

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6月13日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791769

研究課題名（和文） 黄色ブドウ球菌の新規 ET 産生制御機構に関する研究

研究課題名（英文） Novel regulatory mechanism for Exfoliative toxin in *S. aureus*

研究代表者

加藤 文紀 (KATO FUMINORI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70452589

研究成果の概要（和文）：

黄色ブドウ球菌が産生する表皮剥脱毒素の転写調節機構を解明する過程で2つの新規転写調節因子を見出し、SptA および SptB と名付けた。SptA は黄色ブドウ球菌の病原性因子発現制御において最も重要な RNAPIII の転写を主として抑制することにより、様々な病原性因子の産生をグローバルに制御することが強く示唆された。一方、SptB は表皮剥脱毒素遺伝子領域に直接結合することにより転写抑制することが示唆された。以上より、本研究結果は新規な黄色ブドウ球菌病原性遺伝子発現制御機構を提唱するものである。

研究成果の概要（英文）：

During the search for a regulatory mechanism of exfoliative toxin in *Staphylococcus aureus*, I found two novel transcriptional regulators and designated it SptA and SptB. This study suggest that the SptA globally regulates various pathogenic factors by suppressing the expression of RNAPIII that is most important key factor for a production of pathogenic factors in *S. aureus*. On the other hand, SptB represses the expression of exfoliative toxin by directly binding to the internal region of exfoliative toxin gene. These results propose a novel regulatory mechanism for the production of staphylococcal pathogenic factors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

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：黄色ブドウ球菌、病原性、遺伝子発現、転写調節因子

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌は通性嫌気性グラム陽性球菌でヒトの常在菌であり、主に口腔、鼻腔等に見られ、様々な化膿性疾患の起原菌として知られている。中でも新生児に発症するブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群

(Staphylococcal Scalded Skin Syndrome, SSSS)は患児の咽頭に感染した黄色ブドウ球菌が表皮剥脱毒素 (exfoliative toxin, ET) を産生し、産生された ET が毒素血症 (Toxemia) を起こして、全身に播種し、全身の表皮剥脱を起こす疾患である。近年、薬

剤耐性を持つメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) で ET を産生する株が新生児室で院内感染を起こし、SSSS の集団発生の症例が報告されている。SSSS は黄色ブドウ球菌のおこす感染症の中では稀な咽頭 (口腔) で細菌が原因毒素 (ET) を産生し、全身性の皮膚症状をおこす、臨床症状 (表皮剥脱) と原因 (細菌毒素) が 1 対 1 に対応する感染症モデルであるということが出来る。これまで黄色ブドウ球菌の産生する病原性因子の産生調節に関わる因子としては、菌密度依存的な遺伝子発現調節を制御している Agr、DNA 結合タンパク質であり遺伝子プロモーター領域に結合して遺伝子の発現を制御する Sar family、環境因子に応答し種々の遺伝子の発現を調節する二成分制御機構及び RNA ポリメラーゼのシグマ B 因子が知られている。しかしながら表皮剥脱毒素 ET の発現調節機構に関しては全く明らかになっていない。また同一の菌株を用いて網羅的に制御因子の解析をおこなった事例は非常に少ない。さらに、これら既知の転写調節因子だけでは、黄色ブドウ球菌の病原性因子制御機構を完全に説明することはできず、未解明な病原性因子の転写調節因子の解明が求められている。

2. 研究の目的

伝染性膿痂疹 (とびひ) および新生児に発症するブドウ球菌性熱傷様症候群の治療のための基礎研究として、本研究ではこれら疾患の原因毒素である黄色ブドウ球菌表皮剥脱毒素の産生制御機構の解明を目的とした。

まず初めに、これまで黄色ブドウ球菌の産生する病原性因子の調節に関わる因子として報告されている、Agr、Sar family、15 組の二成分制御機構及び RNA ポリメラーゼのシグマ B 因子による表皮剥脱毒素産生制御機構を解明する。

次に、公開されている黄色ブドウ球菌のゲノム情報を活用し、機能未知な推定タンパク質の中から病原性因子の発現制御に関わる因子を探索する過程で新規な発現抑制因子を 2 遺伝子見出し、SptA: Staphylococcal pathogenicity-related transcriptional regulator A、他方を SptB: Staphylococcal pathogenicity-related transcriptional regulator B と名付けた。そこで本研究では、新規病原性発現調節因子 SptA および SptB による黄色ブドウ球菌病原性因子の遺伝子発現制御機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

