

## 論 文 要 旨

**Expression of virulence factors in *Staphylococcus aureus* grown in serum**

血清中における黄色ブドウ球菌の病原性因子  
発現性解析

大 貝 悠 一

**【序論および目的】**

黄色ブドウ球菌は化膿性疾患、食中毒、肺炎、毒素性ショック症候群などを引き起こす病原性細菌である。黄色ブドウ球菌は溶血毒素や白血球殺滅毒素、腸管毒素、表皮剥奪毒素といった様々な毒素やプロテアーゼやリパーゼ、コアグララーゼなどの菌体外産生性酵素、宿主免疫力に対する抵抗性を示す表層因子など多種多様な病原性因子を保有することが報告されている。これまでに、黄色ブドウ球菌の病原性因子発現性解析は数多く行われてきているが、それらの多くは細菌用培地中で行われた解析である。しかしながら、黄色ブドウ球菌が宿主に感染した際の環境(生体中)と培地では成分が大きく異なることから、病原性因子の発現性も生体中と培地中では異なると考えられる。そこで、本研究では生体中成分の一つである血清を用いて、病原性因子の発現性を解析した。

**【材料および方法】**

黄色ブドウ球菌MW2株を子牛血清(CS)及び細菌用培地Tryptic soy broth (TSB)で培養し、代表的な病原性因子 27 遺伝子の発現量を定量性PCRにより解析した。一部の病原性因子においてはヒト及びウサギ血清による解析も行った。血清タンパクの黄色ブドウ球菌の病原性因子発現性への影響を解析するため、限外濾過膜を用い、50 kDa以上の分子を含まないCS、3 kDa以上の分子を含まないCS、ペプチド及び脂質を含まないCS画分を作成し、病原性因子の発現性を解析した。黄色ブドウ球菌の病原性因子の発現性に及ぼす鉄の影響を解析するため、FeCl<sub>3</sub>を添加したCS及び鉄非添加の合成培地(CDM)を用い病原性因子の発現性を解析した。CSからアフィニティークロマトグラフィーにより高純度のアルブミンを精製し、アルブミンを 20 mg/ml含むCDMを作成し、病原性因子の発現性を解析した。一部の解析は、黄色ブドウ球菌の二成分制御系因子である*agrC*の欠損株を用いて行った。

**【結 果】**

黄色ブドウ球菌 MW2 株の CS 培養により、病原性因子 27 遺伝子のうち 21 遺伝子の発現量が TSB 培養と比べ有意な増加を示した。特に溶血毒素(*hlgA*)や白血球殺滅毒素(*lukD*, *psmβ1*)、腸管毒素(*sec4*)、プロテアーゼ(*splA*)、菌体表層因子 (*capG*, *icaA*, *clfA*)の発現量は TSB 培養と比べ 10 倍以上の増加を示した。黄色ブドウ球菌の病原性因子調節因子として機能する small RNA である RNAIII (*hld*)は 100 倍近い発現量増加を認めた。また、多くの鉄獲得性因子(*sirA*, *sbnF*, *isdD*)が 30 倍程度の発現量増加を認めた。これらの現象はヒト及びウサギ血清を用いた解析においても同様の結果が得られた。

黄色ブドウ球菌の病原性因子発現量増加に影響を及ぼす血清中因子の同定を行うため、50 kDa 以上の分子を除去した CS 画分、3 kDa 以上の分子を除去した CS 画分、ペプチド及び脂質を除去した CS 画分を作成し、培養実験を行った結果、病原性因子(RNAIII)の発現量はどの画分においても依然 CS 培

養と同様に TSB 培養より高い発現量を示した。

FeCl<sub>3</sub>を 300 μM 添加した CS を用いて病原性因子発現解析を行った結果、CS 培養において TSB 培養と比べ有意に発現量増加を示す 21 遺伝子のうち、19 遺伝子の発現量が未添加のものと同様に有意に減少した。しかしながら、3 μM の FeCl<sub>3</sub> 添加では、病原性因子の発現量減少は認められなかった。

