

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25年 4月 1日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590395

研究課題名（和文） レンサ球菌の代謝と生体内物質との関係

研究課題名（英文） The relation between the metabolism of genus *Streptococcus* and host components.

研究代表者

飯田 健一郎（KENICHIRO IIDA）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：00346777

研究成果の概要（和文）：

レンサ球菌 (*Streptococcus*) 属菌は、生体内から病原体または常在菌としてのみ分離され、環境中からは殆ど分離されない。これは、本属菌の生態が生体内の物質と密接な関わりを持つことを示しており、生体内における本属菌の生態を解明することは極めて重要である。本研究では、我々が以前に明らかにした *S. pyogenes* と *S. agalactiae* に存在する酸素を利用する代謝経路を中心に、生体内に存在すると考えられる物質とこれらの菌の代謝経路の関係を解析した。その結果、*S. pyogenes* は自らが作り出した乳酸のみならず外界の乳酸も ATP 産生に使うことが可能であると思われる知見を得た。また、*S. agalactiae* では生体内で本菌の持つ溶血素を使うことで利用可能になるとと思われる heme を外界から取り込み、電子伝達系を活性化できることを示した。これらの研究成果は、本属菌が生体内の物質と密接に関連した生態を持つことを示しており、生体内に常在することで能率的に ATP を産生し、その結果病原性を発揮することにつながることを示しており、本属菌の生態を理解する上で重要な知見を与えると思われる。

研究成果の概要（英文）：

Genus *Streptococcus* has been isolated from the body as a pathgen or part of the nomal flora, but has not been isolated from the environment. This shows that, the these bacteria has a close relationship with components of the host's body therefore there is a need to elucidate the ecology of genus *Streptococcus*. In this study, using our privious report on the use of oxygen for metabolism by *S. pyogenes* and *S. agalactiae*, we have analyzed the relationship between these bacteria's metabolism and the supposed host component. Results showed that *S. pyogenes* can possibly use lactic acid that it produces or from an external source for ATP production. Also, we have shown that inside the body, *S. agalactiae* takes in heme from an external source using its hemolysin and is able to activate the electron transport system. We have shown from these results the close relationship between host component and *Streptococcus* and now this genus efficiently produces ATP by thriving inside the host's body. From these results we have shown its relation to these bacteria's pathogenicity and important knowledge on the ecology of genus *Streptococcus* has also been elucidated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学（含真菌学）

キーワード：lactate oxidase、化膿レンサ球菌、過酸化水素

1. 研究開始当初の背景

レンサ球菌 (*Streptococcus*) 属に含まれる細菌種、特に *S. pyogenes* (化膿レンサ球菌) は古くは産褥熱、猩紅熱を引き起こすことで知られ、また咽頭炎、急性糸球体腎炎の原因菌であり、近年では特に劇症型A群レンサ球菌感染症を引き起こすことで注目されている。また、*S. agalactiae* は重篤な新生児感染症を起こす細菌として医学上非常に重要である。これらの菌は、臨床分離株またはヒトまたは動物の常在菌として分離され、環境中からは分離されない。これらの菌は重篤な感染症を引き起こすことは分かっているが、その病態の解明については多くの研究者の努力にも関わらずまだまだ不明な点が多く残されている。申請者らは本菌の生態を解明すべく長年にわたり本菌の代謝について研究を重ねてきた。これまでの知識では一般に本属菌は活性酸素を処理する能力を有し酸素には耐性であっても、酸素を利用する代謝は行わないとされてきた（ホモ乳酸発酵により ATP を獲得する＝酸素は代謝に関与しない）のであるが、我々の研究成果はこの考えを覆し、条件により積極的に酸素を利用し、効率良く ATP を獲得していることを明らかにしてきた。我々が明らかにしてきた酸素を利用する代謝経路は、生体内において比較的容易に獲得可能と思われる物質を本菌が取り込み利用する時のみ活性化できると考えられる。本属菌は生体からのみ分離されことから、生体内の物質と密接に関わった生態を持つことが予測されるが、その詳細については殆ど分かっていなかった。本属菌の生態を明らかにし、さらに病原性を理解するためには、生体内の物質と本属菌の生態との関係を明らかにしていくことが極めて重要であると思われた。

