

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390021

研究課題名（和文） カイコ感染モデルを基盤とした細菌の病原性発現システムの解明

研究課題名（英文） Elucidation of bacterial pathogenesis system based on a silkworm infection model

研究代表者

関水 和久 (SEKIMIZU KAZUHISA)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：90126095

研究成果の概要（和文）：本研究で、我々は、カイコ感染モデルを用いて同定された黄色ブドウ球菌の病原性調節因子、CvfB の機能解析を行った。解像度が 1.4 Å の結晶構造解析から、CvfB タンパク質が三つの S1 RNA 結合ドメインと一つの Winged-Helix ドメインから構成されていた。また、CvfB タンパク質の RNA 結合活性が黄色ブドウ球菌の溶血毒素産生に必要であることを明らかにした。（180 文字）

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed to solve molecular function of CvfB (conserved virulence factor B), which was identified as a virulence regulatory factor using silkworm infection model. CvfB has three S1 RNA binding domain and a Winged-Helix domain revealed by crystal structure at 1.4 Å resolution. Moreover, we uncovered the RNA binding activity of CvfB is required for hemolysin production in *Staphylococcus aureus*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2009年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2010年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：カイコ・病原性・病原性因子

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌は化膿性炎症、敗血症などを引き起こす日和見感染菌である。我々は、カイコ感染モデルを用い、黄色ブドウ球菌の新規病原性遺伝子 *cvfB* (conserved virulence factor B) を同定している。*cvfB* 遺伝子は黄色ブドウ球菌の病原性調節因子の発現を介する毒素の産生に寄与することも明らかとしている。しかし、CvfB タンパク質の分子機能は不明であった。今回我々は、CvfB の結晶構造解析と生化学的解析を試みた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、黄色ブドウ球菌の病原性因子である CvfB の分子機能の解明である。

3. 研究の方法

(1) CvfB タンパク質の結晶構造解析

肺炎連鎖球菌の His-tag 融合型 CvfB タンパク質をニッケルカラムで調製し、X 線を照射し、回析像を得た。

(2) RNA 結合活性の定量

人工 RNA である poly(U) の末端に γ -³²P-ATP からリン酸を付加した。ラベルされた poly(U) と精製した CvfB タンパク質を混合し、4°C で反応させ、フィルターバインディングアッセイにより、RNA 結合活性を算出した。

(3) 溶血活性の定量

黄色ブドウ球菌株をそれぞれ一晩培養し、培養上清を得た。その培養上清に羊赤血球溶液に加え、37°C で反応させた。遠心上清の吸光度を測定し、溶血活性を算出した。

4. 研究成果

(1) 肺炎球菌の CvfB タンパク質の結晶構造解析

我々は、様々な菌種の CvfB をそれぞれ調製し、X 線結晶構造解析を行った。その結果、グラム陽性菌である肺炎連鎖球菌の CvfB の結晶構造解析像が解像度 1.4 Å で得られた (図 1)。

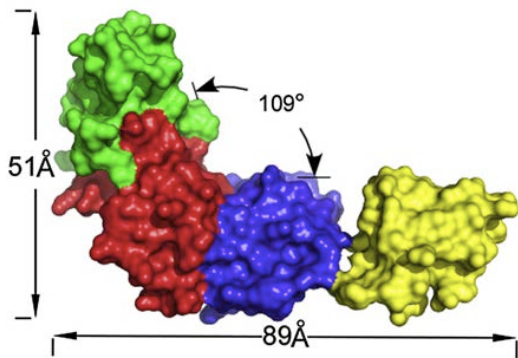


図 1 肺炎レンサ球菌の CvfB タンパク質の結晶構造

CvfB タンパク質は、三つの S1 RNA 結合ドメインとひとつの Winged-Helix ドメインからなるタンパク質であった (図 2)。

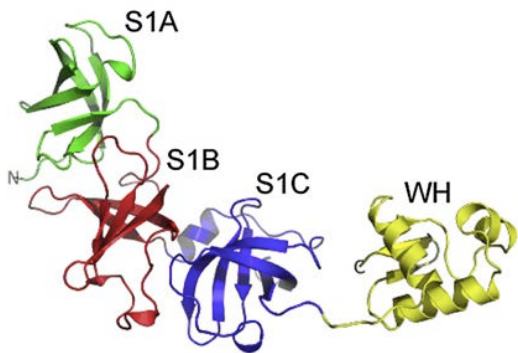


図 2 CvfB タンパク質のドメイン

(2) CvfB タンパク質の RNA 結合活性

次に、CvfB タンパク質が RNA 結合活性を有するか検討した。肺炎レンサ球菌の CvfB タンパク質も黄色ブドウ球菌の CvfB タンパク質も RNA 結合活性を有していた (図 3)。

