ブドウ球菌属のゲノム解析とゲノムから見える 薬剤耐性・病原因子の解析

黒 田 誠

筑波大学大学院・人間総合科学研究科 社会環境医学専攻・感染生物学（微生物）
〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

腐性ブドウ球菌 *Staphylococcus saprophyticus* は、ブドウ球菌属の中でも急性膀胱炎を起こし女性の外来患者から主に分離されるという性差の違いをもつ極めて特徴的な尿路感染起因菌として知られている。全ゲノム配列を解読した結果、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* 型の病原因子全てを保有せず、その一方、尿中のイオン組成に適したトランスポート類をパラログとして多数保有していた。その中でも、海洋細菌の多くが保有する Na^+ 依存型の鉄獲得系を *S. saprophyticus* も保有しており、尿という豊富なイオン組成と高濃度下での生存・感染成立に貢献しているものと考えられた。*S. aureus* は 20 種の細胞壁結合型の定着因子を保有していることが知られているが、*S. saprophyticus* は 1 個のみしかゲノム配列から推定できなかった。定着因子候補が少ないという解析結果は、多臓器に重篤な感染症を引き起こす *S. aureus* とは異なり、主に尿路における感染症に限定されている事実を反映したものと思われる。その蛋白質の過剰発現によって、羊赤血球を凝集し、膀胱由来の T24 細胞に顕著な定着が見られたことから、尿路親和性を担う新規定着因子であることが示唆された。また、ウレアーゼ産生が他のブドウ球菌よりも亢進しており、尿中の尿素を迅速にアンモニアに代謝し、尿路感染に貢献しているものと思われる。ゲノム解読により、尿路感染に極めて重要な接着・増殖に関与する因子を特定し、尿路感染に関与している可能性が示唆された。

はじめに

ブドウ球菌（*staphylococcus* 属）はヒトを含め家畜などの哺乳動物、鳥類にわたり広く常在している。それぞれ種々の疾患を発症することで知られているが、ヒトに対して最も病原性の高い黄色ブドウ球菌は、エンテロトキシンによる毒素性食中毒を起こすだけでなく、20 種以上もの細胞表層定着因子により多種臓器に定着し、コアグラゼ、溶血毒、プロテアーゼ、リパーゼといった分泌型毒素によって感染成立を起こす。この多様な定着・外毒素因子を有することで、肺炎、心内膜炎、腸炎、トキシック・ショック症候群、熱傷用皮膚症候群といった全身性疾患を発症することがこれまでの報告で逐次実証されるとともに、著者が従事した黄色ブドウ球菌の全ゲノム配列解読により、その病原性の全貌解明の基盤を構築した (1, 2)。

本編では、急性膀胱炎を発症する女性外来患者に特有

の腐性ブドウ球菌 *S. saprophyticus* のゲノム解読と比較ゲノム解析により明らかになった尿路病原性について考察する (3)。尿路感染症は単純性と複雑性に分類され、*S. saprophyticus* は単独で単純性尿路感染症を起こすグラム陽性球菌として知られている (4, 5)。一方、*S. aureus*, *S. epidermidis* といった他のブドウ球菌属の場合、尿路カテーテルの長期留置などもっぱら院内で分離され、緑膿菌・大腸菌などグラム陰性菌と混合感染して発症する複雑性尿路感染症の例も臨床現場で見受けられる (6)。それら発症事例を考慮すると *S. saprophyticus* には尿路感染に特有の因子を保有していることが示唆されてきた。飲食物・季節など様々な外的要因に影響を受ける尿のイオン組成・濃度環境下で、どのようにして *S. saprophyticus* が“定着”“増殖”“病原性”を発揮して尿路感染成立に至っているのか、ゲノム配列に問いかけた私なりの答えを述べたいと思う。

1. 腐性ブドウ球菌 *S. saprophyticus* ATCC 15305 株の ゲノム配列と、推定遺伝子の機能分類から 見えてきた病原因子

S. saprophyticus ATCC 15305 株の全ゲノム配列決定により、2.5 Mb の環状ゲノム DNA を有し、他の既読ブドウ球

Makoto KURODA

Whole genome sequence analysis reveals the staphylococcal pathogenesis and the antimicrobial resistances

Dept. of Microbiology, Graduate School of Comprehensive Human Sciences, Univ. of Tsukuba, 1-1-1 Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8575

