

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590510

研究課題名(和文)連鎖球菌感染に必須なヒト特異的細胞溶解毒素の発現制御機構の解析

研究課題名(英文) Investigation of the regulatory mechanism for the production of a human specific cytolysin, a crucial factor for the infectivity of *Streptococcus intermedius*

研究代表者

友安 俊文 (Tomoyasu, Toshifumi)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・准教授

研究者番号：20323404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：Streptococcus intermedius は、インターメディリシン(ILY)を主要な病原因子として分泌する。我々は、ILY低産生株のlacR破壊株において、ily発現亢進とそれに伴う溶血活性の増加を確認した。また、この株がHepG2に対して強い細胞毒性を示すことも明らかにした。加えて、LacRとilyプロモーター領域が直接相互作用することやガラクトースがILY分泌を促進することを確認した。さらに、臨床分離株50株と歯垢分離株7株の溶血活性の測定とlacR配列を検討した結果、13株の臨床分離株がILYを高産生し、その中の9株にLacRの機能が低下する変異が起こっている事を発見した。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus intermedius secretes intermedilysin(ILY), which is a major virulence factor of this pathogen. We showed that the disruption of lacR in an ILY low-producing strain (PC574) led to higher hemolytic activity, increased transcription of ily and higher cytotoxicity against HepG2 cells, when compared to the parental strain. The direct binding of LacR within the ily promoter region was observed by a DNA probe pull-down assay. Adding galactose or lactose into the medium increased the amount of ILY secreted by PC574 cells.

Furthermore, we studied the lacR nucleotide sequences and the hemolytic activity of 50 strains isolated from clinical infections and 7 strains isolated from dental plaque. Thirteen strains isolated from clinical infections showed high ILY production and 9 strains had one or more point mutations and/or an insertion mutation in LacR, which caused the decline in its function.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：連鎖球菌 細胞溶解毒素 発現制御 細胞毒性 ガラクトース

## 1. 研究開始当初の背景

*Streptococcus intermedius* (SI)は、アングノーサス群 (AGS) に属する口腔内細菌叢に含まれる菌であるが、日和見的に難治性で反復性の歯周病、また脳や肝臓などの深部臓器で重篤な膿瘍感染を引き起こす事が明らかになり、国内外においてその臨床的な重要性の認識が高まっている。我々は、SI がコレステロール依存性細胞溶解毒素ファミリーに属するヒト特異的細胞溶解毒素 “Intermedilysin (ILY)” を分泌することを明らかにしている。さらに、*ily* 遺伝子ノックアウト株のヒト細胞感染性や細胞毒性が激減すること、重症膿瘍由来の強毒株の ILY 分泌量が歯垢由来の弱毒株に比べて平均で 6~10 倍も多いことなども確認しており、この毒素は SI 感染に必須の因子であると考えられている。そこで、我々は *ily* 遺伝子の発現制御機構についての解析を行った。その結果、catabolite control protein A (CcpA) によってその発現がカタボライト抑制されることを発見している。さらに、CcpA 以外の *ily* 発現制御に関わる因子を、トランスポゾンにより ILY 低産生株 (PC574) の染色体遺伝子をランダムに破壊することで探索した結果、lactose phosphotransferase system repressor (LacR) をコードしている *lacR* 遺伝子にトランスポゾンが挿入された株の ILY 分泌量が、著しく増加することを発見した。しかしながら、LacR がどのように *ily* 遺伝子発現制御を行っているのかについて、このタンパク質により SI の病原性が制御されているのかどうかについては謎であった。

## 2. 研究の目的

SI の染色体遺伝子をトランスポゾンによってランダムに破壊した結果、LacR が *ily* 発現を制御している可能性が高くなった。そこで、LacR が SI の *ily* 発現制御や病原性発現制御にどのように関わっているのかについて解析する目的で、*lacR* 破壊 (*lacR*) 株やその相補株を作製し、その株の ILY 産生量やヒト由来培養細胞株 (HepG2) に対する細胞毒性などについて検討を行った。

