

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19390123

研究課題名（和文） 臨床分離腸球菌の細菌叢定着因子（バクテリオシン）の研究

研究課題名（英文） Genetic and molecular analysis of bacteriocins of enterococcus clinical isolates - a bacterial colonization factor -

研究代表者

池 康嘉（IKE YASUYOSHI）

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60125820

研究成果の概要（和文）：

1. Bacteriocin 41 の研究

フェロモン反応性高頻度接合伝達性プラスミド pYI14 (61 kbp) は臨床分離株 *E. faecalis* YI714 から分離されたバクテリオシンプラスミドでバクテリオシン Bac41 をコードする。Bac41 遺伝子は *bacl₁* (ORF7)、*bacl₂* (ORF8)、*bacA* (ORF11)、*bacI* (ORF12) から成る。*bacl₁/bacl₂* は菌体外への Bac41 前駆体発現とその分泌に必要な遺伝子、*bacA* 遺伝子産物は分泌された前駆体バクテリオシンを菌体外で活性化する活性化因子である。また *bacI* は自身の生産する Bac41 に対する免疫因子遺伝子であった。

2. Bacteriocin 51 の研究

バンコマイシン耐性、バクテリオシン生産 *E. faecium* NRCH38 株から単離されたプラスミドを pHY (6.0 kbp) と名付けた。pHY には ORF が 9 つ存在した。大腸菌のベクタープラスミド pMW119 を用い pHY 全体をクローン化し、これを *E. faecalis* OG1S に形質転換したものは、*E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans* に対し抗菌活性をもつバクテリオシンを生産した。このクローンを用いた Tn5 挿入変異株、及び転写産物の解析から、ORF1 (*bacA*) がバクテリオシン遺伝子、ORF2 (*bacB*) が免疫能をコードすることが解った。*bacA*, *bacB* はオペロンを形成していた。

研究成果の概要（英文）：

1. The conjugative plasmid pYI14 (61 kbp) was isolated from *Enterococcus faecalis* YI714, a clinical isolate. pYI14 conferred a pheromone response on its host and encoded bacteriocin 41 (*bac41*). Bacteriocin 41 (Bac41) only showed activity against *E. faecalis*. Genetic analysis showed that the determinant was located in a 6.6-kbp region. Six open reading frames (ORFs) were identified in this region and designated ORF7 (*bacl₁*), ORF8 (*bacl₂*), ORF9, ORF10, ORF11 (*bacA*), and ORF12 (*bacI*). They were aligned in this order and oriented in the same direction. ORFs *bacl₁*, *bacl₂*, *bacA*, and *bacI* were essential for expression of the bacteriocin in *E. faecalis*. Extracellular complementation of bacteriocin expression was possible for *bacl₁* and *-L₂* and *bacA* mutants. *bacl₁* and *-L₂* and *bacA* encoded bacteriocin component L and activator component A, respectively. The products of these genes are secreted into the culture medium and extracellularly complement bacteriocin expression. *bacI* encoded immunity, providing the host with resistance to its own bacteriocin activity.

2. The bacteriocin 51 (Bac51) was encoded on the mobilizable plasmid pHY (6,037bp) isolated from vancomycin resistant *E. faecium* V38. Bacteriocin 51 was active against *E. faecium*, *E. hirae*, and *E. durans*. The sequence analysis of pHY showed that plasmid pHY encoded nine ORFs from ORF1 to ORF9 in this order. ORF3, ORF4 and ORF5 showed homology to *mobC*, *mobA*, and *mobB*, respectively. ORF7 and ORF8 showed homology to *repA* and *repB*, respectively. ORF1, ORF2, ORF6 and ORF9 had no homology to the reported genes. The Tn5