黄色ブドウ球菌の CDM 培養は病原性因子 27 遺伝子のうち 22 遺伝子の発現量が TSB 培養と比べ有意な増加を示した。また、3 μM の FeCl<sub>3</sub> を添加した CDM 培養は、TSB 培養と比べ有意に発現量増加を示す 22 遺伝子のうち、20 遺伝子の発現量が未添加のものと同様に有意に減少した。

50 kDa 以下の分子を除去した CS 画分培養の場合、CDM と同様に 3 μM の FeCl<sub>3</sub> の添加により、病原性因子の発現量減少を示した。

CS より精製したアルブミンを血清中の濃度の半量(20mg/ml)添加した CDM を用い、3 μM の FeCl<sub>3</sub> を添加した際の RNAIII の発現量を解析した結果、3 μM の FeCl<sub>3</sub> 添加による発現抑制の阻害が認められた。

黄色ブドウ球菌の二成分制御系因子の一つである *agrC* は、CS 及び CDM 培養により TSB 培養と比べ、発現量の増加を示した。他の二成分制御系因子の発現量に大きな変動は見られなかった。*agrC* 欠損株を用いた解析より、RNAIII, *psm*, *sec4* の CS 及び CDM 培養による発現量増加は抑制された。

### 【結論及び考察】

本研究により、黄色ブドウ球菌 MW2 株は血清培養により、数多くの病原性因子及び鉄獲得性因子の発現量を増加させることが明らかとなった。黄色ブドウ球菌はタンパク成分や脂質を除去した CS で培養した場合でも、依然として高い病原性因子の発現性を示したことから、血清中の病原性因子発現促進因子は血清タンパクや脂質ではない可能性が示唆された。

血清中には遊離状態の鉄が極めて少ない(10<sup>-24</sup> M)ことに着目し、FeCl<sub>3</sub>を 300 μM 添加した CS による黄色ブドウ球菌の培養実験を行った結果、病原性因子の発現量が減少した。また、黄色ブドウ球菌の CDM 培養は CS 培養と似た遺伝子発現パターンを示した。これらの結果より、血清培養による黄色ブドウ球菌の病原性因子の発現量増加は、血清中の鉄欠乏が主要因であることが示唆された。

CDM 培養は 3 μM の FeCl<sub>3</sub> 添加により病原性因子の発現抑制を示すが、CS 培養の場合、3 μM の FeCl<sub>3</sub> 添加は発現抑制を引き起こさなかった。血清中に最も高濃度に存在するアルブミンは、鉄との結合能が報告されている。アルブミンを含む 50 kDa 以上の分子を除去した CS 画分による培養は、3 μM の FeCl<sub>3</sub> 添加により病原性因子の発現抑制を示した。また、アルブミンを含有する CDM 培養は、3 μM の FeCl<sub>3</sub> 添加による病原性因子の発現抑制を阻害した。これらの結果より、アルブミンが黄色ブドウ球菌の血清中における鉄獲得を阻害する可能性が示唆された。

二成分制御系因子は外環境の変化にตอบสนองし、様々な遺伝子の発現制御を行う因子である。黄色ブドウ球菌の二成分制御系因子の一つである AgrAC は、病原性因子の主要なレギュレーターであることが報告されている。*agrC* は血清培養で発現量の増加を示し、*agrC* 欠損株は一部の病原性因子の血清培養による発現量増加を示さないことから、黄色ブドウ球菌の血清中における病原性因子発現調節の一部に AgrAC が関与することが示唆された。

以上の結果により、黄色ブドウ球菌は血中において増殖に必要な鉄を獲得するために、溶血毒素や白血球殺滅毒素などの細胞溶解因子と鉄獲得性因子の産生量を増加させることにより、宿主細胞から鉄を獲得することが示唆された。一方宿主側は、血中に溶出した鉄をアルブミンと結合させることにより、細菌の鉄獲得を防いでいることが示唆された。