図 1. 腐性ブドウ球菌 *S. saprophyticus* ATCC 15305 株のゲノム構造。環状ゲノム構造に対し、外側から 7 本の円でゲノム情報を示した。1) 推定水平伝達により獲得したゲノム・アイランドと IS 配列。2) スケール (Mb)。3) 時計方向に配置している推定遺伝子。4) 逆時計方向に配置している推定遺伝子。5) tRNA と rRNA。6) GC deviation (G-C/G+C)。7) G+C 含量。

菌ゲノムと類似した構造を有していることが明らかとなった (図 1, 表 1) (1, 3, 7, 8)。ブドウ球菌属は GC 含量が平均 33% 程度の AT 含量が豊富な細菌であるが、どのブドウ球菌も non-coding 領域では比較的低い GC 含量 (平均 27.5%) を示した。*S. saprophyticus* は *S. aureus* と比べて 300 Kb ほど短いゲノム配列であった。同じコアグラウゼ陰性ブドウ球菌 (coagulase-negative staphylococci: CoNS) である表皮ブドウ球菌 *S. epidermidis* も 2–300 Kb 程短いゲノム長であり (7), *S. aureus* において多様な病原・薬剤耐性因子を獲得している事が伺えた。*S. saprophyticus* ゲノム配列をアノテーションし、総計 2446 推定遺伝子を抽出した (9, 10)。*S. aureus* N315 株の 2593 全推定遺伝子と、*S. epidermidis* ATCC 12228 株の 2419 全推定遺伝子を代表として用い、比較オルソログ解析を行った (図 2A)。3 種のブドウ球菌に共通して見いだされた推定遺伝子は 1640 遺伝子になり、全体の 63–67% が共通オルソログとして機能していることが示唆された。1 種のみ特異的な遺伝子群を推定機能で分類してみると、*S. saprophyticus* においてラン

スポーツ類、転写調節系に 2 倍近く遺伝子数が多いことを示す分類結果となった (図 2B) (11)。一方、*S. aureus* に見られるようなエンテロトキシン、プロテアーゼ、ヘモリジン、主として組織定着因子として働く細胞壁架橋型蛋白質の全ての病原因子群を有しておらず、同じブドウ球菌属でも *S. aureus* の強病原性たる由縁が理解できる比較解析結果であった (1)。*S. saprophyticus* で特異的に見いだされた遺伝子群について下記の各論で述べる。

2. 腐性ブドウ球菌ゲノムの外来性獲得因子

ブドウ球菌属において頻繁に見いだされる外来性獲得因子として、*mecA* 遺伝子を運ぶ staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) (12) とエンテロトキシン群を水平伝達する *vSa* ゲノムアイランド (または *SaPI* pathogenicity island と呼ばれる) が知られている (1, 13, 14)。*S. saprophyticus* においても同様の類似構造を有する外来性獲得配列を有していた (図 1, 図 3)。SCC*mec* は Ccr 組換え酵素 (CcrAB または CcrC) によって、染色体 DNA 複製領域 *ori* 付近に位置する *orfX* 遺伝子の下流の共通配列に挿入することが知られている (12)。*S. saprophyticus* ゲノムでは、2 種類の異なる Ccr 酵素を有した 2 種の SCC 配列を見いだした (図 3A)。*orfX* 遺伝子下流に CcrAB を有した SCC_{15305RM} が挿入し、SCC_{15305RM} に内在する Ccr 認識共通配列を SCC_{15305cap} の CcrC が認識し、入れ子状にゲノム挿入している可能性が示唆された。その入れ子状の挿入順序のためか、SCC_{15305cap} が挿入したと思われる *att* サイトの重複は確認できたが、SCC_{15305RM} の *att* サイトは確認できなかった。双方の SCC には Ccr 組換え酵素に加え、制限修飾系遺伝子群 (type-I 制限修飾系 HsdRMS, DNA methylase, Restriction enzyme) が個別に存在し、利己的遺伝子として働いて SCC 挿入を安定化している可能性が示唆された (15)。SCC_{15305cap} は荚膜生成遺伝子群 *cap* locus を有し、一部ブドウ球菌属の荚膜生成遺伝子群と類似遺伝子 (*capA, B, C, D, K, M*) に加え、グラム陰性菌に見られる Lipopolysaccharide (LPS) 生合成系に類する遺伝子群と混合した locus を構成していた。経代培養により分離した SCC_{15305cap} 脱落株 C1 は、親株である ATCC 15305 株と比べて粘着性を消失しており、さらにポリスチレン表面への非特異的吸着が顕著に減弱し

