

平成 22 年 5 月 1 日現在

研究種目： 若手研究(B)
 研究期間： 2008 ～ 2009
 課題番号： 20790332
 研究課題名(和文) ブドウ球菌の情報伝達シグナル物質生合成遺伝子の病原性に対する基礎的・臨床的解析
 研究課題名(英文) Clinical and basic analysis of biosynthetic genes for staphylococcal signaling substances for virulence
 研究代表者
 山田 景子 (Keiko Yamada)
 名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
 研究者番号： 00402561

研究成果の概要(和文)：情報伝達シグナル物質 cyclic-di-GMP はバイオフィーム形成に抑制的影響を与えた。類似構造を持つ cyclic-di-AMP 合成遺伝子を同定し生合成能力および必須遺伝子であることを見出した。いずれの分子も遊離菌体内濃度は厳密にコントロールされている可能性が示唆された。カテーテル感染事例のブドウ球菌属細菌が 26 株収集され、バイオフィーム産生量は健康人由来菌株と平均量では変わらず、菌体外 DNA、タンパク質、多糖体など構成成分については菌種や由来に寄らず、菌株ごとに偏りがあった。

研究成果の概要(英文)：Cyclic-di-GMP affected suppressively on biofilm formation. A biosynthetic gene of cyclic-di-AMP became identified and was confirmed its function. It is essential in *Staphylococcus aureus*. Internal concentration of cyclic-di-GMP and cyclic-di-AMP did not affected by plasmid-mediated overexpression, presumed the strict regulation system on the production of these molecules. Amount of biofilm formation of clinical isolates associated with catheter infection varied among strains and not related with their origins. Biofilm of some strains were affected by DNase, Proteinase K or Dispersin B indicated that components of biofilm also differ among strains.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：セカンドメッセンジャー、情報伝達シグナル物質、cyclic-di-GMP、cyclic-di-AMP、バイオフィーム、カテーテル感染、ブドウ球菌

1. 研究開始当初の背景

細菌のバイオフィームは病原因子であり中でもブドウ球菌はバイオフィームを作る

代表的な病原体である(図1)。特にカテーテルなど人工挿入物に関連した感染では高頻度に黄色ブドウ球菌と表皮ブドウ球菌が検

出されることが知られている(O'Gare et al. J. Med. Microbiol. 50: 582-7, 2001)。これまでその産生にどのような環境因子が関わっているのかはあまりわかっていなかった。

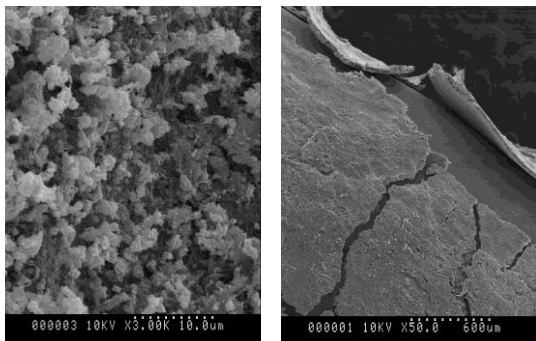


図 1. カテーテルの先に形成されたバイオフィーム

バイオフィーム形成には菌体濃度を感知する細菌間の情報伝達が重要であるが、ブドウ球菌において良く知られている *agr* system は黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成には関与していないことがわかっており、別の菌体間情報伝達システムが存在すると考え、近年、グラム陰性菌で注目され始めた新しい低分子細菌間情報伝達物質 Bis-(3'-5')-cyclic dimeric guanosine monophosphate (cyclic-di-GMP) に注目した。cyclic-di-GMP は新たな細菌セカンドメッセンジャー分子として普遍的な働きをしていることが見だされている (Camilli et al. Science 311: 1113-16, 2006)。cyclic-di-GMP は図 2 のように c-GMP の 2 量体様構造の化学的に安定な物質である。cyclic-di-GMP 合成を担う蛋白はアミノ酸配列に GG(D/E)EF モチーフを持ち、di-guanylate cyclase 活性を示す。このモチーフは多種類の細菌において見られる。ただし、グラム陽性細菌ではほとんど解析がなされていない。