また、深部膿瘍から分離された SI に ILY を高産生する株が多く認められる。そこで、多数の臨床分離株や歯垢分離株の ILY 産生量と *lacR* 遺伝子の変異の有無を調べることにより、それらの間に相関が認められるかどうかを明らかにする為の実験を行った。これにより、LacR の機能消失が SI の高病原性化に関与している可能性について調査した。

これら研究により得られた知見を利用す

ることで、SI による難治性の歯肉炎や深部膿瘍形成の予防法や治療法の開発を行うことを最終目標にして研究を進めた。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究に用いた株

遺伝子組換え実験は歯垢分離株 *S. intermedius* PC574 を用いて行った。PCR プライマーは基準株の *S. intermedius* NCD02227 のゲノム情報を基に設計した。さらに、*ily* 遺伝子の発現量と *lacR* 変異の関連性の有無を調べる実験の為に、上記の株以外に 50 株の臨床分離株と 6 株の歯垢分離株を使用した。

### (2) 培養条件

培地は Brain heart infusion (BHI) 培地ないしは pH の変動を抑える為に 2 倍希釈した BHI 培地に 100mM の MOPS バッファー (pH7.4) を添加した MOPS-BHI 培地を使用した。培養は、嫌気条件下 37°C で行った。

### (3) *lacR* 株の作製

*lacR* 遺伝子内に薬剤耐性 (エリスロマイシン) カセットを挿入した遺伝子断片を作製した。この断片を、nested-PCR によって再び増幅した。この増幅断片を、形質転換促進ペプチド (CSP) 処理した PC574 に添加することで細胞内に導入した。相同組換えにより *lacR* が破壊された株 (PC574 *lacR*) は、エリスロマイシン耐性を指標に単離した。*lacR* 遺伝子の破壊は抗 ILY 抗血清を用いたイムノプロットティングによって確認した (図 1)。

(4) *lacR* 遺伝子とそのプロモーター領域を含む断片を、連鎖球菌-大腸菌シャトルベクター pSETN1 に連結した。このプラスミド (pSETN1 *lacR*) を大腸菌 (DH5 Z1) に形質転換し増幅した。大腸菌から調製したプラスミドを CSP 処理した *lacR* 株に添加しクロラムフェニコール耐性を指標に相補株を分離した。相補が行われていることは抗 ILY 抗血清を用いたイムノプロットティングによって確認した (図 1)。

### (5) LacR の精製と抗 LacR 抗体の作製

N 末端 6xヒスチジンタグベクター pUHE212-1 に *lacR* 遺伝子をクローニングしたプラスミド (pN-his *lacR*) を作製した。このプラスミドを保有する DH5 Z1 を IPTG 含有 LB 培地で培養することでヒスチジンタグが導入された組換え LacR (rLacR) を過剰産生した。この株から、Ni-NTA アフィニティ

ーカラムを用いて rLacR の精製を行った。なお、rLacR の殆どのが大腸菌内でインクルージョンボディを形成していたので 6M 尿素で可溶化した条件で精製を行った。このサンプルを尿素非含有バッファーで透析することでリフォールディングした。透析時沈殿してしまった rLacR は、尿素で再可溶化後にアジュバンドと混合し、ウサギの免疫に用いた。

#### (6) *lacR* 遺伝子の配列決定

臨床分離株と歯垢分離株からゲノム DNA を抽出した後に、プロモーター領域を含む *lacR* 遺伝子領域を PCR によって増幅した。この断片を用いて *lacR* 遺伝子の配列を決定した。

#### (7) 溶血活性

健康人ボランティアから得られたヒト赤血球を用いた。培養上清中の溶血活性は、同じ菌数あたりになるように吸光度 ( $OD_{600}$ ) で補正を行った培養上清を用いて測定した。ヒト赤血球寒天培地を用いる場合は、溶血斑の大きさを比較することで活性の強弱を調べた。