表 1. ブドウ球菌属のゲノム比較

staphylococci strains	<i>S. saprophyticus</i>			<i>S. aureus</i>				<i>S. epidermidis</i>		
	ATCC15305	N315	Mu50	MW2	COL	MRSA252	MSSA476	ATCC12228	RP62A	
ゲノムサイズ (bp)	2516575	2814816	2878529	2820462	2809422	2902619	2799802	2499279	2616530	
ORF 数	2446	2593	2699	2632	2615	2656	2579	2419	2494	
G+C 含量 (%)	33.2	32.8	32.9	32.8	32.8	32.8	32.9	32.1	32.2	
推定遺伝子の平均 G+C 含量 (%)	34.0	33.6	33.6	33.5	33.5	33.5	33.5	33.0	32.9	
推定遺伝子外領域の平均 G+C 含量 (%)	27.3	27.8	27.9	27.8	28.0	28.3	28.2	25.9	26.6	
平均 ORF 長 (bp)	861.4	907.1	893.9	896.6	888.4	893.6	889.8	865.3	867.1	
5S rRNA 数	8	6	6	7	7	4	7	6	7	
16S rRNA 数	6	5	5	6	6	5	6	5	6	
23S rRNA 数	6	5	5	6	6	5	6	5	6	
tRNA 数	60	62	60	60	53	60	60	60	61

図 2. ゲノム解読が終了しているブドウ球菌属とのオルソログ比較。A) blast による蛋白質相同性検索で、双方向でトップ・ヒットの推定遺伝子を共通オルソログとした (e -value cutoff 値: $\leq e^{-10}$)。B) 上記 3 種のオルソログ比較において選別した特異的遺伝子 (*S. saprophyticus*, 582 ORFs; *S. aureus*, 631 ORFs; *S. epidermidis*, 515 ORFs) を COGs および pfam データベースにより機能分類した。*S. saprophyticus* は輸送系、転写調節系の遺伝子数が多く見受けられ、一方、*S. aureus* に見られる病原性因子を有していなかった。

図 3. *S. saprophyticus* ATCC 15305 株の可動ゲノム・アイランド。A) Staphylococcal Cassette Chromosome SCC_{15305RM} と SCC_{15305cap} の構造。SCC_{15305cap} は、SCC_{15305RM} に存在する他のブドウ球菌属の SCCmec と共通する *att* サイトに挿入され、SCC の入れ子構造をなしていた。両 SCC は、ゲノム挿入に必須である組換え酵素 (CcrAB, CcrC) を有していた。組換え後、利己的遺伝子として知られる制限修飾系 (HsdRMS) により、これら SCC はゲノムに安定しているものと考えられる。SCC_{15305cap} は莢膜生成遺伝子群 *cap* locus を有していた。一部ブドウ球菌属の莢膜生成遺伝子群と類似遺伝子 (*capA, B, C, D, K, M*) に加え、グラム陰性菌に見られる Lipopolysaccharide (LPS) 合成系に類する遺伝子群と混合した locus を構成しており、これまで知られているブドウ球菌属と異なる莢膜多糖類を産生している可能性が示唆された。B) この *cap* locus を有する SCC_{15305cap} の脱落株 C1 では、親株の ATCC 15305 株に比べて Polystyrene 表面への接着が顕著に減弱しており、SCC を介して外来性に莢膜生成能力を獲得したことが伺われる。C) 薬剤耐性マーカーを伝達する vSa₁₅₃₀₅ ゲノムアイランド。従来、vSa ゲノムアイランドは TSST-1 (*ist*) やエンテロトキシン遺伝子群の伝達に関与していることが知られているが、毒素因子ではなく薬剤耐性マーカー (*fosB*: fosfomycin 耐性, *aadE*: streptomycin 耐性) の伝達に関与するアイランドとして初めて見いだした。

ていた (図 3B)。SCC_{15305cap} 上にある *cap* locus によって、粘性・非特異的接着性に関与していることが示唆された。

また、平均 15 Kb 長の vSa ゲノムアイランドに近縁な vSa₁₅₃₀₅ アイランドは、エンテロトキシンなどの毒素因子ではなく fosfomycin, aminoglycoside 耐性遺伝子 (*fosB* および *aadE*) と類似性の高い因子の水平伝達に関与していることが示唆された (図 3C)。このタイプのゲノムアイランドによって薬剤耐性マーカーが伝達されている例は初めてであり、これら可動性アイランドは多様な因子の水平伝達に