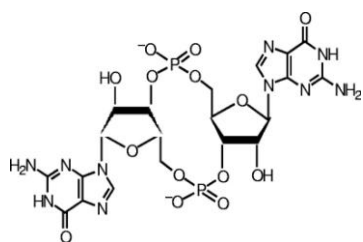


図 2. cyclic-di-GMP

さらに、申請時には報告がなかったがその後類似のセカンドメッセンジャーとしてその可能性が示唆された cyclic di(3'→5')-adenylic acid (c-di-AMP、図 3) (Römling U. Sci Signal. 2008 Aug 19;1(33):pe39.) についても解析を行った。

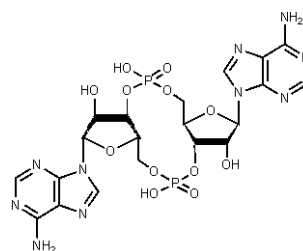


図 3. cyclic-di-AMP

2. 研究の目的

情報伝達シグナル物質合成遺伝子の機能についての基礎的検討とバイオフィーム関連疾患から得られた臨床分離株でのバイオフィーム産生およびの情報伝達シグナル物質合成遺伝子との関連の評価をおこなう。

3. 研究の方法

(1) cyclic-di-GMP および cyclic-di-AMP の生合成遺伝子のゲノム内モチーフ検索、その遺伝子の欠質株の作製、過剰産生株の作製、酵素活性の測定、遺伝子の生理的、機能的役割について考察する。

(2) 名古屋大学医学部附属病院検査部と連携し、バイオフィーム形成と関連があると考えられる疾患 (カテーテル関連感染症・心内膜炎・人工関節関連感染症など) から分離されたブドウ球菌を収集し、健常人由来菌株との比較を行う。二酸化炭素濃度変化およびヒト血清の有無の違いなどの環境刺激によるバイオフィーム形成を評価する。cyclic-di-GMP 合成遺伝子の発現量を RT-PCR により比較を行う。また、バイオフィームの要因物質として、菌体外 DNA およびタンパク質の関与を DNase、Proteinase K により変化量を測定する。

4. 研究成果

(1) 情報伝達シグナル物質合成遺伝子について

① cyclic-di-GMP 合成遺伝子について
本研究の開始までに黄色ブドウ球菌 N315 株のゲノム情報から cyclic-di-GMP を生合成する GG(D/E)EF モチーフを持つタンパク質を検索し SA0701 遺伝子と推定しこの遺伝子のノックアウト株の作成を行った。黄色ブドウ球菌 MS2507 における欠質株ではバイオフィーム形成が抑制されることを見出した(図 4)。さらに、化学合成した cyclic-di-GMP を MS2507 野生株に対し外から添加すると高濃度になるにつれてバイオフィーム形成を抑制することから、ネガティブフィードバックを起こすことが可能であることが分かった。これは、バイオフィームが化合物添加により外部から制御できることを示唆しており、新しい薬剤開発につながる可能性があると考えられる。生合成遺伝子 SA0701 欠失株にお

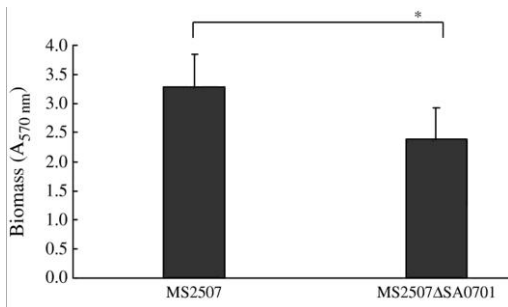


図 4. SA0701 遺伝子欠失株のバイオフィーム産性能低下 *; p<0.05

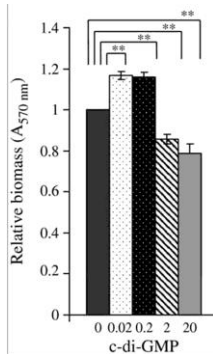


図 5. SA0701 遺伝子欠失株に対する cyclic-di-GMP 添加によるバイオフィームの一部回復 *P<0.05; **P<0.01

いてバイオフィーム形成能は低下するが、低濃度の cyclic-di-GMP を添加することによってバイオフィーム系性能は一部回復した(図 5)。よって、SA0701 遺伝子の cyclic-di-GMP 合成能力がバイオフィーム形成に重要であると考えられた。