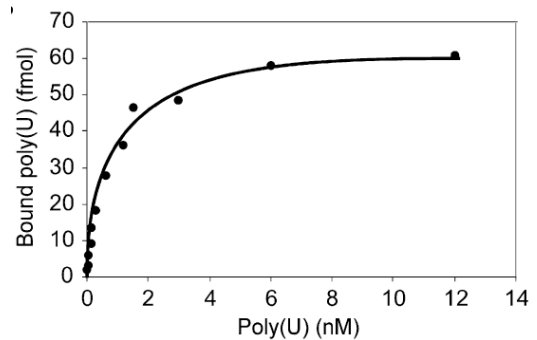


図 3 黄色ブドウ球菌の CvfB タンパク質の RNA 結合活性

さらに、競合阻害アッセイから poly(U), poly(G) との親和性が強く、tRNA や DNA とは結合しなかった (表 1)。

Competitor	Amount for 50% Inhibition [Competitor/Labeled poly(U)]
Poly(U)	1
Poly(G)	1
Poly(C)	>250
Poly(A) poly(U)	4
Poly(C) poly(G)	4
<i>E. coli</i> tRNA	>230
Sonicated salmon sperm DNA	>200
tmRNA	25

表 1 CvfB タンパク質の核酸結合における特異性

結晶構造解析から、CvfB タンパク質の表面電荷を示し、CvfB と RNA との結合領域を予測した (図 4)。

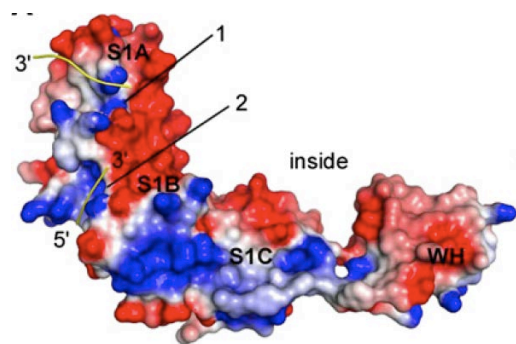


図 4 CvfB タンパク質の表面電荷と RNA 結合領域の予測

CvfB タンパク質の RNA 結合活性に必要なドメインの特定を行った。それぞれのドメインを有する、もしくは欠損した変異型 CvfB タンパク質を調製し、RNA 結合活性を測定した。CvfB タンパク質の三番目の S1 RNA 結合ドメイン (S1C) と Winged-Helix ドメイン (WH) が RNA 結合に必要十分であった (図 5)。

さらに、この S1C ドメイン、WH ドメインのどのアミノ酸が RNA 結合に必要なか検討した。S1C ドメインの 175 番目のフェニルアラニン、WH ドメインの 249 番目のリジン、249、267、275 番目のリジン三つ、アラニンに置換した変異型 CvfB タンパク質は、解離定数 (Kd) が高かった。また、WH ドメインの 271 番目のグリシンをグルタミン酸に置換し、表面電荷を変化させると、RNA 結合活性が低下した (図 6)。

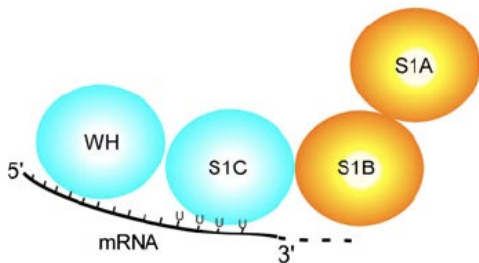
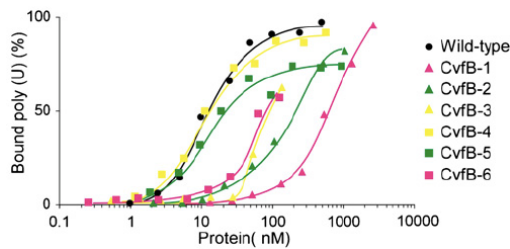
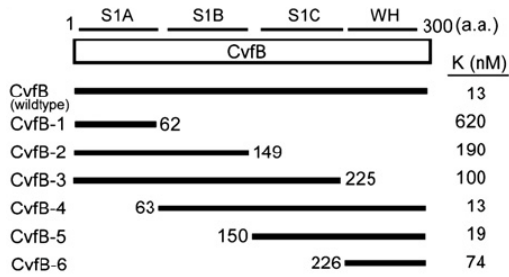


