

## 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15日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590485

研究課題名（和文） A群レンサ球菌における糖輸送系蛋白質発現制御因子と病原性に関する研究

研究課題名（英文） Analysis of the factors which regulate the expression of carbohydrate transporters and their relevance to virulence of *Streptococcus pyogenes*

研究代表者

長谷川 忠男 (HASEGAWA TADAO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：10314014

研究成果の概要（和文）：

劇症型感染症を引き起こすA群レンサ球菌の病原性には、毒素蛋白質の産生が関与する。その産生には栄養条件、特に糖の関与が示唆されている。菌が糖を利用するためには菌体内に取り込む必要があり、膜上のトランスポーターがその役割を担う。トランスポーターの発現調節には転写終結因子、二成分制御因子が関与すると考え研究を行った。それらの発現制御因子が関与する糖を明らかにし、毒素発現にも関与していることを示した。

研究成果の概要（英文）：

Virulent proteins play important roles in the pathogenesis of *Streptococcus pyogenes* that causes streptococcal toxic shock syndrome. Nutritious conditions, especially carbohydrates are considered to be related with the productions of virulent proteins. For utilizing carbohydrates, bacteria need to take through transporters located in the membrane. In this project, we have studied the roles of transcriptional terminators and two-component regulatory proteins which may regulate the production of transporters. We have showed these regulatory factors were involved for specific carbohydrate utilizations and toxic protein productions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
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：病原性

## 1. 研究開始当初の背景

A群レンサ球菌は小児の急性咽頭炎の主要な起炎菌であるとともに劇症型レンサ球菌感染症を引き起こすことでも知られている。劇症型レンサ球菌感染症は典型的にはいわゆる人喰いバクテリア症と呼ばれる壊

死性筋膜炎を始めとする全身性の重篤な病態を引き起こす再興感染症として問題となっている疾患である。劇症型感染症は強力な抗生物質治療を行っても予後は悪く、ワクチン開発も進んでいない。新たな治療法の開発が必要であり、そのためには病態の

更なる解明が必要である。病原性を考える場合、この菌の病原因子として産生する毒素が重要な役割を果たしていることは疑う余地がない。一方宿主と微生物の関連を精査するゲノム研究によって、従来病原因子と考えられていない、生理的な過程に関わる蛋白質が病原性に関与していることも示されてきている。レンサ球菌関連では、肺炎球菌、B群レンサ球菌におけるSTM(signature-tagged mutagenesis)解析によって、糖代謝に関連する遺伝子が病原性に関与することが示唆された(Polissi et al. Infect. Immun. 66: 5620-5629, 1998, Lau et al. Mol. Microbiol. 40: 555-571, 2001, Hava et al. Mol. Microbiol. 45: 1389-1406, 2002, Jones et al. Mol. Microbiol. 37: 1444-1455, 2000)。また包括的 expression microarray 法による、肺炎球菌、A群レンサ球菌の研究によって、菌と宿主の関連においても糖代謝に関連する遺伝子群の発現の大きな変動が示された (Orihuela et al. Infect. Immune. 72: 5582-5596, 2004, Graham et al. Am. J. Pathol. 166: 455-465, 2005, 169: 927-942, 2006, Virtaneva et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102: 9014-9019, 2005, Shelburne et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102: 16037-16042, 2005)。すなわち糖代謝に役割を果たす菌の蛋白質が宿主からの栄養の取り込み、宿主細胞への接着と宿主組織への定着、宿主の防御機構への対抗手段といった感染の成立全般に関与している。加えて糖の利用を制御する過程が、従来のいわゆる毒素蛋白質の発現調節とリンクしていることも証明されつつあった。