黄色ブドウ球菌においてはレセプタータンパク質の存在はまだ不明であるが、菌体外の cyclic-di-GMP の取り込み経路があり菌体表面あるいは内部に cyclic-di-GMP と結合する分子があることが示唆される。グラム陰性細菌、とくに鞭毛を持つバクテリアでは RxxD からなる PilZ とよばれるモチーフが重要であることがわかっているがモチーフ検索エンジンである Pfam

(<http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/>) においては、このモチーフは黄色ブドウ球菌では見つからなかった。枯草菌とビブリオ菌において cyclic-di-GMP は riboswitch として働くことが最近になって明らかとなり (Sudarsan et al. Science 321: 411-413, 2008)、黄色ブドウ球菌におけるターゲットが何か、興味を持たれる点である。

大腸菌において黄色ブドウ球菌の cyclic-di-GMP 合成遺伝子の発現株を作成し *in vitro* での生合成を試みたが、コードするタンパク質は膜タンパク質であり発現ベクターを組み込んだ大腸菌は増殖抑制が見られ精製の困難さは解消できなかった。ベクターをいくつか変えて試したが安定した発現系を得ることができなかった。またわずかに得られた可溶化タンパク質を濃縮して用いても凝集が起り、酵素活性を測定するに至

らなかった。現時点では、酵素が失活しているのか活性がそもそもないのか結論が出せていない。親株と SA0701 遺伝子欠失株との菌体内 cyclic-di-GMP の測定を HPLC により行い比較したが菌体内低分子核酸抽出サンプルには cyclic-di-GMP の明らかなピークは観察できなかった(図 6)。予想される保持時間の流出液を濃縮しても変わらなかった。

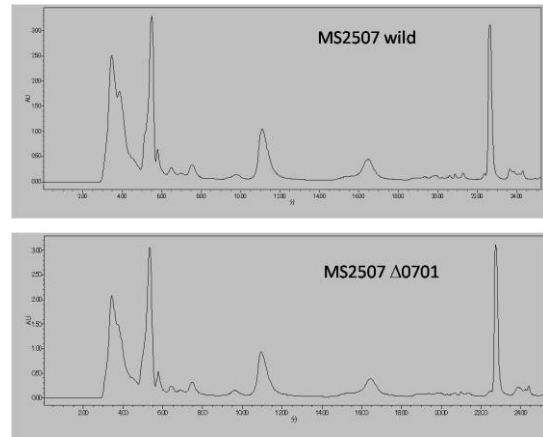


図 6. MS2507 株およびその SA0701 遺伝子欠失株の菌体内低分子核酸の HPLC 解析

そこで SA0701 遺伝子過剰発現系の構築を行い菌体内 cyclic-di-GMP の検出を試みた。メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 3 株についてシャトルベクターである pHY300PLK に SA0701 遺伝子を組み込み、遺伝子発現量の増加を real-time PCR にて確認した(図 7)。24-70 倍に遺伝子の発現量は増加していた。しかしながら、これらの菌株の菌体内核酸の HPLC 解析では、ピークプロファイルに変化がなく、cyclic-di-GMP の存在は確認できなかった。*in vitro* で生合成、*in vivo* で生合成が確認できず、ターゲット分子の探索に至っていない。

