

機関番号：14401

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791786

研究課題名 (和文) レンサ球菌二成分制御系の応答シグナルの検索

研究課題名 (英文) Searching for environmental signals sensed by group A streptococcal two-component systems

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 (和文)：

ヒトを唯一の宿主とする A 群レンサ球菌は多岐に渡る疾患を惹起する。A 群レンサ球菌がヒト体内において、感染部位へ特異的に定着し、感染を成立させるためには、様々な病原因子の発現調節が必要不可欠である。この発現調節の最も上流に存在すると考えられるのが、環境シグナルを感知するセンサーと DNA 転写調節を担うレギュレーターからなる二成分制御系である。本研究では、病原性を調節する二成分制御系を明らかにし、応答する環境シグナルの検索を行った。

研究成果の概要 (英文)：

Streptococcus pyogenes (group A streptococci; GAS) is a human pathogen responsible for a wide variety of diseases that ranges from self-limiting purulent infections such as pharyngitis, tonsillitis, and impetigo to severe necrotizing fasciitis and autoimmune diseases including acute rheumatic fever and glomerulonephritis. To successfully evade host immune responses and cause such diverse diseases, GAS might acclimate to environmental changes and control the expression of a variety of genes including virulence genes. In this study, deletion mutants of genes encoding both histidine kinases and response regulators were constructed in a background of a serotype M3 GAS strain. Utilizing these mutant strains and a silkworm infection model, we revealed that several two-component systems are crucial for GAS pathogenesis. Moreover, analysis of the virulence gene expression in mutant strains under several culture conditions indicated specific environmental signals are sensed by two-component systems.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
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：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：二成分制御系，病原因子，環境応答，転写調節

1. 研究開始当初の背景

A 群レンサ球菌 (Group A streptococci; GAS) は、局所性化膿性疾患として咽頭炎や膿痂疹を起こすだけでなく、二次性続発疾患としてリウマチ熱や急性糸球体腎炎を惹き起こす。さらに、頻度は低いが、壊死性筋膜炎やショック症状を伴う劇症型 GAS 感染症に罹患した場合、高率で死亡することが報告されている。感染病態は、局所性および全身性への感染を呈し、急性や慢性の経過を辿る。GAS の感染による病態発症の機序は完全には解明されておらず、有効な治療法と予防法の確立が待ち望まれている。

GAS の病原性へ関与する複数の転写因子の存在が明らかにされてきた。しかし、発現調節のトリガーとなる環境シグナルやそれを感知する GAS 因子は不明であった。この発現調節の最も上流に位置し、リン酸化によるシグナル伝達を介して転写調節を行う仕組みの一つとして二成分制御系 (Two-component system; TCS) が挙げられる。GAS ゲノム配列のアノテーションから、12~13 種類の二成分制御系の存在が明らかとなっていた。これまで最も詳細に解析されてきた TCS は CovR/S (CsrR/S) システムである。マイクロアレーによる解析から、劇症型感染症由来の血清型 M1 株では、CovR/S システムにより全遺伝子の 15% が転写に影響を受けることが報告されている。実際、CovR/S システムの欠失により、莢膜等の多くの病原因子の産生量の増加が認められ、マウス感染モデルやアカゲザル感染モデルにおいて病原性が上昇する。その他、これまで解析されてきた TCS の代表的なものとして、血清型 M1 株において好中球からの殺菌に抗うよう働く Ihk-Irr システム、FasBCA システム等が挙げられる。それぞれの二成分制御系が感知す

る環境シグナルで明らかとなっているのは、 Mg^{2+} イオン濃度依存性に働く CovR/S による転写調節のみであり、その他の TCS について、応答シグナルは全く不明であった。

2. 研究の目的

GAS の感染で特徴的なことは、皮膚や咽頭・上気道等の多様な解剖学的部位に多岐にわたる疾患を引き起こすことである。これは、GAS が産生する病原因子群や宿主因子等に起因すると考えられる。GAS が多様な解剖学的部位へ様々な疾患を惹起するためには、感染部位において、病原因子群の発現を巧みに調節することが必要不可欠である。この発現調節を司ると考えられる二成分制御系が、どのような環境因子を感知し、如何に病原性に関わるかを中心に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

1. 使用菌株

臨床分離頻度が高い血清 M 型 3 型株から劇症型 GAS 感染症由来株を用いた。

2. TCS レギュレーターと TCS センサーの in-frame 欠失株と再導入株の作製

通常、TCS のレギュレーターとセンサーをコードする遺伝子はオペロンを形成しており、これまでに頻繁に用いられてきた抗生物質耐性遺伝子による置換法では、極性効果が出る可能性があるため、温度感受性ベクターを用い、抗生物質耐性マーカーを導入しない in-frame 欠失株を作製した。欠失株の作製は、センサーとレギュレーター遺伝子のそれぞれについて行った。

3. 各 TCS 変異株の表現型の解析

まず、変異株のコロニー形態や成長速度に変化が認められないかを検討した。グラム染

色により、細胞形態や連鎖の程度を観察した。次に、溶血能、莢膜量、線毛産生量、プロテアーゼ産生量、ヒト全血中での抗食能等の病原性に関連する項目について解析を行った。

4. カイコ感染モデルによる TCS 変異株の病原性の評価

4 令眠から孵化した 5 令カイコ幼虫に抗生剤無添加の飼料を与え、28°C で 24 時間飼育した。この 5 令幼虫の第 5 体節部に試験菌液を注射し、28°C で飼育した。感染 24 および 48 時間後にカイコの生死判定を行った。

