

ブドウ球菌毒素エンテロトキシン A の遺伝子伝播メカニズムの解明

島村 裕子

静岡県立大学 食品栄養科学部

研究の目的

黄色ブドウ球菌は、エンテロトキシン A (SEA) を産生して食中毒を引き起こすだけでなく、人獣共通感染症を引き起こし、その毒素遺伝子は、バクテリオファージにより伝播される。黄色ブドウ球菌が起因する食中毒および感染症を阻止するためには、ファージによる SEA 遺伝子の伝播を抑制することが有効であると考えられる。我々は、これまでに SEA 産生株が非産生株のコロニーと接触した際に、SEA 産生株 (No.29 株) が溶菌し、非 SEA 産生株 (No.77 株) に SEA 遺伝子が伝播することを明らかにしている (図 1)。しかし、ファージ (溶菌) を誘発する因子およびファージの宿主菌への吸着メカニズムについては明らかになっていない。そこで、本研究では、SEA 産生株の溶菌に影響を及ぼす因子および SEA 遺伝子伝播のメカニズムの解明を目的とした。

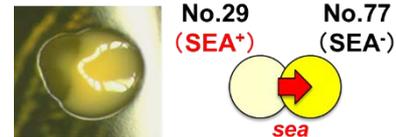


図 1: No.29 株の溶菌

方法

供試菌株として、*Staphylococcus aureus* No.29 (SEA⁺; No.29 株) および *S. aureus* No.77 (SEA⁻; No.77 株) を用いた。SEA 遺伝子の伝播に影響する条件 (培養液の増殖状態、培養温度、培地成分、MgCl₂ 添加、NaCl 濃度および pH) について調べた。また、No.29 株と No.77 株を別府フラスコ内で共培養した際の No.29 株の菌体について、LC-MS/MS を用いたメタボローム解析を行った。さらに、次世代シーケンサーを用いて、既知の黄色ブドウ球菌 (*S. aureus* NCTC8325; accession number NC_007795) の参照ゲノム塩基配列をもとに¹⁾、No.29 株、No.77 株および No.77-L22 株 (No.29 株の SEA 遺伝子が形質導入された No.77 株) の SEA 遺伝子のゲノムリシーケンシングを行い、変異 (一塩基多形: SNP) 解析および SEA 遺伝子の挿入位置解析を行った。

結果

No.29 株の溶菌コロニー形成を促進する因子について検討した結果、シード培養は 6 時間、培養温度は 37°C が最適であった。また、培地の塩分濃度および pH は高い場合に溶菌しやすくなり、MgCl₂ の添加では溶菌コロニーの形成が抑制された。これらの結果より、溶菌コロニー形成は、菌自体の生育に適した環境下で起こりやすいことが示唆された。

No.29 株と No.77 株を別府フラスコで 10 時間 (溶菌誘発時) 共培養した際の No.29 株の菌体内代謝物を解析した結果、No.29 株単独培養時と比較して菌体内代謝物の産

生量に差が認められた (図 2)。主成分分析の結果、No.29 株と No.77 株を共培養した際の No.29 株で flavin adenine dinucleotide (FAD) が有意に減少した。一方、No.29 株と No.77 株を共培養した際の No.29 株で *N*-acetylglucosamine 6-phosphate (GlcNAc-6-P) および phosphatidylglycerol (PG) が有意に増加した (図 3)。黄色ブドウ球菌の細胞壁の構成成分である *N*-acetylmuramic acid (MurNAc) については、No.29 株を単独培養した際と No.29 株と No.77 株を共培養した際の No.29 株において、含有量に差が認められなかった (data not shown)。これらのことから、No.77 株との共培養により、No.29 株の自己溶菌酵素が活性化されていることが示唆された。

参照ゲノム配列に対するマッピングにより、No.29 株、No.77 株および No.77-L22 株 (No.77 株に No.29 株の SEA 遺伝子が伝播した株) の一塩基多型 (single nucleotide polymorphism; SNP) 解析を行ったところ、No.29 株と No.77 株で SNP の分布パターンは異なっており、No.29 株由来の SEA フェージが No.77 株に導入されたことにより、1,103 個の SNP が追加されたことが明らかになった。また、No.77-L22 株の SEA 遺伝子の挿入位置は、2,037,774 塩基から 2,038,315 塩基の間であった。