貢献していることが伺える。

3. 細胞壁架橋型蛋白質 UafA (uro-adherence factor A) の尿路親和性

全身性疾患を発症する *S. aureus* とは異なり、*S. saprophyticus* は主として女性外来患者特有の急性膀胱炎を発症することで知られている (5, 16)。このことは同じブドウ球菌属でも各臓器における定着・増殖機構が異なることを示唆している。ゲノム比較結果が示すように、定着因子候補

である Sortase A 依存型の細胞壁架橋型蛋白質は, *S. aureus* が 20 遺伝子存在するのにに対し (17), *S. saprophyticus* は 1 遺伝子 (遺伝子 ID : SSP0135) しか同定できず, これが尿路組織に特有の定着因子ではないかと推測した。尿路病原性大腸菌 (Uropathogenic *E. coli*: UPEC) では Type I 絨毛, P 絨毛といった尿路系細胞の糖鎖を介した定着機構が解明されており (18), 羊赤血球を用いた凝集反応による簡易試験でその接着能を判定できる。*S. saprophyticus* においても羊赤血球との結合親和性が高いほうが尿路系細胞との結合が強いとの報告もあり (19), SSP0135 蛋白質が赤血球凝集反応に関与するかどうか過剰発現株および遺伝子変異株にて検討した。非凝集菌 *S. aureus* RN4220 株において SSP0135 蛋白質を過剰発現させると, 顕著な凝集陽性反応がみられ, *S. saprophyticus* の SSP0135 遺伝子変異株 G5 を用いても凝集反応が陰性になることから, SSP0135 蛋白質が羊赤血球への結合・凝集に関与していることが明らかになった (図 4A)。さらに, ヒト膀胱癌由来 T24 細胞への親和性も SSP0135 過剰発現により増加し, 加えて, SSP0135 変異株 G5 においても顕著な減少が見られたことから (図 4B), 尿路感染症において初期定着に重要な接着因子であることが

示唆された。この SSP0135 蛋白質を UafA (uro-adherence factor A) と命名した。現在, 羊赤血球の糖脂質サンプル中に特異な凝集阻止因子を単離中で, 耐熱性・プロテアーゼ耐性因子であることまで同定できている。

4. 尿イオン組成に適応した腐性ブドウ球菌の浸透圧調節トランスポーター群の遺伝子重複

UafA による尿路定着に加え, 重篤な尿路感染症を引き起こすためには迅速な増殖が必要と考えられる。尿は栄養豊富で多くの細菌に良好な増殖を促す液体培地であるが, 数時間毎に行う排尿というクリアランスよりも早い増殖能を必要とする。さらに, 尿のイオン組成は飲食物の質・量や季節によっても変動しやすく, 短時間で起きるイオン組成・濃度・pH 変動に対しても迅速に対応する必要があるだろう (図 5)。それを示唆するかのよう, ゲノム比較解析により多種多様なトランスポーター・システムのパラログ重複が *S. saprophyticus* で見いだされた (表 2)。プロリン, グリシンベタインといった osmoprotectant を取り込む耐浸透圧システムや, 鉄・亜鉛・マンガン等を獲得する NRAMP (natural-resistance-associated macrophage protein) ファミリー, Na^+/H^+ アンチポーター, 硫酸シンポーターといった尿イオン組成に関連したトランスポーター類が, 共通オルソログに加えもう 1 セット追加されたゲノム構造を *S. saprophyticus* は有していた (表 2) (20, 21)。また, 2 種のプラスミド上にそれぞれ水チャネル AqrZ を有しており, 極度に変動しやすい尿水分バランスに対応している可能性が示唆された (22, 23)。

一方, *S. aureus* に見られる K^+ 獲得系は *S. saprophyticus* には存在せず, K^+ は尿中に豊富なことから K^+ 獲得系を必要としないのかもしれない。その反面, 臓器などの感染部

