

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861744

研究課題名(和文)黄色ブドウ球菌新規転写制御因子SptAによる病原性因子制御機構に関する研究

研究課題名(英文)A novel transcriptional regulator, SptA, globally regulates pathogenic factors in *Staphylococcus aureus*

研究代表者

加藤 文紀(KATO, FUMINORI)

広島大学・医歯薬保健学研究院(歯)・助教

研究者番号：70452589

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、新規転写調節因子SptAは菌密度依存的な黄色ブドウ球菌の病原性遺伝子発現を担うagrおよびRNAの両遺伝子群の転写を抑制することでグローバルに病原性因子産生を制御することが強く示唆された。さらにSptAタンパク質の基質認識に関与すると推定されるSIS領域の184番目のスレオニン及び191番目のグルタミン酸が基質認識及び転写抑制因子としての機能において重要であること、基質としてN-アセチルムラミン酸6リン酸を認識することが強く示唆された。また、本研究において黄色ブドウ球菌において高効率な多種蛍光タンパク質発現系も構築した。

研究成果の概要(英文)：This research demonstrated that a novel transcriptional factor, SptA:Staphylococcal pathogenicity-related transcriptional factor A, globally regulate the production of pathogenicity factors by repressing both of the agr and rnaIII expression in *S. aureus*. Analysis of variants with amino acid substitutions in the SIS domain revealed that Thr184 and Glu191 are essential amino acid residues for the function of SptA, and further investigation suggested that SptA works as a repressor upon binding with MurNAc-6-phosphate. Furthermore, GFP(Green Fluorescent) variants with different colors and RCFP(Reef Coral Fluorescent Protein) were improved by amino acid substitutions and a codon optimization to enhance the fluorescence brightness in *S. aureus*.

研究分野：細菌学 分子生物学

キーワード：遺伝子発現 転写調節因子 病原性 黄色ブドウ球菌

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌はヒトの常在菌であり、主に口腔、鼻腔等に見られるが、様々な化膿性疾患、肺炎、敗血症、食中毒などの多様な臨床症状を呈す病原性細菌として知られている。私どもは黄色ブドウ球菌が引き起こす“とびひ”や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)の原因毒素として知られている表皮剥脱毒素の産生制御機構に注目して研究を行っており、黄色ブドウ球菌のゲノム情報より機能未解明な遺伝子群の中から *in vitro* および *in vivo* で表皮剥脱毒素産生を抑制する新規な転写調節因子を見出し、SptA (Staphylococcal pathogenicity-related transcriptional regulator A) と名付け解析を行っている。この新規転写調節因子 SptA は、菌密度依存的な遺伝子発現制御に関わる Agr システムのレギュレーター分子である RNA の転写を抑制することにより、グローバルに病原性因子を制御していることが強く示唆されている。さらに、SptA はアミノ酸相同検索からペプチドグリカンのリサイクルに参与する N-アセチルムラミン酸代謝遺伝子群(murPQTR)の転写調節因子である MurR と高い同一性を示すことから、N-アセチルムラミン酸 6 リン酸を基質として認識することで、細胞増殖や生育適応と、病原性発現を繋ぐ新規な機構を担うことが強く示唆される。

2. 研究の目的

黄色ブドウ球菌の病原性因子をグローバルに発現制御するのみならず、病原性発現と増殖や環境適応のインターフェイスとしての SptA による新たな制御機構を明らかにすることを目的とした。

具体的には新規転写調節因子 SptA による病原性発現制御機構を解明する上で、SptA の推定基質認識領域である SIS 領域に含まれる基質認識において必要なアミノ酸残基の同定、SptA が認識する基質の同定、および SptA が直接的に制御する遺伝子群、DNA 配列の同定、さらには蛍光タンパク質を利用したブドウ球菌のラベル化・遺伝子発現レポーター解析を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 既知の病原性制御因子である Agr, RNA および SaeRS と SptA との遺伝子多重欠損黄色ブドウ球菌株を用いた SptA の制御する遺伝子群の解明: 既知の病原性制御因子である Agr, RNA, SaeRS 遺伝子と SptA との多重遺伝子欠損黄色ブドウ球菌を作製し、表皮剥脱毒素の産生量および定量 RT-PCR 解析により表皮剥脱毒素、および Agr, RNA, SaeRS 遺伝子の転写量を解析することにより SptA の病原性発現制御機構を明らかにする。

