

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月8日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590476

研究課題名（和文）臨床分離腸球菌の Sec 依存性 II a 型バクテリオシンの解析

研究課題名（英文）Genetic analysis of the Sec-dependent class II a-type enterococcal bacteriocins.

研究代表者

富田 治芳 (TOMITA HARUYOSHI)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：70282390

研究成果の概要（和文）：臨床分離腸球菌株が生産する Sec 依存性 II a 型バクテリオシンである Bac31 と Bac43 について、Bac31 遺伝子と Bac43 遺伝子とのキメラ型変異バクテリオシンを構築し解析を行った。これにより2つのバクテリオシン活性の差に影響を与えるアミノ酸残基を決定した。またバクテリオシンの発現（分泌）量に影響を与える因子として遺伝子コピー数、転写量、シグナル配列、宿主菌種があり、このうちシグナル配列が最も重要であった。遺伝子発現制御ベクター pHT7343A を新たに構築し、これを用いてそれぞれの免疫因子遺伝子を確定した。

研究成果の概要（英文）：Genetic analysis of Bac31 and Bac43, which are the Sec-dependent class II a-type enterococcal bacteriocins, were performed. The chimera mutants composed of two bacteriocins were constructed and analyzed. Two amino acid residues positioned at 13th and 24th were significance for the activities. The factors concerning the expression and secretion of bacteriocin were as follows, gene copy number, promoter activity, signal peptide, and host bacteria. Of the factors, the signal peptide was the most crucial for the secretion level of bacteriocin. The immunity (resistance) genes for Bac31 and Bac43 were confirmed using a newly-constructed gene-expression controllable plasmid vector named pHT7343A.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：微生物学、医科細菌学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学（含真菌学）

キーワード：腸球菌、抗菌物質、バクテリオシン、腸管内定着、日和見感染菌

1. 研究開始当初の背景

(1) 高度先進医療に伴い、多剤耐性の常在菌による院内感染症が増加し、深刻な問題となっている。腸球菌はヒト腸管内の常在菌で

あり、また多くの薬剤に耐性を示す。欧米ではバンコマイシン耐性腸球菌 VRE の増加が深刻な問題となっている。臨床分離腸球菌株の多くは抗菌活性物質であるバクテリオシン

を生産し、これは腸管内の定着、感染成立に関与すると考えられている。しかし、これまで臨床分離腸球菌株のバクテリオシンについての解析、研究はほとんど存在しなかった。

(2) 私達は臨床分離腸球菌株から Sec 依存性 (N 末側にシグナル配列を持ち Sec 蛋白により菌体外へ分泌される) の耐熱性で抗リステリア菌活性を示す、いわゆる II a 型バクテリオシンを 2 種類 (Bac31 と Bac43) 発見した。Bac43 は複数の臨床分離 VRE 株に存在した。バクテリオシン遺伝子のクローン化と遺伝学的解析により、それらは共に構造遺伝子 *bacA* と免疫遺伝子 *bacB* の 2 つの遺伝子から成るオペロン構造を持つことを明らかにした。また Bac31 (44a. a.) と Bac43 (43a. a.) は分泌蛋白 (活性型バクテリオシン) のアミノ酸配列はほぼ同一であり、内部の 5 アミノ酸残基が異なるのみだが、軟寒天重層法による解析ではそれらの活性強度、抗菌域は互いに異なっていた。

(3) Bac31 のバクテリオシン遺伝子は *bacA*、*bacB*、ORF3 のオペロン構造を持ち、ORF3 の機能は未知であった。しかし、ORF3 は Bac43 の *bacB* や乳酸発酵菌の生産する II a 型バクテリオシンの免疫遺伝子の一部と相同性を持つことから免疫因子として機能することが他グループの報告によって示唆されていた。

2. 研究の目的

(1) 臨床株に見出した 2 つの Sec 依存型 II a 型バクテリオシン Bac31 と Bac43 の比較解析、およびそれぞれのバクテリオシン活性と抗菌域に及ぼす因子の同定を行う。

(2) 遺伝的に示されていた *bacB* 遺伝子、及び相同性比較解析から示唆されている ORF3 が免疫 (耐性) 因子遺伝子として機能するかを直接的に確認する。その解析ために遺伝子発現が調節可能な新規プラスミドベクターの開発を行う。

