

令和 4 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03466

研究課題名(和文) 多様なRNA相互作用因子を介したグラム陽性細菌の病原性制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of virulence mechanism of Gram-positive bacteria regulated by various RNA binding proteins

研究代表者

垣内 力 (KAITO, Chikara)

岡山大学・医歯薬学域・教授

研究者番号：60420238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：黄色ブドウ球菌と肺炎球菌は様々な疾患を引き起こす病原性細菌であり、薬剤耐性菌の増加が大きな問題となっている。薬剤耐性菌に対する新たな治療方策を確立する上で、これらの細菌の病原性発現メカニズムの理解が必要である。本研究では、新規のヌクレオチド分解酵素の生化学的性質を解析し、本酵素が酸化ヌクレオチドを分解することにより黄色ブドウ球菌の酸化ストレス耐性を導き、病原性発現に機能することを明らかにした。さらに研究の過程で、カイコのプラズマ中での黄色ブドウ球菌による凝集塊形成反応を発見した。遺伝子欠損株を用いた解析により、凝集塊形成反応は黄色ブドウ球菌の病原性発現に重要な役割を持つと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、黄色ブドウ球菌の新規ヌクレオチド分解酵素を解析することにより、黄色ブドウ球菌が酸化ヌクレオチドを分解することにより酸化ストレス抵抗性を獲得することを発見した。細菌が多細胞生物への感染を可能とする新たな分子機構を明らかにした点で学術的意義がある。また、本酵素に対する阻害剤は新たな細菌感染症治療薬の創出につながる点で社会的意義がある。さらに、カイコプラズマ中における黄色ブドウ球菌の凝集塊形成の発見は、哺乳類と昆虫という異なる宿主間で保存された黄色ブドウ球菌の病原性発現ストラテジーの一端を明らかにした点で学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：Staphylococcus aureus and Streptococcus pneumoniae are pathogenic bacteria that cause various diseases. In order to establish new therapeutic strategies against drug-resistant bacteria, it is necessary to understand the mechanisms of pathogenesis of these bacteria. In this study, we analyzed the biochemical properties of a novel nucleotidase and demonstrated that this enzyme degrades oxidized nucleotides, leading to oxidative stress resistance in *S. aureus*, and functions in the development of pathogenicity. In the course of our research, we also discovered the reaction of aggregation formation by *S. aureus* in the plasma of silkworms. Analysis using gene-deficient strains suggested that the aggregation formation plays an important role in the development of pathogenicity of *S. aureus*.

研究分野：分子生物学，生化学，微生物学

キーワード：酸化ヌクレオチド カイコプラズマ

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1) グラム陽性細菌の病原性機構の理解の重要性

細菌感染症は今なお世界の死因の上位を占める。その中でも、薬剤耐性菌による感染症は世界規模で問題となっている(薬剤耐性に関する国際行動計画 WHO 2015)。特に、日本国内においては、グラム陽性細菌である黄色ブドウ球菌と肺炎球菌の薬剤耐性菌出現頻度は約 50%であり、新しい治療薬の開発が望まれている(薬剤耐性アクションプラン 厚生労働省 2016)。本研究は、耐性化が進む黄色ブドウ球菌と肺炎球菌を主たる研究対象とし、病原性発現の分子機構を解明することにより、その分子機構を標的とした新しい感染症制御薬開発のための知的基盤を得ることを目指す。これまでに、細菌毒素やその転写制御因子についての生化学的知見は得られているものの、宿主動物体内における病原因子の発現制御機構、宿主動物の免疫系に対する細菌の抵抗メカニズム、宿主動物体内での増殖に必要な細菌の代謝経路は未だ十分に明らかになっていない。

#### (2) RNA と相互作用する新規病原性調節因子群の発見

これまでに代表者は、黄色ブドウ球菌ゲノム上の細菌間で保存された機能未知遺伝子について、黄色ブドウ球菌の遺伝子欠損株を作出し、病原性をカイコ感染モデルにおいて評価することにより、細菌間で保存された新規病原性調節因子を同定してきた。これらの遺伝子はマウスに対する病原性にも必要であり、毒素など複数の病原因子の発現調節に必要であったことから、カイコ感染モデルが細菌の病原性調節因子の同定に有効であることが明らかとなった。同定された分子群は、RNA 結合、RNA 修飾、ヌクレオチド分解などの分子機能を示し、既知の病原性調節因子のカテゴリーに属さない、全く新しいタイプの病原性調節因子であった(下表)。また一方で代表者は、薬剤耐性黄色ブドウ球菌(MRSA)の移動能力を評価する系を構築し、MRSAの病原性制御に働く機能性RNAを発見した(Kaito et al., PLOS Pathog. 2011, 2013)。以上の知見は、黄色ブドウ球菌の病原性発現において、RNA相互作用因子群が重要な役割を果たしていることを示唆している。