(2) 基質認識領域である SIS 領域の機能解

析: SptA は MurR と高い同一性を示し、特に推定リン酸化糖結合領域である SIS 領域と非常に高い同一性を有する(図1)。そこで既に結晶構造が解かれている大腸菌のアラビノース 5 リン酸イソメラーゼの SIS 領域を元に基質認識に重要なクレフト構造に位置し、両者間で保存されている 140 番目のセリン、184 番目のスレオニン、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アラニンに置換した変異体 SptA を *sptA* 遺伝子欠損株にプラスミドにより相補させ、表皮剥脱毒素産生量を解析することにより、基質認識および転写抑制因子としての機能に必須なアミノ酸を明らかにする。さらに SptA の SIS 領域を MurR の SIS 領域で全置換し転写抑制因子としての機能を解析した。

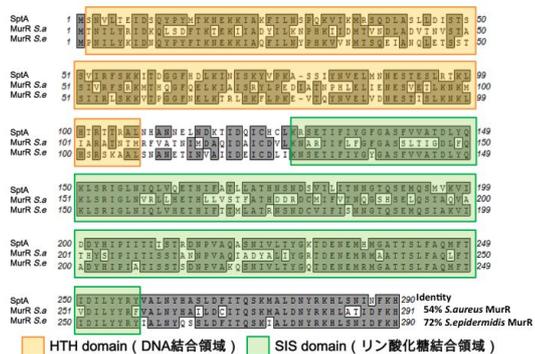


図1. SptA と MurR 間でのアミノ酸配列比較

(3) N-アセチルムラミン酸代謝関連遺伝子群欠損株の解析による SptA の基質解明: SptA と基質認識領域において非常に高い同一性を有するタンパク質 MurR はペプチドグリカンのリサイクルに参与する N-アセチルムラミン酸代謝関連遺伝子群の転写抑制因子であり、N-アセチルムラミン酸 6 リン酸 (MurNac-6P) を基質として認識する(図1)。そこで、菌体内で唯一の MurNac-6P 産生経路である遺伝子群の欠損株(murP, murQ, murT)を作製し、表皮剥脱毒素産生量への影響を Western blotting 法および新生児マウスを用いた *in vivo* における表皮剥脱活性を解析、評価する。murP および murT 遺伝子欠損により、MurNac-6P の欠乏となり SptA の抑制因子として機能消失、murQ 遺伝子欠損により MurNac-6P が蓄積され SptA の抑制因子としての機能が增強する、と推定される。

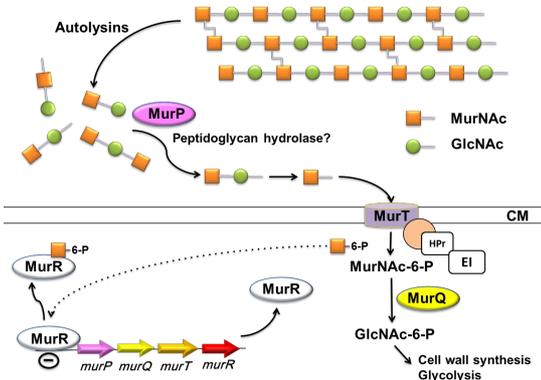


図2. 黄色ブドウ球菌におけるペプチドグリカンリサイクル系 (N-アセチルムラミン酸代謝) の推定モデル図

(4) SptA が結合する DNA 配列および制御遺伝子群の解明: ヒスチジンタグまたはフラッグタグを融合させた SptA を *sptA* 遺伝子欠損株に相補し、抗ヒスチジンタグ抗体または抗フラッグタグ抗体によりクロマチン免疫沈降を行う。免疫沈降により得られた DNA 配列を次世代シーケンサーにより SptA が結合認識する DNA 配列および遺伝子発現を制御する遺伝子群を明らかにする。さらにゲルシフトアッセイ法により SptA タンパク質とターゲット DNA 間の結合能を解析することで、SptA の結合配列を明らかにする。

(5) 蛍光タンパク質を用いた黄色ブドウ球菌のラベル化および遺伝子発現のレポーターの開発: オワンクラゲ由来 GFP および GFP 変異体と造礁サンゴ由来蛍光タンパク質アミノ酸変異を導入する事で、黄色ブドウ球菌において高効率に蛍光を発するタンパク質を開発する。これにより黄色ブドウ球菌を様々な蛍光色でラベル化可能になり、生細胞を *in vitro* 及び *in vivo* においてオンタイムで測定可能となる。また表皮剥脱毒素遺伝子や SptA 遺伝子プロモーター下流に蛍光タンパク質遺伝子を融合し、蛍光量による遺伝子発現量をレポーターアッセイ可能となる。

4. 研究成果

(1) 既知の病原性制御因子群と SptA との多重遺伝子欠損株解析による SptA の病原性制御機構の解明: SptA と *agr* 遺伝子および Agr system のレギュレーター分子である RNA との二重遺伝子欠損株を解析した結果、新規転写調節因子 SptA は当初予想していた RNA のみならず *agr* の転写も抑制することで黄色ブドウ球菌の病原性因子産生をグローバルに制御することが強く示唆された。また、SaeRS との二重欠損株解析から SptA は二成分制御系である SaeRS とは独立的に表皮剥脱毒素を制御することが明らかとなった (図2)。Agr および RNA の両遺伝子群を同時に抑制する因子は、これまでに報告がなく、新規な病原性制御機構であることが強く示唆された。

