科学研究費補助金研究成果報告書

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 $bacL_1$ (0RF7)、 $bacL_2$ (0RF8)、bacA(0RF11)、bacI(0RF12)から成る。 $bacL_1/bacL_2$ 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 (6.0kbp) と名付けた。pHY には 0RF 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* 0G1S 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、0RF1(*bacA*) がバクテリオシン遺伝子、0RF2(*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 (*bacL*₁) ORF8 (*bacL*₂), ORF9, ORF10, ORF11 (*bacA*), and ORF12 (*bacI*). They were aligned in this order and oriented in the same direction. ORFs *bacL*₁, *bacL*₂, *bacA*, and *bacI* were essential for expression of the bacteriocin in *E. faecalis*. Extracellular complementation of bacteriocin expression was possible for *bacL*₁ and $-L_2$ and *bacA* mutants. *bacL*₁ and $-L_2$ 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. duraus*. 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 back. 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。

 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 *Eco*RI 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、*Eco*RI, 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 *Eco*RI 断片のクローン 化

それぞれの *Eco*RI 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、*Eco*RI 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 *Eco*RI 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



1; pAM401::AH 2; pAM401::AHTn5-14 3; pAM401::AHdBa1

指示菌; E. faecalis OG1S

表1. Open reading frames (ORFs) encoded on the *Ban*HI/*Eco*RI 11,952 bp spanning region

ORF	Gene	location on the map	Gene/protein size(bp/s.a.)	Honology	Identity/similarity (%)	Function
136		136.558	455150	pelS (E. forcalis pCP10)	95 200	anto
602		602 234	135'00	EPB0044 (E. favonlis V583 pTEP2)	100/200	
766		766 1344	3.79/192	pefT LE fascalis pCF20	89/90	thermstudease
1350		1350 1670	321 106	pcfU (E. fascalis pCF20)	0597	
1827		1827 2009	183/60	Efae03001107 (E' disection)	30/67	
2204		2204 2920	711/204	linempotein (E. downlie V580)	31/45	
3055	hells	3055 4545	1788/000	Lenoryme (R. subtilis basterionhase B100)	3752 (1 1M a.a.)	Irain Doctoriocia 43
				Louis Of ann/actine peoplese landule Rall	45455 (160 509 + +)	
				Maramidase (Z. plantarum WCFS1)	2441 (118-577 a.m.)	
0032	hard.	5011-5666	636/211			buin expression
0680		5689 4220	432/243	OEF101S preummine hacterisphage MM1)	31/51	holin
4123		41173-0650	1/16/125	EPO037 (J. famalia V38D	27/45	
6693	head	0085 8875	2181/726	white (R autobile)	41/06	Irvin activator
				sting(7.1.8 autoiNa)	40.55	
8982	hart	8982 9973	543190			instantity.
0590		9590 10165	576181			
10304		10306 10640	225110	EFECON7 (F. Samelie VISSI oTEP)	95/100	
11/14/5		11/060 11/261	201/935	an motor of the state of the burners		

 (4) バクテリオシン遺伝子の遺伝学的解析 pAM401::AH (16.1 kbp)を用いてトランス ポゾン (Tn5, Tn7)の挿入変異株の分離、制 限酵素によるバクテリオシン遺伝子変異株 の導入、PCR方法によるバクテリオシン遺伝 子のsubcloneを行った。また、*Eco*RI AH断片 の全塩基配列を決定した。これらの解析の結 果、BAc41 遺伝子はAH断片内の 6.6 kbpの領 域に存在し、同一方向に転写される6 個の0RF (0RF7~0RF12)を含んでいた。6 個の0RFのう ち、Bac41 発現に必須の0RFは4 つで、それぞ れbacL₁ (0RF7)、bacL₂ (0RF8)、bacA (0RF11)、 bacI (0RF12)と命名した。

