

平成 21年 5月 1日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19791343

研究課題名（和文） レンサ球菌溶血毒素の新規機能検索

研究課題名（英文） Analysis of the function of streptococcal heamolysin

研究代表者

中田 匡宣 (NAKATA MASANOBU)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：90444497

研究成果の概要：咽頭炎や膿痂疹の起因菌として知られる A 群レンサ球菌は様々な病原因子を産生する。同菌から産生される溶血毒素の一種であるストレプトリジン S (SLS) について新規機能を検索した結果、SLS が細菌集合体であるバイオフィルムの形成に関与することが示唆された。さらに、SLS をコードするゲノム領域に血清型特異的に存在する転写調節因子が SLS の転写に影響を与えることが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	0	2,400,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	270,000	3,570,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：A 群レンサ球菌，溶血毒素

1. 研究開始当初の背景

(1) A 群レンサ球菌が産生する溶血毒素

A 群レンサ球菌 (Group A streptococci; GAS) はヒトを唯一の宿主とし、初発感染部位と考えられる皮膚あるいは咽頭へ膿痂疹や咽頭炎を惹起する。また、二次性続発疾患としてリウマチ熱や急性糸球体腎炎を起こす場合がある。さらに、壊死性筋膜炎やシヨ

ック症状を伴う劇症型 A 群レンサ球菌感染症に罹患した場合、高率での死亡例が報告されている。これら GAS 感染症の診断として主に用いられるのは血液寒天培地上での溶血環形成である。しかし、この溶血環形成を担うストレプトライシン S (SLS) の溶血機構は現在に至るまで依然として解明されていない。溶血活性陽性を示す SLS の精製は困難を極め、

GAS 菌体存在下もしくはアルブミン、リポタ
イコ酸、非イオン性界面活性剤、RNA core 等
の安定化剤の存在下においてのみ部分精製
されてきた。1990 年代後半、分子生物学的ア
プローチにより SLS をコードするゲノム領域
が明らかにされ、9 つの遺伝子 (*sagA-sagI*)
からなる領域がこの溶血性に必要十分であ
ることが証明された。この領域の先頭に位置
する *sagA* は SLS の構造遺伝子であり 53 アミ
ノ酸から構成される前駆体タンパクをコー
ドしている。またグラム陽性菌が産生するバ
クテリオシンファミリーに頻繁に認められ、
シグナルペプチダーゼ切断部位と推定され
るダブルグリシンモチーフを持つ。SLS は
種々の哺乳類細胞への細胞毒性を示し、マウ
ス感染モデルにおいて好中球からの抗貪食
作用、炎症反応促進などに関与することが示
唆されている。

(2) A 群レンサ球菌のゲノム配列

2001 年に初めて GAS の全ゲノム配列が発表
されて以来、2007 年には 10 種の M 血清型株
からの全ゲノム配列が報告されている。ゲノ
ム比較解析により、主なゲノム間の遺伝子構
成の相違はプロフェージ等の外来性モバイ
ルエレメントを含む領域に認められる。一方、
ゲノムの遺伝子構成の 85%以上は共通して
おり、コアゲノムを構成することが判明して
いる。

2. 研究の目的

レンサ球菌では、バクテリオシンの産生と
輸送を司るシグナリングネットワークと、低
分子ペプチドをシグナルとするクオラムセ
ンシングシステムとの関連が示唆されてい
る。SLS がクオラムセンシングシステムに関
与する可能性が考えられたため、SLS がオー
トインデューサーとして機能するかを検討

し、バイオフィーム形成との関連について明
らかにすることを目的とした。さらに、SLS
をコードするゲノム領域の遺伝子構成に多
様性が認められるかを比較し、新たな SLS 発
現に関与する因子の検索を行った。

3. 研究の方法

(1) *sag* 領域の遺伝子構成の比較

既報のゲノム配列情報から *sag* 領域の DNA
配列を抽出し、遺伝子構成を比較した。各 M
型株のジーンバンク登録番号と菌株名を以
下に示す。M1, NC_002737, SF370; M2,
NC_008022, MGAS10270; M3, NC_004606,
SSI-1; M4, NC_008024, MGAS10750; M5,
NC_009332, Manfredo; M6, NC_006086,
MGAS10394; M12, AF447492, A735; M18,
NC_003485, MGAS8232; M28, NC_007296,
MGAS6180; M49, AAFV00000000, 591.