#### (8) リアルタイム定量 PCR (qRT-PCR)

qRT-PCR には、MOPS-BHI 培地で 16 時間培養した PC574、*lacR* 株、相補株から抽出した RNA から作製した cDNA を用いた。*ily* 遺伝子の発現量は、この遺伝子の一部分を増幅するプライマーを用いて解析した。また、各サンプルの総 RNA 量を補正するために、各株の *gyrB* 遺伝子の qRT-PCR 産物量を内在性コントロールとして用いた。

#### (9) DNA プルダウンアッセイ

5 末端がビオチン化されたプライマーを用いて PC574 *ily* プロモーター領域 (*P<sub>ily</sub>*) の増幅を行った。また、SI の *lac* オペロン中に存在しており LacR 結合部位様の領域を保有している *lacA* と *lacD* プロモーター領域 (*P<sub>lacA</sub>*, *P<sub>lacD</sub>*) のビオチン化 DNA 断片の増幅も行った。また、コントロールとして LacR 認識部位様の配列を保有しない *lacF* 構造遺伝子の一部分を含むビオチン化 DNA 断片 (NC) の増幅も行った。その後、NeutrAvidin (非特異性結合を抑えたアビジン) アガロース樹脂に、各ビオチン化 DNA 断片を添加してコートしたものを作製した。この樹脂を PC574 の細胞破碎上清と混合した後に、遠心操作により分離・洗浄を行った。ビオチン化 DNA 断片に結合しているタンパク質は SDS-PAGE により分離した。この断片に LacR が結合しているかどうかは、抗 LacR 抗血清を用いたイムノブロットングにより検討した。さらに、ビオチン化 DNA コート NeutrAvidin アガロース樹脂を用いて精製 rLacR との結合の有無も

確認した。結合した rLacR はクマシーブリアントブルー染色によって検出した。

#### (10) 感染実験

BHI 培地で PC574、*lacR* 株、相補株を 12 時間培養した。ヒト肝癌細胞由来の HepG2 に対する感染は、MOI = 10、感染時間 3 時間で行った。HepG2 の培養は、5% FBS と 0.1% ヒト血漿を含む DMEM 培地を用いて行った。感染後 12 時間ごとの培地の交換と 24 時間ごとの HepG2 の生存率の測定を行った。

#### 4. 研究成果

PC574、*lacR* 株、相補株の細胞内 LacR 量を、抗 LacR 抗血清を用いたイムノブロットングにより確認した (図 1)。その結果、*lacR* 株において LacR の消失、相補株においてその回復が起こることを確認した。

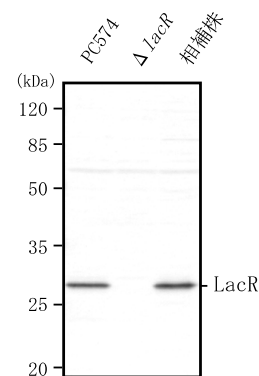


図1. イムノブロットングによるLacRの検出

そこで、これら株の ILY 分泌量をヒト赤血球寒天培地上の溶血斑の大きさ比較することにより推定した (図 2A)。その結果、*lacR* 株は大きな溶血斑を形成することを確認した。また、この増加は *lacR* 遺伝子を相補することにより野生株レベルにまで減少した。

