

厚生労働科学研究費補助金  
(難治性疾患等克服研究事業(難治性疾患等実用化研究事業  
(免疫アレルギー疾患等実用化研究事業 免疫アレルギー疾患実用化研究分野)))  
分担研究報告書

## アトピー由来黄色ブドウ球菌の皮膚定着能に関する研究

研究分担者 菅井 基行 広島大学大学院医歯薬保健学研究院 教授

### 研究要旨

私どもは、アトピー性皮膚炎(AD)の増悪化に起因する黄色ブドウ球菌感染の意義を明らかにするために、これまでに種々の臨床検体から分離された菌株の皮膚付着性及び固着性の比較解析から、AD由来株はFLG-KO新生児マウス皮膚に持続的に定着することを明らかにしてきた。CGH系統解析から抽出した臨床分離株のゲノムドラフトシーケンスを取得し、比較解析を行った結果、AD株に特徴的な遺伝子を抽出した。その中で特徴的な病原因子候補として、エンテロトキシンと相溶性が高い遺伝子に着目し、組換え体をヘアレスFKO成獣マウスに腹腔内投与したところ、全身の血管拡張および体毛の脱毛が観察された。黄色ブドウ球菌臨床分離株の遺伝子改変はしばしば困難が伴う。当該のAD由来株の病原因子候補遺伝子の解析や皮膚への菌の固着性を詳細に解析する為に、遺伝子改変実験が必須だが、AD由来株は従来法の遺伝子改変が不可能であった。今回、私どもは新たなゲノム編集技術CRISPR/Cas9システムを導入し、本菌で利用可能な遺伝子改変用プラスミドの作成を試みた。

### 研究協力者

久恒 順三 広島大学大学院  
医歯薬保健学研究院細菌学  
助教  
佐藤 祐介 広島大学大学院  
医歯薬保健学研究科 研究員  
新津 佳恵 広島大学大学院  
医歯薬保健学研究科 大学院生

球菌感染の役割を明らかにすることである。これまでに種々の臨床検体から分離された菌株の皮膚付着性及び固着性の比較解析から、AD由来株はFLG-KO新生児マウス皮膚に持続的に定着することを明らかにしてきた。並行して、様々な疾患から由来株の比較ゲノム解析から、AD株に特徴的な病原因子の候補となりうる遺伝子を解析している。AD株の病原因子候補遺伝子や、ヘアレスFKOマウス皮膚への菌定着性に寄与する責任因子を解析する為に、遺伝子欠損株の作製は必要不可欠である。しかしながら、臨床分離されたAD由来株は常法の相同組換えに用いるプラスミドが使用不可であった。そこで私どもは新たなゲノム編集技術CRISPR/Cas9システムを導入し、黄色ブドウ球菌で利用可能なプラスミドを作製した。

### A. 研究目的

黄色ブドウ球菌はヒトと共生する病原細菌の代表であり、極めて多様な病原性を示すことで知られている。皮膚は黄色ブドウ球菌のレザバーとされているが、健康人皮膚からの黄色ブドウ球菌検出率は極めて低い。一方、アトピー性皮膚炎(atopic dermatitis, AD)患者患部皮膚の大多数から黄色ブドウ球菌が検出される。しかしながら、ADの発症・増悪化における本菌感染の位置付けは不確定である。本研究の最終目標はADの病態形成における黄色ブドウ

### B. 研究方法

比較ゲノム解析によるAD株のゲノム特徴  
日本全国から収集した種々の疾患由来

臨床分離株ライブラリ株のアレイによる CGH 系統解析から、各クラスター選抜株を イルミナシステムによりゲノム配列を取得し、インシリコバイオロジー社の IMC ソフトにて比較解析を行った。

#### S. aureus 用 CRISPR/Cas9 plasmid の作製

大腸菌-黄色ブドウ球菌シャトルベクター pKAT の MCS に、Addgene 社の pCas9 の Cas9 遺伝子、tracerRNA 及び guideRNA 挿入領域を組み込んで作製した。黄色ブドウ球菌の遺伝子改変するターゲット遺伝子として、バイオフィーム形成に関わる *ica* オペロン内の *icaA* に対して guideRNA 配列を設計し、最終的にシーケンスにより変異を確認した。

### C . 研究結果

これまでに様々な疾患由来株の CGH 系統解析から、疾患別ごとのそれぞれのクラスターから選抜 43 株のドラフトゲノム配列と、このうち AD 株を含む 6 株の完全ゲノム配列を取得し、比較ゲノム解析に用いた。解析の結果、AD 株に特徴的な病原因子候補の一つに、エンテロトキシンと相同性が高い遺伝子が見つかった。この遺伝子の機能を調べる為に、大腸菌にて組換え体を作製した。ヘアレス FK0 成獣マウスに腹腔内投与したところ、全身の血管拡張および体毛の脱毛が観察された。今後、この遺伝子産物の AD 病態形成への関わりを検討する必要がある、そのためには遺伝子改変が必要となる。従来、臨床分離株はしばしば遺伝子改変が困難であることが知られ、AD 由来株も従来法による遺伝子改変が不可能であることがわかった。

そこで、新たな遺伝子改変法の確立を目指して、作製した黄色ブドウ球菌用 CRISPR/Cas9 プラスミドを検証した結果、黄色ブドウ球菌では非相同性末端修復系を欠く為に、修復による変異導入効率が極端に低いことが判明した。並行して、mRNA をターゲットに発現を抑制する CRISPRi 用プラスミドを作製し、検証したところ、効率良く目的タンパクの発現をオフにすることがわかった。続いて、AD 由来株でゲノム編集が可能であるのかを確認する実験を行った。バイオフィーム形成は、菌の