図 4. 細胞壁架橋蛋白質 UafA (uro-adherence factor A: SSP0135) による (A) 羊赤血球凝集能と, (B) ヒト膀胱細胞 T24 への接着能。大多数の *S. aureus* 株による羊赤血球凝集能は通常認められないが, 尿路分離される *S. saprophyticus* の多くは凝集能を有していることが知られており, 尿路病原性を推定する簡易試験として用いられている。*S. aureus* RN4220 株 (A, ウェル 1), ベクター pRIT5H コントロール (A, ウェル 2) では凝集しないが, ゲノム解読で同定した唯一の細胞壁架橋蛋白質 SSP0135 の過剰発現プラスミド pRLC(+) を形質転換した *S. aureus* RN4220 株では赤血球凝集が見られた (A, ウェル 3)。ヒト膀胱細胞 T24 においても SSP0135 の過剰発現により優位な接着能 ($p<0.005$) を示した。*S. saprophyticus* ATCC 15305 株から分離した SSP0135 欠損株 G5 においても赤血球凝集能の消失が見られ, T24 細胞への接着能が減弱 ($p<0.02, 0.0005$) していたことから, ゲノム配列から唯一見いだされた細胞壁架橋蛋白質 SSP0135 (UafA) は, 尿路定着に重要な役割を担っていることを示唆するものであった。

図 5. 人体の体液組成。細胞内外で Na^+ および K^+ 濃度勾配ができるなど, 特徴的なイオン組成を恒常的に維持しているが, 尿はイオン組成・濃度・pH といったパラメーターの変動が激しい体液である。

表 2. *S. saprophyticus* におけるトランスポーター類の
パラログ増幅

蛋白質機能	共通オルソログ ^a	追加パラログ ^b
耐浸透圧		
Proline/betaine transporter	SSP2142	SSP0211
ProP		
High affinity proline permease	SSP0889	SSP0399
PutP		
Glycine betaine/choline transporter	SSP1409	SSP1344
	SSP0701	SSP0323
	SSP0193	
Proline/glycine betaine ABC transporter		
ATPase component OpuCA/	SSP1997	SSP0451
CB/CD	SSP0452	SSP0454
periplasmic component	SSP0453	SSP0993
OpuCC		
Water channel AqpZ		SSPP142 ^d
		SSPP212 ^d
イオン輸送		
Divalent-cation transporter	SSP1158	SSP2176
NRAMP ^c	SSP1685	
Na ⁺ /H ⁺ antiporter NhaC	SSP0612	SSP0329
	SSP0578	SSP0560
Sodium/sulfate symporter	SSP0875	SSP0304
	SSP0395	
Sulfate symporter		SSP0298
		SSP0574

^a オルソログ解析(図 2-A)により選別した 3 種ブドウ球菌の共通
オルソログ

^b *S. saprophyticus* に特異的な ORFs (図 2-A)

^c 3 パラログの蛋白質系統樹解析を図 6 に示す

^d プラスミド上に局在

位では細胞外イオン組成は K⁺ が非常に低濃度であり、優位に K⁺ 獲得できる *S. aureus* と、K⁺ 獲得系を有さない *S. saprophyticus* との間で臨床上見受けられる病原性・分離状況を反映している 1 要素であるかもしれない (図 5)。事実、院内感染型 MRSA N315 株の type II SCC_{mec} 上には K⁺ 獲得系を外来性に獲得しており、臓器感染を促進する病原性因子として考えてもいいであろう (12)。

5. Na⁺ 依存型鉄獲得系 NRAMP ファミリーの新規パラログ

表 2 で取り上げたパラログ増幅の中で、鉄獲得トランスポーター・NRAMP ファミリーのヒトからバクテリアまで全ての 336 蛋白質について系統樹を作製した (図 6)。NRAMP ファミリーは、生物種を越えて広く保存されており、どの生物種においても重要な生理的役割を担っていることが予想される (21)。このトランスポーターは、マクロファージのファゴリソソーム内に残存する二価カチオン (鉄・亜鉛・マンガンなど) を H⁺ 濃度依存的に排泄することにより、貧食した病原体の増殖を抑制する。*S. saprophyticus* の 3 個のパラログのうち、SSP1685 はモチーフ解析と系統関係から H⁺ 濃度依存的であることが推察された。一方、*S. saprophyticus* 特異のパラログである SSP2176 は、モチーフ解析から Na⁺ 濃度依存的で、系統樹からは死海・深海から分離された好塩菌と非常に近縁なトランスポーターであることが分かった。この SSP2176 によって尿中に豊富な Na⁺ を利用した鉄獲得系として働くことが示唆され、尿路感染において優位に増殖するためのパラログ増