insertion mutants in ORF1 did not show both bacteriocin and immunity activities, implying that ORF1 and ORF2 were the bacteriocin determinant, and were designated as *bacA* and *bacB*, respectively. Detailed DNA sequence analysis of *bacA* and *bacB* was performed. *bacA* encoded a 144-amino-acid protein. The ATG start codon was preceded by a potential ribosome binding site 8 bp upstream. The deduced *bacA* protein had a span of hydrophobic residues typical of the signal sequence at its amino terminus and a potential signal peptidase processing site corresponding to the VEA sequence was located at position 37 to 39 amino acid. The predicted BacA mature protein consisted of 105 amino acids. There was a potential promoter sequence upstream of the start codon. *bacB* encoded a 55 amino acid protein. The ATG start codon was preceded by a potential ribosome binding site 12 bp upstream. There was no obvious promoter sequence upstream of the ribosome binding site. A putative transcription terminator signal was identified downstream of *bacB*. There was no obvious promoter or terminator sequence between *bacA* and *bacB*. The transcript of *bacA* and *bacB* were analyzed by Northern hybridization. The results of Northern analysis of *bacA* and *bacB* with *bacA*-RNA probe showed about 700 nucleotides which corresponded to the nucleotide size of both *bacA* and *bacB*, indicating that a transcription initiated from the promoter upstream *bacA*, continued through *bacB*, and terminated at the terminator downstream of *bacB*. The transcription start site was determined at the nucleotide T located at six nucleotides downstream from -10 promoter sequence by Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) method. These results indicated that the *bacA* and *bacB* composed of operon structure, and *bacA* was bacteriocin structure gene and *bacB* was the immunity gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2008年度	6,100,000	1,830,000	7,930,000
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

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：病原性、腸球菌、バクテリオシン、バクテリオシン遺伝子、分子遺伝

1. 研究開始当初の背景

腸球菌は人、動物の腸管常在菌で典型的な日和見感染菌で、10数種類存在する。腸球菌の中で臨床分離腸球菌の多く（約80%）は *E.faecalis* 菌で残りは主として *E.faecium* 菌である。

バクテリオシンは細菌の生産する外分泌蛋白で、同種、近縁の細菌を殺菌する。バクテリオシン生産菌は細菌叢において非生産菌に対して生存の優位性を持つために、細菌叢における定着因子 (colonization factor) と考えられており、病原性因子の一つである。細菌のバクテリオシン遺伝子は複数の遺伝子により構成される複合遺伝子 (オペロン) で、バクテリオシン生産のための構造遺伝子と自らのバクテリオ

シンに対する防御のための免疫遺伝子が必須である。

E.faecium のバクテリオシンは、各種の多くの報告がある。それらのほとんどは乳製品加工における乳酸菌としての *E.faecium* 菌から分離されたもので、それらのバクテリオシンは乳製品加工過程で抗菌剤として利用されている。臨床分離腸球菌、及び *E.faecalis* のバクテリオシンの研究は少なく、本研究によってこれらの菌のバクテリオシンオペロンの新たな遺伝子発現、調節機構、バクテリオシン蛋白の構造と機能が解明できる。

2. 研究の目的

臨床分離 *E.faecalis* 菌の約80%はバク

テリオシンを生産する。それらの中で主なものは① cytolysin(β -Hly/Bac)、② *E. faecalis* にのみ活性をもつ bacteriocin 41(Bac 41) (型)、③ enterococcus に広く活性をもつ bacteriocin 51(Bac 51) (型) 等である。その中で最も分離頻度の高い(約30%) cytolysin(β -Hly/Bac)は人細胞と細菌細胞膜の両方に活性を示す。これまで詳しく研究されてきた。② *E. faecalis* に活性を示すバクテリオシン (Bacteriocin 41型(Bac41型)) は、フェロモン反応性プラスミド上に存在する。フェロモン反応性プラスミド上に存在する。③ enterococcus に広く活性をもつバクテリオシン(bacteriocin 51 (Bac 51))の遺伝子は、主に伝達性プラスミド上に存在する。

本研究では *E. faecalis* に活性を示す Bacteriocin 41 型 (Bac41) 及び enterococcus に広く活性を示す Bacteriocin 51型 (Bac51)の総合的な生物学的研究を行う。バクテリオシン遺伝子の分子遺伝学的解析を行い、バクテリオシン遺伝子を構成するそれぞれのORFの機能、生産発現機構、発現調節機構を研究する。