消毒剤や抗菌薬への抵抗性増強や、菌の付着・定着性に関わるよく知られた構造体である。本菌のバイオフィームは、成分の一つに多糖類であるポリサッカライド PIA があり、合成に関わる *ica* オペロンが染色体上にコードされている。AD 株のヘアレス FK0 の皮膚定着にバイオフィーム形成の *ica* 遺伝子が機能しているのかを解析する為に、ターゲット遺伝子として遺伝子改変を試みた。そこで、*icaA* 遺伝子内の 3 箇所に guide RNA が結合する候補箇所を選択し、変異導入の確認をシーケンスにて確認したところ、変異導入効率は極めて低いながらも、AD 由来株 TF3378 で *ica* 変異株が作製できた。今後の予定として、ヘアレス FK0 マウスを用いて皮膚感染実験にて、菌の定着性の解析を行う予定である。

### D . 考察

ヘアレス FK0 マウスの血管拡張や脱毛反応が観察されたエンテロトキシン様因子について、一般的に黄色ブドウ球菌の多くのエンテロトキシンはスーパー抗原活性により、種々のサイトカイン遊離を惹起する。この新規エンテロトキシン様因子も免疫応答の惹起による生体反応を引き起こしていることが考えられた。

一方、AD 由来株で CRISPR/Cas9 及び CRISPRi による欠損株の作製が可能であることが確認できた。変異導入効率を向上させるために、プラスミドの大きさのコンパクト化、遺伝子導入に用いる機材（エレクトロポレーション）の特性、コンピテントセルの調製方法によって大きく影響することがわかってきた。

### E . 結論

AD 由来株の遺伝子改変が可能となり、皮膚定着性解析の菌側因子の詳細な解析が可能となった。また、AD 株の新規エンテロトキシンの生物活性について、今後より詳細な解析が必要である。今回の結果は Atopy 性皮膚炎患者から分離される黄色ブドウ球菌の病理学的意義を明らかにする糸口になる可能性があると考えられる。

## F . 健康危険情報

なし

## G . 研究発表 (平成 26 年度)

### < 論文発表 >

1. Harada-Hada K, Harada K, Kato F, Hisatsune J, Tanida I, Ogawa M, Asano S, Sugai M, Hirata M, Kanematsu T: Phospholipase C-related catalytically inactive protein participates in the autophagic elimination of *Staphylococcus aureus* infecting mouse embryonic fibroblasts. **PLoS One**, 9 (5), e98285, 2014.
2. Sato'o Y, Omoe K, Naito I, Ono HK, Nakane A, Sugai M, Yamagishi N, Hu DL: Molecular epidemiology and identification of a *Staphylococcus aureus* clone causing food poisoning outbreaks in Japan. **J Clin Microbiol**, 52 (7), 2637-2640, 2014.
3. Horimukai K, Morita K, Narita M, Kondo M, Kitazawa H, Nozaki M, Shigematsu Y, Yoshida K, Niizeki H, Motomura K, Sago H, Takimoto T, Inoue E, Kamemura N, Kido H, Hisatsune J, Sugai M, Murota H, Katayama I, Sasaki T, Amagai M, Morita H, Matsuda A, Matsumoto K, Saito H, Ohya Y: Application of moisturizer to neonates prevents development of atopic dermatitis. **J Allergy Clin Immunol** 134 (4), 824-830. e826, 2014.
4. Hagiya H, Hisatsune J, Kojima T, Shiota S, Naito H, Hagioka S, Morimoto N, Otsuka F, Sugai M: Comprehensive analysis of systemically disseminated ST8/non-USA300 type community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infection. **Intern Med**, 53 (8), 907-912, 2014.
5. Kayama S, Shigemoto N, Shimizu W, Kuwahara R, Ikeda M, Ikebe K, Maeda K, Hisatsune J, Ohge H, Sugai M: Tripoli metallo-beta-lactamase-1 (TMB-1)-producing *Acinetobacter* spp. with decreased resistance to imipenem in Japan. **Antimicrob Agents Chemother**, 58 (4), 2477-2478, 2014.
6. Kayama S, Koba Y, Shigemoto N, Kuwahara R, Kakuhamata T, Kimura K, Hisatsune J, Onodera M, Yokozaki M, Ohge H, Sugai M: Imipenem-Susceptible, Meropenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae* Producing OXA-181 in Japan. **Antimicrob Agents Chemother**, 59 (2), 1379-1380, 2015.
7. Kayama S, Shigemoto N, Kuwahara R, Oshima K, Hirakawa H, Hisatsune J, Jove T, Nishio H, Yamasaki K, Wada Y, Ueshimo T, Miura T, Sueda T, Onodera M, Yokozaki M, Hattori M, Ohge H, Sugai M: Complete Nucleotide

Sequence of the IncN Plasmid Encoding IMP-6 and CTX-M-2 from Emerging Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in Japan. **Antimicrob Agents Chemother**, 59 (2), 1356-1359, 2015.

### < 学会発表 >

1. Hisatsune J, Murakami T, Tatsukawa N, Hayashi I, Sugai M: Skip, a cell wall protein of *S. aureus* for biphasic skin adhesion strategies. **16th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections (ISSSI)**, Chicago, USA, 2014. 8. 26- 29.
2. Tatsukawa N, Hisatsune J, Hayashi I, Sugai M: Regulatory mechanism of cell wall protein Skip in *S. aureus*. **16th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections (ISSSI)**, Chicago, USA, 2014. 8. 26-29.
3. 久恒順三, 平川英樹, 伊從慶太, 西藤公司, 大島健志朗, 服部正平, 菅井基行: 犬膿皮症由来*S. pseudintermedius*表皮剥脱毒素 ExpB産生株のゲノム解析. **第59回日本ブドウ球菌研究会**, 東京, 2014. 8. 4.

## H . 知的所有権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし