

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22715

研究課題名（和文）細菌における新規翻訳制御機構の探索

研究課題名（英文）Exploration of novel regulatory mechanisms of translation in bacteria

研究代表者

中田 匡宣（Nakata, Masanobu）

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：90444497

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：ヒト病原体である化膿レンサ球菌は感染過程において、周囲温度に対応して病原性を調節する。化膿レンサ球菌が温度の変遷により翻訳効率を変化させる因子群を検索した結果、mRNA翻訳開始部位の近隣に位置するステムループ構造だけでなく、非翻訳領域のmRNA構造も温度感受性の翻訳調節に関与することが示唆された。また、特定の転写因子を有する菌株において、エンドリボヌクレアーゼの一種であるRNase Yが付着因子である線毛の産生に重要であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

化膿レンサ球菌はヒトに多様な疾患を引き起こす。上市されているワクチンはなく、感染者数の増加が懸念されている。したがって、ワクチン抗原の選択や治療法開発の礎となる病態発症機序の解明が求められる。体内と比較して温度が低い皮膚や咽頭などの初発感染部位から体内へ感染が拡大する際、本菌は環境温度の変化に対応して、様々な因子の発現量を調節すると考えられている。感染過程における細菌の温度感知機構を理解することにより、細菌因子発現部位の予測や治療標的・ワクチン抗原を選択する際の指標となり得る。

研究成果の概要（英文）：The human pathogen *Streptococcus pyogenes* modulates virulence in response to ambient temperature during the infection process. We searched for bacterial factors that alter translation efficiency in response to temperature shifts. Our findings suggested that not only stem-loop structures located near mRNA translation initiation sites, but also mRNA structures in 5'-untranslated regions are likely involved in the temperature-sensitive translational regulation. In addition, our data revealed that the endoribonuclease RNase Y is crucial for pilus production from strains possessing a specific transcriptional regulator.

研究分野：細菌学

キーワード：レンサ球菌 翻訳効率 エンドリボヌクレアーゼ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

化膿レンサ球菌はヒトを宿主とし、皮膚や上気道へ局所性の化膿性炎症を惹き起こす。また、化膿性疾患が治癒した後に続発性免疫疾患として急性糸球体腎炎や急性リウマチ熱を起こす場合がある。さらに本菌は、低頻度ではあるものの、壊死性筋膜炎や敗血症を伴う劇症型感染症を惹起するため、ヒト喰いバクテリアという呼称で知られている。劇症型感染症での致死率は約30%を超えるにもかかわらず、上市されているワクチンはない。感染者数増加が懸念されており、病態発症機序の解明と基礎データに基づくワクチン抗原の選択と開発が待ち望まれている。

化膿レンサ球菌は組織指向性の付着因子として線毛を菌体表層に産生する。特定の血清型に属する本菌の線毛発現が温度依存性に制御されることが明らかにされてきた。すなわち、通常の培養温度(37°C)では、線毛は産生されず、初期感染部位(皮膚や上気道)を反映する低温において(〜30°C)、線毛遺伝子の発現と線毛産生が認められていた。この温度感受性の線毛発現を担う機構の一つは、線毛遺伝子に対する正の転写因子である RALP1 の環境温度による翻訳制御であった。温度変化により RALP1 の mRNA 量は変化しないにも関わらず、翻訳量が低温において上昇した。変異株ライブラリーを用いたスクリーニングにより、RALP1 の温度感受性を担う mRNA 部位として、開始コドンから約 20 塩基下流に位置するステムループ構造を明らかにした。ステムループの配置、培養温度の変遷による翻訳効率の変化、遺伝子変異株を用いた解析データ等に鑑みて、RALP1 mRNA 翻訳領域 5' 側ステムループは翻訳開始複合体形成の促進に関与することが考えられた。

転写産物の分解とプロセシングの制御はリボヌクレアーゼによって部分的に制御されるため、翻訳量に影響を与える。膜タンパク質である RNase Y はエンドリボヌクレアーゼ活性を示し、化膿レンサ球菌において複数の病原因子や制御因子の発現に影響を与えることが報告されてきた。また、一部の血清型において、主要な二成分制御系転写因子の変異により莢膜合成が培養温度で調節される現象が発見されていた。当該変異株では、莢膜合成酵素をコードする遺伝子の転写レベルは温度の変遷により変化しなかったが、タンパク質レベルは変化したことが報告されていた。この現象を担う因子として挙げられた RNase Y は莢膜合成酵素発現の転写後制御に影響を与える因子であることが示唆された。しかし、線毛産生の制御に RNase Y が関与するかについて不明であった。

### 2. 研究の目的

化膿レンサ球菌の初発感染部位である上気道や皮膚は、体内コア温度と比較して、低温となる傾向にあり、感染からヒト体内での定着と伝播の過程において、菌体周囲温度への適応が菌体の生存に重要であると推察される。また、菌体周囲温度に対応して選択的に遺伝子転写と翻訳を調節する可能性がある。この推定機構を検討するため、同様の位置にステムループ構造を有すると予測された因子群について、ステムループ構造が翻訳効率に与える影響を検討した。また、RNase Y が線毛産生と線毛産生に関与する制御因子の発現に与える影響について明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 化膿レンサ球菌の培養と菌体タンパク質の検出

大気条件下で 0.2%の酵母エキスを含む Todd Hewitt 培地 (THY 培地) を用いて培養した。通常の培養温度である 37°C と 25°C において菌株を一晩もしくは対数増殖期まで培養した。高濃度のショ糖を含む緩衝液を用いたムタノリジン抽出により細胞表層画分を調製した。細胞質画分はプロトプラストの破碎により調製した。ウェスタンブロット解析により、菌体タンパク質の検出やリン酸化率の検討を行った。タンパク質リン酸化の検討には、フォスタグゲルを用いた。検出に用いた抗血清は、組換えタンパク質を 4〜5 週齢 BALB/c マウスに免疫することにより作製した。

#### (2) 組換えタンパク質の作製

検出対象因子の遺伝子をヒスチジンタグ融合タンパク質発現プラスミドに挿入し、大腸菌に形質転換を行った。対数増殖期まで培養を行い、0.5 mM のイソプロピル-β-D(-)-チオガラクトピラノシドを添加し、アミノ基末端側にヒスチジンタグを融合させた組換えタンパク質の産生誘導を 37°C で 3 時間行った。菌体破碎液を調製し、Ni-NTA レジンを用いたアフィニティークロ

マトグラフィーならびにゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。タンパク質濃度は BCA 法により決定した。

### (3) 解析遺伝子群の抽出と発現解析

化膿レンサ球菌株の全構造遺伝子の DNA 塩基配列を対象に、RNA 構造予測ウェブサイトを用いて、開始コドンから 70 塩基までの配列を用いて開始コドンから～30 bp までにステムループ構造をとる遺伝子群を抽出した。そして、ステムループの位置と自由エネルギー変化を指標にして、特に病原性と代謝に関連する候補遺伝子群を選出した。選出した因子について、組換えタンパク質と抗血清を作製した。それぞれの因子に関して、培養温度が産生量に与える影響について検討した。

### (4) RNase Y 遺伝子欠失株の作製と表現型の解析

血清型 M49 型株を親株として、温度感受性ベクターを用いて抗菌薬耐性が付与されない RNase Y 遺伝子欠失株と復帰変異株を作製した。また、M1 型株、M3 型株、M6 型株についても同様に欠失株と復帰変異株を作製した。親株と作製した菌株から菌体表層画分を調製し、ウェスタンブロット解析により線毛発現量を比較した。また、線毛関連遺伝子と線毛産生に関わる制御因子の mRNA 量を定量的逆転写 PCR 法により解析した。線毛依存性に菌体が付着すると報告されているヒト角化上皮細胞株 HaCaT 細胞への菌体付着量を検討し、線毛産生量と菌体付着能の相関を確認した。線毛遺伝子の翻訳を抑制する二成分制御系転写因子については、タンパク質量およびリン酸化量を解析した。RALP1 については、タンパク質量の検討を行った。病原性に関連する表現型として、各菌株の血液寒天培地上での溶血能と細胞外システインプロテアーゼ活性を評価した。また、病原性に深く関与するヒト末梢血中での菌体生存能について検討した。

## 4. 研究成果

温度感受性の翻訳調節を担う mRNA 部位として、mRNA 翻訳開始部位の下流に位置するステムループ構造に着目し、同様の位置に推定ステムループ構造を有する遺伝子群を全遺伝子から抽出した。特に病原性と代謝に関連する遺伝子について、37°C と 25°C で培養した菌体を用いた発現解析により、温度変化に伴い翻訳効率に変化する因子群と変化しない因子群の存在が示唆された。したがって、mRNA 翻訳開始部位の近隣に位置するステムループ構造だけでなく、5'非翻訳領域の mRNA 構造も温度感受性の翻訳調節に関与することが示唆された。

