

短 報

黄色ブドウ球菌の病原性に関わる付着因子となる clumping 活性阻害物質の探索

森江 未希, 塩田 澄子
就実大学 薬学部 病原微生物学研究室

Search for compounds that inhibit the clumping factor associated with fix to host cells in *Staphylococcus aureus*

Miki Morie, Sumiko Shiota

Department of Pathogenic Microbiology, School of Pharmacy, Shujitsu University

(Received 30 October 2014; accepted 18 November 2014)

Abstract: *Staphylococcus aureus* is a human pathogen and produce various kinds of virulent factor. The prevalence of isolates, virulence and increasing resistance to antibiotics indicates the need for alternative prevention or treatment approaches for *S.aureus* infection. To prevent infection caused by *S.aureus* without using antiseptic or antimicrobial agents, we take notice to the compounds that inhibit the virulence factors. The surface proteins called microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) are one of virulence factors in *S.aureus*. Strains without MSCRAMM are defective in the establishment of infections, because they cannot fix to host cells or indwelling devices. Among the MSCRAMM, we focused on the fibrinogen-binding protein, also called clumping factor A (ClfA). This protein shows the clumping activity which is easy to detect. We searched for inhibitors among natural compounds, and found that several monoterpenoids showed to inhibit the clumping activity. These compounds might be candidates for the prevention of infections caused by *S. aureus*.

Keywords: *Staphylococcus aureus*; clumping activity; inhibitor

緒言

黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* は、通常は健康人に害を及ぼさないが、ブドウ球菌属の中では、最も強い病原性をもち、皮膚創傷面から

感染して化膿性炎症を起こしたり、食中毒の原因となる。易感染者においては日和見感染を起こし、難治性となって死に至らしめることもある。このような黄色ブドウ球菌の病原性は、きわめて多様

な病原因子を産生する能力に由来する。

臨床においては、多剤耐性を示すメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) が院内感染の主要な原因菌であり、現在も院内感染対策上最も重要な菌となっている¹⁾。易感染者が増加する一方の医療現場で蔓延する MRSA に対し、さらなる感染予防対策の構築は急務である。

黄色ブドウ球菌は薬剤耐性を獲得しやすいことから、抗菌活性に頼る予防や治療を続けることで、多剤耐性菌を選択することになる。そこで、菌が産生する病原因子を抑える物質「抗病原性物質 (anti-pathogenics)」を用い、感染症を予防するという概念が生じてきた²⁾。

この概念に基づき、本研究では、病原因子の一つである付着・定着因子³⁾に着目した。細菌の生育や生存能力には影響を与えず、宿主細胞への接着・定着性を阻害することによる新たな感染症予防あるいは治療法の可能性を探った。

宿主細胞や体内異物への付着、定着因子として、microbial surface component recognizing adhesive matrix molecules (MSCRAMM) と称される菌体表層物質がある⁴⁾。黄色ブドウ球菌の MSCRAMM には、protein A、fibronectin 結合タンパク質、fibrinogen 結合タンパク質、collagen 結合タンパク質などが知られている⁵⁾。特に、fibrinogen 結合タンパク質は clumping 活性をもった付着因子であり、別名 clumping factor A (ClfA) と呼ばれている⁶⁾。Clumping 活性を指標にスクリーニングを行った結果、fibrinogen 結合タンパク質の結合活性を阻害する物質を見出したので報告する。

材料及び方法

各種テルペノイドとその他の天然物由来物質

スクリーニングに用いた天然由来物質はそれぞれ精製されたものを購入した。溶媒として Dimethyl sulfoxide (DMSO) 用いた。

菌株

研究室が保有するメチシリン感受性黄色ブド

ウ球菌 (MSSA) 3 株 (209P, RN4220, RDN1) 及び MRSA 4 株 (OM584, OM623, H2, N315) を用いた。

最小生育阻止濃度 (MIC) の測定

微量液体希釈による MIC 測定を日本化学療法学会標準法に従って行った⁷⁾。

Clumping (fibrinogen との結合) 活性の測定

Kang らの方法⁸⁾に若干の変更を加えた。天然物質を添加した Brain-heart infusion (BHI) 培地を用い、37°C で対数増殖後期 (O.D.₆₅₀=1.0) まで振盪培養後、集菌した菌体をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に溶解した 1mg/ml fibrinogen 溶液で懸濁した。菌体と fibrinogen が結合すれば、凝集体 (clump) を形成することで沈殿が生じ、溶液の濁度が低下する。37°C で静置し、懸濁直後及び 1 時間、2 時間、3 時間後に O.D.₆₂₀ を測定した。