結論

本研究では、SEA 産生株 (No.29 株) の溶菌および SEA 遺伝子伝播の詳細な作用機序の解明を目的に研究を行った。その結果、溶菌コロニー形成は、菌自体の生育に適した環境下で起こりやすいこと、SEA 非産生株 (No.77 株) との透析共培養により、No.29 株の自己溶菌酵素が活性化されていることが示唆された。ゲノム配列が既知の参照配列に対して、No.29 株、No.77 株および No.77-L22 株のリシーケンシングを行い、現在、No.77-L22 株の SEA 遺伝子を保有するフェージカセットの挿入位置推定解析を行っており、今後、SEA 遺伝子伝播に関わる遺伝子群を同定する予定である。本研究の成果により、SEA 遺伝子伝播に関わる遺伝子群を同定し、SEA 遺伝子伝播機序を明らかにすることで、細菌の進化のメカニズムの解明および毒素型食中毒の有効な予防・治療法の開発が期待される。

文献

- 1) Bæk, K. T., Frees, D., Renzoni, A., Barras, C., Rodriguez, N., Manzano, C., and Kelley, W. L. (2013). Genetic variation in the *Staphylococcus aureus* 8325 strain lineage revealed by whole-genome sequencing. *PLoS One*, **8(9)**: e77122.

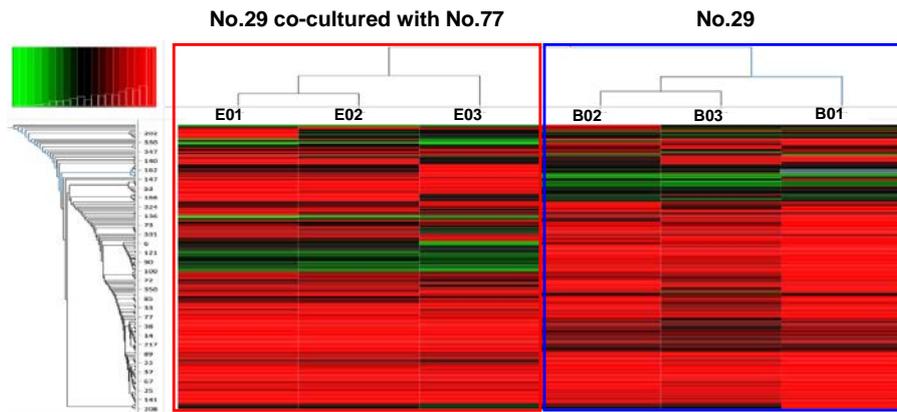


図 2: 透析共培養時の No.29 株の菌体内代謝物のクラスタリング解析およびヒートマップ表示

横軸はサンプル、縦軸はピークを示す。ヒートマップは、サンプル間およびピーク間の距離を示しており、緑色に行くほど平均値よりも小さいことを示し、赤色に行くほど平均値よりも大きいことを示す。E01-E03: No.77 株と透析共培養した際の No.29 株の菌体内代謝物、B01-03: No.29 株単独培養時の菌体内代謝物。

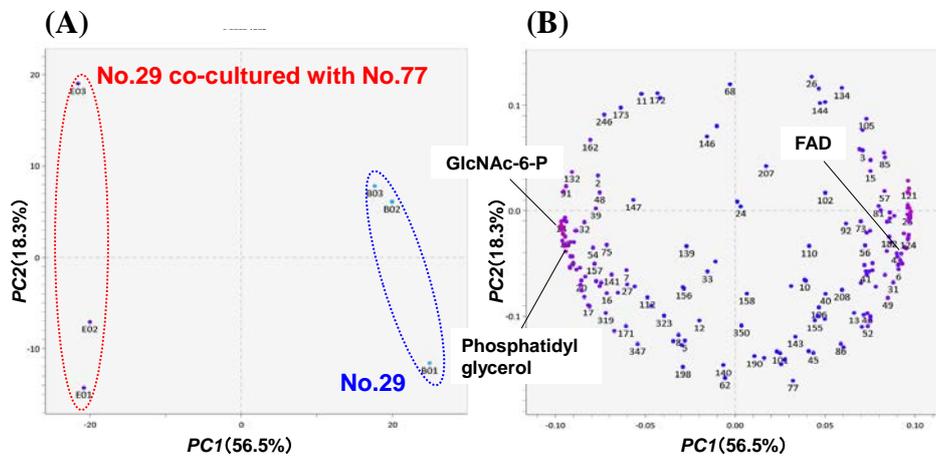


図 3: 透析共培養時の No.29 株の菌体内代謝物における (A) スコアプロット、(B) ローディングプロット

(A) E01-E03: No.77 株と透析共培養した際の No.29 株の菌体内代謝物、B01-03: No.29 株単独培養時の菌体内代謝物。