2. 研究の目的

前述の通り、*Streptococcus* 属菌は生体内から病原体または常在菌として分離され、環境中からは殆ど分離されない。従って、生体内の物質と密接に関連した生態を持っていると考えられ、そのため生体外では生育不可能、または生育が極めて難しいのであろうと

思われた。本研究では、我々が明らかにしてきた酸素を利用する代謝経路から、*S. pyogenes* と *S. agalactiae* を対象に、生体内物質との関連を検討した。

3. 研究の方法

(1) *S. pyogenes* について

本菌について、我々は本菌が過酸化水素産生性と非産生性の2つに分類できることを示している。また、過酸化水素産生株では培地中の glucose が枯渇すると同時に過酸化水素の産生が始まり、自らが産生した乳酸を取り込み ATP を産生していることを明らかにした。この現象は glucose 枯渇後起動される本菌の生存戦略であると考えられ、この現象は本菌ゲノム上にコードされている lactate oxidase の働きにより乳酸からピルビン酸を産生、このとき酸素を利用し過酸化水素を産生するものである。従って、まずは外界の乳酸を利用できるかどうかを検討した。また、lactate oxidase を精製し、様々な変異を入れた変異酵素を作成し、活性中心を明らかにした。さらに、本酵素をコードする遺伝子を詳細に解析した。また、人為的に本酵素を破壊した lactate oxidase 変異株を作成し、病原性試験を行った。

(2) *S. agalactiae* について

本菌については、ゲノム情報から cytochrome の存在が示唆されており、試験管内で heme と menaquinone を添加することにより電子伝達系が駆動されるとの報告がある。同様の報告は、*Enterococcus* や乳酸菌属にも散見され、本菌を含め乳酸菌と称される菌群には不完全な電子伝達系を持つ菌があると思われた。我々は、非発酵性物質とされている glycerol を本菌が代謝出来るかどうかを確認した。また、heme や menaquinone を添加し、電子伝達系阻害薬を用いることで電子伝達系の動きを追跡した。また、放射線同位元素を用

いて menaquinone 合成経路を検討した。

4. 研究成果

(1) *S. pyogenes* について

我々は本菌過酸化水素産生株を培養し、glucose が枯渇した時点で乳酸濃度を測定、これに外界の乳酸を加え、乳酸の消費を検討した。その結果、本菌過酸化水素産生株は外界の乳酸を完全に消費し、外界の乳酸も利用可能であることが示された。また、培地中にカタラーゼを加えて培養すると過酸化水素を産生しても菌の増殖が抑えられないことがわかり、実際の生体内ではカタラーゼが豊富にあると思われることから、本菌は生体内で過酸化水素を産生し生体内の乳酸を使って ATP 産生を行えることがほぼ示された。また、この現象に関連する酵素である lactate oxidase は、His タグを付加、ニッケルカラムを用いる方法では精製不可能であり、ゲル濾過の結果より遺伝子配列から予測される分子量 (43kDa) の数倍の大きさを持つことも明らかになった。本酵素の遺伝子は、非常に典型的なプロモータにより発現するオペロンでない単一の遺伝子であり、カタボライトリプレッションおよび転写終結を規定するターミネーターも非常に明確に判別できる配列を持っていた。大腸菌に本酵素を発現させ、陰イオンクロマトグラフィー・ゲル濾過・ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーの順番で用いることで本酵素を単一の酵素として精製できることを示したが、37°C で発現させた本酵素は活性を持たなかった。活性を有する酵素を得るためには 18°C での発現が必要であった。また、アミノ酸を置換した lactate oxidase を作成することにより、395 アミノ酸のうち 96 番目と 312 番目のアミノ酸が活性を発揮するのに重要であることも明らかになった。過酸化水素非産生株由来の lactate oxidase ではこのアミノ酸が置き換わっており、lactate oxidase の活性を完全に消失していた。また、人為的に本酵素を破壊した lactate oxidase 変異株を作成し、病原性試験を行った。lactate oxidase が破壊されることによる病原性への影響は軽微であるようであるが、現在確認実験をすすめている。