図 5 CvfB タンパク質は、S1C ドメインと WH ドメインを介して RNA と結合する

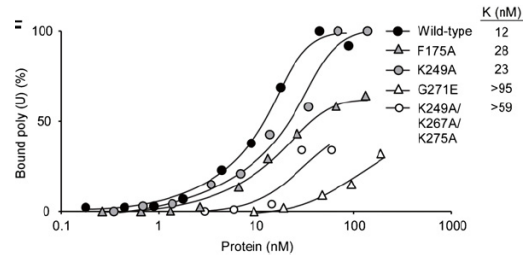


図 6 変異型 CvfB における RNA 結合活性の低下

CvfB タンパク質の WH ドメインにおける表面電荷が RNA 結合に必要なことが示唆された。そこで、結晶構造から、CvfB と RNA との結合様式について予測した。249、267、275 番目のリジン、及び 271 番目のグリシンは、一つの α ヘリックス上に位置してお

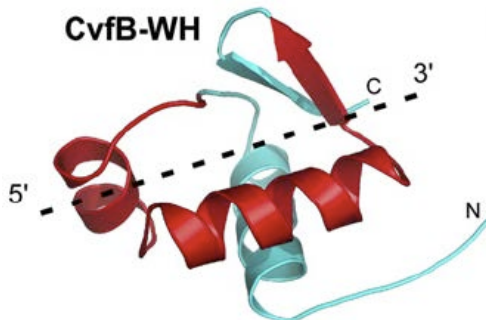
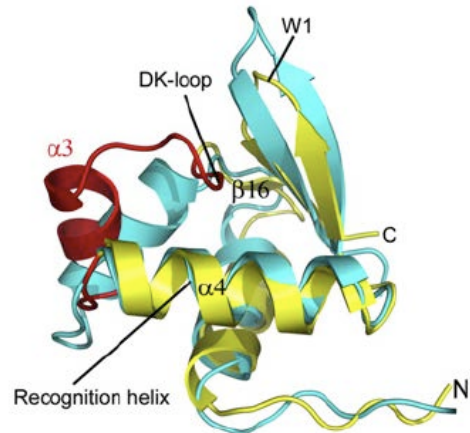
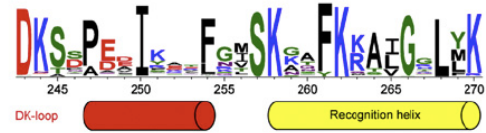


図 7 CvfB タンパク質の RNA 認識領域

り、この表面電荷がプラス荷電であると RNA と結合する。この領域が RNA との認識領域 (Recognition Helix) であることが予想された (図 7)。

(3) 黄色ブドウ球菌の溶血毒素産生に CvfB タンパク質の Winged-Helix ドメインは必要

次に我々は、CvfB タンパク質の WH ドメインが黄色ブドウ球菌の溶血毒素産生に寄与するか検討した。WH ドメインが欠損した変異型 CvfB タンパク質 (CvfB(1-225)) が発現している黄色ブドウ球菌株は、野生型、及び S1A ドメインが欠損している変異型 CvfB タンパク質 (CvfB(63-300)) を発現している株より溶血活性が低かった (図 8)。よって、CvfB の RNA 結合活性に必要な WH ドメインは、黄色ブドウ球菌の溶血毒素産生にも必要であることがわかった。これらの結果は、CvfB タンパク質の RNA 結合活性が溶血毒素産生に寄与することを示唆する。

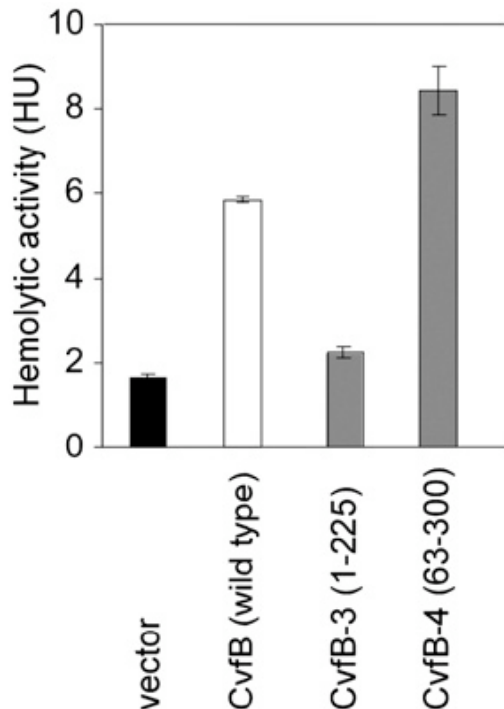


図 8 CvfB タンパク質の WH ドメインの欠損による溶血活性の低下

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 10 件)
全て査読有。

(1) Transcription and translation products of the cytolysin gene psm-mec on the mobile genetic element SCCmec regulate *Staphylococcus aureus* virulence.

Kaito C, Saito Y, Nagano G, Ikuo M, Omae Y, Hanada Y, Han X, Kuwahara-Arai K, Hishinuma T, Baba T, Ito T, Hiramatsu K, Sekimizu K.

PLoS Pathog. 2011 Feb 3;7(2):e1001267.

