

令和元年5月27日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04727

研究課題名(和文)新規RNA結合タンパク質群による細菌の病原性発現機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of bacterial virulence system via novel RNA binding proteins

研究代表者

垣内 力 (KAITO, Chikara)

東京大学・大学院薬学系研究科(薬学部)・准教授

研究者番号：60420238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：黄色ブドウ球菌は様々な疾患を引き起こす病原性細菌であり、薬剤耐性菌の増加が問題となっている。薬剤耐性菌に対する新しい治療薬を創出する上で、黄色ブドウ球菌の病原性発現の分子機構を理解することが重要である。本研究では、RNAおよび核酸と相互作用する黄色ブドウ球菌の機能未知因子群の中から、黄色ブドウ球菌の病原性に必要な新しい因子の同定を試みた。その結果、リボソームRNAのメチル化酵素、およびヌクレオチド分解酵素が黄色ブドウ球菌の病原性発現に必要であることを見出した。これらの新規因子の解析から、RNAおよびヌクレオチドを介した新たな病原性制御機構が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、RNAの修飾酵素とヌクレオチド分解酵素が細菌の病原性において重要な働きをすることを初めて見出した。細菌の病原性発現に関わる因子を同定し、その分子機能を解明することは、細菌がヒトを含む多細胞生物の体内に侵入し、増殖し、危害をもたらすメカニズムを理解するという学術的意義がある。また、本研究で同定した病原性因子群は、細菌の病原性を抑制する新しいタイプの感染症治療薬のターゲットとして利用可能であり、薬剤の標的分子を提示した点で社会上の意義がある。

研究成果の概要(英文)：Staphylococcus aureus is a human pathogenic bacterium and causes clinical problems of drug resistance. To find novel therapeutic agents, it is important to understand the virulence mechanism of S. aureus. In this research project, we tried to identify novel virulence factors of S. aureus from hypothetical genes whose products are assumed to interact with RNA or nucleotide. We found that three rRNA methyltransferases and a nucleotide hydrolase contribute to S. aureus virulence. Investigations of these novel virulence factors have revealed new mechanism of S. aureus virulence via RNA and nucleotide.

研究分野：微生物学、生化学、分子生物学

キーワード：リボソームRNA メチル化酵素 ヌクレオチド分解酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 病原性の分子機構の理解の重要性

細菌感染症は今なお世界の死因の上位を占める。薬剤耐性菌の出現は、先進国においても大きな問題となっており、新しい作用機序の感染症治療薬の開発が望まれている。新しい感染症治療薬を開発する上で、細菌の病原性発現の分子機構についての知的基盤を築くことが重要である。宿主動物体内において細菌が病原性因子の発現を制御する分子機構はほとんど明らかになっておらず、その理解には病原性因子の発現制御に関わる新規因子を同定することが必要である。

(2) 細菌の新規病原性制御因子群の発見

これまでに代表者は、黄色ブドウ球菌において細菌間で保存された機能未知遺伝子の欠損株を作出し、その病原性をカイコに対する殺傷能力を指標に評価することにより、細菌間で保存された新規病原性因子 CvfA, CvfB, CvfC を同定することに成功した。これらの遺伝子はマウスに対する病原性に必要であり、毒素など複数の病原性因子の発現調節に必要であった。代表者は、CvfA が RNA の分解制御に働くこと、CvfB がリボソームと相互作用する RNA 結合タンパク質であること、CvfC がヌクレオチド代謝酵素の発現調節に関わることを明らかとした。最近、代表者は新たに2つの病原性因子(CvfD, CvfE)の同定に成功し、それらがリボソーム RNA のメチル化酵素とヌクレオシド二リン酸の分解酵素に相同性を有することを見出している。CvfA, CvfB, CvfC, CvfD, CvfE は転写因子などの既知の病原性調節因子とは異なる新しいカテゴリーの病原性因子であり、RNA 分解、リボソーム構造修飾、ヌクレオチド代謝を介した新しい病原性発現システムの存在が示唆される。これらの細菌の病原性発現に必要な新しいプロセスを解明するためには、細菌の感染過程における各因子の分子機能を解明し、各因子と協調して機能する因子群を同定する必要がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新規 RNA 結合タンパク質群の機能解明によって、細菌の病原性発現の新たな機構を明らかにすることである。これまでに代表者は黄色ブドウ球菌のゲノム上に見出された機能未知因子群の欠損株ライブラリーを作製し、その中から病原性低下株を検索することにより、新規の病原性因子群を同定してきた。これらの病原性因子群は多くが RNA 結合、RNA 分解、リボソームの構造修飾などの機能を有することから、細菌の病原性因子の新しい機能カテゴリーの存在が示唆される。さらに、代表者は宿主動物体内での細菌 RNA の発現動態を捉え、感染過程において細菌 RNA の発現が大きく変化することを見出している。本研究は、新規機能カテゴリーの病原性因子群を基盤として、細菌の新しい病原性制御機構を明らかにするとともに、RNA 結合タンパク質の分子機能に関する新たな知的基盤を構築する。