図 6. 二価カチオン輸送体として知られる NRAMP (natural-resistance-associated macrophage protein) ファミリー蛋白質の系統樹分類。NRAMP ファミリーは、ヒトを初めとする後生動物からバクテリアまで広く存在し、プロトン勾配依存的に鉄・亜鉛等の二価カチオンを輸送することで知られている。マクロファージの NRAMP は、細菌を貧食したリソソーム内の鉄含有量を減少させ、感染細菌の増殖を抑え迅速に処理するための機構と考えられている。細菌もまたそれに抵抗するかのごとく類似の NRAMP ファミリーを有しており、解析した 3 種のブドウ球菌においてもプロトン依存型オルソログ (SSP1158, SSP1685) を有していた。一方、*S. saprophyticus* にのみ追加としてもう 1 個オルソログ (SSP2176) を有しており、その SSP2176 の系統樹分類から、海洋細菌や死海で分離された好塩菌とより近縁であることが明らかとなった。SSP2176 蛋白質のモチーフ解析から Na⁺ 依存的なイオン輸送体であることが示唆され、上記の系統分類樹と併せて、SSP2176 は Na⁺ 勾配依存的二価カチオン輸送体である可能性が示唆された。尿路感染において、イオン変動の激しい尿組成に適応し、それを利用することで鉄などの必須二価カチオンを獲得していることが考えられる。

幅と考えられる。

6. 高ウレアーゼ活性がもたらす尿路感染の増殖促進

ブドウ球菌属の多くがウレアーゼを産生し、同定検査においても重要な検査項目である (24)。比較した 3 種ブドウ球菌において同様のウレアーゼ・オペロン構造を有しており、ゲノム構造からは特筆すべき相違は認められないものの、クリステンセン尿素培地におけるウレアーゼ活性が *S. saprophyticus* では 2 時間以内で陽性反応が認められるほど強ウレアーゼ産生菌であることが分かった。尿素分解によるアンモニア産生量を Indophenol blue 法にて検討した結果でも、*S. saprophyticus* はアンモニア産生能が高く、それ

A Ammonium detection by indophenol blue reaction

B Growth curve on Christensen urea medium

図7. *S. saprophyticus* の強ウレアーゼ産生。クリステンセン尿素液体培地にて培養したブドウ球菌属の A) アンモニア産生量を Indophenol blue 法で定量し, B) 採取時における増殖曲線を示した。*S. saprophyticus* は培養初期から迅速に尿素分解によるアンモニア産生が見られ, 迅速な増殖能を示した。2 時間後には多量に産生したアンモニアによるアルカリ pH のため, 一時増殖抑制が見られた。

故に菌培養液が 1 時間で pH 9 程度のアルカリに達し増殖阻害を起こすほどであった (図 7)。ウレアーゼ阻害剤である acetohydroxamate 添加によりアンモニア産生がほぼ完全に抑制されることから, ウレアーゼによるアンモニア産生であることを確認した。臨床分離の *S. saprophyticus*, *S. aureus*, *S. epidermidis* においてもクリステンセン尿素培地で同様の傾向が確認でき, 尿路感染において *S. saprophyticus* の強ウレアーゼ活性が酸性尿を中和するとともに, 窒素源の確保および局所的な強アルカリ環境を作り出すことにより, 膀胱粘膜の組織障害にも寄与しているものと思われる。

おわりに

S. saprophyticus は, 女性外来患者の急性膀胱炎・単純性尿路感染症の起病因菌として単独分離され, カテーテルなど医療挿入具なしで感染成立・発症を起こす。このことは, 独自に定着・増殖・病原性メカニズムを持ち合わせていることを示し, 事実, 尿路環境に適応するかのような特有の遺伝子群を保有していることを, ブドウ球菌属ゲノム比較と実験的に実証できた。女性と違って男性では極端に分離頻度が低く, 尿路カテーテル留置による *S. saprophyticus* 感染症例や尿道の長さなど解剖学的な要因が考えられる。運動性を有さないブドウ球菌属が上行性に尿路感染を発症するためには尿路特異的の定着因子の存在が必要不可欠であり, それを示すかのように *S. saprophyticus* には尿路親和性を有する細胞壁架橋蛋白質 UafA が関与していることを明らかにした。定着後の増殖を迅速に行うために, 尿イオン組成に適応した多種多様なトランスポーター類のパラログ増幅で質・量的に対応し, イオン組成・濃度変動の激しい

