

研究種目：基盤研究（C）
研究期間：平成19 - 20年度
課題番号：19590439
研究課題名（和文） ブドウ球菌属の感染成立に關与する細胞表層蛋白質の発現・定着特性の機能解析
研究課題名（英文） Characterization of expression and adherent property of staphylococcal surface proteins associated with staphylococcus infectious diseases.
研究代表者
黒田 誠（KURODA MAKOTO）
国立感染症研究所・病原体ゲノム解析研究センター・第三室・室長
研究者番号：80317411

研究成果の概要：

ワクチン等による病原細菌の感染制御には初期感染メカニズムをより重点的に解明していく必要があり、本研究では定着因子候補である因子群とそれら制御レギュレーターの転写変動に着目した。黄色ブドウ球菌の21種の定着因子候補と8種の病原因子レギュレーターのマウス生体内での発現プロファイルを解析し、定着因子群がマウス生体内で強く転写増強していることを明らかにした。加えて、感染時においてブドウ球菌属に特徴的な Sar 病原因子レギュレーターが転写増強し、それら制御下にある *sasG* 遺伝子が転写増強していることも明らかにした。*sasG* 遺伝子に変異を導入すると菌凝集・バイオフィーム形成が消失し、プラスミドにより *sasG* 遺伝子を相補すると回復した。SasG の A ドメインの組換え発現体を Native 電気泳動法およびフォルマリン架橋実験で分析したところ、4 もしくは 8 量体のホモ複合体を形成していることが分かった。黄色ブドウ球菌の感染時において、Sar ファミリーの複合的な転写調節系と SasG による菌凝集・バイオフィーム形成が臨床で重要視される微小膿瘍形成に關与し、抗菌薬治療の難治化に關連している可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成19年度	1,800,000	0	1,800,000
平成20年度	1,700,000	0	1,700,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	0	3,500,000

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

1. 研究開始当初の背景

感染症の制御においては抗菌薬投与が最も効果的であるが、昨今の薬剤耐性株の増加や製薬企業の相次ぐ抗菌薬開発の撤退を受け、将来の感染制御に危惧を抱いている。起因菌が確定していない段階では予防医学的に抗菌薬が処方されている現状である。高度薬剤耐性を遂げた黄色ブドウ球菌 (Meticillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) は院内だけでなく、学校・老人ホームといった市中にも蔓延している危険性が示唆されており、今後、抗菌薬による患者個別の治療を施すだけでは不十分だと思われる。ワクチン療法を用いれば集団に蔓延する危険を予防できるのであるが、黄色ブドウ球菌ワクチン (StaphVAX) は臨床フェーズIIに入っていたものの有効性が認められず、2005年11月に断念したとの経緯がある。その理由として挙げられるのが、黄色ブドウ球菌の病原性に莢膜は必須ではなく、生体内では産生されていないために莢膜ワクチンによる定着阻止・感染制御が難しいものと思われる。参考までに述べると、中耳炎を起こす肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) は莢膜が病原性を発揮する根本になっており、莢膜ワクチンによる感染制御が有効である。ワクチン開発における基礎的データの蓄積は最終的に最も近道であると考え、生体内における黄色ブドウ球菌の定着因子、細胞表層タンパク質の網羅的な発現プロファイルを解明する研究計画を立てた。感染過程で起きている実像を解明し、現実的なターゲット選択ができる1歩にしたいと考えている。

研究代表者は3種のブドウ球菌属ゲノム解析 (黄色ブドウ球菌 *S. aureus*、尿路病原性ブドウ球菌 *S. saprophyticus*、高度薬剤耐性 *S. haemolyticus*) に従事し、種ごとに存在する特徴的な毒素因子と定着因子を同

定し、それらが種特徴的な病原性を発揮している可能性を示した。ブドウ球菌属の比較ゲノム解析から、定着因子候補として挙げられる細胞壁結合型蛋白質においては機能未知のものも多く、ブドウ球菌属の中でも *S. aureus* は 20 遺伝子を有し、*S. epidermidis* (11 遺伝子)、*S. saprophyticus* (1 遺伝子) と比較しても非常に多い。これは *S. aureus* の多様な定着特性を示していると推察されるが未だ 11 遺伝子の機能解析が進んでいない。その理由として、複数の定着因子を有していることから、単独欠損株を作製しても定着特性が重複する他因子によって明確な結果を見いだせないことも考えられる。また、生体内で特有に発現する可能性が有る場合、*in vitro* 培養による機能解析だけでは不十分と思われる。