(A) ヒト赤血球寒天上での溶血斑 (B) 培養上清中の溶血活性

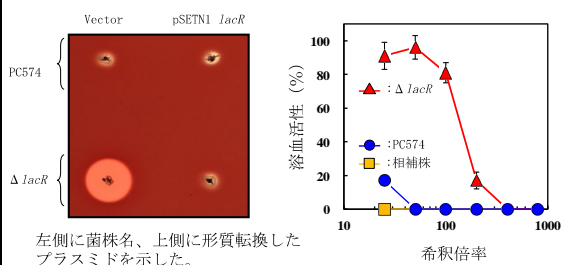


図2. *lacR*破壊株とその相補株の溶血活性の比較

つぎに、培養上清中の溶血活性の測定を行った (図 2B)。その結果、ヒト赤血球寒天培地の結果と同じく *lacR* 株において強い溶

血活性が認められること、相補株では野生株レベルにまで減少することを確認した。

グラム陽性菌の多くはガラクトースをタガトース 6 リン酸経路により代謝することが知られている。この経路の代謝産物であるタガトース 6 リン酸が、染色体上の LacR 結合配列に結合している LacR と結合すると、LacR が DNA から解離することが報告されている。よって、環境中にガラクトースやそれを含有する糖(ラクトースなど)が存在すると、*ily* 遺伝子の発現増加とそれに伴う ILY 分泌量の増加が起こる可能性が考えられる。そこで、0.2%ガラクトースないしはラクトースを添加した BHI 培地で PC574 を培養し培養上清中の溶血活性を測定した(図 3)。その結果、これら糖に ILY 発現促進効果があることを確認した。なお、ラクトースにガラクトースほどの ILY 発現促進効果が認められない理由はラクトースに含まれるグルコースが CcpA を介して *ily* 遺伝子発現をカタボライト抑制する為であると考えられる。

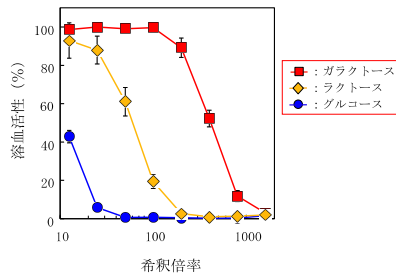


図3. ガラクトースによるPC574株のILY分泌促進効果

そこで、LacR が実際に *ily* 発現を制御しているかどうかを確認する目的で qRT-PCR により PC574、*lacR* 株、相補株の *ily* 転写量を比較した(図 4)。その結果、*lacR* 株において *ily* 発現が強く活性化されていること、相補株では *ily* 発現量が野生株レベルにまで減少していることを確認した。これら結果から、LacR はガラクトース非存在条件下で *ily* 遺伝子の発現を負に制御する因子である可能性が高いことを発見した。

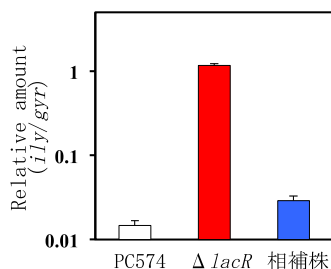


図 4. qRT-PCRによる *ily* 転写量の解析

さらに、この制御が LacR と *ily* プロモーター領域 (*P<sub>ily</sub>*) が直接相互作用することに

よって起こっているのかそれとも間接的なものであるのかを DNA プルダウンアッセイを用いて解析した(図 5A, B)。なお、この実験では *lac* オペロン中に存在し LacR 認識様配列を保有する *lacD* プロモーター領域 (*P<sub>lacD</sub>*) と *lacA* プロモーター領域 (*P<sub>lacA</sub>*) を LacR との相互作用を検出する為のポジティブコントロールとして用いた。まず、PC574 細胞破碎液に含まれる LacR がこれらの DNA 断片と相互作用するかどうかについて解析を行った(図 5A)。なお、相互作用した LacR は抗 LacR 抗血清を用いたイムノプロットングによって検出した。その結果、*P<sub>ily</sub>*、*P<sub>lacD</sub>*、*P<sub>lacA</sub>* は LacR と相互作用することが可能であることが分かった。つぎに、精製 LacR (rLacR) と *P<sub>ily</sub>*、*P<sub>lacD</sub>*、*P<sub>lacA</sub>* の相互作用を調べた(図 5B)。その結果、細胞破碎液を用いた場合と同じく、rLacR もこれら断片と相互作用することが可能であることも分かった。なお、LacR 認識配列を持たない DNA 断片(図中では NC と記載)で DNA プルダウンアッセイを行った場合には内在性 LacR や rLacR のどちらにも相互作用は認められなかった(図 5A, B)。これら結果から、LacR は *ily* プロモーター領域に直接結合することによりその遺伝子発現量を調節している可能性が高いことを明らかにした。