### カイコ感染モデルを用いて代表者が同定した新規病原性調節因子

カテゴリー	因子名	分子機能	発表論文
RNA 相互作用	CvfA	RNA3'末端構造変換	Mol. Microbiol. (2005), J. Biol. Chem. (2008)
	CvfB	RNA 結合	Infect. Immun. (2007), Structure (2010)
	CvfD	リボソーム RNA メチル化	FEBS J. (2015)
	RsmH	リボソーム RNA メチル化	FEBS J. (2015)
	KsgA	リボソーム RNA メチル化	Biochimie (2015)
	PNPase	RNA 分解	J. Biol. Chem. (2014)
	SA0873	RNA リガーゼ	未発表
DNA 相互作用	SarZ	DNA 結合	Mol. Microbiol. (2006)
ヌクレオチド代謝	CvfE	ヌクレオチド分解	J. Biol. Chem. (2016)
	SA1292	ヌクレオチド分解	未発表
不明	CvfC	不明	Microb. Pathog. (2010)

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、細菌が宿主環境を認識し、病原因子を発現制御する過程における RNA 相互作用因子群の役割を明らかにすることである。本課題では、新技術ショットガン LC-MS/MS 法と代表者の病原性評価系を連携させ、グラム陽性細菌の病原性機能に関わる新規 RNA 相互作用因子を網羅的に同定し、RNA の質と量の調節による新しい病原性制御機構を解明する。中長期的には、薬剤耐性菌の病原性を抑制する RNA 医薬への展開を志向するとともに、生物学の普遍的課題である RNA 動態制御に関する新たな学術領域開拓を目指す。

### 3. 研究の方法

- (1) ゲノムデータベースを用いた逆遺伝学的アプローチ、ならびにショットガン LC-MS/MS 法を用いた生化学的アプローチにより、RNA と相互作用する病原性調節因子を同定する。
- (2) 病原性調節因子の分子機能と感染プロセスにおける生理機能を明らかにする。
- (3) RNA シークエンス法、iTRAQ 法を用いた解析により、病原性調節因子が引き起こす細菌分子群の変化を解明し、RNA を中心とした病原性調節ネットワークを明らかにする。
- (4) グラム陽性細菌間における病原性調節ネットワークの保存性を解明する。

(5) 病原性調節ネットワークに対して影響を与える宿主因子の同定・機能解析を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) SA1292 タンパク質の精製と機能解析

核酸と相互作用するドメインを有する黄色ブドウ球菌の機能未知遺伝子の欠損株を作成し、カイコに対する病原性が低下する株を探索した。その結果、SA1292 遺伝子欠損株がカイコに対する殺傷活性を低下することを見出した。SA1292 遺伝子欠損株においては、 $\alpha$  溶血毒素遺伝子の転写開始活性が低下し、溶血毒素の分泌量が減少していた。

SA1292 遺伝子産物には、ヌクレオチドピロフォスファターゼドメインが見出された。SA1292 遺伝子産物の分子機能を解明するため、大腸菌を用いて SA1292 リコンビナントタンパク質を精製した。SA1292 リコンビナントタンパク質は、マグネシウム存在下においてヌクレオシド 3 リン酸をヌクレオシド 1 リン酸とピロリン酸に分解する活性を示した (図 1)。SA1292 によるヌクレオシド 3 リン酸分解活性は、GTP, TTP, UTP に対して強く、ATP と CTP に対して弱かった。ヌクレオシド 2 リン酸やヌクレオシド 1 リン酸に対する分解活性は見いだされなかった。SA1292 による GTP 分解活性の  $K_m$  は、 $300 \mu M$  前後であった。ヌクレオチドピロフォスファターゼ活性はマグネシウムイオン、コバルトイオン、マンガンイオンの存在下で見いだされたが、カルシウムイオンと亜鉛イオンの存在下では見いだされなかった。また、金属イオンとの相互作用が推定されたアミノ酸をアラニンに置換した変異型の SA1292 遺伝子産物は、GTP 分解活性を消失した。

SA1292 遺伝子産物と同一性を有するヌクレオチドピロフォスファターゼ MazG が酸化型ヌクレオチドの分解に働くという知見に基づき、SA1292 によるヌクレオチドピロフォスファターゼ分解活性が、酸化型ヌクレオチドに対して強いのか検討した。酸化型ヌクレオチドである 8-oxo-GTP に対する SA1292 の分解活性は、GTP と dGTP に対する分解活性に比べて高い値を示した。そこで、SA1292 遺伝子欠損株が酸化ストレス条件における生存に必要であるか検討を行ったところ、SA1292 遺伝子欠損株は、過酸化水素存在下で野生株に比べて増殖速度が低下することが判明した。