図8. 腐性ブドウ球菌 *S. saprophyticus* による尿路定着機構と尿イオン組成に適した増殖機構

尿中での増殖を促進しているようである。強ウレアーゼ産生の発現メカニズムは尿路感染にとって最重要項目と考えられ, 今後の解析で明らかにしたい。同じブドウ球菌属に分類されていても種固有の顔を有し, 実際に臨床・疫学で得られている現実像に答えるかのような病原性遺伝子群を抽出し, その役割を理解することができた。さらに, 今回の比較ゲノム解析は, 高度薬剤耐性 *S. aureus* の薬剤耐性・病原性においても特徴的な遺伝子候補をより明確に分類・整理できたわけで, 今後のブドウ球菌属ゲノム解読・比較ゲノム解析により, *S. aureus* や他のコアグラウゼ陰性 staphylococci による感染メカニズム解明の糸口となるものと考えている。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導を頂きました太田敏子教授（筑波大学大学院人間総合科学研究科）に深く感謝致します。また、本研究に協力していただきました筑波大・教室員の方々、および共同研究でご協力頂きました服部正平先生（北里大）、久原 哲先生（九州大）、平松啓一先生（順天堂大）ならびに教室員の方々にこの場を借りて感謝申し上げます。病原微生物ゲノム班では、長きに渡りご指導を賜りました中澤晶子先生、林 英生先生、林 哲也先生、清水 徹先生に御礼申し上げます。