3. 研究の方法

(1) 新規 RNA 結合タンパク質群 (CvfA, CvfB, CvfC, CvfD, CvfE) が標的とする生体分子を明らかにする。すなわち、CvfA と CvfB の標的 RNA、CvfD によるリボソーム RNA のメチル化、CvfC と CvfE が基質とするヌクレオチド分子種を解明する。

(2) 新規 RNA 結合タンパク質群 (CvfA, CvfB, CvfC, CvfD, CvfE) による基質代謝がもたらす黄色ブドウ球菌の変化をタンパク質レベル (プロテオーム解析)、RNA レベル (RNA シークエンス解析) で解明する。

(3) 黄色ブドウ球菌の機能未知タンパク質群から、RNA と相互作用し、病原性に必須な働きをするタンパク質を同定し、その分子機能を解明する。

4. 研究成果

(1) 黄色ブドウ球菌の病原性発現におけるリボソーム RNA メチル化酵素の分子機能の解明

黄色ブドウ球菌の機能未知遺伝子からカイコに対する殺傷活性に寄与する遺伝子として RsmI (CvfD) と RsmH を同定した。大腸菌において、これらの因子はリボソーム RNA をメチル化する酵素であることが知られている。黄色ブドウ球菌の RsmI/RsmH 遺伝子欠損株は、酸化ストレスに対して感受性を示すこと、ならびに、マウスマクロファージ内での生存能力が低下することを見出した (図1)。また、RsmI/RsmH 遺伝子欠損株においては、酸化ストレス条件において、翻訳の忠実度が低下することが明らかとなった。RsmI/RsmH 遺伝子欠損株の表現型は、酸化ストレスを除去する薬剤である N-アセチル-L-システインによりキャンセルされた。さらに、RsmI と RsmH 以外のリボソーム RNA メチル化酵素が黄色ブドウ球菌の病原性に寄与するかについて検討を行ったところ、

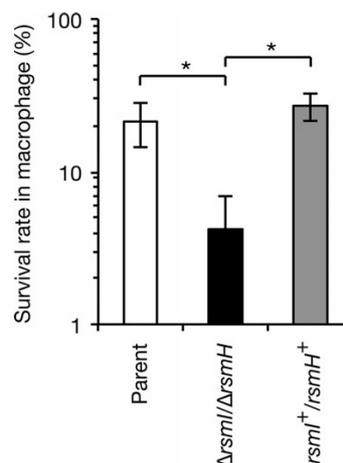


図1. リボソーム RNA メチル化酵素欠損株のマクロファージ内の生存率

KsgA の遺伝子欠損が黄色ブドウ球菌の酸化ストレス感受性、酸化ストレス条件下における翻訳忠実度の低下、カイコに対する病原性の低下を導くことが明らかとなった。以上の結果は、リボソーム RNA のメチル化修飾が酸化ストレス条件下における翻訳忠実度の悪化を防ぎ、黄色ブドウ球菌の病原性に寄与することを示唆している。