RALP1 陽性である血清型 M49 株を用いた解析の結果、RNase Y が病原因子の発現や線毛産生量の調節に関与することが明らかとなった。RNase Y 遺伝子欠失株は、野生型や復帰型と比較して、線毛産生量の低下とヒト角化上皮細胞への付着能の低下を示した。さらに、RNase Y 遺伝子欠失株では、線毛関連遺伝子の転写レベルが低下し、その低下は低温において顕著であった。また、RALP1 の mRNA レベルおよびタンパク質レベルも RNase Y 遺伝子欠失により著しく低下した。RNase Y 遺伝子欠失による線毛産生量の低下は RALP1 をもたない M1 型株と M6 型株では認められず、RALP1 を有する M3 型株では認められた。これまでに線毛遺伝子の翻訳を抑制すると報告されてきたノンコーディング RNA の発現は RNase Y 遺伝子欠失により減少した一方、線毛遺伝子の転写を抑制する二成分制御系転写因子の mRNA 量、タンパク質量、およびリン酸化量に大きな変化が認められなかったことから、両者は必ずしも温度感受性の線毛産生に関与しないことが示唆された。変異株の表現型を解析した結果、培養温度と RNase Y 遺伝子欠失が溶血能とシステインプロテアーゼ活性に影響することが明らかになった。さらに、血中菌体生存試験では、RNase Y 遺伝子欠失によりヒト血液中での菌体生存率は低下した。以上の結果から、RNase Y が RALP1 を有する化膿レンサ球菌の線毛産生および病原性の制御に関与することが推察された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計18件（うち査読付論文 18件 / うち国際共著 6件 / うちオープンアクセス 13件）