黄色ブドウ球菌において病原性因子の発現調節をすることが報告されているグローバルレギュレーターである Agr、Sar family、15 組の二成分制御機構及びシグマ B 因子によ

る表皮剥脱毒素遺伝子の発現制御機構を明らかにするために、これら全ての遺伝子群の破壊株を温度感受性ベクターを用いた相同組み換え法により作製した。作製した遺伝子破壊株は、親株である TY34 株を TSB にて 16 時間本培養し、培養上清中に産生された表皮剥脱毒素 (ETA) 量を SDS-PAGE および抗 ETA ポリクローナル抗体を用いた Western blotting 法により解析した。さらに Total RNA を経時的に抽出しランダムプライマーを用いた cDNA 合成、遺伝子特異的なプライマーを用いた定量 RT-PCR 法により遺伝子転写量を解析した。また新生児マウスを用いた動物感染モデルにて表皮剥脱活性を解析した。

続いて、公開されている黄色ブドウ球菌 MW2 株のゲノム情報から、病原性因子の新規転写制御因子としての候補を次に挙げる 3 段階により絞り込みを行った。①機能未解明な転写調節因子を選抜 ②糖代謝やアミノ酸代謝遺伝子の近傍に位置する遺伝子を排除 ③病原性因子の近傍に位置する、または単独で位置する遺伝子を選抜。以上より候補遺伝子を 20 遺伝子に絞り込んだ。表皮剥脱毒素 ETA 産生 TY34 株を用いて遺伝子破壊株を作製、ETA 産生量および表皮剥脱活性を評価した結果、黄色ブドウ球菌表皮剥脱毒素を抑制的に制御する 2 つの新規な転写調節因子 SptA および SptB を見出した。続いて SptA および SptB 遺伝子欠損株を作製、*E. coli*-*S. aureus* shuttle plasmid vector である pKAT vector を用いて遺伝子相補株を作製した。また、SptA の推定基質認識領域に PCR 法を用いてアミノ酸変異を導入した plasmid を作製し、sptA 遺伝子欠損株に形質導入した。作製した相補株および変異株は表皮剥脱毒素 (ETA) 量を SDS-PAGE および抗 ETA ポリクローナル抗体を用いた Western blotting 法により解析した。さらに遺伝子特異的なプライマーを用いた定量 RT-PCR により遺伝子発現量の解析および DNA マイクロアレイを用いた発現解析により制御遺伝子の探索、新生児マウスを用いた動物感染モデル実験を行った。

4. 研究成果

伝染性膿痂疹 (とびひ) および新生児に発症するブドウ球菌性熱傷様症候群の原因毒素である表皮剥脱毒素のグローバルレギュレーターによる発現制御機構の解明を行った。Western immunoblotting 法および定量 RT-PCR 解析より ETA 産生量および mRNA 発現量は二成分制御系の agrCA, saeRS, arlRS 遺伝子破壊株において顕著に減少しており、AgrCA、SaeRS、ArlRS が ETA 産生を転写レベルで促進的に制御していることを明らかにした。また sigB, sarA, sarS 遺伝子破壊株では Western immunoblotting および定量 RT-PCR 解析により ETA 産生量および mRNA 発

現量は顕著に増加しており、SarA, SarS, SigB により ETA 産生は抑制的に制御されていることを明らかにした。さらに定量 RT-PCR 解析により SigB による ETA 産生の抑制制御は SarA, SarS を介した機構であること、ArlRS による ETA 産生の促進制御は Agr 及び SarS を介した機構であることが示唆された。また新生児マウスを用いた表皮剥脱活性から in vivo においても ETA 産生を AgrCA, SaeRS, ArlRS が促進的に制御、SarS, SigB が抑制的に制御していることが示唆された。以上の結果からグローバルな制御因子である Agr, SigB, SarA, SarS による表皮剥脱毒素 *eta* 遺伝子の発現制御機構のネットワークモデル図を描いた (図 1)。本結果は、Infection and immunity 2011 79(4):1660-70 にて報告した。さらに黄色ブドウ球菌において遺伝子の機能解析を行う際の重要な遺伝子欠損株の作製方法および plasmid vector を独自に開発し、報告した。[Journal of Microbiological Methods. 2011 87: 76-81]