3. 研究の方法

- ・ 抗菌剤の MIC 測定
- ・ プラスミドの接合伝達、液体培地中、固形培地上での接合伝達。
- ・ 軟寒重層法によるバクテリオシン活性の測定
- ・ プラスミド DNA の分離と解析、及び遺伝子のクローニング
- ・ プラスミドの制限酵素地図の作成
- ・ DNA 塩基配列の決定
- ・ トランスポゾンによる挿入変異株の分離
- ・ 変異部位及び変異株の解析
- ・ PCR による遺伝子解析

等の方法を用いた。詳しくは発表論文に記載した。

4. 研究成果

1. Bacteriocin 41 の研究成果

(1) バクテリオシン生産菌とバクテリオシンプラスミドの分離

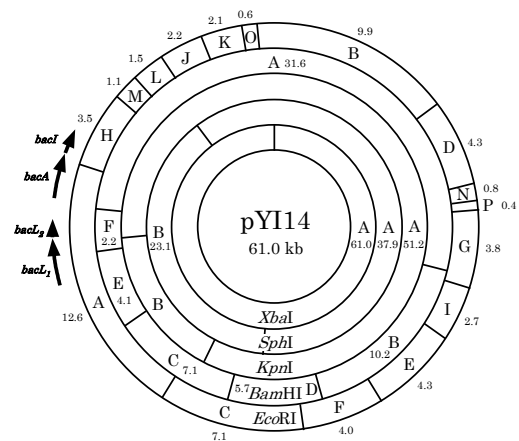
臨床分離 *E. faecalis* YI714 は *E. faecalis* にのみバクテリオシン活性を示すバクテリオシン生産菌であった。*E. faecalis* YI714 は 61 kbp のプラスミドを含んでいた。*E. faecalis* YI714 を供与菌、*E. faecalis* FA2-2 Rif, Fus を受容菌として液体培地中で接合伝達を行い、接合伝達株を Rif, Fus を含む培地で選択し、バクテリオシン活性を寒天平板法で調べた。接合伝達株約 500 株に 1 個の割合で、バクテリオシン生産株が得られた。こ

のバクテリオシン生産株 (接合伝達株) は、61 kbp のプラスミド(pYI714)を含んでいた。pYI714 (61 kbp) は *E. faecalis* のフェロモン反応性プラスミドで、*E. faecalis* にのみ活性のあるバクテリオシンをコードしていた。このバクテリオシンを bacteriocin 41 (bac41) と名付けた。

(2) pYI714 (61.0 kbp) の制限酵素地図の作成

pYI714 (61.0 kbp) の制限酵素地図を *EcoRI* その他の制限酵素を用いて作成した (図 1)。pYI714 (61.0 kbp) の制限酵素地図は、*EcoRI*, AHMLJKOBDNPGIEFC の順で、その他の制限酵素の地図も示した。研究の結果、解った Bac41 の遺伝子地図も示した。

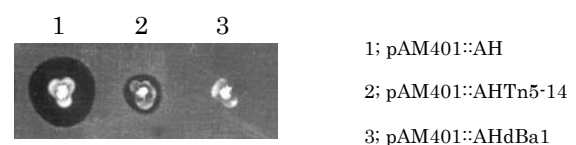
図 1. 臨床分離腸球菌株 YI714 (*E. faecalis*) から分離した高頻度接合伝達性バクテリオシンプラスミド pYI14



(3) Bac41 遺伝子の *EcoRI* 断片のクローニング

それぞれの *EcoRI* 断片をベクタープラスミド pAM401 にクローニングし、*E. faecalis* FA2-2 を形質転換した結果、*EcoRI* AH 断片を持つクローンがバクテリオシン活性を示した。Bac41 遺伝子は *EcoRI* AH (16.1 kbp) 内に存在することが示唆された。