(2) 黄色ブドウ球菌の病原性発現におけるヌクレオシド三リン酸分解酵素の機能の解明

核酸と相互作用することが予想された黄色ブドウ球菌の機能未知因子群の遺伝子破壊株を作出し、カイコに対する殺傷能力が低下する遺伝子欠損株の探索を行った。その結果、カイコ殺傷能力に必要な 5 つの因子が同定された。その中のひとつの因子 (CvfE) の遺伝子欠損株は親株に比べて、カイコに対する半数致死量が 10 倍上昇していた。cvfE 遺伝子欠損株では、黄色ブドウ球菌が分泌する溶血毒素とヌクレアーゼの産生量が減少し、コロニースプレディング活性が低下していた (図 2)。CvfE は、放線菌のヌクレオシド三リン酸分解酵素 SC4828 と同種性を有していた。CvfE がヌクレオシド三リン酸分解活性を有するかについて、リコンビナントタンパク質を精製し検討した。その結果、リコンビナント CvfE タンパク質はマンガンイオン存在下においてヌクレオシド三リン酸を分解する

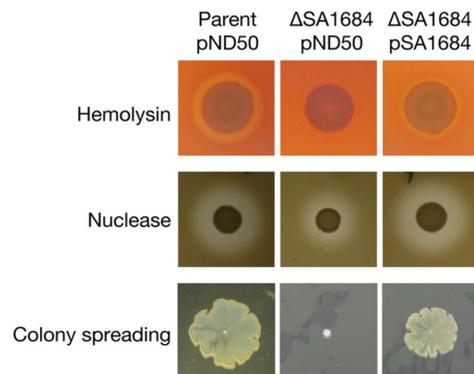


図 2 . cvfE (SA1684) 遺伝子欠損株における毒素産生量とコロニースプレディングの低下

こと、ならびに、ヌクレオシド三リン酸、一リン酸は分解しない事が判明した。CvfE のヌクレオシド三リン酸分解活性が CvfE による病原性発現に必要であるかを知るために、SC4828 との間で保存された CvfE のアミノ酸残基にアラニン置換変異を導入した。変異型 CvfE はヌクレオシド三リン酸分解活性を示さないこと、cvfE 遺伝子欠損株の溶血毒素産生量の低下を回復する活性を失っていることが見出された。RNA シークエンス解析により、cvfE 遺伝子欠損株において、病原性制御遺伝子以外に、解糖系や発酵経路などの代謝経路に関わる遺伝子の発現量が変化していることが明らかとなった。以上の結果は、新規ヌクレオシド三リン酸分解酵素 CvfE が病原性遺伝子と代謝経路遺伝子の発現を制御し、黄色ブドウ球菌の病原性発現に寄与することを示唆している。

(3) 環状ヌクレオチド分解酵素の分子機能の解明

核酸相互作用因子からの病原性因子探索により見出された CvfG は、2H ホスホエステラーゼスーパーファミリータンパク質に同種性を有していた。2H ホスホエステラーゼスーパーファミリータンパク質の基質のひとつである環状ヌクレオチドに対して、CvfG が分解活性を示すか、リコンビナント CvfG タンパク質を精製し検討した。その結果、CvfG は 2',3'-cGMP と 2',3'-cAMP を分解し、3'-リン酸ヌクレオチドを生成する活性を示した。一方、CvfE はピリミジン塩基の 2',3'-環状ヌクレオチドや 3',5'-環状ヌクレオチドに対する分解活性を示さなかった。見出された CvfG の環状ヌクレオチド分解活性に対する構造基盤を理解するために、CvfG と同種性を有するタンパク質群を用いて、2',3'-環状ヌクレオチド分解活性とタンパク質構造の比較解析を行った。大腸菌、好熱菌、サルモネラの相同タンパク質は、CvfG とは異なり、2',3'-環状ヌクレオチドを分解し、2'-リン酸ヌクレオチドを生成した。一方、枯草菌の相同タンパク質は、CvfG と同様に、2',3'-環状ヌクレオチドを分解し、3'-リン酸ヌクレオチドを生成した。タンパク質の構造比較の結果、大腸菌、好熱菌、サルモネラの相同タンパク質は、基質ポケットの芳香族アミノ酸のヌクレオチド塩基に対する配向性が CvfG とは異なっていた。一方、枯草菌の相同タンパク質は、基質ポケットの芳香族アミノ酸のヌクレオチド塩基に対する配向性が CvfG と同じであった。以上の結果は、CvfG タンパク質グループと大腸菌タンパク質グループの環状ヌクレオチド分解活性の違いが基質ポケットの芳香族アミノ酸により規定されていることを示唆している。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Mitsutomi S, Sekimizu K, Kaito C

Isolation of antibiotic-producing *Pseudomonas* species with low-temperature cultivation of temperate soil.

