

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007 年度～2008 年度

課題番号：19590449

研究課題名 (和文)

ストレス誘導型シャペロンやプロテアーゼによる連鎖球菌の病原性発現制御機構

研究課題名 (英文)

Regulation of pathogenicity by the heat shock chaperone and the protease in streptococci.

研究代表者

友安 俊文 (TOMOYASU TOSHIFUMI)

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・准教授

研究者番号：20323404

研究成果の概要：グラム陰性病原細菌が宿主感染する際に、宿主の生体防御システムの攻撃により合成が誘導されるストレス誘導タンパク質群が病原性のコントロールを行うことを報告している。そこで、グラム陽性の病原細菌である連鎖球菌においても同様の機構が存在するかどうかを調べる為に、*S. intermedius* のストレス誘導型分子シャペロン DnaK 破壊株とストレス誘導型プロテアーゼの構成因子である ClpP ペプチダーゼ破壊株を作製した。それら株を解析した結果、両破壊株とも温度感受性を示すこと、DnaK 破壊株ではヒト培養細胞に対する細胞毒性が低下することを発見した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学 (含真菌学)

キーワード：感染症, 細菌, 連鎖球菌, シャペロン, AAA+プロテアーゼ, DnaK, ClpP, Intermedilysin

1. 研究開始当初の背景

Streptococcus intermedius は、口腔内などの常在菌であるが、まれに難治性で反復性の歯周病や脳、肝臓などの深部臓器で重篤な膿瘍感染を引き起こす事が近年明らかになり臨床的重要性の認識が高まっている。*S. intermedius* は、主要な病原因子としてヒト特異的なコレステロール依存性細胞溶解毒素である Intermedilysin (ILY) を分泌する。しかしながら *S. intermedius* などの連鎖球菌は、栄養要求性が高いため培養条件設定が難しいことや、プラスミドなどの遺伝子操作

を行う為の道具が系統的に開発されていないことなどの要因で病原性発現調節機構の解析はあまり進んでいない。

近年、グラム陰性のサルモネラ属細菌や腸管病原性大腸菌などが宿主に感染する際に、宿主の生体防御システムの攻撃により合成が誘導されるストレス誘導タンパク質群が、病原因子や病原性の発現をコントロールすることが明らかになった。そこで、グラム陽性の病原細菌である *S. intermedius* において、そのような機構が存在するかどうかについての解析を行った。

2. 研究の目的

グラム陰性菌の研究により明らかになった、ストレス誘導型シャペロンやAAA+プロテアーゼによる病原性発現制御機構が連鎖球菌 *S. intermedius* で存在しているかどうかを解析する。そして、これらの解析から、まだ謎が多い *S. intermedius* を含む連鎖球菌の病原性発現メカニズムを明らかにする。また、これら研究によって得られた知見を応用することで、新たな連鎖球菌感染症に対する治療法の開発も視野に入れた研究を進める。

3. 研究の方法

(1) 株と培養条件

S. intermedius は、基準株の NCD02227 と臨床分離株 UNS38 を使用した。培養は Brain heart infusion (BHI) 培地を使用して、嫌気条件下でおこなった。

大腸菌は、MC4100 とその *dnaK* ないしは *rpoH* 破壊株を使用した。培養は、Luria (LB) 培地を用いて好気条件下で行った。

培養細胞は、ヒト肝癌細胞由来する HepG2 を用いた。培養は、10% FBS を含む DMEM 培地を用いて行った。

(2) *dnaK* と *cIspP* 破壊株の作製

ストレス誘導型シャペロン DnaK と AAA+プロテアーゼ複合体の触媒ドメインである ClpP を破壊した株を作製した。方法は、ゲノム配列が明らかになっていない *S. intermedius* の *dnaK* と *cIspP* を、ゲノム配列が明らかな *Streptococcus pneumoniae* の遺伝子情報を利用して設計したプライマーを用いて PCR によって増幅した。得られた断片のシーケンスを決定し、その配列をもとに DnaK と ClpP をコードする領域の遺伝子配列を決定した。その情報を利用して、これらの構造遺伝子内に薬剤耐性 (エリスロマイシン) カセットを挿入した遺伝子断片を作製した。この断片を、nested-PCR によって再び増幅した後に、形質転換を促進するペプチド (CSP) を作用させた *S. intermedius* に加えることで細胞内に導入した。相同組換えが起こり *dnaK* ないしは *cIspP* が破壊された株は、エリスロマイシン耐性を指標に単離した。