図3. pYI14 にコードされる Bacteriocin 41 遺伝子の解析







(5) Bac41 の細菌細胞外相補活性

bacL₁ / bacL₂生産株とbacA生産株それぞれ を、指示菌を含む寒天平板上に近接して培養 した時、それぞれの菌の間の細菌増殖が阻害 され、バクテリオシン活性が見られた。また、 それぞれの変異株を交叉させて培養した時、 交叉部分の細菌(指示菌)の増殖が阻害され、 バクテリオシン活性が見られた。これらの結 果は、bacL₁ / bacL₂、およびbacAの生産物が それぞれ細菌外に分泌され、細菌外でbacL₁ / bacL₂のバクテリオシン前駆体がbacAにより 活性化されて、バクテリオシン活性が出現す ることを示している。

表3.各 Bacteriocin 41 変異体間の菌体外相 補試験結果

						Plarmidz			
Plasmids	Genotype	Phenotype*	PARAOUTARTING CO.	MAKAULAHARAL MAKAULAHARAL	MAROLANTIA 107. MAROLANTIA 107.	MARANI ANTA-104	Vitoriy	MMADE PURE	MMMOLPOR
pAM401 AHTs5-42, AHTs5-25	bacL	L-, A+, 1+	NT						
pAM401 AH4Ba1, AH4Kp	bacL1+, L1+, A+, I+	L-, A+, I+	C-	NT					
AM401 AHTs5 107, AHTs5 188	bacL 1+, Ly. A+, I+	L-, A+, I+	C-	0	NT				
AM401 AHTe5-104, AHTe5-11	bacL 1+, L 2+, A+, I+	L+, A-, I+	C+	C+	C+	NT			
AM401 A	bacL 1+. L 1+. A. I	L+, A-, I-	C+	C+	C+	C-	NT		
AM401 PCR3	bacL 1+, L 1+, A-, I-	L+, A', I-	C+	C+	C+	c-	c-	NT	
AM301 PCR5	back 1 Ly. A+, 5	L. A*, I-	C-	0-	C-	C+	C+	C+	NT