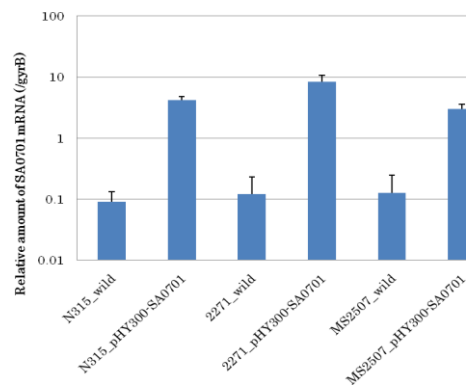


図 7. SA0701 遺伝子の過剰発現株の作製

②cyclic-di-AMP 合成遺伝子について diadenylate cyclase (DAC) ドメインが cyclic-di-AMP 合成を担っているとされ、この DAC ドメインをもつ遺伝子を黄色ブドウ球菌について検索したところ、SA1967 遺伝子が

候補として抽出された。この遺伝子産物は枯草菌の YbbP と相同性を示した。この遺伝子は報告されているすべての黄色ブドウ球菌ゲノム中において 100% の相同性を示し、表皮ブドウ球菌においても 92.5% の高い相同性を示し保存性が高かった。大腸菌において *SA1967* のコードするタンパク質 YbbP の発現系を構築し、タンパク質の精製、*in vitro* における活性を調べた。組換え YbbP と ATP を 18 時間反応させ、産物を HPLC によって解析したところ、pH8.0 ではほとんど産生されないのに対し、pH9.2 では活性が上昇した(図 8)。このピークを分取し MALDI-TOF MS により cyclic-di-AMP であると同定した。枯草菌では *ybbP* 遺伝子がアルカリで誘導されてくるのが指摘されており、黄色ブドウ球菌における新たな pH シグナルの受容体としての役割があるのかが今後の研究課題であろう。

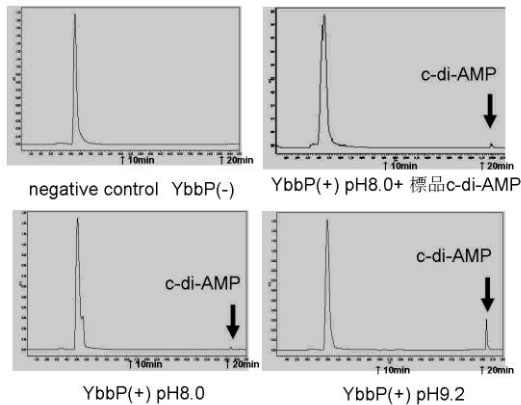


図 8. *SA1967* 遺伝子の diadenylate cyclase 活性は pH 依存性

この *SA1967* 遺伝子の欠失株の作製を試みたが、困難であった。保存性が高いことから必須遺伝子である可能性があるかと判断し、DNAzyme を用いた遺伝子発現の down regulation を行った。*SA1967* に特異的な配列のものと同配列をランダムに入れ換えた negative control DNA を electroporation によって導入した。20h 培養後の CFU (colony forming unit) を計測し、菌の生存に対する効果を評価した。図 9 に示すとおり、*SA1967* に特異的な配列の DNAzyme を導入することで生菌数は 60% ほどに減少し、生存に必須の遺伝子であることが強く示唆された。菌体内 cyclic-di-AMP の検出を行ったところ、分画脱塩濃縮サンプルでは重ねうちの標品と重なるピークがあり(図 10)、菌体内 cyclic-di-AMP の存在が示唆された。ただし、近傍のピークと分離が難しいことから質量分析には至らず HPLC の条件検討が今後必要である。