## 2. 研究の目的

細菌の遺伝子制御機構には細菌に特有な二成分制御系と呼ばれる、膜に存在するセンサー蛋白質とレギュレーター蛋白質の組み合わせや、stand-alone regulator と呼ばれる制御系に関与が示唆されている。A群レンサ球菌には上述した遺伝子発現制御系のほかに転写終結による制御系の存在がゲノム解析により示唆されている。興味深いことに転写終結因子と推定される Spy0571(*licT*)、Spy1325 遺伝子のすぐ近傍にはホスホトランスフェラーゼ(PTS)関連遺伝子群が存在した。PTSとは糖の移送に関与するシステムの一つであり、アンチポーター、シンポーター、ABCトランスポーターと同様にエネルギーの消費を伴う能動的輸送系である。細菌の他の膜輸送機構としては受動的な拡散によるもの、エネルギーを消費しない輸送系(ポーリン、チャンネルなど)も存在する。ゲノム解析によればA群レンサ球菌には糖の取り込みに関与すると

想定されるPTS関連遺伝子群が13個存在する。本研究では、糖代謝と病原性の関連について、その中でPTS輸送系とその制御系特に転写終結系、二成分制御系に注目し、これらがいかにA群レンサ球菌の病原性に関与しているかを明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

従来から劇症型感染症の頻度が高いと報告されているM1タイプとM3タイプのA群レンサ球菌劇症型感染症患者由来臨床分離株を使用した。これらの株でPTS関連遺伝子の近傍に位置し、発現制御に関与すると考えられる *licT*、Spy1325 制御因子のノックアウト株を樹立した。またA群レンサ球菌で13種類の二成分制御系センサー蛋白質と考えられる遺伝子のノックアウト株も使用した。ノックアウト株の樹立は、ポラーエフェクトが起こらないようダブルクロスオーバー法を用いた。これらを通常のbrain heart infusion(BHI)培地、種々の糖(グルコース、マンノース、ガラクトース、フルクトース、アラビノース、ソルビトール、マンニトール、マルトース、ラクトース、セロビオース、サリシン、アルブチン)を様々な濃度で添加した最小発育培地(chemically defined medium, CDM)で菌を培養し、経時的な濁度測定、プレート培養によるコロニーカウントを指標として増殖に及ぼす影響を検討した。また同時にSDS-PAGE、二次元電気泳動により、培養上清蛋白質を分離、同定し、野生株との比較を行った。

## 4. 研究成果

PTS系遺伝子の近傍に位置する転写終結因子 *LicT*、Spy1325 のノックアウト株の樹立に成功した。*LicT* に関しては、M1, M3, M5 タイプ由来の臨床分離株で、Spy1325 に関してはM1由来下部のゲノム株 SF370、臨床分離株 1529、MDN 株由来のノックアウト株を樹立した。またこれらのノックアウト株に対して、遺伝子相補株も作成した。

それらの株をCDMに種々の糖を加えて培養し、増殖の解析を行った。M1由来の *licT* ノックアウト株では *licT* 遺伝子の近傍にβグリコシド特異的トランスポーター遺伝子が存在するためβグリコシドであるサリシンとアルブチンを用いた。M1タイプの親株においては糖添加によって増殖が促進されたがノックアウト株では増殖が認められず、*LicT* とβグリコシド利用の関連が示唆された。しかしM3, M5タイプの親株、ノックアウト株を用いた実験では明瞭な同様の結果が得られず、異なる制御系の存在も考えられた。

*spy1325* 遺伝子の近傍にはセロビオース特

異的トランスポーター遺伝子が存在するためセロビオースをはじめ、それと近縁の糖を用いた。ノックアウト株でセロビオース添加による増殖の促進が認められ、Spy1325 はセロビオース利用を負に制御している可能性が示唆された。