(3) ストレス感受性試験

取得した遺伝子破壊株の温度感受性 (37, 40, 42°C) やその他のストレス (酸, H₂O₂) に対する感受性は、スポットテストで解析した。方法は、培養液ないしは酸や H₂O₂ で処理した培養液を 10⁻¹ から 10⁻⁵ まで希釈して 2 μl ずつ BHI 寒天培地にスポットした。

(4) 病原因子の分泌量

病原因子である ILY やヒアルロニダーゼの分泌量を解析した。方法は、培養上清を用いてヒト赤血球の溶血活性やヒアルロン酸分解活性を測定することでこれらの分泌量を推定した。なお、これらの活性は各培養液の

吸光度 OD₆₀₀ により同じ菌数あたりの活性になるように補正を行っている。また、ILY 分泌量は抗 ILY 抗体を用いたウエスタンブロッティングによっても測定した。

(5) *dnaK* 破壊株の相補株作製

連鎖球菌-大腸菌シャトルベクター pSET1 由来のプラスミドに、*Streptococcus suis* において強いプロモーター活性が報告されている CP25 プロモーターを挿入した。このプラスミド (pSET1 CP25) に、*grpE-dnaK-dnaJ* オペロンをクローニングし *S. intermedius dnaK* 破壊株に形質転換することで相補株を作製した。

(付記: DnaK シャペロンは GrpE と DnaJ コシャペロンが協力することによりシャペロン機能を発揮することが可能になり DnaK シャペロンシステムと総称される。)

(6) 感染実験

10 ml の BHI 培地で *cIspP* 破壊株は 12 時間、*dnaK* 破壊株は 48 時間培養した。また、野生株 (UNS38) や相補株は破壊株と同じ時間培養した。ヒト肝癌細胞由来の HepG2 に対する感染は、MOI=3 感染時間 3 時間で行った。感染後 12 時間ごとの培地の交換と 24 時間ごとの HepG2 の生存率の測定を行った。

(7) *ily* 遺伝子発現調節領域の解析

DnaK や ClpP による *ily* 遺伝子発現制御機構を解析する目的で、*ily* 遺伝子のプロモーターの上流に存在し、その発現を制御している可能性が高い inverted repeat (IR) 領域ないしは direct repeat 領域 (DR) を破壊した株を *dnaK* や *cIspP* 破壊株と同様の方法を用いながら作製した。

(8) 大腸菌の *dnaK* 破壊株の *S. intermedius* の DnaK シャペロンシステムによる相補

IPTG 誘導型の発現ベクター (pZE13) に *grpE-dnaK-dnaJ* オペロン (*EKJ*)、*grpE-dnaK* オペロン (*EK*) ないしは *dnaK-dnaJ* オペロン (*KJ*) をクローニングした。作製したプラスミドは、大腸菌の *dnaK* 破壊株に CaCl₂ 法により形質転換した。これら株が 42°C において温度感受性を回復するかどうかについて IPTG 含有 (50 μM) ないしは非含有 LB 寒天培地を用いてスポットテストを行う事で検討した。

(9) *S. intermedius* の DnaK シャペロンシステムの細胞内タンパク質凝集阻害活性

大腸菌 *rpoH* 破壊株に pZE13 *EKJ* ないしはコントロールベクターを形質転換した。これら形質転換株を LB 培地で 30°C、一晚、前培養を行った。前培養 100 μl を 10 ml の 50 μM IPTG を添加ないしは無添加の LB 培地で 30°C、3 時間培養した。さらに 42°C で 1 時間培養の後に細胞を回収し、ソニケーションと界面活性剤による洗浄を繰り返すことにより凝集タンパク質を単離した。なお、タンパク質の定量はブラッドホード法により行った。