2. 研究の目的

ブドウ球菌属の細胞壁架橋型・定着因子を単独で機能解析できるシステムを確立し、感染成立に関与する定着因子の発現・定着特性を個別に明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 黄色ブドウ球菌の臓器組織に依存した感染の変遷と臓器特異的な細胞表層因子の発現プロファイルの解析

マウス (BALB/c) の腹腔内に黄色ブドウ球菌 MW2株 (臨床分離、ゲノム配列解読済み) 1×10^9 CFU (100 μ l) を接種し、どのような変遷を経て全身に感染していくのか日数経過を追い、臓器ごと (肝臓、腎臓、脾臓、小腸、大腸、血液) に重量あたりの生菌数を測定した。

表1に列挙病原因子候補を定量的PCRにより、Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地で *In vitro* 培養とマウスの感染臓器サンプルから total RNA を抽出し、転写発現量

を検討した。

表1 転写発現プロファイル解析に用いた遺伝子リスト

Gene ID	Gene name	Product name
Virulence factors		
MW0023	-	hypothetical protein, similar to 5'-nucleotidase
MW0084	<i>spa</i>	Immunoglobulin G binding protein A precursor
MW0108	-	hypothetical protein
MW0206	<i>coa</i>	Coagulase
MW0517	<i>sdrD</i>	Ser-Asp rich fibrinogen-binding, bone sialoprotein-binding protein
MW0764	<i>clfA</i>	fibrinogen-binding protein
MW1011	<i>isdB</i>	Iron surface determinant B
MW1324	<i>ebh</i>	Extracellular binding protein homolog
MW1378	<i>lukF</i>	Fanton-Valentine lukocidin F
MW1674	-	hypothetical protein
MW1699	-	hypothetical protein
MW2007	-	hypothetical protein
MW2086	<i>fmtB</i>	FmtB protein
MW2416	<i>sasG</i>	Staphylococcal surface associated protein G
MW2420	<i>fibB</i>	fibronectin-binding protein homolog
MW2421	<i>fib</i>	fibrinogen binding protein
MW2515	-	truncated hypothetical protein
MW2551	<i>clfB</i>	Clumping factor B
MW2567	-	conserved hypothetical protein
MW2575	-	hypothetical protein
MW2588	<i>icaB</i>	intercellular adhesion protein B
MW2612	<i>cna</i>	collagen adhesin precursor
Virulence regulators		
MW1963	<i>agrA</i>	Accessory gene regulator A
MW1959	<i>hld</i>	delta-hemolysin
MW0580	<i>sarA</i>	Staphylococcal accessory regulator A
MW2213	<i>sarR</i>	Staphylococcal accessory regulator R
MW0085	<i>sarS</i>	Staphylococcal accessory regulator S
MW2417	<i>sarT</i>	Staphylococcal accessory regulator T
MW2418	<i>sarU</i>	Staphylococcal accessory regulator U
MW1988	<i>sigB</i>	Sigma factor B
Protein synthesis (Internal control)		
MW2166	<i>rplB</i>	50S ribosomal protein L2 (BL2)

グラム陽性球菌である黄色ブドウ球菌はRLT溶解バッファー (QIAGEN) では破碎しないため、RLT溶解バッファーによる数回の溶解・洗浄によりマウス組織由来RNAの混入をできるだけ最小限になるよう除去した。非溶解の沈査をDEPC処理水にて洗浄後、Lysostaphin酵素にて溶菌し、Rneasy Mini kit (QIAGEN) にてRNA精製を行った。Template RNA 40 ng を SuperScript III Platinum SYBR Green One-step qRT-PCR kit with ROX (Invitrogen) と ABI7000 定量PCR 装置により転写発現量を定量的に算出した。蛋白合成系の *rp1B* 遺伝子の転写発現量で発現量を補正し、増殖定常期 (OD600nm=1.48) の転写発現量を用いてデータの標準化を行った。

(2) SarT, SarUにおける細胞表面蛋白質の転写発現制御解析

臓器組織特異的に転写増強の見られた転写調節因子SarUについて、シャトルベクターpYT3にクローニングし、黄色ブドウ球菌RN4220株 (形質転換可能株) にプラスミドによる過剰発現株を作製した。同様に、ホモログ・レギュレーターであるSarS, SarT