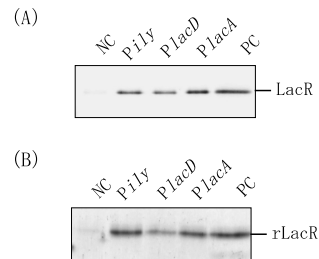


図5. DNAプルダウンアッセイによる *P<sub>ily</sub>* と LacR の相互作用の検出  
(A) PC574細胞破碎液を用いたDNAプルダウンアッセイ。LacRは抗LacR抗血清を用いたイムノプロットングにより検出した。PC: 細胞破碎上清 (5  $\mu$ g) (B) 精製 LacR (rLacR) を用いたDNAプルダウンアッセイ。rLacRはクマシープリリアントブルー染色によって検出した。PC: rLacR (0.2  $\mu$ g)

我々は、ILY 低産生株と高産生株の細胞毒性を比較したところ、高産生株が HepG2 に対して強い細胞毒性や細胞侵入性を示すことを報告している。そこで、ILY を高産生するようになった *lacR* 株とその母株である PC574 の HepG2 に対する細胞毒性を比較した(図 6)。その結果、PC574 と比較して *lacR* 株に強い細胞毒性を認め、感染 2 日目には HepG2 細胞の生存率が著しく低下していることを確認した。しかしながら、PC574 と相補株では感染 3 日目においても 50%以上の細胞が生存していた。以上の結果から、*lacR* 変異によって引き起こされる ILY 産生量の増加が S1 の細胞毒性の増加を引き起こすことを確認

した。以上の結果から、LacR が SI の病原性発現に關与している可能性が高いことを世界に先駆けて報告することに成功した。

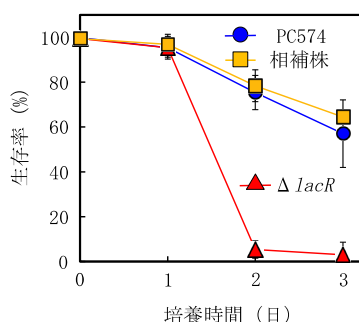


図6. ΔlacR株と相補株の細胞毒性

SI は抵抗力の低下したヒトの脳や肝臓などの深部臓器に重篤な膿瘍感染を引き起こすことが報告されている。また、それらの病巣から単離された菌は歯垢などに常在している菌よりも多くの ILY を分泌するものが多いことが明らかになっている。そこで、臨床から分離された 50 株と歯垢から分離された 7 株と基準株 NCD0227 の溶血活性の測定と lacR 遺伝子配列を決定した (図 7)。また、この研究によって分離された変異 lacR 遺伝子を pSETN1 にクローニングしたものを作製した。このプラスミドを lacR 株に形質転換し、この株の溶血活性を調べることで、クローニングした変異遺伝子が機能しているかどうかを解析した。これらの解析から、ILY 高産生株 (青枠: UNS38 の 30%以上の溶血活性を保有) の多くに LacR の活性が消失ないしは低下する変異 (赤色で示している) が認められることを発見した。また、この変異が認められた 10 株中 9 株が脳または肝膿瘍由来であることも確認した。

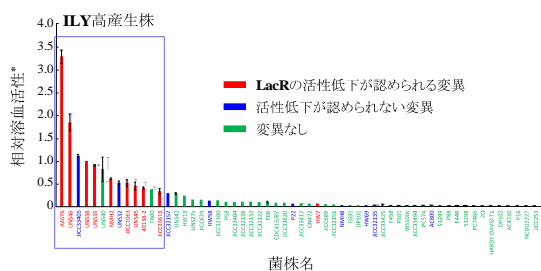


図7. 臨床・歯垢分離株のILY分泌量とlacR遺伝子配列の解析

これらの結果から、lacR 遺伝子の変異と SI の病原性の増加には密接な関わりがある可能性が高いことを発見し、世界に先駆けて報告した。

我々の研究から、ily 遺伝子の発現制御は CcpA と LacR によって行われていることが明

らかになった。このことから、タンパク質や細胞に存在する糖鎖の分解産物が SI の病原性発現に關与している可能性が高いと考えられる。そこで SI ゲノム中のグリコシダーゼをコードする遺伝子を探索した結果、LacR によりその発現が制御される lac オペロン中に -ガラクトシダーゼ活性や -N-アセチルヘキソサミニダーゼ活性など複数のグリコシダーゼ活性を保有する新規のグリコシダーゼ (MsgA) をコードする遺伝子が存在することを発見することに成功した。現在、このタンパク質の特性と SI の病原性に果たす役割について解析を進めている。