(2) *S. agalactiae* について

前述の通り本菌には、cytochrome の存在が示唆されており、試験管内で heme と menaquinone を添加することにより電子伝達系が駆動されるとされている。我々は、非発酵性物質とされている glycerol に着目し、本菌が glycerol を代謝出来るかどうかを確認した。glucose と glycerol を培地中に加え本菌を培養したところ、本菌は glucose が枯渇したところで glycerol を使い始めることが明らかになった。従って、glycerol 利用に関する遺伝子群はカタボライトリプレッションの制御下にある可能性が高い。また、非発酵性物質とされる glycerol が本菌に使用される事実は非常に興味深い。glycerol 利用経路には過酸化水素を産生する酵素が含まれるが、同じオペロン上にある NADH-peroxidase で処理されているらしく、過酸化水素は検出できなかった。また、ゲノム情報上 heme や menaquinone 合成遺伝子を本菌は持たないが、培地中に hemin を添加することで電子伝達系が活性化されることを示した。この時、菌体内には menaquinone が蓄積していることを薄層クロマトグラフィーにより確認した。この時解糖系から作られた pyruvate からは lactate が全く作られておらず、NADH は全て電子伝達系で処理されているものと思われた。電子伝達系阻害薬を用いることで glycerol 代謝時に増殖が阻害され、これは電子伝達系の動きが阻害されることで ATP 産生に障害が起きていることを示している。また、放射線同位元素を用いて menaquinone 合成経路を検討したが、一般に知られたメバロン酸を出発点とする menaquinone 合成経路とは違い未知の経路で作られているようである。glycerol は生体内でリパーゼにより遊離するとされている。従って本菌が glycerol 利用能を持ち、しかもその時電子伝達系を活性化させることが可能である知見は、本菌の代謝も生体内の物質と密接な関わりを持つことを示している。未知の menaquinone 合成経路を解明することは出来なかったが、長年唯一の経路とされたメバロン酸を出発点とする経路以外にも近年 menaquinone 合成経路が報告されており、今後この課題に取り組む予定である。

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 3 件) (全て査読あり)

- (1) Tamura T, Iida K, Saito M, Shiota S, Nakayama H, Yoshida S. (2012)
Effect of hyperbaric oxygen on *Vibrio vulnificus* and murine infection caused by it. *Microbiol Immunol.* 56(10):673-9.
doi: 10.1111/j.1348-0421.2012.00491.x.
- (2) Saito M, Kajiwara H, Iida K, Hoshina T, Kusuhara K, Hara T, Yoshida S. (2011)
Systematic cytokine response in moribund mice of streptococcal toxic shock syndrome model. *Microb Pathog.*
doi: 10.1016/j.micpath.2010.12.001.

[学会発表] (計 6 件)

- (1) Iida K, Seki M, Saito M, Nakayama H, Yoshida S.
Analysis of mechanisms actively using oxygen for production ATP found in *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae*
The 11th Korea-Japan International Symposium on Microbiology 2012.
Buyeo, Korea.
- (2) Iida K, Seki M, Saito M, Yoshida S.
Purification of *Streptococcus pyogenes* lactate oxidase and analysis of its activity.
The International Union of Microbiological Societies (IUMS) 2011
Sapporo.

[図書] (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.kyushu-u.ac.jp/bact/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

飯田 健一郎 (KENICHIRO IIDA)
九州大学・医学研究院・助教
研究者番号：00346777

(2) 研究分担者

齋藤 光正 (MITSUMASA SAITO)

九州大学・医学研究院・学術研究員

研究者番号：00315087

(3) 連携研究者・・・なし
()

研究者番号：