以上の結果は、SA1292 遺伝子産物が酸化型ヌクレオチドを分解し、酸化ストレス条件における黄色ブドウ球菌の増殖に寄与することを示唆している。これまでに代表者が黄色ブドウ球菌の様々な遺伝子欠損株について解析を行った結果、黄色ブドウ球菌の酸化ストレスに対する耐性はカイコ殺傷活性に必要なことを見出している。したがって、SA1292 遺伝子産物による酸化ストレス耐性の付与は、黄色ブドウ球菌のカイコ感染時に重要な役割を持つと推定される。

##### (2) 抗生物質耐性を導く RNA ポリメラーゼ $\beta$ サブユニットのアミノ酸置換変異の解析

転写と翻訳を阻害する抗生物質に対して耐性を示す黄色ブドウ球菌遺伝子変異株の中から病原性が変化する遺伝子変異株を探索し、病原性に影響を与える RNA 相互作用因子を同定することを試みた。リファンピシンに対する耐性株として、RNA ポリメラーゼ  $\beta$  サブユニット RpoB の H481Y 変異を有する株を分離した。また、エリスロマイシンに対する耐性株として、リボソームタンパク質 Rp1V の A89E/G91D 変異を有する株を分離した。これらの薬剤耐性株はカイコに対して病原性が低下していた。遺伝子変異とカイコに対する病原性低下との因果関係を検証するため、RpoB H481Y、もしくは Rp1V A89E/G91D の変異部位近傍に薬剤耐性マーカーを挿入し、ファージを用いた形質導入を行うことにより、RpoB H481Y、もしくは Rp1V A89E/G91D 変異株を新たに作製した。その結果、RpoB H481Y 変異株はカイコに対する病原性が低下し、Rp1V A89E/G91D 変異株は黄色ブドウ球菌のカイコに対する病原性低下を導くことが示唆された。一方、Rp1V A89E/G91D 変異株はカイコに対する病原性を低下せず、Rp1V A89E/G91D 変異はカイコに対する病原性低下の原因ではないことが示唆された。RpoB H481Y 変異株は、酸化ストレスを与える薬剤であるメナジオンに対して感受性を示した。以上の結果は、RNA ポリメラーゼ  $\beta$  サブユニットの H481Y 変異は、黄色ブドウ球菌の酸化ストレス感受性化とカイコに対する病原性低下を導くことを示唆している。

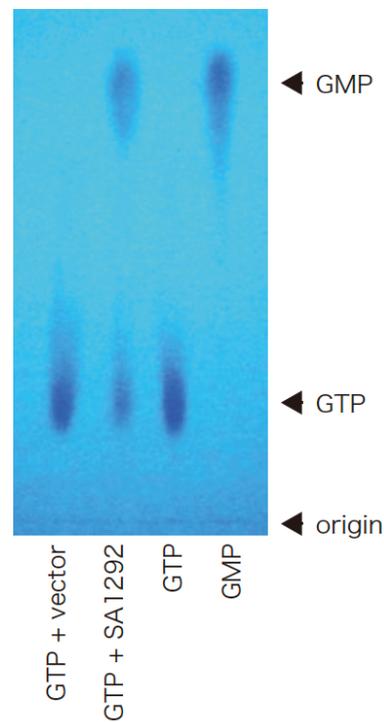


図 1. SA1292 タンパク質による GTP の分解

左から、空ベクターで形質転換した大腸菌から精製されたタンパク質と GTP を反応させたサンプル、SA1292 タンパク質と GTP を反応させたサンプル、GTP、GMP を示す。PEI Cellulose F TLC plate で展開後、UV 照射し観察した。

その結果、RpoB H481Y 変異株はカイコに対する病原性が低下し、Rp1V A89E/G91D 変異株はカイコに対する病原性を低下せず、Rp1V A89E/G91D 変異はカイコに対する病原性低下の原因ではないことが示唆された。RpoB H481Y 変異株は、酸化ストレスを与える薬剤であるメナジオンに対して感受性を示した。以上の結果は、RNA ポリメラーゼ  $\beta$  サブユニットの H481Y 変異は、黄色ブドウ球菌の酸化ストレス感受性化とカイコに対する病原性低下を導くことを示唆している。

(3) カイコプラズマ中の黄色ブドウ球菌の凝集塊形成に関する解析

黄色ブドウ球菌のカイコ体液液中での増殖について解析を行う過程で、黄色ブドウ球菌はカイコ Plasma 中で培養されると凝集塊を形成することを見出した (図 2)。アラビノース、もしくはガラクトースの添加により、カイコ Plasma 中での黄色ブドウ球菌の凝集塊形成は阻害されたことから、黄色ブドウ球菌表層の多糖類とカイコプラズマ中の糖結合タンパク質が凝集塊形成に関与して