(2) *Porphyromonas gingivalis* peptidoglycans induce excessive activation of the innate immune system in silkworm larvae.

Ishii K, Hamamoto H, Imamura K, Adachi T, Shoji M, Nakayama K, Sekimizu K.

J Biol Chem. 2010 Oct 22;285(43):33338-47.

(3) Insect cytokine paralytic peptide (PP) induces cellular and humoral immune responses in the silkworm *Bombyx mori*.

Ishii K, Hamamoto H, Kamimura M, Nakamura Y, Noda H, Imamura K, Mita K, Sekimizu K.

J Biol Chem. 2010 Sep 10;285(37):28635-42.

(4) Structure of a virulence regulatory factor CvfB reveals a novel winged helix RNA binding module.

Matsumoto Y, Xu Q, Miyazaki S, Kaito C, Farr CL, Axelrod HL, Chiu HJ, Klock HE, Knuth MW, Miller MD, Elsliger MA, Deacon AM, Godzik A, Lesley SA, Sekimizu K, Wilson IA. Structure. 2010 Mar 14;18(4):537-47.

(5) The *cvfC* operon of *Staphylococcus aureus* contributes to virulence via expression of the *thyA* gene.

Ikuo M, Kaito C, Sekimizu K.

Microb Pathog. 2010 Jul-Aug;49(1-2):1-7.
Epub 2010 Mar 27.

(6) Rapid exchange of bound ADP on the Staphylococcus aureus replication initiation protein DnaA.

Kurokawa K, Mizumura H, Takaki T, Ishii Y, Ichihashi N, Lee BL, Sekimizu K.
J Biol Chem. 2009 Dec 4;284(49):34201-10.

(7) Evaluation of target specificity of antibacterial agents using Staphylococcus aureus ddlA mutants and D-cycloserine in a silkworm infection model.

Kurokawa K, Hamamoto H, Matsuo M, Nishida S, Yamane N, Lee BL, Murakami K, Maki H, Sekimizu K.
Antimicrob Agents Chemother. 2009 Sep;53(9):4025-7.

(8) A novel gene, fudoh, in the SCCmec region suppresses the colony spreading ability and virulence of Staphylococcus aureus.

Kaito C, Omae Y, Matsumoto Y, Nagata M, Yamaguchi H, Aoto T, Ito T, Hiramatsu K, Sekimizu K.
PLoS One. 2008;3(12):e3921.

(9) Purification of a soil bacteria exotoxin using silkworm toxicity to measure specific activity.

Usui K, Miyazaki S, Kaito C, Sekimizu K.
Microb Pathog. 2009 Feb;46(2):59-62.

(10) Pleiotropic roles of polyglycerolphosphate synthase of

lipoteichoic acid in growth of Staphylococcus aureus cells.

Oku Y, Kurokawa K, Matsuo M, Yamada S, Lee BL, Sekimizu K.
J Bacteriol. 2009 Jan;191(1):141-51.

〔学会発表〕（計 7 件）

(1) 彩都産学官連携シンポジウム
カイコ幼虫感染症モデルを用いた、バイオアッセイによる感染症治療薬シーズの開発
関水と久、2011年1月27日、大阪

(2) 「特定領域」感染現象のマトリックス 第7回全体班会議
新規病原性遺伝子群を基盤とする病原性発現システムの把握
関水と久、2011年1月13日、東京

(3) 拠点大学交流事業 The 9th NRCT-JSPS Joint Seminar
招待講演「Silkworm infection models for evaluation of bacterial pathogenicity and the therapeutic effects of antibiotics」
関水と久、2010年12月9日、バンコク

(4) 第32回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム
毒素遺伝子の転写産物と翻訳産物によるメチシリン耐性黄色ブドウ球菌の病原性制御
垣内力、2010年11月29日、富山県

(5) 2010年度日本農芸化学会西日本支部若手シンポジウム
招待講演「カイコ創薬のすすめ」
関水と久、2010年10月23日、九州大学

(6) 第10回あわじしま感染症・免疫フォーラム
招待講演「Use of silkworm for evaluation bacterial pathogenicity and the therapeutic effects of antibiotics」
関水と久、2010年9月8日、兵庫県

(7) (社) 日本薬剤学会第35回製剤セミナー
招待講演「カイコを利用した医薬品開発」
関水と久、2010年7月22日、浜松市

〔図書〕（計 1 件）

(1) 関水と久、垣内力、浜本洋、松本靖彦
廣川書店
創薬化学の魅力 -東京大学大学院薬学系研究科からの発信-
2010年・P263-274

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~bisei/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関水 和久 (SEKIMIZU KAZUHISA)

東京大学・大学院薬学系研究科・教授

研究者番号：90126095

(2) 研究分担者

垣内 力 (KAITO CHIKARA)

東京大学・大学院薬学系研究科・准教授

研究者番号：60420238