4. 研究成果

M3 型株が有する 12 種の TCS について欠失株の作製を試みたが、1 種の TCS について欠失株の作製が不可能であった。M3 型株では、この TCS は生存に必須であることが示唆された。作製した欠失株の増殖培地中での成長度を検討した結果、野生株と比較して、著しい成長度の変化は認められなかった。また、寒天培地上に生育した欠失株のコロニー形態を観察した結果、野生株と異なるコロニー形態を呈したのは、これまで報告されているレギュレーター CsrR の欠失株であった。そのコロニーは、莢膜が過剰に発現したムコイド型のコロニーとして観察された。グラム染色により各欠失株の細胞形態や連鎖の程度を観察したが、野生株と比較して顕著な差は認められなかった。各 TCS の欠失が及ぼす病原因子発現への影響を種々の培養条件で検討した結果、病原因子群の発現は、様々な TCS により、培養温度などの環境因子に対応して調節されることが示唆された。各 TCS の病原性への関与を検討するため、自然免疫系を備えるカイコ幼虫の体液中に野生株および各欠失株を感染させた結果、野生株と比較して致死毒性の異なるセンサー欠失株とレギ

ュレーター欠失株が認められた。すなわち、複数の TCS が *in vivo* で病原因子の発現を調節することが示唆された。同一の TCS に属するセンサーとレギュレーターの欠失株が必ずしも同様の致死毒性を示さなかったことから、TCS 間のクロストークが推察された。これらの結果は複雑な病原因子発現機構の一端を明らかにし、病原性レンサ球菌に対する治療・予防法を確立する一助となる可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① Okahashi N, Nakata M, Terao Y, Isoda R, Sakurai A, Sumitomo T, Yamaguchi M, Kimura RK, Oiki E, Kawabata S, and Ooshima T. **2011**. Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to salivary amylase and promote the biofilm formation. *Microb Pathog* 50(3-4): 148-154. 査読有.
- ② Sumitomo T, Nakata M, Higashino M, Jin Y, Terao Y, Fujinaga Y, Kawabata S. **2011**. Streptolysin S contributes to group A streptococcal translocation across an epithelial barrier. *J Biol Chem* 286(4): 2750-2761. 査読有.
- ③ Okahashi N, Nakata M, Sakurai A, Terao Y, Hoshino T, Yamaguchi M, Isoda R, Sumitomo T, Nakano K, Kawabata S, and Ooshima T. **2010**. Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to fibronectin and contribute to cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* 391(2): 1192-1196. 査読有.
- ④ Nakata M, Köller T, Moritz K, Ribardo D, Jonas L, McIver KS, Sumitomo T, Terao Y, Kawabata S, Podbielski A, and Kreikemeyer B. **2009**. Mode of expression and functional characterization of FCT-3 pilus region encoded proteins in the *Streptococcus pyogenes* serotype

M49. *Infect Immun* 77(1): 32-44. 査読有.

⑤ Panchaud A, Guy L, Collyn F, Haenni M, Nakata M, Podbielski A, Moreillon P, and Roten CA. 2009. M-protein and other intrinsic virulence factors of *Streptococcus pyogenes* are encoded on an ancient pathogenicity island. *BMC Genomics* 10:198. 査読有.

[学会発表] (計 10 件)

① 木村敬次リチャード, 中田匡宣, 住友倫子, 寺尾豊, 磯田竜太郎, 川端重忠. M6 型 A 群レンサ球菌が産生する線毛の形成機構と機能の解析. 第 63 回日本細菌学会関西支部総会. 2010 年 11 月 20 日, 関西医科大学.

② Sumitomo T, Nakata M, Terao Y, and Kawabata S. Streptolysin S contributes to group A streptococcal paracellular translocation across epithelial cells. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity. September 7-10, 2010. Awaji, Hyogo, Japan.

③ 住友倫子, 中田匡宣, 寺尾豊, 川端重忠. Streptolysin S contributes to group A streptococcal paracellular translocation across epithelial cells. 第 62 回日本細胞生物学会大会. 2010 年 5 月 19-21 日, 大阪国際会議場.

④ 岡橋暢夫, 中田匡宣, 桜井敦朗, 寺尾豊, 山口雅也, 星野倫範, 川端重忠, 大嶋隆. 口腔レンサ球菌 *S. sanguinis* 線毛 pili の機能. 第 83 回日本細菌学会総会. 2010 年 3 月 27-29 日, パシフィコ横浜.

⑤ 東野美晴, 住友倫子, 中田匡宣, 寺尾豊, 川端重忠. 宿主細胞間接着分子の破壊に関与する A 群レンサ球菌プロテアーゼの検索. 第 83 回日本細菌学会総会. 2010 年 3 月 27-29 日, パシフィコ横浜.

⑥ 住友倫子, 中田匡宣, 東野美晴, 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与する宿主プロテアーゼの解析. 第

83 回日本細菌学会総会. 2010 年 3 月 27-29 日, パシフィコ横浜.

⑦ 中田匡宣, 住友倫子, 磯田竜太郎, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌が産生する線毛の細胞壁架橋機構の解析. 第 83 回日本細菌学会総会. 2010 年 3 月 27-29 日, パシフィコ横浜.

⑧ 住友倫子, 中田匡宣, 東野美晴, 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与する宿主プロテアーゼの検索. 第 8 回感染症沖縄フォーラム. 2010 年 2 月 12 日. 沖縄国民年金健康センター.

⑨ 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発現機構の解析. 第 51 回歯科基礎医学会学術大会. 2009 年 9 月 9-11 日, 朱鷺メッセ, 新潟市.

⑩ Sumitomo T, Nakata M, Terao Y, and Kawabata S. Group A Streptococci translocates across epithelial barrier via intercellular junction cleavage. 109th General Meeting of American Society for Microbiology. May 17-21, 2009. Philadelphia, USA.

[その他]

ホームページ等

<http://www.dent.osaka-u.ac.jp/~mcrbio>

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