(10) *S. intermedius* の DnaK シャペロン

システムによる大腸菌の熱ショック転写因子 σ^{32} の活性制御

pZE13 *EKJ* ないしはコントロールベクターを形質転換した *dnaK* 破壊株を 30°C で 3 時間培養した。培養液の吸光度 OD600 を測定した後に集菌し、等量のサンプルを SDS-PAGE と抗 σ^{32} 抗血清ないしは抗 GroEL 抗体を用いたイミュノブロットイングによって解析した。

4. 研究成果

S. intermedius の基準株 NCD02227 と臨床分離株 UNS38 で *dnaK* ないしは *cI*pP が破壊されている可能性が高い株を複数個単離し、それら株をコロニーダイレクト PCR とサザンブロットイング法によって解析することで、遺伝子が確実に破壊されている事を確認した (未発表データ)。なお、*S. intermedius* 以外の連鎖球菌において *cI*pP 破壊株は作製されているのであるが、*dnaK* 破壊株はこれまで作製する事は不可能であると考えられていた。しかしながら、我々は世界で初めて *dnaK* 破壊株の分離に成功した。基準株 NCD02227 は病原性を示さず ILY も殆ど分泌しないので、*dnaK* や *cI*pP 破壊株の病原性に関する影響を解析する目的には不適であるので、本報告書では特に断らない限り臨床分離株 UNS38 由来株を用いたデータを示している。

最初に、各破壊株 3 株を用いて熱ストレスに対する感受性をスポットテストによって解析した。その結果、*dnaK* 破壊株 ($\Delta dnaK$) では 37°C において増殖が可能な株も得られたが、40°C 以上では全ての破壊株が温度感受性を示した (図. 1)。

(図. 1) *dnaK* 破壊株の熱感受性

*cI*pP 破壊株 ($\Delta cIpP) では、42°C 以上で温度感受性を示した (図. 2)。$

(図. 2) *cI*pP 破壊株の熱感受性

この表現型は、大腸菌などのグラム陰性菌の *dnaK* や *cI*pP 破壊株で得られた表現型と類似しており、*S. intermedius* の細胞内におい

ても *DnaK* や *C1pP* は同様の機能を保有していると考えられる。しかしながら、*dnaK* 破壊株では大腸菌の *dnaK* 破壊株で報告されている酸や H_2O_2 に対する感受性は示さなかった (未発表データ) がこの理由については謎である。

また、SDS-PAGE による解析を行い破壊株の細胞内タンパク質を野生株と比較した。その結果、*dnaK* 破壊株において 60kDa 付近のタンパク質の蓄積が観察された。そこで、抗 Hsp60 (GroEL) 抗体を用いてイミュノブロットイングを行ったところ、このタンパク質は GroEL の可能性が高いことがわかった (図. 3)。連鎖球菌 *dnaK* や *groEL* などの熱ショック遺伝子の発現は、HrcA リプレッサーによって抑制されている。よって、*S. intermedius* の *DnaK* は HrcA リプレッサーの活性をコントロールしている可能性が高いと考えられる。なお、*cI*pP 破壊株の細胞内タンパク質は、これまでのところ野生株と有為な差は認められていない (未発表データ)。

(図. 3) *dnaK* 破壊株の細胞内タンパク質の解析

次に、BHI 培地で野生株と破壊株を培養した培養上清中の ILY の分泌量をイミュノブロットイングによって調べた (図. 4, 5)。その結果、両破壊株において ILY 分泌量に有為な差を認めなかった。