結果

スクリーニングに用いる菌株の選定

黄色ブドウ球菌の菌株ごとに clumping 活性が異なることから、活性を測定し比較した (図 1)。

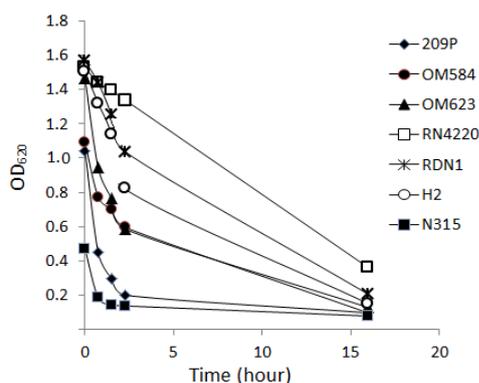


図 1 菌株ごとの clumping 活性

黄色ブドウ球菌7株について測定した結果、MRSAのN315株はfibrinogenと菌体を混和した直後からfibrinogenと結合して凝集し沈殿したため、上清の濁度が0時点でO.D.₆₂₀が3分の1以下にまで低下していた。7株のうち最も強いclumping活性

を示したことから全ゲノム配列が決定されていたことからN315株をスクリーニング株とした。

スクリーニングに用いた天然由来物質の *S. aureus* N315株に対する抗菌活性

31種類の天然由来物質について、N315株に対するMICの測定を行い、抗菌活性を調べた(表1)。Farnesol と berberine以外は抗菌活性はほとんどなかった。スクリーニングには、生育に影響を与えないために、それぞれの物質のMICの8分の1の濃度(以下1/8 MIC)を用いることとした。

表1 *S. aureus* N315に対する各種天然物質のMIC

Compound	MIC (μg/ml)
Abietic acid	256
Berberine hydrochloride	64
Borneol	>1024
Camphene	>512
Camphor	>1024
Capsaicin	>128
Cineol	>1024
Citral	1024
Citronellol	1024
Citronellyl acetate	1024
Cymene	>1024
Dihydrocapsaicin	>128
Eugenol	>1024
Farnesol	32
Geraniol	1024
Geranyl acetate	>1024
Linalool	>1024
Linalyl acetate	>1024
Myrcene	>1024
Naringenin	256
Nerol	1024
Nerolidol	>256
Nonylic vanillylamide	>128
Phytol	>1024
α-pinene	>1024
β-pinene	>1024
Quercetin dihydrate	>1024
Terpineol	1024
Tetrahydrolinalool	>1024
Thymol	256

Clumping 阻害物質のスクリーニング

スクリーニングには表1に示す各種天然由来物質を用いた。そのうち、比較的強く clumping を阻害したもののみを図2に示した。

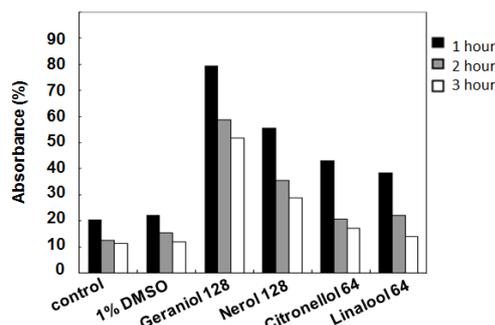


図2 天然由来物質存在下における N315 株の clumping 活性

1/8 MICになるように試料を加えた BHI 培地を用いて 37°C で N315 株を培養した。Fibrinogen と菌株の懸濁直後の O.D.₆₂₀ に対する各時間の O.D.₆₂₀ 値の百分率を算出した。数字は添加した物質の濃度(μg/ml)を示す。

最も強く clumping を阻害したのは geraniol であった。溶媒である 1% DMSO のみを加えて生育させた場合、clumping が起こり、反応開始 1 時間後に O.D.₆₂₀ 値が約 20% まで低下したのに対し、geraniol を加えて生育させた場合、O.D.₆₂₀ 値は 80% であった。以下、nerol は約 55%, citronellol は約 43%, linalool は約 38% で、clumping 活性を阻害していた。Linalool 以外は 3 時間後も control より高い O.D.₆₂₀ 値を示し、clumping 阻害活性が持続することが分かった。

Clumping 阻害活性を持つ物質の構造

Clumping 阻害活性が確認できた geraniol, nerol, citronellol 及び linalool の構造式を図3に示した。いずれもモノテルペノイドで、geraniol, nerol 及び linalool は化学式 C₁₀H₁₈O の構造異性体であり、geraniol と nerol は立体異性体であった。Citronellol は dihydrogeraniol と呼ばれ、geraniol を水素化したものである。今回調べた物質のうちモノテルペノイドは 21 種類であったが、clumping 阻害活性があったものは、すべて geraniol とその構造異性体か、構造類似体であった。