1. 著者名 Kubota Seiko, Nakata Masanobu, Hirose Yujiro, Yamaguchi Masaya, Kreikemeyer Bernd, Uzawa Narikazu, Sumitomo Tomoko, Kawabata Shigetada	4. 巻 -
2. 論文標題 Involvement of ribonuclease Y in pilus production by M49 Streptococcus pyogenes strain via modulation of messenger RNA level of transcriptional regulator	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.13069	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Okahashi Nobuo, Sumitomo Tomoko, Nakata Masanobu, Kawabata Shigetada	4. 巻 66
2. 論文標題 Secondary streptococcal infection following influenza	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 253 ~ 263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12965	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Oogai Y, Nakata M.	4. 巻 57
2. 論文標題 Small regulatory RNAs of oral streptococci and periodontal bacteria.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Jpn. Dent. Sci. Rev.	6. 最初と最後の頁 209-216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jdsr.2021.09.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sumitomo T, Nakata M, Nagase S, Takahara Y, Honda-Ogawa M, Mori Y, Akamatsu Y, Yamaguchi M, Okamoto S, Kawabata S.	4. 巻 12
2. 論文標題 GP96 Drives Exacerbation of Secondary Bacterial Pneumonia following Influenza A Virus Infection.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 e0326920
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mBio.03269-20	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nakata M, Kreikemeyer B.	4. 巻 12
2. 論文標題 Genetics, Structure, and Function of Group A Streptococcal Pili	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 616508
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.616508	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Okahashi N, Nakata M, Hirose Y, Morisaki H, Kataoka H, Kuwata H, Kawabata S.	4. 巻 15
2. 論文標題 Streptococcal H2O2 inhibits IgE-triggered degranulation of RBL-2H3 mast cell/basophil cell line by inducing cell death.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0231101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0231101	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yamaguchi M, Takemura M, Higashi K, Goto K, Hirose Y, Sumitomo T, Nakata M, Uzawa N, Kawabata S.	4. 巻 11
2. 論文標題 Role of BgaA as a pneumococcal virulence factor elucidated by molecular evolutionary analysis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Microbiol	6. 最初と最後の頁 582437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.582437	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hirose Y, Yamaguchi M, Sumitomo T, Nakata M, Hanada T, Okuzaki D, Motooka D, Mori Y, Kawasaki H, Coady A, Uchiyama S, Hiraoka M, Zurich R.H, Amagai M, Nizet V, Kawabata S.	4. 巻 34
2. 論文標題 Streptococcus pyogenes upregulates arginine catabolism to exert its pathogenesis on the skin surface.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Rep.	6. 最初と最後の頁 108924
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2021.108924	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Nakata M, Sumitomo T, Patenge N, Kreikemeyer B, Kawabata S.	4. 巻 113
2. 論文標題 Thermosensitive pilus production by FCT type 3 Streptococcus pyogenes controlled by Nra regulator translational efficiency.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 173-189
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mmi.14408	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Hirose Y, Yamaguchi M, Okuzaki D, Motooka D, Hamamoto H, Hanada T, Sumitomo T, Nakata M, Kawabata S.	4. 巻 85
2. 論文標題 Streptococcus pyogenes transcriptome changes in inflammatory environment of necrotizing fasciitis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Appl. Environ. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 e01428-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.01428-19	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計38件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 中田匡宣
2. 発表標題 化膿レンサ球菌におけるサーモセンサーの発見
3. 学会等名 第3回南九州歯学会学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 窪田星子, 中田匡宣, 広瀬雄二郎, 山口雅也, 住友倫子, 川端重忠.
2. 発表標題 血清型M49型Streptococcus pyogenesのCvfAは病原因子の発現と温度依存性の線毛産生に関与する.
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 窪田星子, 中田匡宣, 広瀬雄二郎, 山口雅也, 住友倫子, 川端重忠.
2. 発表標題 Streptococcus pyogenesのCvfAと温度依存性の線毛産生機構の解析.
3. 学会等名 第73回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東孝太郎, 山口雅也, 中田匡宣, 武部克希, 住友倫子, 鈴木守, 川端重忠.
2. 発表標題 化膿レンサ球菌におけるヒアルロン酸分解酵素の分子系統解析およびタンパク質結晶構造解析
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 東孝太郎, 山口雅也, 中田匡宣, 武部克希, 住友倫子, 鈴木守, 川端重忠.
2. 発表標題 結晶構造解析に基づく化膿レンサ球菌におけるヒアルロン酸分解酵素の分子機構解明
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中田匡宣
2. 発表標題 化膿レンサ球菌における温度感受性の線毛産生を担う分子機構の解析
3. 学会等名 第4回鹿大細菌カンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 広瀬雄二郎, 山口雅也, 住友倫子, 川端重忠.
2. 発表標題 化膿レンサ球菌のアルギニン代謝系は皮膚上で病原性発揮機構に寄与する.
3. 学会等名 第93回日本感染症学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中田匡宣, 住友倫子, 川端重忠.
2. 発表標題 化膿レンサ球菌による温度依存性の線毛産生(Temperature-dependent pilus production of <i>Streptococcus pyogenes</i> ).
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 広瀬雄二郎, 山口雅也, 毛利泰士, 後藤花奈, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠.
2. 発表標題 <i>Streptococcus pyogenes</i> のアルギニン代謝系が病変形成に果たす役割の解析.
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 李怡萱, 中田匡宣, 岡橋暢夫, 山口雅也, 住友倫子, 川端重忠.
2. 発表標題 Component analysis of cell-wall anchored pili in <i>Streptococcus sanguinis</i> .
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Sumitomo T, Hamd DT, Honda-Ogawa M, Mori Y, Yamaguchi M, Nakata M, Kawabata S.
2. 発表標題 Two-component regulatory system TCS08 contributes to pathogenesis in pneumococcal pneumonia.
3. 学会等名 ASM Microbe 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 花田知己, 広瀬雄二郎, 山口雅也, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠.
2. 発表標題 マウス壊死性筋膜炎モデルの感染局所におけるStreptococcus pyogenesの遺伝子発現解析.
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Li Y, Nakata M, Sumitomo T, Hirose Y, Takemura M, Yamaguchi M, Okahashi N, Kawabata S.
2. 発表標題 Restoration of intact nra into serotype M18 Streptococcus pyogenes restored thermosensitive pilus production.
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 広瀬雄二郎, 山口雅也, 花田知己, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠.
2. 発表標題 Streptococcus pyogenesは低グルコース環境においてアルギニン代謝依存的に遺伝子発現を変動させる.
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中田匡宣, 住友倫子, 川端重忠.
2. 発表標題 温度感受性転写因子の翻訳効率に依存する化膿レンサ球菌の線毛発現.
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Li Y, Nakata M, Sumitomo T, Hirose Y, Takemura M, Yamaguchi M, Kawabata S.
2. 発表標題 Restoration of transcriptional regulator nra in serotype M18 Streptococcus pyogenes leads to phenotypic change.
3. 学会等名 第7回口腔微生物研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 住友倫子, 中田匡宣, 長瀬賢史, 高原悠樹, 山口雅也, 岡本成史, 川端重忠.
2. 発表標題 インフルエンザに続発する細菌性肺炎の発症におけるGP96の機能解析.
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中田匡宣.
2. 発表標題 mRNAサーモセンサーにより制御される化膿レンサ球菌の温度感受性線毛産生.
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Nakata M, Kawabata S.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer Nature	5. 総ページ数 10
3. 書名 Detection of fibronectin-binding proteins of Streptococcus pyogenes by ligand-blot analysis. Ed: Thomas Proft and Jacelyn Loh, Methods in Molecular Biology, Group A Streptococcus: Methods and Protocols.	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 口腔微生物学分野  <a href="https://www2.kufm.kagoshima-u.ac.jp/field/health-research/f004/06.html">https://www2.kufm.kagoshima-u.ac.jp/field/health-research/f004/06.html</a></p>
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	住友 倫子 (Sumitomo Tomoko) (50423421)	大阪大学・大学院歯学研究科・講師  (14401)	
研究分担者	山口 雅也 (Yamaguchi Masaya) (00714536)	大阪大学・大学院歯学研究科・准教授  (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------

ドイツ	ロストック大学医学部病院			
-----	--------------	--	--	--