(2) *sagA* 欠失株の作製

M1 型臨床分離株を親株として、温度感受性
シャトルベクターを用い、下流遺伝子の発現
に影響を与えない in-frame *sagA* 欠失株の作
製を行った。*sagA* 欠失を確認するため、血液
寒天培地上での溶血能の観察と PCR を行った。
また、組換えによる欠失部位の近辺の配列を
決定し、欠失の正否を検討した。

(3) *sagA-luc* レポーター株の作製と経時的 *sagA* 転写活性の検討

ルシフェラーゼ遺伝子を *sagA* 直下に組み
込んだレポーター株を作製した。ルシフェラ
ーゼの基質であるルシフェリンを添加し、生
じた化学発光の強度を測定することにより、
sagA の転写活性を経時的に測定した。

(4) コンディショニングメデイウムを用いた、 *sagA* 転写活性の検討

野生株および *sagA* 欠失株の一晩培養液を遠心分離およびフィルター処理することにより、コンディションメディウムを調整した。野生株および *sagA* 欠失株からのコンディションメディウムを用いて一晩培養後の野生株を希釈した後、培養を行い、経時的に細胞を回収し total RNA を採取した。この total RNA から cDNA を合成後、リアルタイム PCR により、*gyrA* をコントロールとして、*sagA* の mRNA レベルを検討した。さらに、コンディションメディウムを用いて一晩培養後の *sagA-luc* レポーター株を希釈し、経時的にレポーターアッセイを行った。

(5) GAS の上皮細胞に対する付着試験

ヒト咽頭上皮細胞 HEp-2 の細胞数に対して、GAS 菌体が 1:10 になるように培養液へ添加し、2 時間感染させた。その後、DMEM 培地で 3 度洗浄を行い、滅菌蒸留水で懸濁した。この懸濁液を寒天平板培地へ播種し、37°C で一晩培養を行った後、生育したコロニー数から付着率を算定した。侵入試験では、感染後、ペニシリン含有 DMEM 培地中で 2 時間培養し、付着試験と同様の操作を行い、侵入率を算定した。

(6) バイオフィーム試験

一晩培養液を C medium (0.5% Proteose Peptone #3 ; 1.5% yeast extract ; 10 mM K_2HPO_4 ; 0.4 mM $MgSO_4$; 17 mM NaCl, pH 7.5) で 10 倍希釈し、24 穴ポリスチレンプレートへ播種した。37°C で 24 時間培養後、PBS で 2 度洗浄し、クリスタルバイオレットにより、ポリスチレンプレート上に形成されたバイオフィームを染色した。PBS で洗浄後、1% SDS 溶液に懸濁し、吸光度 (A_{540}) を測定した。

4. 研究成果

既報のゲノム配列情報から *sag* 領域の遺伝

子構成を比較した結果、血清型間で遺伝子構成に違いが認められた。M1, M4, M12, M28, および M49 型では、転写調節因子である RALP3 と推定表層タンパクをコードする *epf* を含む遺伝子群が同定された。これらの遺伝子群は、M2, M3, M5, M6, および M18 株では認められなかった。RALP3 は、線毛産生を担うゲノム領域に認められる転写因子のホモログであり、この遺伝子の欠失により、上皮細胞への菌体付着能の減少と溶血活性の上昇が認められた。この結果から、RALP3 は付着因子や *sagA* の転写活性に影響を与えることが示唆された。

SLS がオートインデューサーとして機能するかを、野生株および *sagA* 欠失株の一晩培養液から調整した培地を用いて、*sagA* 転写活性への影響をレポーターアッセイとリアルタイム PCR により測定したが、有意な差は認められなかった。一方、SLS のバイオフィーム形成への関与を検討した結果、野生株と比較して、*sagA* 欠失株のバイオフィームの形成能は低下した。そして、*sagA* 欠失株への *sagA* の再導入により、部分的にバイオフィーム形成能は回復した。この結果から、SLS はバイオフィーム形成に関与する可能性が示唆された。また、SLS がオートインデューサーとして、バイオフィーム形成促進に働く遺伝子群の転写調節に関与する可能性が推察された。

以上の結果は、SLS の発現機構と病態発症機構の一端を解明し、GAS 感染症のさらなる理解へ寄与すると考えられる。今後、さらに詳細なトランスクリプトーム解析や組換え SLS を用いた解析により、SLS による細菌間シグナル伝達機構の存在が明らかとなる可能性がある。

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 4 件)

- ① Nakata M, Köller T, Moritz K, Ribardo D, Jonas L, McIver KS, Sumitomo T, Terao Y, Kawabata S, Podbielski A, and Kreikemeyer B., Mode of expression and functional characterization of FCT-3 pilus region encoded proteins in the *Streptococcus pyogenes* serotype M49. *Infect Immun* 77:32-34. 2009. 査読有
- ② Köller T, Nelson D, Nakata M, Kreutzer M, Fischetti VA, Glocker MO, Podbielski A, Kreikemeyer B., PlyC, a novel bacteriophage lysin for compartment-dependent proteomics of group A streptococci. *Proteomics* 8:140-148. 2008. 査読有
- ③ Klenk M, Nakata M, Podbielski A, Skupin B, Schrotten H, Kreikemeyer B., *Streptococcus pyogenes* serotype-dependent and independent changes in infected HEp-2 epithelial cells. *ISME J* 1:678-692. 2007. 査読有
- ④ Kreikemeyer B, Nakata M, Köller T, Hildisch H, Kourakos V, Standar K, Kawabata S, Glocker MO, and Podbielski A., The *Streptococcus pyogenes* serotype M49 Nra-Ralp3 transcriptional regulatory network and its control on virulence factor expression from the novel ERES pathogenicity region. *Infect Immun* 75: 5698-5710. 2007. 査読有