図 2. Bacteriocin 41 の軟寒重層法による検出と変異クローンのバクテリオシン活性



指示菌 ; *E. faecalis* OG1S

図 6. 活性化因子蛋白 BacA の構造



2. Bacteriocin 51 の研究成果

(1) VRE のバクテリオシン

表 1. 6 株の VRE のバクテリオシン生産能とその活性域

菌株名	<i>E. faecalis</i> FA2-2	<i>E. faecalis</i> OGIS	<i>E. faecium</i> BM4105RF	<i>E. hirae</i> ATCC9790	<i>E. durans</i> ATCC49135	<i>E. raffinosus</i> JCM9733	<i>E. gallinarum</i> BM4174	<i>Listeria innocens</i>	<i>S. aureus</i> FDA209P
VRE34	+	+	+	+	+	+	+	+	-
VRE35	-	-	+	+	+	+	-	-	-
VRE36	+	+	+	+	+	+	+	+	-
VRE37	+	+	+	+	+	+	+	+	-
VRE38	+	+	+	+	+	+	+	+	-
VRE39	+	+	+	+	+	+	+	+	-

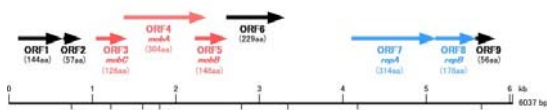
(2) 接合伝達による *E. faecium* VRE38 からのバクテリオシンプラスミド pHY (6.1kbp) の単離

5 株の Gm 耐性 VRE (34, 35, 37, 38, 39) を供与菌、受容菌を *E. faecium* BM4105RF (Rif 耐性、Fus 耐性) とし、固形培地上で接合伝達実験を行った。得られた接合伝達株の中にはいずれも *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans* に対して抗菌活性を示すもの (bac+ とする) が存在した。*E. faecium* VRE38 から分離されたバクテリオシンプラスミドを pHY と名付け、詳細な解析を行った。

(3) pHY の遺伝子地図

pHY の全塩基配列を決定した。総塩基数は 6037bp であった。pHY の ORF は 9 つであった。5 個の ORF は既報の腸球菌のプラスミドにコードされる ORF (プラスミド複製、可動化遺伝子) と高い相同性を示した。ORF1, ORF2 は既報の遺伝子配列・アミノ酸配列ともに相同性がみられず、pHY は新規のバクテリオシンをコードするプラスミドと考えた。

図 1. pHY の遺伝子地図



(4) pHY バクテリオシン遺伝子の腸球菌へのクローニング

スペクチノマイシン耐性遺伝子を入れた大腸菌のベクタープラスミド pMW119 を用い、

pHY 全体をクローン化した形質転換株 DH5 α /pMW119+Spc^r+pHY を得た。このプラスミドを用い *E. faecalis* FA2-2 を形質転換した株は、*E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans* に対して抗菌活性を示した。

(5) pHY のトランスポゾン Tn5 挿入変異株の分離

クローン化した pHY を用い大腸菌内で Tn5 挿入変異株を得た。変異株の解析結果から ORF1 と ORF2 は、バクテリオシン遺伝子、及び免疫因子遺伝子であると考えられ、それぞれ *bacA* (144a. a.), *bacB* (57a. a.) と名付けた。

図 2.



● : バクテリオシン活性なし ○ : バクテリオシン活性なし

(6) Bac51 のシグナルペプチド同定

SignalP-HMM prediction (gram⁺ models): sequence) により解析した。BacA の N 末端側 39 アミノ酸は典型的なシグナル配列であり、39 番目と 40 番目のアミノ酸間で Sec 依存的に切断され、C 末端側が菌体外へ分泌される。切断部位直前のアミノ酸配列 VEA である。BacB には明らかなシグナル配列は存在しなかった。*bacA* が *bac* 51 の構造蛋白遺伝子であり、*bacB* が免疫因子遺伝子である。分泌型 *bac* 51 蛋白は、105 アミノ酸 (約 12.0 kDa) である。

(7) pHY のバクテリオシン領域の Northern hybridization

Northern hybridization により転写産物の解析を行った。*bacA* のプローブを用いた時、約 700nt と約 500nt の 2 本の mRNA が検出された。約 700nt の mRNA は、オペロン全体、500nt の mRNA は *bacA* のみの転写産物と考えられた。