文 献

- 1) Kuroda, M., Ohta, T., Uchiyama, I., Baba, T., Yuzawa, H., Kobayashi, I., Cui, L., Oguchi, A., Aoki, K., Nagai, Y., Lian, J., Ito, T., Kanamori, M., Matsumaru, H., Maruyama, A., Murakami, H., Hosoyama, A., Mizutani-Ui, Y., Takahashi, N.K., Sawano, T., Inoue, R., Kaito, C., Sekimizu, K., Hirakawa, H., Kuhara, S., Goto, S., Yabuzaki, J., Kanehisa, M., Yamashita, A., Oshima, K., Furuya, K., Yoshino, C., Shiba, T., Hattori, M., Ogasawara, N., Hayashi, H., Hiramatsu, K. (2001): Whole genome sequencing of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Lancet* **357**, 1225–1240.
- 2) Baba, T., Takeuchi, F., Kuroda, M., Yuzawa, H., Aoki, K., Oguchi, A., Nagai, Y., Iwama, N., Asano, K., Naimi, T., Kuroda, H., Cui, L., Yamamoto, K., Hiramatsu, K. (2002): Genome and virulence determinants of high virulence community-acquired MRSA. *Lancet* **359**, 1819–1827.
- 3) Kuroda, M., Yamashita, A., Hirakawa, H., Kumano, M., Morikawa, K., Higashide, M., Maruyama, A., Inose, Y., Matoba, K., Toh, H., Kuhara, S., Hattori, M., Ohta, T. (2005): Whole genome sequence of *Staphylococcus saprophyticus* reveals the pathogenesis of uncomplicated urinary tract infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 13272–13277.
- 4) Torres Pereira, A. (1962): Coagulase-negative strains of staphylococcus possessing antigen 51 as agents of urinary infection. *J. Clin. Pathol.* **15**, 252–253.
- 5) Wallmark, G., Arremark, I., Telander, B. (1978): *Staphylococcus saprophyticus*: a frequent cause of acute urinary tract infection among female outpatients. *J. Infect. Dis.* **138**, 791–797.
- 6) von Eiff, C., Peters, G., Heilmann, C. (2002): Pathogenesis of infections due to coagulase-negative staphylococci. *Lancet Infect. Dis.* **2**, 677–685.
- 7) Zhang, Y.Q., Ren, S.X., Li, H.L., Wang, Y.X., Fu, G., Yang, J., Qin, Z.Q., Miao, Y.G., Wang, W.Y., Chen, R.S., Shen, Y., Chen, Z., Yuan, Z.H., Zhao, G.P., Qu, D., Danchin, A., Wen, Y.M. (2003): Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228). *Mol. Microbiol.* **49**, 1577–1593.
- 8) Holden, M.T., Feil, E.J., Lindsay, J.A., Peacock, S.J., Day, N.P., Enright, M.C., Foster, T.J., Moore, C.E., Hurst, L., Atkin, R., Barron, A., Bason, N., Bentley, S.D., Chillingworth, C., Chillingworth, T., Churcher, C., Clark, L., Corton, C., Cronin, A., Doggett, J., Dowd, L., Feltwell, T., Hance, Z., Harris, B., Hauser, H., Holroyd, S., Jagels, K., James, K.D., Lennard, N., Line, A., Mayes, R., Moule, S., Mungall, K., Ormond, D., Quail, M.A., Rabinowitsch, E., Rutherford, K., Sanders, M., Sharp, S., Simmonds, M., Stevens, K., Whitehead, S., Barrell, B.G., Spratt, B.G., Parkhill, J. (2004): Complete genomes of two clinical *Staphylococcus aureus* strains: evidence for the rapid evolution of virulence and drug resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**, 9786–9791.
- 9) Delcher, A.L., Harmon, D., Kasif, S., White, O., Salzberg, S.L. (1999): Improved microbial gene identification with GLIMMER. *Nucleic Acids Res.* **27**, 4636–4641.
- 10) Sakiyama, T., Takami, H., Ogasawara, N., Kuhara, S., Kozuki, T., Doga, K., Ohya, A., Horikoshi, K. (2000): An automated system for genome analysis to support microbial whole-genome shotgun sequencing. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **64**, 670–673.
- 11) Tatusov, R.L., Natale, D.A., Garkavtsev, I.V., Tatusova, T.A., Shankavaram, U.T., Rao, B.S., Kiryutin, B., Galperin, M.Y., Fedorova, N.D., Koonin, E.V. (2001): The COG database: new developments in phylogenetic classification of proteins from complete genomes. *Nucleic Acids Res.* **29**, 22–28.
- 12) Ito, T., Katayama, Y., Asada, K., Mori, N., Tsutsumimoto, K., Tiensasitorn, C., Hiramatsu, K. (2001): Structural comparison of three types of staphylococcal cassette chromosome *mec* integrated in the chromosome in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 1323–1336.
- 13) Lindsay, J.A., Ruzin, A., Ross, H.F., Kurepina, N., Novick, R.P. (1998): The gene for toxic shock toxin is carried by a family of mobile pathogenicity islands in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **29**, 527–543.
- 14) Ruzin, A., Lindsay, J., Novick, R.P. (2001): Molecular genetics of SaPI1—a mobile pathogenicity island in *Staphylococcus aureus*. *Mol. Microbiol.* **41**, 365–377.
- 15) Naito, T., Kusano, K., Kobayashi, I. (1995): Selfish behavior of restriction-modification systems. *Science* **267**, 897–899.
- 16) Meers, P.D., Whyte, W., Sandys, G. (1975): Coagulase-negative staphylococci and micrococci in urinary tract infections. *J. Clin. Pathol.* **28**, 270–273.
- 17) Comfort, D., Clubb, R.T. (2004): A comparative genome analysis identifies distinct sorting pathways in gram-positive bacteria. *Infect. Immun.* **72**, 2710–2722.
- 18) Mulvey, M.A. (2002): Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* **4**, 257–271.
- 19) Fujita, K., Yokota, T., Oguri, T., Fujime, M., Kitagawa, R. (1992): In vitro adherence of *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus haemolyticus*, and *Staphylococcus aureus* to human ureter. *Urol. Res.* **20**, 399–402.
- 20) Poolman, B., Spitzer, J.J., Wood, J.M. (2004): Bacterial osmosensing: roles of membrane structure and electrostatics in lipid-protein and protein-protein interactions. *Biochim. Biophys. Acta* **1666**, 88–104.
- 21) Forbes, J.R., Gros, P. (2001): Divalent-metal transport by NRAMP proteins at the interface of host-pathogen interactions. *Trends Microbiol.* **9**, 397–403.
- 22) Deen, P.M., Knoers, N.V. (1998): Physiology and pathophysiology of the aquaporin-2 water channel. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens* **7**, 37–42.
- 23) Hohmann, I., Bill, R.M., Kayingo, I., Prior, B.A. (2000): Microbial MIP channels. *Trends Microbiol.* **8**, 33–38.
- 24) Jose, J., Christians, S., Rosenstein, R., Gotz, F., Kaltwasser, H. (1991): Cloning and expression of various staphylococcal genes encoding urease in *Staphylococcus carnosus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **64**, 277–281.