(図. 4) *dnaK* 破壊株の ILY 分泌

(図. 5) *cI*pP 破壊株の ILY 分泌

また、ヒアルロニダーゼ活性についても両破壊株で有為な差を認めなかった（未発表データ）。

興味深い事に、宿主に感染した状態に近い血清中（ウシ胎児血清）で破壊株の培養を行い、培養上清の溶血活性を調べたところ、*dnaK* 破壊株において野生株と比較して有為な ILY 分泌量の低下を認めた（図. 6）。なお、*c1pP* 破壊株ではこのような差を認めていない（未発表データ）。このことから、DnaK は宿主への感染時に ILY の分泌量の制御を行っている可能性が考えられる。

QuickTimey C²
TIFF (LZW) 8LIEVEEEOEaEÁ
Ç™ÇÇÄEsENE EEC%a@ÇEÇzÇ%Ç...ÇÖIKóvÇ-ÇIAB

（図. 6）ウシ胎児血清で培養を行った *dnaK* 破壊株の培養上清の溶血活性

さらに、我々は両破壊株の病原性を調べる目的でヒト肝癌細胞（HepG2）に破壊株を感染させ細胞毒性の検討を行った。その結果、*dnaK*破壊株においてHepG2に対する細胞毒性の著しい低下を観察したが（図. 7）、*c1pP* 破壊株は野生株とほぼ同程度の細胞毒性を示しことが分かった（図. 8）。この結果から、培養細胞レベルでは *C1pP* は、病原性に関して重要な関与をしていない可能性が高くなった。そこで DnaK に焦点絞って、より詳細な研究を進めた。

QuickTimey C²
TIFF (LZW) 8LIEVEEEOEaEÁ
Ç™ÇÇÄEsENE EEC%a@ÇEÇzÇ%Ç...ÇÖIKóvÇ-ÇIAB

（図. 7）*dnaK* 破壊株の感染実験

QuickTimey C²
TIFF (LZW) 8LIEVEEEOEaEÁ
Ç™ÇÇÄEsENE EEC%a@ÇEÇzÇ%Ç...ÇÖIKóvÇ-ÇIAB

（図. 8）*c1pP*破壊株の感染実験

そこでまず、連鎖球菌-大腸菌シャトルベクターpSET1由来のプラスミドpSET1 CP25に *grpE-dnaK-dnaJ* オペロンをクローニングしたプラスミド (pSET1 *EKJ*) を *dnaK*破壊株に形質転換することで相補株を作製した。相補株は、42°Cでコロニーを形成することが可能であり熱感受性を相補した（図. 9）。しかしながら、HepG2に対する細胞毒性の回復は認めなかった（図. 7）。この理由については不明であるが、相補株はウシ胎児血清で観察される ILY 発現量の低下を部分的にしか回復できず（未発表データ）DnaK の機能回復が病原性発現には不十分である可能性が考えられる。今後、プラスミドやプロモーターを変更する事などにより更に解析を進めて行く計画である。

QuickTimey C²
TIFF (LZW) 8LIEVEEEOEaEÁ
Ç™ÇÇÄEsENE EEC%a@ÇEÇzÇ%Ç...ÇÖIKóvÇ-ÇIAB

（図. 9）*dnaK*破壊株の相補株の熱感受性

*dnaK*破壊株において ILY の分泌が影響を受ける事が明らかになったので、*ily* 遺伝子発現制御機構も並行して解析した。なお、*ily* プロモーター上流領域には 59bp の Inverted Repeat (IR) 領域や 22bp の Direct Repeat (DR) 領域が存在しており（図. 10）、これら領域が発現制御に関わっている可能性が考えられる。そこでまず、これら領域の欠失変異株を作製し、それら株の培養上清の溶血活性を測定した（図. 11）。

QuickTimey C²
TIFF (LZW) 8LIEVEEEOEaEÁ
Ç™ÇÇÄEsENE EEC%a@ÇEÇzÇ%Ç...ÇÖIKóvÇ-ÇIAB

（図. 10）*ily* 遺伝子またプロモーター上流領域と欠失領域

その結果、ILY 弱産生株である NCD02227 の IR や DR 領域を欠失株で有為な ILY の分泌量の増加を確認した。特に、IR 領域の欠損株では野生株と比較して 20 倍以上増加した。よって、ILY の発現は IR 領域で強く抑制されていることが明らかになった。今後、これらの領域と相互作用する因子の同定と、この因子の活性が DnaK により制御されているかについて解析を進める予定である。