この手法を用いることにより黄色ブドウ球菌において遺伝子機能を解析するための非常に有効な多重遺伝子欠損株の作製が可能となった。

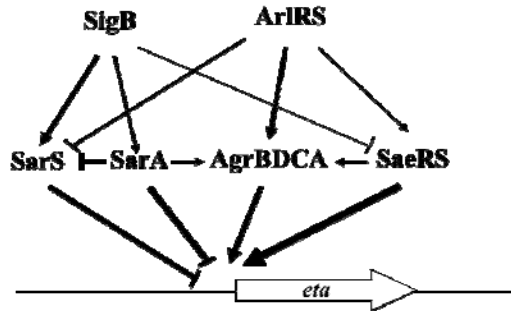


図 1. グローバルレギュレーターによる表皮剥脱毒素 ETA の発現制御機構のモデル図

新規転写調節因子 SptA は遺伝子欠損株の Western blotting 解析および定量 RT-PCR 解析から表皮剥脱毒素遺伝子を抑制的に制御する転写調節因子であることを明らかにした (図 2)。さらに DNA マイクロアレイ解析および定量 RT-PCR 解析により、*sptA* 遺伝子欠損株では、*eta* 遺伝子のみならず黄色ブドウ球菌の病原性因子であるプロテイン A や α -ヘモリジン、ウレアーゼ産生、バイオフィーム形成能、菌凝集能などの黄色ブドウ球菌の様々な病原性因子の増減に影響を与えた (図 3)。これより SptA が黄色ブドウ球菌の病原性因子の発現をグローバルに制御する新規転写調節因子であることが示唆された。さらに、定量 RT-PCR 解析によりグローバルレギュレーター遺伝子群の解析結果より、*sptA* 遺伝子欠損株では、特に黄色ブドウ球菌の病原性因子発現制御において最も重要な RNAIII の発現量が増加していた (図 4)。以上より新

規転写調節因子 SptA は *eta* 遺伝子の転写促進因子である RNAIII の転写を抑制することにより *eta* 遺伝子の産生量のみならず、黄色ブドウ球菌の病原性因子をグローバルに調節していることが示唆された (図 5)。

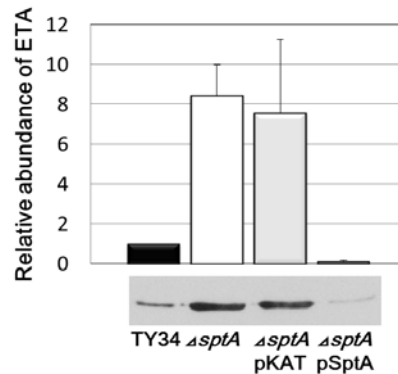


図 2. SptA 遺伝子欠損株および相補株における ETA 産生量



図 3. SptA 遺伝子欠損株および相補株におけるプロテイン A 産生量

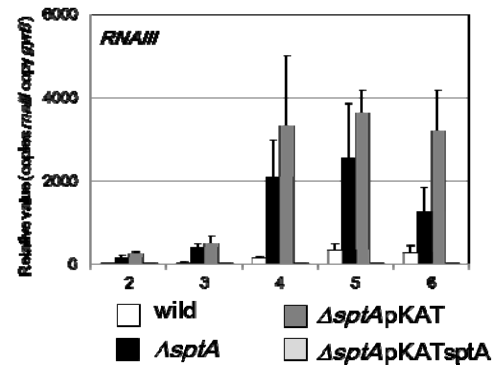


図 4. 定量 RT-PCR 法による RNAIII 発現量解析

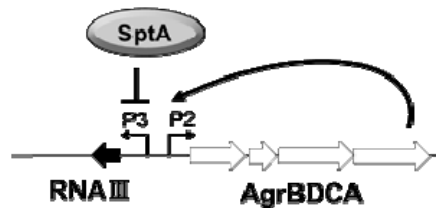


図 5. SptA による RNAIII 発現制御抑制

また、SptA タンパク質の相同性検索を行った結果、黄色ブドウ球菌の MurR、表皮ブドウ球菌の MurR とそれぞれ 54% および 72% のアミノ酸の同一性が見られ、特に SIS domain において非常に高く保存されていた。さらに SptA の SIS (Sugar Isomerase) domain 上の基質認識に関与すると推定されるアミノ酸を既に X 線結晶構造解析が行われている同じ RpiR family に属する大腸菌の arabinose 5-phosphate isomerase の SIS domain を基に 190 番目のセリン、191 番目のグルタミン酸、232 番目のグルタミン酸を候補として見出した。これら 3 つのアミノ酸をアラニンに置換する変異を導入し、ETA 産生量を指標に解析した結果、191 番目のグルタミン酸をアラニンに置換すると SptA による ETA 産生抑制が解除された(図 6)。これらの結果から SptA の SIS domain に位置する 191 番目のグルタミン酸が基質認識に必須であること、さらに SptA は基質が結合した状態で転写調節因子として機能し、転写を抑制することを示唆した。