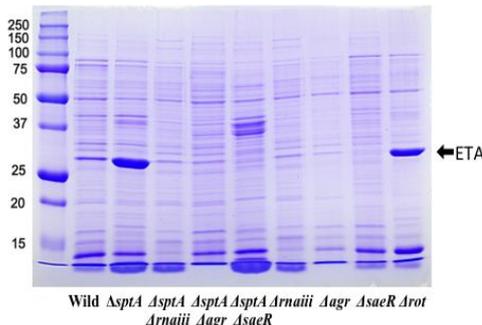


図3. 多重遺伝子欠損株の病原性因子の産生解析

(2) SptA の基質認識に関わるアミノ酸残基の同定: SptA と MurR の両者間で保存されている 184 番目のスレオニン、および 191 番目のグルタミン酸へのアラニン置換導入により SptA の転写抑制因子としての機能が失われた。さらに SptA の SIS 領域を MurR の SIS で置換した SptA-SIS(MurR) 置換体は、SptA と同等な機能を有していた。これらの結果から、SptA は MurR と同じ基質を認識すること、SptA の SIS 領域に位置する 2 つのアミノ酸残基 184 番目のスレオニンと 191 番目のグルタミン酸が SptA の基質認識において重要であることが強く示唆された (図3)。さらにこの結果は SptA に基質が結合した際に転写抑制因子として機能する事を示唆する。

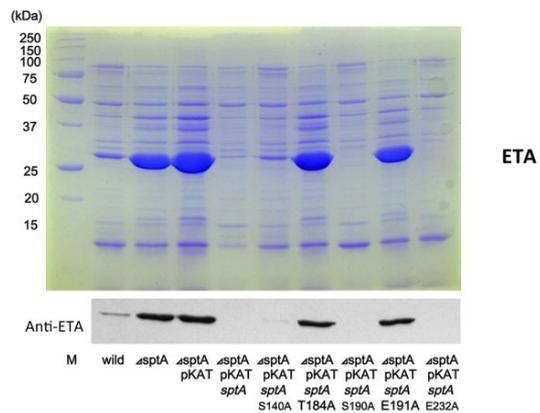


図4. SIS 領域へのアラニン置換導入による SptA の転写抑制機能の解析

(3) N -アセチルムラミン酸代謝関連遺伝子群欠損株解析による SptA が認識する基質の解明: N-アセチルムラミン酸の菌体内への取り込みに関与する MurT および N-アセチルムラミン 6 リン酸を N-アセチルグルコサミン 6 リン酸に変換する MurQ の欠損株を作製し解析した結果、MurT 欠損株 (N-アセチルムラミン 6 リン酸の欠乏) では表皮剥脱毒素産生量が増加し、MurQ 欠損株 (N-アセチルムラミン 6 リン酸の蓄積) では逆に減少した。さらに MurPQT (N-アセチルムラミン 6 リン酸の欠乏) 欠損株では特に *in vivo* 動物感染モデルにおいて SptA 欠損株と同等の強い表皮剥脱毒素活性を示した (図4)。

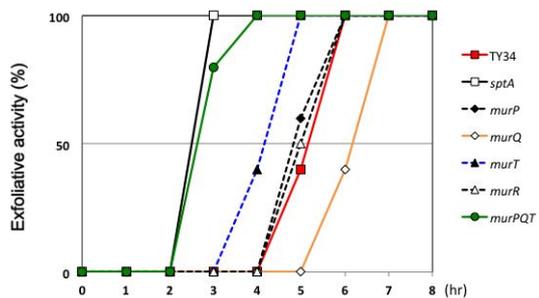


図5. murPQT 遺伝子欠損株を用いた動物感染モデルにおける表皮剥脱活性評価

この結果は細胞分裂・増殖において行われているペプチドグリカンのリサイクルで発生する菌体内のN-アセチルムラミン6リン酸量を感じし病原性遺伝子調節を行機構が存在する事を示唆し、病原性因子発現制御機構において新規な制御機構を提唱するものである。

(4)Chip-Seq およびゲルシフトアッセイによる SptA が結合する DNA 配列の同定：ヒスチジンタグおよびフラッグタグ融合 SptA タンパク質は黄色ブドウ球菌細胞内において転写抑制因子としての機能を失っており、Chip-Seq が困難であった。さらに大腸菌を利用し生産・精製した SptA はヒスチジンタグの有無に関わらず水溶液中で可溶化せず、ゲルシフトアッセイが困難であった。そこで黄色ブドウ球菌で機能を保持した状態でのタグ融合型 SptA および精製 SptA タンパク質の可溶化について検討した結果、pColdProS2 (TaKaRa Bio)vector の可溶化タグである ProS2 を N 末に融合した SptA が黄色ブドウ球菌において抑制因子としての機能を保持している事を明らかにした。このことにより、今後ゲルシフトアッセイおよび Chip-Seq 解析による SptA の結合する遺伝子配列を決定できる。