(2) 臨床分離株におけるバイオフィーム形成能の評価及びバイオフィームに及ぼす環境因子・構成成分の検討について

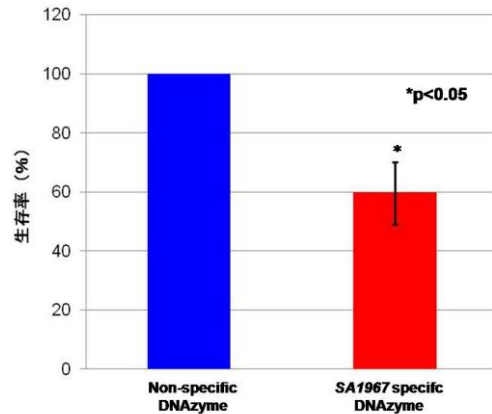


図 9. *SA1967* 遺伝子の down regulation による生存数の低下

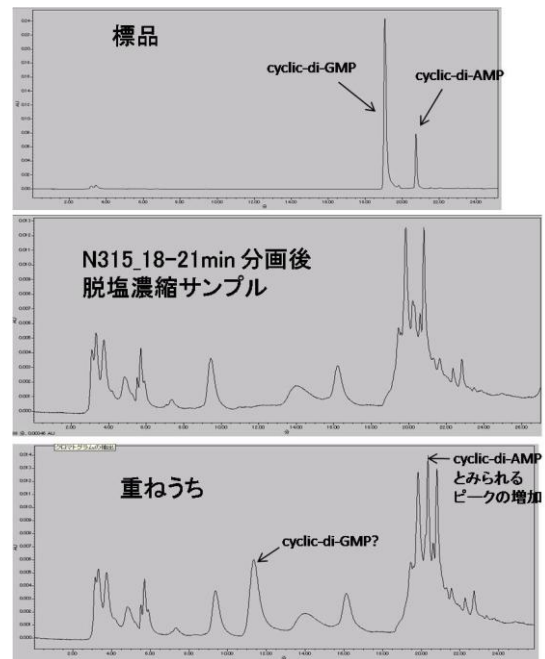


図 10. 菌体内核酸の脱塩濃縮と標品との重ねうち

名古屋大学医学部附属病院においてカテーテル感染事例で分離されたブドウ球菌株を 2007 年 4 月から 2009 年 1 月まで収集した。臨床的に挿入部位と血流から同じ菌が分離されていること、カテーテル抜去後に臨床的敗血症(熱と寒気)が改善すること等の要件を満たしたものは 26 株あり、黄色ブドウ球菌 12 株(うち MRSA 5 株, MSSA 7 株)、表皮ブドウ球菌 12 株(うち MRSE 10 株, MSSE 2 株)、その他 *S. hominis* 1 株、*S. haemolyticus* 1 株であった。

① バイオフィーム産生量の評価

それら菌株のバイオフィーム産生量を大気下および CO₂ 存在下で測定しサフラニン染色により定量した(図 11A)。ヒト血清をコートする方法では過去の論文に倣いクリスタルバイオレット染色で測定した(図 11B)。