についても過剰発現株を作製した。それぞれ過剰発現株の対数増殖期における菌体から全RNAを調整し、上記と同様に定量的PCR法・マイクロアレイ法により転写発現量の変動を検討した。

(3) 細胞壁架橋蛋白質 SasG による黄色ブドウ球菌の自己凝集の解析

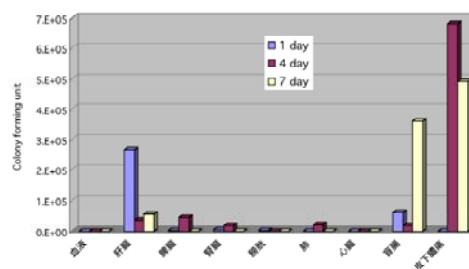
SasG 蛋白質の機能を調べるため、テトラサイクリン耐性マーカーを *sasG* 遺伝子に導入し変異株を作製した。変異株をプラスミドによる *sasG* 遺伝子相補実験を行い、バイオフィルム・菌凝集能を検討した。SasG 組換え発現体を調整し、Native 電気泳動法およびフォルマリン架橋実験で蛋白複合体形成能を検討した。

4. 研究成果

(1) 黄色ブドウ球菌の臓器組織に依存した感染の変遷と臓器特異的な細胞表面因子の発現プロファイルの解析

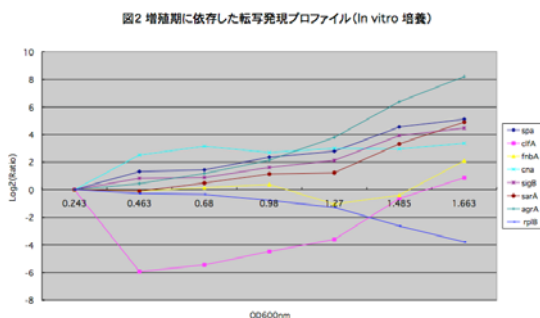
1日後の感染初期においてはマウス肝臓で最も定着菌数が多く見られ、日数経過とともに減少するものの依然持続的な定着をおこなっていることが分かった (図1)。臓器所見において、4日後に感染による嚢胞と虚血状況が見られた。盲腸においては感染初期から持続的な定着菌数が見られ、数週間単位で定着菌数を追っていく必要があるものと考えられた。心臓採血により得た血液からは菌の検出が見られず、腹腔内接種による菌血症を発症していなかった。その他臓器 (脾臓、腎臓、膀胱、肺) では、

図1 各種臓器から得られた黄色ブドウ球菌 *S. aureus* MW2株の定着菌数



4日後に菌数増加が見られるものの、7日後には検出できなかつた。心臓からは菌の検出が無く、臓器所見においても心内膜炎など菌定着は見られなかつた。4日後には腹腔内接種部位に複数の皮下膿瘍（直径2mm）ができており、7日後にも広範囲な皮下膿瘍が形成されていた。

これまでの報告通り、In vitro 培養では対数増殖期後期から病原因子の転写増強が確認できた。一方、internal control として使用予定の 50S ribosomal protein L2 遺伝子 *rplB* では徐々に減少する傾向が見られた。閉鎖環境である In vitro 培養では栄養源の枯渇とともに基礎代謝である蛋白合成系が抑えられ、一方、さらなる増殖・感染巣拡大のために病原因子を増員させている様子が伺えた（図2）。



マウス臓器への感染において、マウス尾静脈接種し1時間後の腎臓サンプル (IV-Kidney 1 h) と、マウス腹腔内接種4日後の肝臓サンプル (IP-Liver 4 days) と、腹腔内接種4日後に得られた皮下膿瘍 (IP-abscess 4 days) とで比較検討した(図3)。

① Fibronectin-binding proteins (Fnb, FnbB) は細胞外マトリックスの主要構成要素であるFibronectinに結合する定着因子であり、腎臓、肝臓、皮下膿瘍ともに発現量は非常に多く (24~3700倍)、マウス生体内で主要な定着因子であるこ