Drug Discoveries and Therapeutics 11(5):267-275. (2017) 査読有

doi: 10.5582/ddt.2017.01053.

Imae K, Saito Y, Kizaki H, Ryuno H, Mao H, Miyashita A, Suzuki Y, Sekimizu K, Kaito C

Novel nucleoside diphosphatase contributes to *Staphylococcus aureus* virulence.

J Biol Chem. 291(36):18608-19. (2016) "Paper of the Week" 査読有

doi: 10.1074/jbc.M116.721845.

Kizaki H, Omae Y, Tabuchi F, Saito Y, Sekimizu K, Kaito C
Cell-Surface Phenol Soluble Modulins Regulate *Staphylococcus aureus* Colony Spreading.
PLoS ONE. 11(10):e0164523. (2016) 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0164523.

Kaito C.

Understanding of bacterial virulence using the silkworm infection model.
Drug Discoveries and Therapeutics 10(1):30-3. (2016) Review. 査読有
doi: 10.5582/ddt.2016.01020.

Kyuma T, Kizaki H, Ryuno H, Sekimizu K, Kaito C
16S rRNA methyltransferase KsgA contributes to oxidative stress resistance and virulence
in *Staphylococcus aureus*.
Biochimie 119:166-74. (2015) 査読有
doi: 10.1016/j.biochi.2015.10.027.

Kyuma T, Kimura S, Hanada Y, Suzuki T, Sekimizu K, Kaito C
Ribosomal RNA methyltransferases contribute to *Staphylococcus aureus* virulence.
The FEBS Journal 282(13):2570-84. (2015) 査読有
doi: 10.1111/febs.13302.

〔学会発表〕(計 1 1 件)

Chikara Kaito

Silkworm infection model to investigate the staphylococcal virulence system
Workshop to Understand *Staphylococcus aureus* Pathogenesis (招待講演)(国際学会, Korea)
(2018)

光富修平、関水久、垣内力

A Novel Group of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Confers Heat Resistance in Bacteria
第 91 回日本細菌学会総会 (2018)

垣内力

黄色ブドウ球菌の菌体表層における毒素の機能
第 90 回日本細菌学会総会 (招待講演) (2017)

Chikara Kaito

Understanding of bacterial virulence using an insect infection model
先進ゲノム支援 国際シンポジウム「The Start of New Genomics」(国際学会) (2017)

垣内力

昆虫モデルを用いて解明する細菌の病原性発動システム
第 99 回日本細菌学会関東支部会総会 (招待講演) (2016)

Hayato Kizaki, Yosuke Omae, Yuki Saito, Kazuhisa Sekimizu, Chikara Kaito

Role of Cell Surface Phenol Soluble Modulins in *Staphylococcus aureus* Colony Spreading
The 17th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections (国際
学会, Korea) (2016)

垣内力

Microbe-host interactions revealed using the silkworm infection model
第 89 回日本細菌学会総会 シンポジウム (招待講演) (2016)

垣内力

昆虫モデルを利用した細菌-宿主相互作用の解明
生物の共生進化を考える (昆虫共生酵母研究会主催シンポジウム) (招待講演) (2015)

今江健太、齋藤祐樹、木崎速人、毛瀬、立野浩輝、宮下惇嗣、関水久、垣内力

黄色ブドウ球菌の病原性発現に働くヌクレオシドニリン酸分解酵素に関する研究
第 14 回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム 2015 (2015)

木崎速人、大前陽輔、齋藤祐樹、関水久、垣内力

黄色ブドウ球菌コロニー Spreiting における菌体表層の PSM 毒素の役割
第 60 回日本ブドウ球菌研究会 (2015)

垣内力、松本靖彦

新規 RNA 結合タンパク質群による細菌の病原性発現機構の解明
新学術領域「ゲノム支援」2015年度 拡大班会議 (2015)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：松本 靖彦

ローマ字氏名：(MATSUMOTO, yasuhiko)

所属研究機関名：東京大学

部局名：大学院薬学系研究科（薬学部）

職名：助教

研究者番号（8桁）: 60508141

(2)研究協力者

研究協力者氏名：関水 和久

ローマ字氏名：(SEKIMIZU, kazuhisa)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。