図4. 代表的な Bacteriocin 41 変異体の菌 体外相補試験



710

図6.活性化因子蛋白 BacA の構造

		putative ;	processing	8108							
ORF6693(Back) ybfG YkuG	signal : MDENVLGTQ : MUDENVLITQ : MDENVLGTQ :	peptide DELNETTGNV QMLNDTYSGE DMLNETYEGE	SGPHEVPENG HGYNPVEESG SGYNSIEENG	KTGNPTIYGL KTGNDTIYGL KTGNKTMYAL	RRALQKENGI TRALQIELGI TRALQLELGI	QELSDNFGPT SEPADNFGPT TQTSDSFGPT	TERYPKEKVE TORLFHPLKR TLRKLKELOP	KQLNERFGAG QAPDSKP ISTSTNS	81 IGNIVEINOG S-NMNPILQG KKNIVKIIQG	GPWCEGINPY ALWCEGPNP- ALYCEGYGP-	99 95 95
ORF6693(BacA) YbfG YkuG	VSGTEAVDGL I GGFTGV GGLTGT I	PTELTENAVE PTELTENAVE PGQGTKEAIA	N binding d EFQEMAGLAP EFQEMAGLIT ENQLINGLISE	GDGIVTTLIM DGVVTPKVP	ALLINSAFA	LVPGGDKNIR LV9GGDSRIR LLNGASEKVR	SNDOSLADARY DIQONLARRY	NRYFGLLP NDYIGLMP YNRENFYFMP .*	CDGVYQRDTN CDGLYGRDTN CDGLYSRDTQ	SALIYALQAR KALIYALQKE KSLVYALQYE	195 189 191
ORF6693(BacA) YbfG YbuG	MGMDENTANG EGNSTSVANG EGLSDSIANG	FYGPGTTAKT FFGNGTTSLC NFGPTTORLI	PTLTVGS PTLTPGDS PVLRIGETDE	TGNFVEILOM RTGFVLIVOY ENSFIELFOA	ALYVNG-FNQ ALYCNGESFD ALIFNGY	SAVFSGSFTS PGEFDGKYGV NVPFDGVYSE	Y LAAEVENFR GWYSAWKAFQ SVRSKVKAFQ	LFMNLPFINT EFMCLP-QTG SFAKLQ-QSG	SADMTVIEGL YADMPTIKAL TADPQTWASL	LSSAGNTDRA LSSSGDTTRT LVSTGDPNRK	292 286 287
ORF6693(BacA) YbfG YkuG	ASACDMATQL ASACDTATII GVACDSITQI	TEQQAQLIED TAEEAQTLEN TSDRAESLER	NGYSIVGRYL NGYKTVGRYL AGYKIVGRYL	TGSVGVGANE TGNVRTSSGL TNAPGSTLNE	KDKNLTLERI TSKALTSKEL EIQPGEL	QAITSVGLSI AVILDAGLEV ETILESGLEV	PPIYQDGGNE EPIYQDGGYE PPIYQTYGGA	ESYFNEOROL SSYFVEDOOT THYFNEEDOR	RDGSLAHNAA RDAYSAASAA KDAFAAYKAA	FELGFPYGAT RELGFPSGTT KEYGFENNTV	392 386 384
ORF6693(BacA) YbfG YkuG	IYFAVDVDIL I IFFAVDFDAY I IYFAVDYDAY (DGNIPGTVLP DYEVTDEIIP GNDLNNNIIP	YIRKVK YFQEIKSAFT HFEGIN	ESLDANGH ENQTESTAPE EIMNGELGST	YKTGIYGTRM YEIGVYGPRM YKIGIYAPRM	VCQQAIDAGF ICIRTSEAGL VCTIVSEEGL	VERCEVSIDES TETSEVANES AFASEVSGES	TGFSGNLGFP TGFSGNLGTP TGFSGNLGTP	NFRENAFDOF NFRENAFDOF LFYNNAFDOI	YERSELG YEGTIGSGSG STITVGNGSG	483 486 480
ORF6693(BacA) YbfG YkuG	-EPIDEVAVS SIGIDEDGYS MIRIDNDICS	GRDHGTKAFS GRDSGASNVN GLDNGVNTIN	TTIG PPSDFVYDAR IVPSE	NLIQLETIKL LETLTDILST NEEFFDQIDV	LNALGENFTI IPALENLTSL LYETAEKYAQ	KDWGIKLDTP ANAMPEPDTT MQSDLNNGVK	TQIISSPTLD ETIFTSPELD ETQLAMELVA	VYFESSASNT IILSTSLLAT QYLEEDDYEG	HEVIDSGNSI IPSEGSPNTI NENVPIAGOI	SIENCKIDTE TITNCKPG DPIYRENAVE	576 584 575
ORF6693(BacA) YhfG YhuG	VY	VNPIKESLNS -AYITGLLGD VDPISKTVIG	YEDLLENYN- TOTSLTASO- TOSLMATYNA	IIYSGGYSQT	ENQVDEMLNE IDSYQNLLNS LEDFAGWTGD	LAPVIK LSLSVR LLTTIQDRKL	NGYIE NGYLE HAQEPNSPYD	TGPCARNNLI VYVNPTAESL AAMKIIGNYN	GTKLVIKK NIQIKIYTPD QFSLDDLFSD	EIGDSE IFVGDNV VDAINLANKT	642 650 675
ORF6693(BacA) YhdG YhuG	NEGTLQLEIE TTG-LTTTIT SVGANAQPLN	LYPKPLLPTD PKIKTYKGVP IAIRDYYSNN	IKIPQPDYDK VTSPESELAL DCHDRFTQFV	AYRDIEDSEV DWPSYDQYLF NNRFDGSLDK	PQLNVEVILE PVVGVAALLL IFSEAEYYLN	GVLIG-ALAV IGNMGSDLTN TNLDPVVVPI	VIIIGIASGA NEGVEVATAL RLAFKRAFDV	AELAGAITAF SAMLLAIFAY EDYSEEIGKI	FAALA YTS TARSI		726 732 760

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

指示器 菌株名	<i>E. faecalis</i> FA2-2	<i>E. faecalis</i> OG1S	E. faecium BM4105R	E. hirae ATCC9790	E. durans ATCC49135	Erallinosus JCM8733	E. gallinarium BM4174	Listeria monocytogenes	S. aureus 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 0RF は9つであった。 5 個の 0RF は既報の腸球菌のプラスミドにコ ードされる 0RF (プラスミド複製、可動化遺 伝子)と高い相同性を示した。0RF1, 0RF2 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.