当初の実験方法では、培養に使用する CDM 中の種々の糖を変化させ、培養後 18 から 24 時間後の濁度を基準に糖利用の可否を判断していた。しかし、その後の解析により、CDM 中での培養では、栄養豊富な BHI 中での培養と異なり、いったん増殖した菌は、時間経過とともに濁度が減少した。したがって最大の菌の増殖濁度と培養開始 18 から 24 時間後の濁度の両者の解析が不可欠であると判断した。かつ 24 時間後のコロニー数も検討に加えた。Spy1325 ノックアウトについて再度解析を行ったところ、ノックアウト株が野生株に比して、セロビオース存在培養において 24 時間後の濁度/最大濁度比が高いこと、生菌数多いことが明らかとなり、当初の結果が確認された。遺伝子相補株を用いた実験においても結果が確認された。

次に種々の糖利用におけるその感知システムを検討するために、すでに我々が樹立していた A 群レンサ球菌の 13 種類すべての二成分制御センサー蛋白質ノックアウト株を用いて実験を行った。驚くべきことに LicT との関連が示唆されたサリシンに対しては、5 種類のセンサー蛋白質のノックアウトにより、利用が十分にできなくなることが確認された。このことはサリシンの利用には複雑な感知システムが存在し、A 群レンサ球菌の生存に重要な栄養源であることが考えられた。

増殖実験の基本として利用してきたグルコースに関しても、二成分制御因子 CovS の関与が示唆された。すなわち CovS の存在の有無によって菌の増殖に最適なグルコース濃度が異なることを見出した。

加えて CovS ノックアウト株ではラクトース利用が低下することが明らかとなった。しかしこれらの実験では時間経過で溶菌しにくいという観点からの結果であり、糖利用がこの現象にどのように関与しているかを明らかにすることが今後の課題である。

最後に CovS とグルコース利用についての、毒素蛋白質発現に関する実験を行い、グルコース付加と増殖時期に基づく発現が CovS によって影響を受けていることを示唆する結果を得た。すなわちグルコース濃度の違いにより、毒素蛋白質の一つである SpeB の発現が、CovS ノックアウト株において、増殖の時期と発現の関係が変化する現象を見出した。このことは二成分制御因子と糖の関連が病原性に関与することを強く示唆している。

以上今回の研究結果は A 群レンサ球菌にお

ける転写終結系と糖利用の関係を明らかにした成果である。また種々の糖存在下で *licT*, *spy1325* ノックアウトと親株の間で培養上清中の毒素蛋白質の発現変化は検討中であるが、これによって糖利用と病原性の関連の新たな因果関係が明らかになることが期待される。一方上記の増殖の違いが認められた糖の存在下でトランスポーターの発現が実際どのように変化しているかを検討する必要がある。

## 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 10 件)

- ① Minami M, Sobue S, Ichihara M, Hasegawa T. Analysis of the pathological lesions of the lung in a mouse model of cutaneous infection with *Streptococcus pyogenes*. *Pathol Int.* 62, 99-104, 2012 査読有 DOI: 10.1111/j.1440-1827.2011.02756.x
- ② Ichikawa M, Minami M, Isaka M, Tatsuno I, Hasegawa T. Analysis of two-component sensor proteins involved in response to acid stimuli in *Streptococcus pyogenes*. *Microbiology* 157, 3187-94, 2011 査読有 DOI: 10.1099/mic.0.050534-0
- ③ Minami M, Ichikawa M, Hata N, Hasegawa T. Protective effect of Hainosankyuto, a traditional Japanese medicine, on *Streptococcus pyogenes* infection in murine model. *PLoS One.* 6, e22188, 2011 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0022188
- ④ Minami M, Ichikawa M, Matsui H, Hata N, Wakiyama N, Matsumoto M, Ohta M, Hasegawa T. Prevalence of a Streptococcal inhibitor of a complement-mediated cell lysis-like gene (*sicG*) in *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. *Curr Microbiol.* 62, 884-887, 2011 査読有 DOI: 10.1007/s00284-010-9798-8
- ⑤ Hasegawa T, Okamoto A, Kamimura T, Tatsuno I, Hashikawa S, Yabutani M, Matsumoto M, Yamada K, Isaka M, Minami M, Ohta M. Detection of invasive protein profile of *Streptococcus pyogenes* M1 isolates from pharyngitis patients. *APMIS* 118, 167-78, 2010 査読有