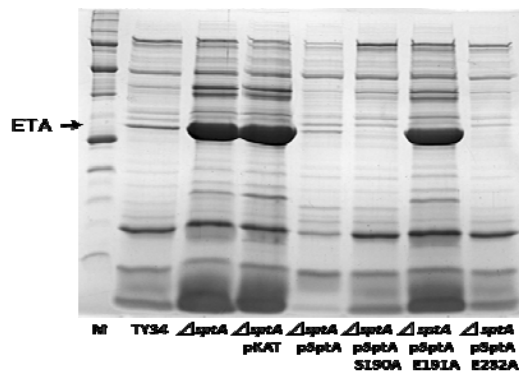


図 6. SptA SIS ドメインのアミノ酸変異導入による影響

一方、SptB は遺伝子欠損株の Western blotting 解析および定量 RT-PCR 解析から表皮剥脱毒素遺伝子を抑制的に制御する転写調節因子であることを明らかにした(図 7)。さらに DNA マイクロアレイ解析および定量 RT-PCR 解析により、eta 遺伝子の転写促進因子である RNAIII の転写量を抑制的に制御、eta 遺伝子の転写抑制因子である SarA を発現抑制する SarR を抑制することを明らかにした。さらにゲルシフトアッセイによりタンパク質-DNA 間の結合を解析した結果、SptB タンパク質は表皮剥脱毒素 eta 遺伝子のコーディング領域と直接結合することにより転写を抑制していることが示唆された(図 8)。以上の結果から、SptB による表皮剥脱毒素 eta 遺伝子の発現制御機構のネットワークモデル図を描いた(図 9)。

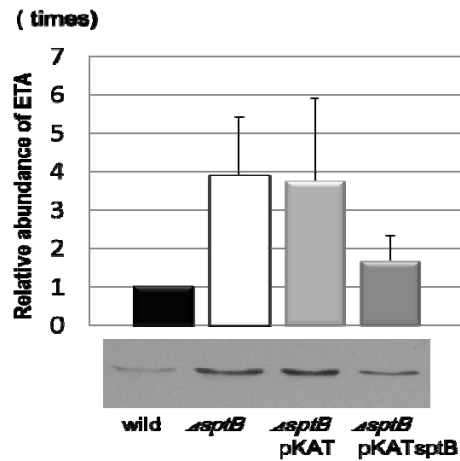


図 7. SptB 遺伝子欠損株および相補株における ETA 産生量

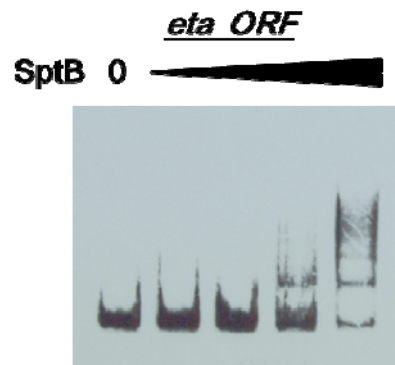


図 8. SptB タンパク質と表皮剥脱遺伝子 DNA との結合解析

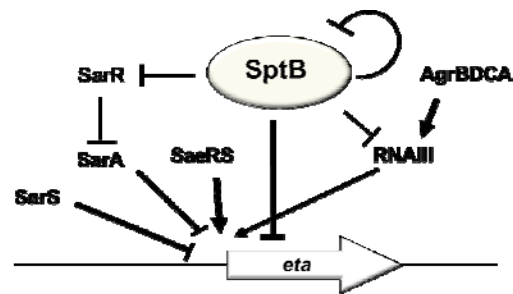


図 9. SptB による表皮剥脱毒素遺伝子の発現制御モデル図

「今後の展望」

本研究で新規転写調節因子 SptA が黄色ブドウ球菌の病原性制御において重要な RNAIII の転写を抑制することにより、病原性因子の発現制御をすることを見出した。一方 SptB は表皮剥脱毒素遺伝子領域に直接結合することにより表皮剥脱毒素の転写調節することを明らかにした。新規転写調節因子 SptA は DNA 結合領域である HTH domain とリン酸化糖が結合する SIS domain を有するリン酸化糖を認識し遺伝子発現を制御する RpiR family に属する転写調節因子である。RpiR