(3) 最終的な目標として、腸球菌バクテリオシンが腸管内定着と感染症成立に果たす役割を解明することを目指す。

3. 研究の方法

(1) 分泌型 Bac31 と Bac43 のアミノ酸配列は C 末端の 1 残基 R を除き、5 アミノ酸残基のみが異なる。Bac43 の発現クローンを基に、5 個の異なるアミノ酸残基をそれぞれ Bac31 の配列に置換した変異型 Bac43 を作製し、バクテリオシン活性を調べた。

(2) それぞれのプロモーター配列、シグナル配列、免疫因子遺伝子を交換したキメラ型

バクテリオシンを構築し解析した。またプロモーターレス *lacZ* を持つシャトルベクター pHT*lac* を用いて、それぞれのプロモーター活性を測定比較した。

(3) 腸球菌株において、腸球菌フェロモンにより組み込まれた遺伝子の発現調節 (誘導と抑制) が可能な新規のプラスミドベクター pHT7343A を考案した。具体的には腸球菌 *E. faecalis* のフェロモン反応性高頻度接合伝達性プラスミド pAD1 (Hly/Bac) のフェロモン反応調節に関与する遺伝子群全領域をシャトルベクター pAM401 に組み込み、さらに発現調節される遺伝子をクローン化するための制限酵素切断部位を導入した。pHT7343A にそれぞれの免疫因子遺伝子 *bacB* および ORF3 をクローン化し、フェロモンの有無により遺伝子発現を制御し免疫機能の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 軟寒天重層法による活性測定では、Bac31 と比較して Bac43 がより活性が高く、また抗菌域も広がった。活性の差異に関与するアミノ酸残基を同定するため、活性型 Bac43 のアミノ酸配列を Bac31 と同一の配列に順次置換した変異型バクテリオシンを合計 16 種類作製し、個々の活性を調べた。その結果、13 番目と 24 番目のアミノ酸残基を同時に Bac31 型に変えた変異体において最もバクテリオシン活性が減弱した。二つのバクテリオシン活性の差異はこの 2 つのアミノ酸が関与していることを示している。しかし、全てのアミノ酸配列を Bac31 型に変えた変異型 Bac43 でも Bac31 と完全に同一の活性を示さなかった。

(2) それぞれのプロモーター配列、シグナル配列、免疫因子遺伝子を交換したキメラ型バクテリオシンを構築し、バクテリオシン活性を調べた。またそれぞれのプロモーター活性を測定した。その結果、バクテリオシンの発現、分泌には遺伝子コピー数、転写量、シグナル配列、宿主菌種が影響することがわかった。そのうちシグナル配列が最もバクテリオシン発現 (分泌量) に影響を与えた。Bac43 のシグナル配列を組み込んだバクテリオシンは非常に高い活性 (分泌量) を示した。

(3) 軟寒天重層法による活性比較とは異なり、液体培地中での抗菌作用の測定では Bac31 と Bac43 はほとんど同じ活性を示した。これは実際の腸管内においては Bac31 も Bac43 も選択的優位性に同等に働くことが推測された。

(4) これまでの遺伝学的解析から自身のバクテリオシンに免疫能 (耐性) を付与する遺

伝子として、それぞれのバクテリオシン構造遺伝子 *bacA* の下流に存在する *bacB* が遺伝学的に同定されていた。しかし Bac31 の *bacB* 下流に位置する ORF3 が Bac43 の *bacB* や他の IIa 型バクテリオシンの免疫遺伝子と相同性を認めることから、ORF3 も免疫因子として働く可能性が示唆されていた。これを確認する目的で、新たにフェロモン (低分子ペプチド) により遺伝子発現が誘導されるシャトルベクター pHT7343A を構築した。この新規の遺伝子発現調節性ベクターが機能するか *lacZ* をクローン化し、LacZ の活性を測定することにより確認した。予想通り、腸球菌 *E. faecalis* 株を用いた実験でフェロモン cAD1 の培地への添加により LacZ が検出された。一方、阻害性フェロモン iAD1 の添加により、LacZ の発現は完全に消失した。またこのプラスミドを腸球菌 *E. hirae* 株に導入しても同様の結果が得られ、このシステムが *E. faecalis* 以外の他の腸球菌種でも働き得ることが始めて確認できた。この pHT7343A に Bac31 と Bac43 のそれぞれの *bacB*、及び Bac31 の ORF3 をクローン化し、*E. hirae* 株を用いフェロモンの存在下で免疫能を解析した。その結果、*bacB* はそれぞれ免疫因子として働くが ORF3 は機能しないことが確認された。