(8) 転写開始点の解析

RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) 法を行い、mRNA の開始点を決定し、次図のように *bacA* 上流の予想プロモータ配列 (-10) より 6 塩基下流の T であることが解った。

図 3. *bac* 51 の転写解析 (Northern hybridization)

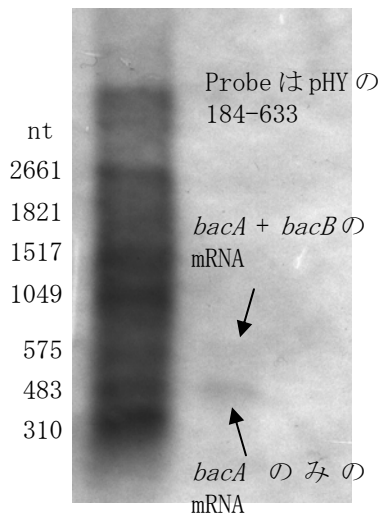
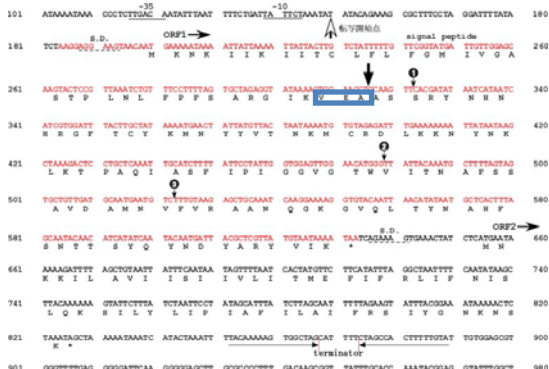


図4. pHY の ORF1 (*bacA*) と ORF (*bacB*) の塩基配列と遺伝子構造



赤字は Northern hybridization を用いたプローブ

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)

1. Zheng B., Tomita H., Inoue T. and Ike Y. Isolation of VanB-Type *Enterococcus faecalis* Strains from Nosocomial Infections: First Report of the Isolation and Identification of the Pheromone-Responsive Plasmids pMG2200, Encoding VanB-Type Vancomycin Resistance and a Bac41-Type Bacteriocin, and pMG2201, Encoding Erythromycin Resistance and Cytolysin (Hly/Bac). *Antimicrob Agents chemother.* 53(2):735-747, 2009. 査読有
2. Tomita H. and Ike Y. Genetic Analysis of the *Enterococcus* Vancomycin-Resistance Conjugative Plasmid pHT β : Identification of the Region involved in Cell Aggregation

and *traB*, a Key Regulator Gene for Plasmid Transfer and Cell Aggregation. *J Bacteriol.* 190(23):7739-7753, 2008. 査読有

3. Tomita H., kamei E. and Ike Y. Cloning and genetic analyses of the bacteriocin 41 determinant encoded on the *Enterococcus faecalis* pheromone-responsive conjugative plasmid pYI14: a novel bacteriocin complemented by two extracellular components (lysin and activator). *J Bacteriol.* 190(6):2075-85, 2008. 査読有

[学会発表] (計 21 件)

1. 池康嘉、多剤 β -ラクタム薬耐性と抗緑膿菌薬、第83回日本細菌学会総会、2010. 3. 27、パシフィコ横浜 (神奈川県)
2. 池康嘉、Vancomycin-Resistant *Enterococci* (VRE) in Japan、第21回日本臨床微生物学会総会 (日韓合同シンポジウム)、2010. 1. 31、東京ドームホテル (東京)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

池 康嘉 (IKE YASUYOSHI)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60125820

(2) 研究分担者

富田 治芳 (TOMITA HARUYOSHI)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70282390

井上 貴子 (INOUE TAKAKO)

研究者番号：00431700

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

(3) 連携研究者

谷本 弘一 (TANIMOTO KOICHI)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：40188389

藤本 修平 (FUJIMOTO SHUHEI)

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：90241869

(H19, 20年度)

野村 隆浩 (NOMURA TAKAHIRO)

群馬大学・大学院医学系研究科・技術専門職員

研究者番号：30396634