family の特徴として基質であるリン酸化糖が SIS domain に結合することにより DNA に結合または乖離する、つまり転写制御する転写調節因子であり非常に興味深い点である。SptA は同じ RpiR family に属する MurR と非常に高い同一性を有するタンパク質であり、黄色ブドウ球菌の MurR とは 54% のアミノ酸が一致、表皮ブドウ球菌の MurR とは 72% のアミノ酸が一致しており特に SIS domain は両タンパク質間で非常に高く保存されている。MurR はペプチドグリカンの主要な構成成分である MurNAc (N-アセチルムラミン酸) のリサイクルやターンオーバーに関与する遺伝子群 murPQT (MurQ: hypothetical protein, MurQ: N-acetylmuramic acid 6-phosphate etherase, MurT: N-acetylmuramic acid specific PTS system, II BC component) の転写を抑制し、MurNAc-6phosphate が SIS domain に結合すると DNA 領域から乖離し、転写抑制を解除すると考えられている。一方、SptA は SIS domain の基質認識部位と推定されるアミノ酸の変異実験から、SIS domain に MurNAc-6 phosphate が結合すると遺伝子発現を抑制すると示唆される(図 6)。このことは非常に興味深く、栄養条件が乏しいとき、または死菌が増加する環境条件下ではペプチドグリカン由来の MurNAc を資化し ET のような分泌タンパク質である病原性因子の産生を抑制し、栄養条件が豊富または細胞分裂が盛んな時には、MurNAc の代謝を抑制し分泌タンパク質である病原性因子の産生を促進するといった環境条件と菌の増殖を感知し病原性因子の産生を制御していることが示唆される。また、細菌の分裂増殖時に MurNAc が放出されることが知られており、MurNAc がクオラムセンシング物質として関与することも推測される。本研究で明らかにした新規転写調節因子 SptA および SptB による黄色ブドウ球菌の病原性因子の産生制御機構はこれまでにない新規な制御機構を提唱するものである。

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 8 件)

1. Fuminori Kato and Motoyuki Sugai
A simple method of markerless gene deletion in *Staphylococcus aureus*
J Microbiol Methods. 査読有 87(2011), 76-81, doi:10.1016/j.mbs.2011.03.031
2. Fuminori Kato, Noriko Kadomoto, Yuko Iwamoto, Katsuaki Bunai, Hitoshi Komatsuzawa, Motoyuki Sugai. The regulatory mechanism for exfoliative toxin production in *Staphylococcus aureus*
Infect and immune, 査読有, 79(4), 2011,

1660-70, doi: 10.1128/IAI.00872-10

[学会発表] (計 10 件)

1. 加藤文紀、黄色ブドウ球菌新規転写調節因子 SptA による病原性制御機構, 第 85 回日本細菌学会総会, 2012 年 3 月 27 日, 長崎
2. 加藤文紀、SptB is a novel transcriptional regulator of exfoliative toxin A in *Staphylococcus aureus*, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011 年 12 月 16 日, 横浜
3. 加藤文紀、菅井基行、黄色ブドウ球菌表皮剥脱毒素の新規転写調節因子 SptA, 第 56 回日本ブドウ球菌研究会, 2011 年 9 月 23 日, 高知
4. 加藤文紀、A novel transcriptional regulator, SptB, of exfoliative toxin A in *Staphylococcus aureus*, IUMS 2011 (XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology), 2011 年 9 月 7 日, 札幌
5. 加藤文紀、黄色ブドウ球菌表皮剥脱毒素の新規転写因子 SptA の解析, 第 3 回日本ゲノム微生物学会年会, 2011 年 3 月 16 日, 仙台
6. 加藤文紀、黄色ブドウ球菌表皮剥脱毒素 ETA の新規転写調節因子の解析, 第 33 回日本分子生物学会年会, 2010 年 12 月 8 日, 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 文紀 (KATO FUMINORI)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 70452589