QuickTimey C2
TIFF (LZW) 8LIEEVEcEOEaEÄ
Ç™ÇçÄEsENE EEC%a@CEÇZÇ%Ç...ÇÖIKöVÇ-ÇIAB

(図. 11) プロモーター上流領域と欠失株の溶血活性

上記した研究に加え、まだ謎が多い連鎖球菌の DnaK シャペロンシステムの細胞内での機能を明らかにする目的で、大腸菌の *dnaK* 破壊株を用いた解析を行った。なお、ホモロジー検索の結果、*S. intermedius* の DnaK シャペロンシステムは、大腸菌のそれと GrpE で 52 %、DnaK で 71 %、DnaK で 61 % の相同性であった。まず、*S. intermedius* の *grpE-dnaK-dnaJ*、*grpE-dnaK*、*dnaK-dnaJ* オペロンを発現ベクターにクローニングし、大腸菌 *dnaK* 破壊株の温度感受性を相補出来るかどうかについて解析した (図. 12)。その結果、*grpE-dnaK-dnaJ* オペロン全てを保有するプラスミド pZE13 *EKJ* を保有する株のみ高温条件下 (42°C) で生育が可能であった (図. 12)。このことから、SI の DnaK シャペロンシステムは、大腸菌内で機能するが、大腸菌の DnaJ や GrpE は SI の DnaK を活性化することは出来ないことが明らかになった。

QuickTimey C2
TIFF (LZW) 8LIEEVEcEOEaEÄ
Ç™ÇçÄEsENE EEC%a@CEÇZÇ%Ç...ÇÖIKöVÇ-ÇIAB

(図. 12) 大腸菌 *dnaK* 破壊株の温度感受性の *S. intermedius* DnaK シャペロンシステムによる相補

このように、*S. intermedius* の DnaK シャペロンシステムが、大腸菌内で機能することが明らかになったので、次に大腸菌の *rpoH* 遺伝子破壊株を用いて *S. intermedius* の DnaK シャペロンシステムのタンパク質凝集阻害活性について解析した。なお、熱ショック転写因子 σ^{32} をコードする *rpoH* 破壊株は分子シャペロンやストレス誘導型プロテアーゼの著しい減少により高温下 (42°C、1 時間) で細胞内に多量の凝集タンパク質が蓄積する (図. 13)。しかしながら、*rpoH* 破壊株に pZE13 *EKJ* を形質転換し 50 μ M の IPTG 存在下で熱処理を行うと凝集タンパク質の蓄積がほとんど起こらなかった (図. 13)。この結果

から、*S. intermedius* の DnaK シャペロンシステムは大腸菌の DnaK シャペロンシステムと同様に細胞内で強い凝集阻害効果を発揮する事が可能であることが分かった。

QuickTimey C2
TIFF (LZW) 8LIEEVEcEOEaEÄ
Ç™ÇçÄEsENE EEC%a@CEÇZÇ%Ç...ÇÖIKöVÇ-ÇIAB

(図. 13) *S. intermedius* DnaK シャペロンシステムの凝集阻害活性

グラム陽性菌の連鎖球菌とグラム陰性菌の大腸菌の熱ショック応答機構は異なる。*S. intermedius* などの連鎖球菌は、熱ショック遺伝子プロモーター領域に存在する CIRCE オペレーターに結合している HrcA リプレッサーが高温環境下で失活することによりその発現が活性化される。なお、失活した HrcA は DnaK シャペロンシステムにより再活性化される。一方、グラム陰性の大腸菌の場合は、DnaK シャペロンシステムが、 σ^{32} の活性を抑制し FtsH プロテアーゼによる分解を助けている。しかしながら、高温などのストレスで変性したタンパク質が DnaK シャペロンシステムと結合すると σ^{32} が DnaK と解離し RNA ポリメラーゼと結合する。これによって、熱ショック遺伝子の発現が活性化される。このように、*S. intermedius* の熱ショック応答機構は大腸菌と異なる。しかしながら、*S. intermedius* の DnaK シャペロンシステムは大腸菌 *dnaK* 破壊株で蓄積する σ^{32} の分解と GroEL などの熱ショックタンパク質の蓄積を抑制する事が可能であった (図. 14)。この結果は、DnaK シャペロンシステムや熱ショック応答制御機構の進化を考える上で非常に興味深い。