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 2 件)  
Tomoyasu T, Imaki H, Masuda S, Okamoto A, Kim HJ, Waite RD, Whiley RA, Kikuchi K, Hiramatsu K, Tabata A, Nagamune H. (2013) LacR mutations are frequently observed in *Streptococcus intermedius* and are responsible for increased intermedilysin production and virulence. *Infect. Immun.* 81(9):3276-3286. 査読有  
 DOI: 10.1128/IAI.00638-13.

Tomoyasu T, Tabata A, Imaki H, Tsuruno K, Miyazaki A, Sonomoto K, Whiley RA, Nagamune H. (2012) Role of *Streptococcus intermedius* DnaK chaperone system in stress tolerance and pathogenicity. *Cell Stress Chaperones* 17(1):41-55. 査読有  
 DOI: 10.1007/s12192-011-0284-4

[学会発表](計 25 件)  
 山本 直輝, Characterization of a novel secreted glycosidase (MsgA) of *Streptococcus intermedius*. 第 87 回日本細菌学会総会・2014 年 3 月 26 日, タワーホール船堀 (東京都)

友安 俊文, Identification and characterization of MsgA, a novel secreted glycosidase of *Streptococcus intermedius*. 第 36 回日本分子生物学会年会・2013 年 12 月 3 日, 神戸ポートアイランド (兵庫県)

友安 俊文, *Streptococcus intermedius* の主要病原因子であるインターメディリシンの発現調節機構の解析. 第 60 回毒素シンポジウム・2013 年 7 月 18 日, 楓香荘 (兵庫県)

今木 英統 , 糖タンパク質による *Streptococcus intermedius* の *ily* 発現促進機構の解析 . 第 22 回 Lancefield レンサ球菌研究会・2013 年 6 月 28 日 , 島根イン青山(東京都)

今木 英統 , *Streptococcus intermedius* の *ily* 発現促進因子の同定 . 第 86 回日本細菌学会総会・2013 年 3 月 18 日 , 幕張メッセ国際会議場 (千葉県)

今木 英統 , ILY を高産生する *Streptococcus intermedius* の臨床分離株の多くが LacR に変異を持つ . 第 85 回日本細菌学会総会・2012 年 3 月 29 日 , 長崎ブリックホール (長崎県)

Hidenori Imaki, Molecular and phenotypic analysis of mutants of *ily* expressional control factors in *Streptococcus intermedius*. IUMS 2011 Sapporo Congress, Sep. 7, 2011, Sapporo Convention Center (Sapporo, Japan)

Toshifumi Tomoyasu, Genetic screening of *ily* expression control factors in *Streptococcus intermedius*. XVIII Lancefield International Symposium, Sep. 7, 2011, Hilton Villa Igiea (Palermo, Italy)

友安 俊文 , コレステロール依存性細胞溶解毒素 intermedilysin の発現調節因子が *Streptococcus intermedius* の病原性に果たす役割の解析 . 第 58 回 トキシンシンポジウム・2011 年 7 月 8 日 , 順天堂大学本郷キャンパス (東京都)

## 6 . 研究組織

### (1) 研究代表者

友安 俊文 (TOMOYASU, Toshifumi)  
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・准教授  
研究者番号 : 20323404

### (2) 研究分担者

田端 厚之 (TABATA, Atushi)  
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・助教  
研究者番号 : 10432767

長宗 秀明 (NAGAMUNE, Hideaki)  
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・教授  
研究者番号 : 40189163