図11B. biofilm formation of *Staphylococcus* genus with human plasma

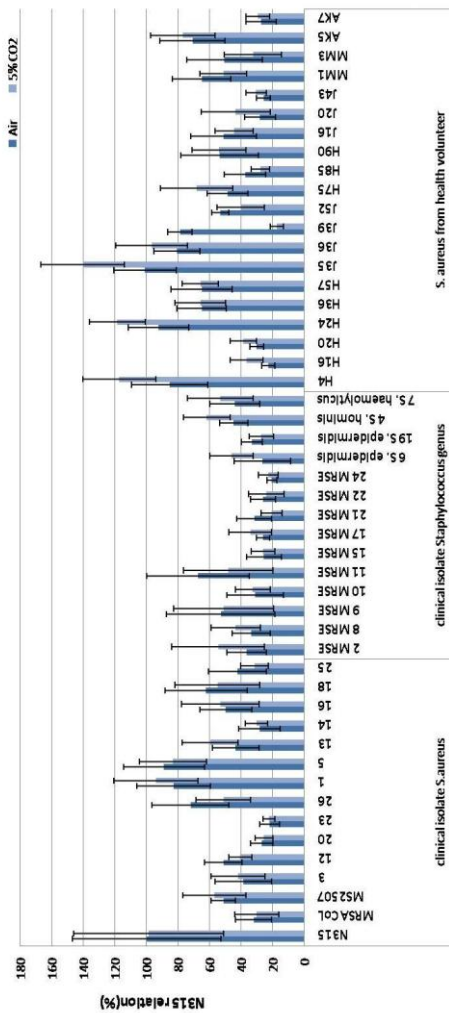


図11A. biofilm formation of *Staphylococcus* genus by safranin stain

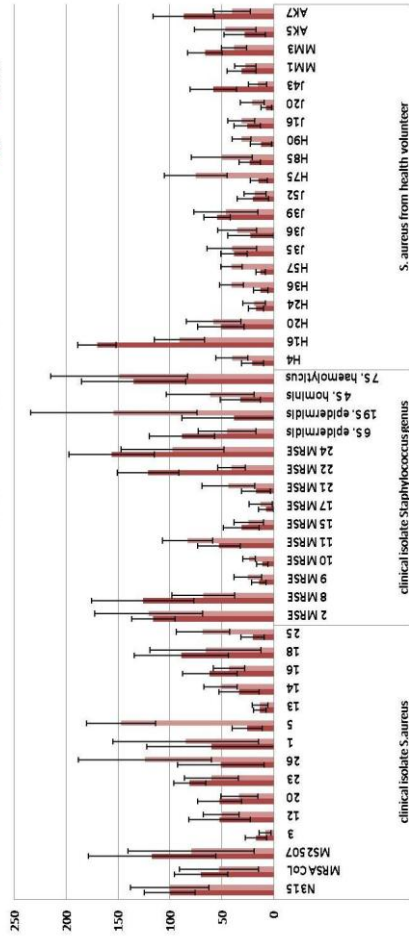
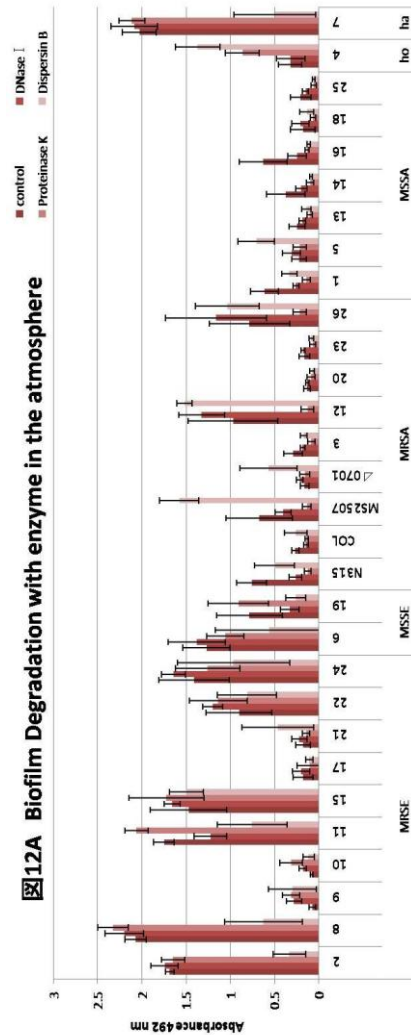


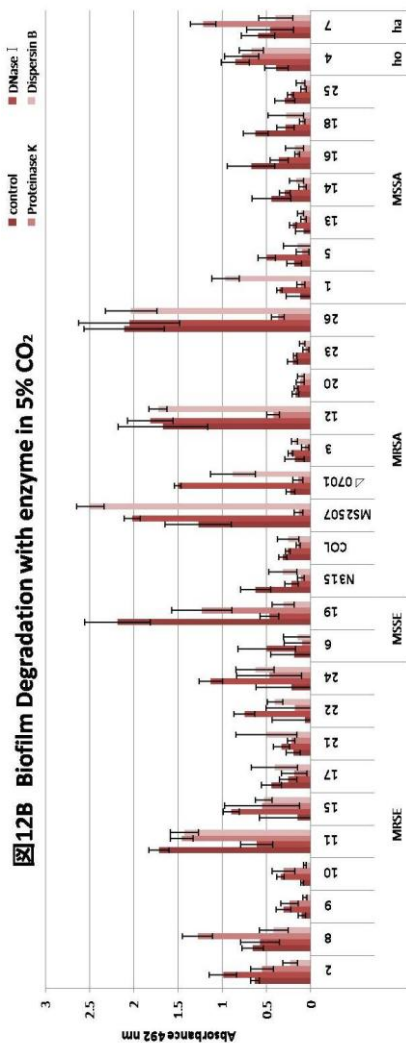
図12A Biofilm Degradation with enzyme in the atmosphere