QuickTimey C2
TIFF (LZW) 8LIEEVEcEOEaEÄ
Ç™ÇçÄEsENE EEC%a@CEÇZÇ%Ç...ÇÖIKöVÇ-ÇIAB

(図. 14) *S. intermedius* DnaK シャペロンシステムによる細胞内タンパク質凝集阻害

我々は、本課題を遂行することによりストレス誘導型シャペロンやプロテアーゼによ

連鎖球菌の病原因子発現制御機構に関する様々な新しい知見を得る事に成功した。さらに本課題に関する研究を進める事で、*S. intermedius*の病原因子発現制御機構について明らかにして行く計画である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0件)

[学会発表] (計 9件)

(1) *Streptococcus intermedius*の病原性発現調節機構の解析, 友安 俊文, 廣島 理樹, 石田 俊輔, 小南 章, 田端 厚之, 長宗 秀明, 第 16 回 Lancefield レンサ球菌研究会, 2007 年 6 月 1 日 熊本

(2) Function of DnaK in *Streptococcus intermedius*, Toshifumi Tomoyasu, Atsushi Tabata and Hideaki Nagamune, 2007 World conference of stress, 23-26 August 2007, Budapest, Hungary

(3) *Streptococcus intermedius*が生産するヒト特異的細胞溶解毒素インターメディシンの発現調節, 第 30 回日本分子生物学会年会, 廣島 理樹, 友安 俊文, 田端 厚之, 長宗 秀明, 2007 年 12 月 13 日 横浜

(4) 連鎖球菌 (*S. intermedius*) ClpP 破壊株の作成とその表現型の解析, 友安 俊文, 田端 厚之, 長宗 秀明, 第 81 回日本細菌学会総会, 2008 年 3 月 24 日 京都

(5) ヒト特異的細胞溶解毒素インターメディシンの発現調節機構の解析, 廣島 理樹, 友安 俊文, 小南 章, 田端 厚之, 長宗 秀明, 第 17 回 Lancefield 連鎖球菌研究会, 2008 年 7 月 25 日 徳島

(6) *Streptococcus intermedius*が保有するヒト特異的細胞溶解毒素インターメディシンのコードする *ily* 遺伝子のプロモーター領域の解析, 廣島 理樹, 友安 俊文, 小南 章, 田端 厚之, 菊池 賢, 佐々木 崇, 馬場 理, 平松啓一, 長宗 秀明, 第 31 回日本分子生物学会年会, 2008 年 12 月 12 日 神戸

(7) *Streptococcus intermedius dnaK* 破壊株の表現型の解析, 友安 俊文, 長門 薫, 田端 厚之, 長宗 秀明, 第 31 回日本分子生物学会年会, 2008 年 12 月 12 日 神戸

(8) *Streptococcus intermedius* のストレス誘

導型シャペロン DnaK の機能解析, 友安 俊文, 田端 厚之, 長宗 秀明, 第 82 回日本細菌学会総会・2009 年 3 月 12 日 名古屋

(9) カタボライト抑制因子 CcpA によるヒト特異的細胞溶解毒素インターメディシンの発現調節機構の解析, 友安 俊文, 田端 厚之, 菊池 賢, 佐々木 崇, 馬場 理, 平松 啓一, 長宗 秀明, 第 82 回日本細菌学会総会・2009 年 3 月 14 日 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

友安 俊文

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・准教授

研究者番号：20323404

(2) 研究分担者

田端 厚之

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・助教

研究者番号：10432767

長宗 秀明

徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・教授

研究者番号：40189163