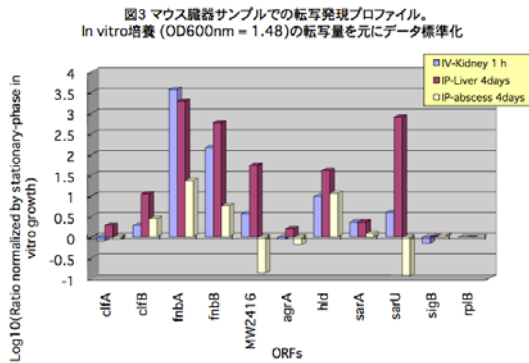
とが推察された。

② Fibrinogen-binding proteinであるClumping factors (ClfA, ClfB) は In vitro培養で異なる転写発現制御を受けていることが知られており、本研究においても同様の結果が得られた。マウス生体内においてはClfBのほうがより高発現しており、また、皮下膿瘍サンプルにおいてもClfBの高発現が認められることから、ClfBによる菌凝集が膿瘍形成において重要な要素であることが示唆された。

③ 機能未知である細胞壁架橋型蛋白質のなかで、MW2416遺伝子が腎臓、肝臓サンプルにおいて顕著な転写増強をしていることが明らかになった。

④ 病原因子レギュレーターとして解析が進んでいるAgr system (*agrABCD*, *hld*)やSarA グローバル・レギュレーターの転写発現もマウス生体内サンプルで増強していることが明らかになり、これまでの知見・報告に準じた結果を得ることができた。その一方、新規知見として、SarAホモログであるSarUレギュレーターの転写増強が腎臓、特に肝臓サンプルにおいて顕著であり、Agr, SarAと異なり皮下膿瘍サンプルでは逆に転写抑制されていることが明らかになった。類似病原因子レギュレーターであるが、臓器組織に直接接触する場合と皮下膿瘍のような“膿”に包み込まれた状態ではその関連する病原因子が異なっていることが推察され、感染巣に特異的な転写調節機構を有している可能性が示唆された。SarUと同様な転写変動を示す因子としてMW2416 (*sasG*)が挙げられた。ゲノム構造上、MW2416(*sasG*) - *sarT* (MW2417) - *sarU* (MW2418)と隣接していることから、MW2416はSarT, SarUによる転写調節を受けていることが考え

られた。



(2) SarT, SarUにおける細胞表面蛋白質の転写発現制御解析

BHI液体培地で振倒培養したところ、激しい振倒にも関わらずSarT, SarU過剰発現株において通常の黄色ブドウ球菌には見られない菌凝集塊を形成することが分かった。一方、SarS過剰発現株はよりplanctonicな菌集団になっており、対極的な結果が得られた。

それぞれ過剰発現株の対数増殖期における菌体から全RNAを調整し、上記の手法と同様に定量的PCR法により転写発現量の変動を検討したところ、SarTおよびSarU過剰発現株においてMW2416 (*sasG*)の転写増強が見られ、ゲノム構造から推測したようにSarT-SarUシステムによる転写調節を受けていることが示唆された(表2)。さらに、SarS過剰発現株ではSarT, SarU, MW2416 (*sasG*)の転写発現量が激減しており、SarSがSarT-SarUシステムを転写抑制することでMW2416の転写調節にも関与していることが示唆された。

表2 SarS, SarT, SarU過剰発現による転写発現量の変動

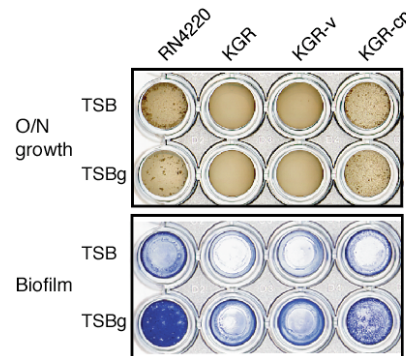
Genes	log2 (ratio normalized by 4220-pYT3)		
	4220-sarS+	4220-sarT+	4220-sarU+
MW2416	-4.36	1.33	0.98
sarS	1.37	0.64	0.71
sarT	-6.79	2.60	1.51
sarU	-4.90	1.78	3.07
rplB	0.00	0.00	0.00

加えて、マイクロアレイ法で解析したところ、SarT および SarU 遺伝子近傍にコードしている SasG 遺伝子(MW2416)の転写増強を再検証することができた。