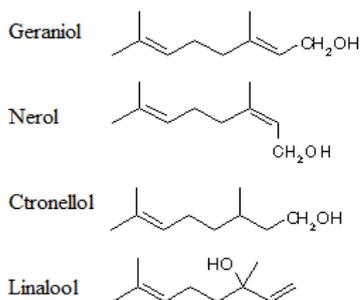


図3 Clumping 阻害活性を示した物質の構造式

Clumping 阻害活性の濃度依存性

黄色ブドウ球菌の clumping を特に強く阻害した geraniol 及び nerol について、さらに低濃度において clumping に与える影響を調べた (図4)。

Geraniol は 1/8 MIC の 128 µg/ml 及び 1/16 MIC の 64 µg/ml で濃度依存的に clumping を阻害した。より低濃度である 64 µg/ml でも反応開始から 3 時間後まで clumping を阻害していたことから、その阻害活性は強く、持続することが分かった。Nerol についても geraniol と同様、1/8 MIC 及び 1/16 MIC で濃度依存的に clumping を阻害した。ただし、その阻害活性は geraniol ほど強くはなかった。

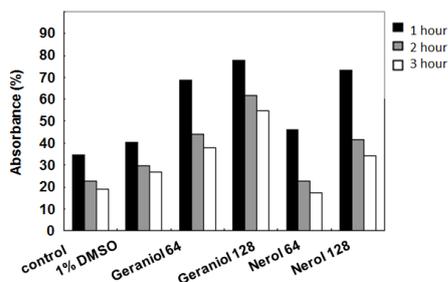


図4 Geraniol 及び nerol の濃度の変化と黄色ブドウ球菌 N315 株の clumping

1/16 または 1/8 MIC になるよう試料を加えた BHI 培地を用いて 37°C で N315 株を培養した。数字は添加した物質の濃度 (µg/ml) を示す。

考察

モノテルペノイドの精油成分である geraniol 及びその立体異性体の nerol に黄色ブドウ球菌の clumping を強く阻害する活性があることを見出

した。このうち geraniol は、1/16 MIC の 64 µg/ml でも clumping を阻害し、特に強い clumping 阻害活性を示した。データには示していないが、geraniol 及び nerol は、用いた濃度では N315 株の増殖には全く影響を与えなかった。また、活性を測定する直前にこれらの物質を加えても、clumping 阻害効果は見られなかったことから、fibrinogen 結合タンパク質の産生を阻害した可能性があった。

黄色ブドウ球菌は、clumping 活性をもった fibrinogen 結合タンパク質をはじめとする付着因子を発現し、カテーテルなど体内留置異物や宿主組織に存在する宿主タンパク質に付着することで感染を起こす⁸⁾。付着を抑えることができれば感染には至らないため、clumping 活性を阻害する geraniol や nerol は感染予防を可能にすると考えられる。

引用文献

- 1) 厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業、公開情報検査部門 (2013)
http://www.nih-janis.jp/report/open_report/2013/3/1/ken_Open_Report_201300.pdf
- 2) Rasmussen TB., Givskov M.: Quorum-sensing inhibitors as anti-pathogenic drugs., *Int. J. Med. Microbiol.*, 296(2-3):149-161 (2006).
- 3) Foster TJ., McDevitt D.: Surface-associated proteins of *Staphylococcus aureus*: their possible roles in virulence., *FEMS Microbiol. Lett.*, 15; 118(3):199-205 (1994).
- 4) Patti J., M., Allen BL., McGavin MJ., Höök M.: MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues., *Annu. Rev. Microbiol.*, 48, 585-617 (1994).
- 5) Que YA., Haefliger JA., Francioli P., Moreillon P.: Expression of *Staphylococcus aureus* clumping factor A in *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* using a new shuttle vector., *Infect. Immun.* 68(6):3516-3522 (2000).

- 6) Mazmanian SK., Ton-That H., Schneewind O.: Sortase-catalysed anchoring of surface proteins to the cell wall of *Staphylococcus aureus*., *Mol. Microbiol.*, 40:1049-1057 (2001).
- 7) 日本化学療法学会：日本化学療法学会抗菌薬感受性測定法検討委員会報告. *日化療会誌*, 38: 102-105 (1990).
- 8) Kang SS., Kim JG., Lee TH., Oh KB.: Flavonols inhibit sortases and sortase-mediated *Staphylococcus aureus* clumping to fibrinogen., *Biol. Pharm. Bull.*, 29(8):1751-1755. (2006).
- 9) O'Grady NP., Alexander M., *et. al.*, (HI-CPAC): "Guidelines for the Prevention of Intravascular Catheter-Related Infections, 2011" ., *Clin. Infect. Dis.*, 52(9):e162-193 (2011).