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 Yamashita H, Tomita H, Inoue T, Ike Y, Genetic organization and mode of action of novel bacteriocin 51: determinant of VanA-type vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 査読有, Vol.55, 2011, 4352-4360
- ② Li Y, Tomita H, Lv Y, Liu J, Xue F, Zheng B, Ike Y, Molecular characterization of *erm(B)*- and *mef(E)*-mediated erythromycin-resistant *Streptococcus pneumoniae* in China and complete DNA sequence of Tn2010. Journal of Applied Microbiology, 査読有, Vol.110, 2011, 254-265.
- ③ Fukao M, Tomita H, Yatabe T, Nomura T, Ike Y, Yajima N, Assessment of antibiotic resistance in probiotic strain *Lactobacillus brevis* KB290. Journal of Food Protection, 査読有, Vol.72, 2009, 1923-1929.

- ④ 富田治芳, バンコマイシン耐性腸球菌 VRE の高頻度接合伝達性プラスミド、日本細菌学会誌、査読無、64 巻、2009、pp. 343-355.

[学会発表] (計12件)

- ① 山下均、富田治芳、池康嘉、臨床分離バンコマイシン耐性腸球菌が生産する新規バクテリオシン Bac51 の解析、第 85 回日本細菌学会総会、2012. 3. 27、長崎新聞文化ホール (長崎)
- ② 池康嘉、富田治芳、グラム陽性菌の薬剤耐性、第 85 回日本細菌学会総会、2012. 3. 28、長崎新聞文化ホール (長崎)
- ③ 池康嘉、井上貴子、山下均、富田治芳、Novel enterococcal bacteriocins、第 3 回国際ASM腸球菌学会、2010. 7. 31、ポートランド (オレゴン、米国)
- ④ 富田治芳、Clewel DB、池康嘉、Comparative analysis of the sec-dependent class IIa bacteriocins of enterococci and construction of the conditional expression vector plasmid pHT7343A、第 3 回国際ASM腸球菌学会、2010. 7. 31、ポートランド (オレゴン、米国)
- ⑤ 富田治芳、池康嘉、Highly conjugative pMG1-like plasmids in enterococci、第 3 回国際ASM腸球菌学会、2010. 7. 31、ポートランド (オレゴン、米国)
- ⑥ 富田治芳、池康嘉、Genetic analysis of vancomycin resistance pMG1-like conjugative plasmid pHT β : identification of *traD* and *traF*, the key genes for plasmid transfer and cell aggregation、第 3 回国際ASM腸球菌学会、2010. 7. 31、ポートランド (オレゴン、米国)
- ⑦ 富田治芳、Zheng B、池康嘉、Complete nucleotide sequence and analysis of the *vanA*-type vancomycin resistance highly conjugative plasmid pZB18 found in the Chinese clinical *Enterococcus faecium* isolate、第 3 回国際ASM腸球菌学会、2010. 7. 31、ポートランド (オレゴン、米国)
- ⑧ 富田治芳、池康嘉、Structural and comparative analysis of the pMG1-like plasmids isolated from clinical

Enterococcus faecium strains in the world、第3回国際ASM腸球菌学会、2010. 7. 31、ポートランド (オレゴン、米国)

- ⑨ 富田治芳、戸所大輔、池康嘉、Genetic analysis of the bacteriocin 41 encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYI14、第3回国際ASM腸球菌学会、2010. 7. 31、ポートランド (オレゴン、米国)
- ⑩ 富田治芳、Lu J、池康嘉、Characterization of the vancomycin-resistant enterococci isolated from human patients and livestock in Taiwan: high incidence of multiple-drug resistant pheromone responsive plasmids and evidence of transmission of VRE from livestock to human、第3回国際ASM腸球菌学会、2010. 7. 31、ポートランド (オレゴン、米国)
- ⑪ 富田治芳、バンコマイシン耐性腸球菌 VREの高頻度接合伝達性プラスミド、日本細菌学会関東支部総会、2009. 11. 6、東京医科歯科大学講堂、東京
- ⑫ 富田治芳、池康嘉、Genetic analysis of *Enterococcus* vancomycin-resistance conjugative plasmid pHT β 、淡路国際フォーラム、2009. 9. 9、淡路国際会議場、兵庫

6. 研究組織

(1) 研究代表者

富田 治芳 (TOMITA HARUYOSHI)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：70282390

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：