(5)黄色ブドウ球菌のラベル化および遺伝子発現のレポーター解析のための蛍光タンパク質の開発：前段階として、黄色ブドウ球菌において高強度に効率よく発現する様々な色の蛍光タンパク質の開発を行った。細菌においてオリジナル型のオワンクラゲ由来 GFP (Green Fluorescent Protein) は蛍光を示さない事が知られている事から、大腸菌において強い蛍光を示す GFPmut3b 遺伝子を用い、転写量の高い黄色ブドウ球菌のラクタマーゼ遺伝子由来のプロモーター下流に GFP 遺伝子を融合し、種々のアミノ酸変異を導入することで、黄色ブドウ球菌における高効率な蛍光タンパク質を評価した。その結果、EGFP (red-shifted GFP), Citrine (Yellow), BFP (Blue), Cerulean (Cyan), mEmerald (単量体, Green) を作製した。さらに、タカラバイオより購入した造礁サンゴ由来 AmCyan および mCherry は哺乳動物にコドン頻度が最適化されており、黄色ブドウ球菌では十分な蛍光を示さなかったことから、インバース PCR 法によりコドン使用頻度を黄色ブドウ球菌に最適化させることにより、十分な蛍光を観察できる事に成功した。今回開発した高効率な蛍光タンパク質は黄色ブドウ球菌においてこれまでに無い非常に強い蛍光を発し、寒天培地上のコロニーレベルで観察可能であった (図 5)。

今後 in vivo における感染動物モデル、感染細胞内やバイオフィーム形成における経時的な黄色ブドウ球菌の細胞増殖・遺伝子発現解析、蛍光タンパク質を指標とした遺伝子発現制御因子および DNA 配列の解析等、黄色

ブドウ球菌における実験手法を飛躍的に発展できる。

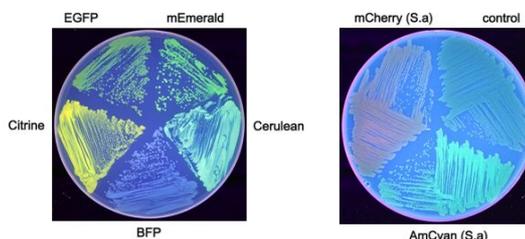


図 6. 寒天培地上での黄色ブドウ球菌の蛍光観察

本研究により、黄色ブドウ球菌新規転写調節因子 SptA が Agr および RNA の両遺伝子の転写を抑制することで、黄色ブドウ球菌の病原性因子産生を制御している事が強く示唆された。さらに新規転写調節因子 SptA はペプチドグリカンのリサイクルに関与する N-アセチルムラミン酸 6 リン酸、SIS 領域の 184 番目のスレオニンと 191 番目のグルタミン酸を介して認識結合し、転写抑制因子として機能する事が示唆された。細胞増殖や環境中での死菌により発生するペプチドグリカンの分解物を感じし、病原性生産が制御される機構はこれまでに報告がなく新規な病原性遺伝子発現制御機構を提唱するものである。さらに本研究を通じて高効率で多種の蛍光タンパク質を黄色ブドウ球菌において発現させることに成功したことから、今後、黄色ブドウ球菌における病原性解析の発展が期待される。

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 1 件)

1. Harada-Hada K, Harada K, Kato F, Hisatsune J, Tanida I, Ogawa M, Asano S, Sugai M, Hirata M, Kanematsu T. Phospholipase C-Related Catalytically Inactive Protein Participates in the Autophagic Elimination of *Staphylococcus aureus* Infecting Mouse Embryonic Fibroblasts. PLoS One. 2014 May 27;9(5):e98285. doi: 10.1371/journal.pone.0098285. 査読有

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 加藤文紀, 黄色ブドウ球菌における高強度な蛍光タンパク質発現ベクターの開発, 第 88 回日本細菌学会総会, 平成 27 年 3 月 27 日, 長良川国際会議場・岐阜県岐阜市

2. 加藤文紀, 黄色ブドウ球菌の病原性発現機構に関与するゲノム情報基盤, 中四国乳酸菌研究会, 平成 25 年 5 月 17 日, 岡山県岡山市

〔その他〕

ホームページ等

広島大学大学院医歯薬保健学研究院細菌学

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/saikin/>

6．研究組織

(1)研究代表者

加藤 文紀 (KATO FUMINORI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：70452589