これらの結果から、平均化した場合に黄色ブドウ球菌が表皮ブドウ球菌よりバイオフィーム産生量が多かった($p=0.00037$)ものの、カテーテル感染由来株と健康人由来株とは差がなかった。興味深いことには、CO₂存在下での産生量が激増している菌株が複数あり、これらについては環境刺激のシグナル伝達と宿主での感染メカニズムとの関連が今後の課題である。

② バイオフィーム構成成分の評価
臨床分離株のバイオフィーム産生に対するDNase、Proteinase KおよびDispersin Bに対する感受性を検討した。バイオフィームの構成成分は多糖体が重要であるとの報告が多くある一方でタンパク性の結合因子や菌体外DNAが重要であるとの報告もあり、評価は一定ではなかった。得られた臨床分離株について解析したところ、DNase、Proteinase KおよびDispersin Bに対する感受性は様々であった(図12A:大気下、図12B:CO₂存在下)。バイオフィーム形成成分が多糖体だけでなくDNAやタンパク質分子を主要とする菌株も複数存在し、個々の菌株の性質に依存する問題であることが明らかとなった。

黄色ブドウ球菌菌株について対数増殖期のSA0701遺伝子の発現量解析をreal-time PCRにより測定したが、大きな差は観察されなかった。経時的な評価が今後の検討課題である。



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 6 件)すべて査読有

1. Hasegawa, T., A. Okamoto, T. Kamimura, I. Tatsuno, S. N. Hashikawa, M. Yabutani, M. Matsumoto, K. Yamada, M. Isaka, M. Minami, and M. Ohta. Detection of invasive protein profile of *Streptococcus pyogenes* M1 isolates from pharyngitis patients. *Apmis* 118:167-178. 2010.

2. Yamada, K., K. Inuzuka, N. Tatsumi, I. Sanzen, T. Ohkura, A. Okamoto, T. Hasegawa, and M. Ohta. Evaluation of selection media for the detection of borderline MRSA. *J Infect Chemother* 16:19-24. 2010.

3. Ishihara Y, Hyodo M, Hayakawa Y, Kamegaya T, Yamada K, Okamoto A, Hasegawa T, Ohta M. Effect of cyclic bis(3'-5')diguanlylic acid and its analogs on bacterial biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett.* 301(2), 2009, 193-200.

4. Ohkura, T., K. Yamada, A. Okamoto, H. Baba, Y. Ike, Y. Arakawa, T. Hasegawa, and M. Ohta. Nationwide epidemiological study revealed the dissemination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying a specific set of virulence-associated genes in Japanese hospitals. *Journal of Medical Microbiology* 58:1329-1336. 2009.

5. Nagao, M., A. Okamoto, K. Yamada, T. Hasegawa, Y. Hasegawa, and M. Ohta. Variations in amount of TSST-1 produced by clinical methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolates and allelic variation in accessory gene regulator (*agr*) locus. *BMC microbiology* 9:52. 2009.

6. Mahmoudian, L., J. Melin, M. R. Mohamadi, K. Yamada, M. Ohta, N. Kaji, M. Tokeshi, M. Nilsson, and Y. Baba. Microchip electrophoresis for specific gene detection of the pathogenic bacteria *V. cholerae* by circle-to-circle amplification. *Anal Sci* 24:327-332. 2008.

〔学会発表〕(計 2 件)

1・山田景子 (外 2 名 2 番目)、黄色ブドウ球菌とセカンドメッセンジャーについて、日本細菌学会中部支部会総会、2009 年 10 月 23-24 日、名古屋

2. 山田景子 (外 3 名 3 番目)、*Staphylococcus aureus* のバイオフィルム形成における c-di-GMP の関与、日本細菌学会中部支部会総会、2008 年 10 月 17-18 日、金沢

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 景子 (Keiko Yamada)
名古屋大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00402561