0	ORF1 bacA (144aa)	ORF2 bacB (57aa)	ORF3 mobC (126aa)	ORF4 mobA (304aa)	ORI mol (148	5 8 aa)	ORF6 (229aa)			1	ORF7 repA (314aa)	•	ORF8 repB (178aa)	ORF9 (56aa)	kb
	↓ ² ³	ALCE O	10 19	AT ELEV	e p ²⁵	ee ee	း ထိုရာ	- E	ŝ	1494		40	40	a1	0007.05

●: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0RF1(*bacA*)と0RF(*bacB*)の塩 基配列と遺伝子構造

101	АТАЛААТААА	-35 CCCTCTTGAC	AATATTTAAT	TTTCTGATTA	10 TTCTANATAT	ATACAGAAAG	COCTTTCCTA	GGATTTIATA	180
181	TCTAAGGO	D. MOTAACAAT H	CRF1-	ATTATIAAAA I I K	TIATTACTTO	CIATITIC L F L	signal pep' TTCOGTATOA F G M	IVGA	260
261	AAGTACTOOS S T P	L N L	P P P S	A R G	I K V		TTCACGATAT S R Y	N II N	340
341	ATCOTOGATT	TACTTOCTAT T C Y	K M N	ATTATOTTAC Y Y V T	TAATAAAATG N K M	C R D	LKKN	TTATAATAAG Y N K	420
421	L K T	P A Q I	A S P	I P I	G G V G	AACATOOOTT	ATTACAAATO I T N	A F S S	500
501	A V D	A H N	V F V R	AGCTOCAAAT	CHOOMAAG	GTOTACAATT G V Q L	AACATATAAT T Y N	A H F	580
581	CAATACAAC S N T T	ATCATATCAA S Y Q	Y N D	ACOCTCOTTA Y A R Y	V I K	TAATCAGAAA	GTGAAACTAT	ORF2= CTCATGAATA M N	660
661	AAAAGATTTT K K I L	AGCTOTAATT A V I	ATTTCAATAA I S I	TAGTITIAAT IVLI	CACTATOTTC T M E	TTCATATTTA F I F	GGCTAATTTT R L I P	CAATATAAGC N I S	740
741	TTACAAAAA L Q K	GTATICITIA 8 I L Y	L I P	ATAOCATTTA I A F	TCTTASCAAT I L A I	F R 8	ATTTACOGAA I Y G	ATAAAAACTC N K N S	820
821	TAAATAGCTA K *	AAAATAAATC	ATACTAAATT	TTACAAAAAG	TOUCTAUCAT	nator	CTITITIGIAT	TOTOGAGOUT	900
901	GOOTT TTOAG	ODDGATTCAA	GOODGAOCTT	GCGCCCCTTT	GACAAGCOGT	TATTTOCACC	ANATACOGAG	GTATTTOOCT	980
赤	字は	North	ien h	ybriz	atio	n を月	いた	プロ・	_
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., <u>Tomita H.</u>, <u>Inoue T.</u> and <u>Ike</u> Isolation of VanB-Type Υ. 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 а Bac41-Type Bacteriocin, and pMG2201, Encoding Erythromycin Resistance and Cytolysin (Hly/Bac). Antimicrob Agents chemother. 53(2):735-747. 2009. 査読有
- 2. <u>Tomita H.</u> and <u>Ike Y</u>. 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

 <u>Tomita H.</u>, kamei E. and <u>Ike Y.</u> 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)

- 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)
- 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