(3) 細胞壁架橋蛋白質 SasG による黄色ブドウ球菌の自己凝集能

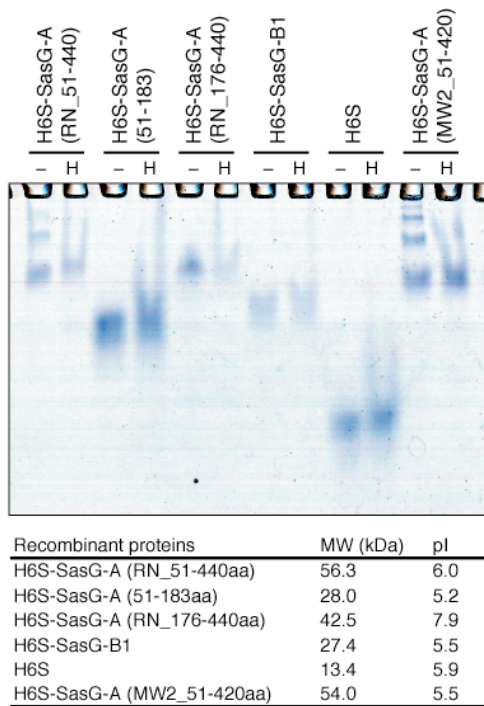
親株 RN4220 株には菌凝集・バイオフィーム形成が見られるが、*sasG* 遺伝子変異株 KGR では菌凝集・バイオフィーム共に消失した。プラスミドによる *sasG* 遺伝子相補株 KGR-cp では菌凝集が回復し、ベクターのみのコントロール株 KGR-v は回復しなかったことから、*sasG* 遺伝子が菌凝集・バイオフィーム形成に直接関与していることが示唆された(図4)。

図4 SasG相補による菌凝集・バイオフィーム形成



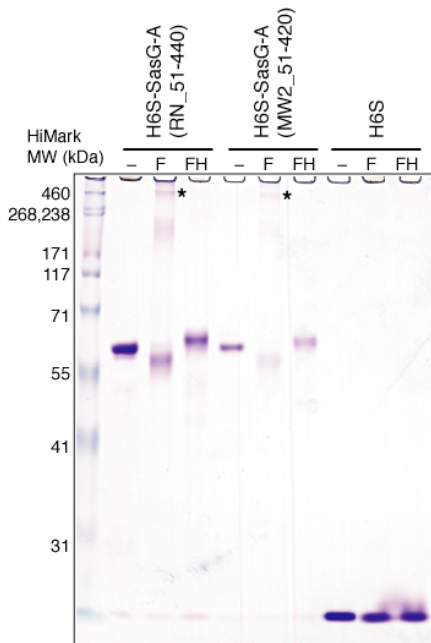
SasGはAドメインと8回の繰り返しBドメインを有し、SasG蛋白質のAドメイン(51から440番目のアミノ酸配列)の組換え発現体H6S-SasG-A(RN_51-440)をNative電気泳動法で分離したところ、複数のバンドが検出されホモオリゴマーを形成していることが示唆された(図5)。Aドメインの一部断片(51-183番目、176-440番目)とBドメインでは1本のバンドしか検出されなかったことから、Aドメイン全体がオリゴマー形成に必要なことが明らかになった(図5)。

図5 SasG蛋白質のNative電気泳動



同様に、SasGはフォルマリン架橋実験で複合体を形成し(F)、フォルマリン架橋された複合体は熱処理(FH)により単量体に戻ったことから、生理的条件下では4もしくは8量体のホモ複合体を形成していることが分かった(図6)。

図6 SasG蛋白質のフォルマリン架橋実験



[結語]

ワクチン等による病原細菌の感染制御には、初期感染メカニズムをより重点的に解明していく必要があり、本研究では定着因子候補である因子群とそれら制御レギュレーターの転写変動に着目した解析内容である。本研究により、21種の定着因子候補と8種の病原因子レギュレーターのマウス生体内での発現プロファイルを解析し、in vitro よりもマウス生体内でより定着因子群が強く発現増強していることが示唆された。これら結果は、定着因子群が感染状況で重要であることをより明確に提示できたものと考えている。本研究では感染実験で得られた知見から、ブドウ球菌属に特徴的な Sar 病原因子レギュレーターとその調節下にある SasG に焦点を絞った。Sar 転写調節因子が SasG を転写増強することで菌凝集・バイオフィーム形成に関与していることを明らかにした。感染時における Sar ファミリーの転写調節機構と、その転写制御下の SasG による菌凝集、微小膿瘍形成、そして抗菌薬治療の難治化に関与しているのかどうか明らかにすることが今後の課題である。