[学会発表] (計 14 件)

- ① Isoda R, Terao Y, Nakata M, Sumitomo T, and Kawabata S. Neonatal exposure induced commensal-like immune-response against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in mice. 87th

General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research. April 1-4, 2009. Miami, USA.

- ② 中田匡宣, 住友倫子, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌線毛の温度感受性発現機構の解析. 第 82 回日本細菌学会総会. 2009 年 3 月 12-14 日, 名古屋市.
- ③ 住友倫子, 中田匡宣, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌の上皮バリア突破機構に関する解析. 第 82 回日本細菌学会総会. 2009 年 3 月 12-14 日, 名古屋市.
- ④ 住友倫子, 中田匡宣, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌の上皮バリア突破機構に関する解析. 第 6 回感染症沖縄フォーラム. 2009 年 2 月 12-14 日, 沖縄県中頭郡.
- ⑤ 中田匡宣, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌が産生する線毛の機能解析. 第 50 回歯科基礎医学会学術大会. 2008 年 9 月 23 日-25 日, 東京都.
- ⑥ 住友倫子, 中田匡宣, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌の上皮バリア突破機構に関する解析. 第 17 回 Lancefield レンサ球菌研究会. 2008 年 7 月 25-26 日, 徳島市.
- ⑦ Nakata M, Fiedler T, Köller T, Stander K, Kawabata S, Podbielski A, and Kreikemeyer B. The Nra-Ralp3 transcriptional regulatory network of *Streptococcus pyogenes* serotype M49: control of the novel ERES pathogenicity region. 17th Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. June 22-26, 2008. Porto Heli, Greece.
- ⑧ Nakata M, Köller T, McIver KS, Kawabata S, Podbielski A, and Kreikemeyer B. Role of the *Streptococcus pyogenes* serotype M49 FCT-3 region encoded pilus in virulence. 17th Lancefield

International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. June 22-26, 2008. Porto Heli, Greece.

- ⑨ 中田匡宣, 住友倫子, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌線毛の機能解析. 第 81 回日本細菌学会総会. 2008 年 3 月 24-26 日, 京都市.
- ⑩ 中田匡宣, 住友倫子, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌線毛の機能検索と発現機構の解析. 第 6 回感染症沖縄フォーラム. 2008 年 2 月 14-16 日, 沖縄県中頭郡.
- ⑪ 中田匡宣, 住友倫子, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌 pilus 発現機構の解析. 第 60 回日本細菌学会関西支部総会. 2007 年 11 月 10 日, 吹田市.
- ⑫ Nakata M, Ribardo DA, McIver KS, Podbielski A, Kreikemeyer B, and Kawabata S. Role of the *Streptococcus pyogenes* FCT-region components in pilus assembly and virulence. The 7th Awaji International Forum on Infection and Immunity. September 1-5, 2005. Higashiura, Hyogo, Japan.
- ⑬ 寺尾豊, 山口雅也, 中田匡宣, 浜田茂幸, 川端重忠. *Streptococcus pneumoniae* に対するキメラ免疫グロブリン製剤の構築. 第 49 回歯科基礎医学会学術大会. 2007 年 8 月 30-31 日, 札幌市.
- ⑭ Nakata M, Ribardo DA, McIver KS, Kawabata S, Podbielski A, and Kreikemeyer B. Role of *Streptococcus pyogenes* FCT-region sortase and other components in pilus assembly and virulence. 107th General Meeting of American Society for Microbiology. May 21-25, 2007. Toronto, Canada.

[図書] (計 3 件)

- ① 中田匡宣, 寺尾豊, 川端重忠. レンサ球菌感染症に対する免疫療法の可能性. (口腔での免疫—最近の進歩と疾患). 炎症と免疫., 先端医学社. 15 : 701-706. 2007. 査読無し
- ② 寺尾豊, 中田匡宣, 住友倫子, 磯田竜太郎, 川端重忠. 病原性レンサ球菌の病原因子の機能解析. 生命歯科医学のカッティング・エッジ (米田俊之編), 大阪大学出版会. 68-78, 2008. 査読無し
- ③ 川端重忠, 寺尾豊, 中田匡宣. A 群レンサ球菌の病原性発現に関する分子機構. 感染・炎症・免疫., 医薬の門社. 38 : 2-13. 2008. 査読無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 匡宣 (NAKATA MASANOBU)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号 : 90444497

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者