- DOI: 10.1111/j.1600-0463.2009.02574.x
- ⑥ Hasegawa T, Minami M, Okamoto A, Tatsuno I, Isaka M, Ohta M.  
Characterization of a virulence-associated and cell-wall-located DNase of *Streptococcus pyogenes*.  
Microbiology 156, 184-190, 2010  
査読有  
DOI: 10.1099/mic.0.031955-0
- ⑦ Tatsuno I, Isaka M, Minami M, Hasegawa T.  
NADase as a target molecule of *in vivo* suppression of the toxicity in the invasive M-1 group A Streptococcal isolates.  
BMC Microbiol. 10, 144, 2010 査読有  
DOI: 10.1186/1471-2180-10-144
- ⑧ Minami M, Kamimura T, Isaka M, Tatsuno I, Ohta M, Hasegawa T.  
Clindamycin-induced CovS-mediated regulation of the production of virulent exoproteins streptolysin O, NAD glycohydrolase, and streptokinase in *Streptococcus pyogenes*.  
Antimicrob Agents Chemother. 54, 98-102, 2010 査読有  
DOI: 10.1128/AAC.00804-09
- ⑨ Minami M, Wakimoto Y, Matsumoto M, Matsui H, Kubota Y, Okada A, Isaka M, Tatsuno I, Tanaka Y, Hasegawa T.  
Characterization of *Streptococcus pyogenes* isolated from balanoposthitis patients presumably transmitted by penile-oral sexual intercourse.  
Curr Microbiol 61, 101-105, 2010  
査読有  
DOI: 10.1007/s00284-010-9581-x
- ⑩ Minami M, Ohmori D, Tatsuno I, Isaka M, Kawamura Y, Ohta M, Hasegawa T. The streptococcal inhibitor of complement (SIC) protects *Streptococcus pyogenes* from bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS) from *Streptococcus salivarius*.  
FEMS Microbiol Lett. 298, 67-73, 2009  
査読有  
DOI: 10.1111/j.1574-6968.2009.01696.x

[学会発表] (計5件)

- ① 立野一郎、南正明、井坂雅徳、長谷川忠男  
A群レンサ球菌における二成分制御系因子の解析  
第48回日本細菌学会中部支部総会  
名古屋 名古屋大学  
平成23年10月21日
- ② Masaaki Minami, Yoshiko Oshima, Mamiko

- Kuriyama, Tadao Hasegawa.  
Distribution of phage-associated virulence genes in *Streptococcus pyogenes* isolated from Japanese children.  
XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology  
兼第84回日本細菌学会総会  
札幌 札幌コンベンションセンター  
平成23年9月10日
- ③ Masanori Isaka, Mariko Ichikawa, Hideyuki Matsui, Jun-ichi Maeyama, Masaaki Minami, Ichiro Tatsuno, Tadao Hasegawa.  
Analysis of the candidate sensor protein of two-component regulator system that regulate acid production in *Streptococcus pyogenes*.  
XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology  
兼第84回日本細菌学会総会  
札幌 札幌コンベンションセンター  
平成23年9月7日
- ④ 南正明、太田美智男、長谷川忠男  
マウス感染モデルを用いたA群連鎖球菌感染症に対する排膿散及湯の検討  
第84回日本感染症学会総会  
京都 国立京都国際会館  
平成22年4月6日
- ⑤ 市川麻里子、南正明、立野一郎、井坂雅徳、松井秀之、長谷川忠男  
A群レンサ球菌における酸耐性に関与する二成分制御系因子の解析  
第46回日本細菌学会中部支部総会  
名古屋 名城大学薬学部  
平成21年10月23日

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
長谷川忠男 (HASEGAWA TADAO)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授  
研究者番号：10314014
- (2) 研究分担者  
南正明 (MINAMI MASA AKI)  
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号：70418739
- (3) 連携研究者  
該当なし