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 5 件)

1. **Kuroda, M.**, Ito, R., Tanaka, Y., Yao, M., Matoba, K., Saito, S., Tanaka, I., Ohta, T. *Staphylococcus aureus* Surface Protein SasG Contributes to Intercellular Autoaggregation of *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun.* **377(4):1102-6 (2008)**. Epub 2008 Nov 5.
2. Watanabe, M., Tanaka, Y., Suenaga, A., **Kuroda, M.**, Yao, M., Watanabe, N., Arisaka, F., Ohta, T., Tanaka, I., Tsumoto,

- K. Structural basis for multimeric heme complexation through a specific protein-heme interaction: the case of the third neat domain of IsdH from *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem.* **283(42):28649-59 (2008)**. Epub 2008 Jul 30.
3. **Kuroda, M.**, Tanaka, Y., Aoki, R., Shu, D., Tsumoto, K., Ohta, T. *Staphylococcus aureus* giant protein Ebh is involved in tolerance to transient hyperosmotic pressure. *Biochem Biophys Res Commun.* **374(2):237-41 (2008)**. Epub 2008 Jul 17.
 4. Miyafusa, T., Tanaka, Y., **Kuroda, M.**, Ohta, T. and Tsumoto, K. Expression, Purification, Crystallization, and Primary Diffraction Analysis of CapF, a Capsular Polysaccharide Synthesis Enzyme from *Staphylococcus aureus*. *Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun.* **64:512-5 (2008)**. Epub 2008 May 23
 5. Tanaka, Y., Sakamoto, S., **Kuroda, M.**, Goda, S., Gao, YG., Tsumoto, K., Hiragi, Y., Yao, M., Watanabe, N., Ohta, T. and Tanaka, I. A Helical String of Alternately Connected Two Three-helix Bundles for the 1.1-Megadalton Cell Wall-Associated Adhesion Protein Ebh from *Staphylococcus aureus*. *Structure.* **16:488-496 (2008)**

[学会発表] (計 6 件)

1. **黒田誠**、関塚剛史。黄色ブドウ球菌の SarAパラログによる細胞壁架橋型タンパク質 SasG の転写制御の解析。第 82 回日本細菌学会 名古屋国際会議場 2009 年 3 月。
2. **Makoto Kuroda**, Masato Higashide, Carlos Takashi Neves Omura, Saburo

- Ohkawa, Sadahiro Ichimura, Toshiko Ohta. Methicillin-Resistant *Staphylococcus saprophyticus* Carrying Staphylococcal Cassette Chromosome *mec* (SCC*mec*) Have Emerged in Urogenital Tract Infections. 108th ASM general meeting. 2008, June. Boston, MA USA.
3. **Makoto Kuroda**. In vivo expression of cell surface proteins in *Staphylococcus aureus*. Gordon Research Conference, staphylococcal diseases. 2007, Sep. Les Diablerets, Switzerland (シンポジストとして口頭発表)
 4. **Makoto Kuroda**, Sanae Nagasaki and Toshiko Ohta. Sesquiterpene Farnesol Affects Lipase Activity of *Staphylococcus aureus* as a Competitive Inhibitor. 107th ASM general meeting. 2007, May. Toronto, Canada.
 5. Ryuta Ito, **Makoto Kuroda** and Toshiko Ohta. *Staphylococcus aureus* surface protein SasG contributes to intercellular adhesion and biofilm formation. 107th ASM general meeting. 2007, May. Toronto, Canada.
 6. **黒田誠**。(W5. 近縁ゲノム配列比較から病原性へ) 比較ゲノム解析から見えるブドウ球菌属の種特徴的な病原性と生存機構。第 80 回日本細菌学会総会 大阪市アジア太平洋トレードセンター 2007 年 3 月。

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒田誠（国立感染症研究所・病原体ゲノム
解析研究センター・第三室・室長）

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

田中良和（北海道大学 創成科学共同
研究機構 北大基礎融合科学領域リーダ
ー育成システム 特任助教）