いると考えられた。黄色ブドウ球菌の菌体表層の多糖類である細胞膜タイコ酸の合成に関わる *ypfP* と *ItaA*, 細胞壁タイコ酸の合成に関わる *tagO* 遺伝子の欠損株はカイコ Plasma 中での凝集塊形成能が低下した。*ypfP*, *ItaA*, *tagO* の欠損株はカイコに対する殺傷能力を低下した。以上の結果は、カイコ Plasma 中において、黄色ブドウ球菌が菌体表層のタイコ酸を介して凝集塊を形成すること、凝集塊形成が黄色ブドウ球菌のカイコにおける病原性発現に関与することを示唆している。

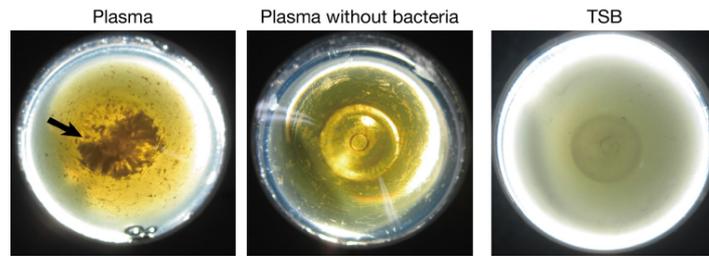


図 2. カイコ体液中での黄色ブドウ球菌の凝集塊形成

左: カイコプラズマ中での培養結果, 中央: 菌なしのカイコプラズマの培養結果, 右: TSB 中での培養結果を示す。

(PLOS ONE 2019 May 30;14(5):e0217517.)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Kaito C, Murakami K, Imai L, Furuta K.	4. 巻 64(9)
2. 論文標題 Animal infection models using non-mammals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol.	6. 最初と最後の頁 585-592
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12834.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Domon H, Maekawa T, Isono T, Furuta K, Kaito C, Terao Y.	4. 巻 11(1)
2. 論文標題 Proteolytic cleavage of HLA class II by human neutrophil elastase in pneumococcal pneumonia	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 2432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-82212-5.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kanaida M, Kimishima A, Eguchi S, Iwatsuki M, Watanabe Y, Honsho M, Hirose T, Noguchi Y, Nonaka K, Sennari G, Matsui H, Kaito C, Hanaki H, Asami Y, Sunazuka T.	4. 巻 16(13)
2. 論文標題 Total Syntheses and Chemical Biology Studies of Hymeglusin and Fusarilactone A, Novel Circumventors of $\beta$ -Lactam Drug Resistance in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ChemMedChem.	6. 最初と最後の頁 2106-2111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cmdc.202100219.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Ryuno H, Nigo F, Naguro I, Sekimizu K, Kaito C.	4. 巻 14(5)
2. 論文標題 Staphylococcus aureus aggregation in the plasma fraction of silkworm hemolymph	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0217517
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0217517.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mitsutomi S, Akimitsu N, Sekimizu K, Kaito C	4. 巻 165
2. 論文標題 Identification of 2H phosphoesterase superfamily proteins with 2'-CPDase activity	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimie	6. 最初と最後の頁 235-244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biochi.2019.08.008.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tabuchi F, Lulitanond A, Lulitanond V, Thunyaharn S, Kaito C.	4. 巻 64(3)
2. 論文標題 Epidemiological study on the relationship between toxin production and psm-mec mutations in MRSA isolates in Thailand	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol.	6. 最初と最後の頁 219-225
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12764.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Miyata M, Robinson RC, Uyeda TQP, Fukumori Y, Fukushima SI, Haruta S, Homma M, Inaba K, Ito M, Kaito C, Kato K, Kenri T, Kinoshita Y, Kojima S, Minamino T, Mori H, Nakamura S, Nakane D, Nakayama K, Nishiyama M, Shibata S, Shimabukuro K, Tamakoshi M, Taoka A, Tashiro Y, Tulum I, Wada H, Wakabayashi KI.	4. 巻 25(1)
2. 論文標題 Tree of motility - A proposed history of motility systems in the tree of life	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes Cells.	6. 最初と最後の頁 6-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12737.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida N, Kaito C.	4. 巻 30
2. 論文標題 Dataset for de novo transcriptome assembly of the African bullfrog <i>Pyxicephalus adspersus</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Data Brief.	6. 最初と最後の頁 105388
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dib.2020.105388.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 垣内力
2. 発表標題 病原体進化の要因となる病原体宿主相互作用
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会 シンポジウム（オンライン開催）（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 垣内力
2. 発表標題 MRSAの病原性制御機構
3. 学会等名 第94回日本感染症学会総会 シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	寺尾 豊  (TERAO Yutaka)  (50397717)	新潟大学・医歯学系・教授    (13101)	
研究分担者	古田 和幸  (FURUTA Kazuyuki)  (50644936)	岡山大学・医歯薬学域・准教授    (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------