taurocholate を含む BHI 寒天培地に播種・培養後、コロニー数を計測した。

### 6. *C. difficile* 分離株のゲノム解析

CD 11 株の全ゲノム配列は MiSeq システム (Illumina 社) を用いて決定した。得られたゲノムデータを用いて、系統樹解析を行った。また、CprABC のアミノ酸配列比較を得られたゲノムデータおよび既に公開されているゲノムデータ (50 株) を用いて解析を行った。

## 【結果と考察】

Nisin A 感受性試験の結果、CD 11 株において、ナイシン A 感受性が高い株 (5 株) と低い株 (6 株) の 2 つのグループに分かれ、この 2 つのグループは全ゲノム配列による

系統樹解析でも同様に分かれた。また、Nisin A と相同性を認める Epidermin, Mutacin I、III b および III も感受性が Nisin A と同様に 2 つのグループに分かれる傾向を示したが、その他のバクテリオシンは傾向を示さなかった。Nisin A 添加による *cprA* 発現は 2 つのグループで差はなく、同様に発現誘導が認められた。*dltD* 発現は Nisin A 添加による誘導は認められず、発現量は 2 つのグループで差は認めなかった。また、抗菌薬の感受性については、2 つグループにおいて感受性に有意差を認めなかった。Cytochrome c 結合試験の結果、結合親和性と Nisin A 感受性の間に関連性は認められなかった。次に CprABC のアミノ酸配列を各株間で比較した結果、2 つのグループで共通の違いが認められた。さらに、芽胞の発芽時における Nisin A の効果を検討した結果、感受性には 2 つのグループで差が認められた。

以上の結果から、Nisin A は CD 菌株に抗菌力を発揮するが、その感受性は 2 つに分かれ、その原因として CprABC のアミノ酸構造が関与している可能性が示唆された。この CprABC の耐性は Nisin A と構造が相似するバクテリオシンの耐性に関与することが明らかになった。