

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20790057
 研究課題名 (和文) 新規病原性因子 CVF による細菌間で共通した病原性発動システムの解明
 研究課題名 (英文) Research on virulence regulatory mechanisms by CVF
 研究代表者
 垣内 力 (KAITO CHIKARA)
 東京大学・大学院薬学系研究科・講師
 研究者番号：60420238

研究成果の概要 (和文)：黄色ブドウ球菌の *cvfA* 遺伝子 (SA1129) はカイク感染モデルを用いて我々が同定した病原性制御遺伝子である。*CvfA* タンパク質は RNA の 3' 末端に生じる 2',3' ホスホジエステル結合を分解する活性を有する。*cvfA* 遺伝子欠損株においては、黄色ブドウ球菌の全遺伝子の 20% の発現が親株に比べて変化していた。さらに我々は、*cvfA* 遺伝子欠損株の表現型がエキソヌクレアーゼをコードする *pnpA* 遺伝子の欠損により回復することを見出した。従って、*CvfA* はエキソヌクレアーゼ *PnpA* と協調して働くと考えられる。*CvfB* が新規構造を有する RNA 結合タンパク質であることを明らかにした。*cvfC* が核酸代謝に影響を与える事を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：We previously identified the *cvfA* gene (SA1129) that is required for the expression of the virulence regulatory locus *agr* in *Staphylococcus aureus* using silkworm infection model. *CvfA* cleaves 2',3'-cyclic phosphodiester linkage at the 3'-terminal of RNA. In this study, we performed microarray analysis of the *cvfA* mutant to identify the genes whose expressions are under the control of the *cvfA* gene. In the *cvfA*-deletion mutant, the expression of 20% of total genes were increased or decreased over 2-fold compared with parent strain. The WH domain is critical to *CvfB* function and contains a unique sequence motif. Thus *CvfB* represents a novel assembly of modules for binding RNA. *cvfC* affects the expression of metabolic genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：分子生物学・病原性

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌の病原性発現機構に関しては、病原性毒素に関する多くの生化学的研究がある。また、病原性の発現に必要な遺伝子が、主にマウスを用いた感染モデル系により同定されている。特に、*agr* と呼ばれる病原性毒素の発現に必要な遺伝子であることが明らかにされており、細菌の病原性発現において重要な役割を演じていると考えられている。マウス感染モデルは、コスト及び倫理面から数多くの検体の病原性を評価するには不向きである。

2. 研究の目的

本研究の目的は、細菌間で保存された新規病原性因子であるCvfA、CvfB、CvfCの機能を明らかにすることにより、細菌間で保存された病原性のシステムを明らかにすることである。黄色ブドウ球菌のゲノムプロジェクトから、その染色体上には細菌間で保存された機能未知遺伝子が589個存在することが明らかになっている。研究代表者らは、これら589遺伝子の欠損変異株を作成し、研究代表者が確立したカイコ感染モデルを用いて、病原性低下株を検索した。その結果、3つの新規遺伝子がカイコに対する病原性に必要である事が見出された (Kaito *et al.*, (2005) *Mol. Microbiol.*)。研究代表者らはこれら3つの遺伝子を *cvfA*、*cvfB*、*cvfC* (Conserved Virulence Factor A, B, C) と命名した。これらの遺伝子はマウスに対する病原性に寄与し、黄色ブドウ球菌の細胞外毒素の産生に必要である。しかしながら、これらの遺伝子産物の分子機能については全く不明である。そこで本研究では、同定された新規病原性遺伝子の機能を、変異株を用いたマイクロアレイ解析、及び遺伝子産物の一次構造から予測される生化学的活性の解析により、明らかにする。また、黄色ブドウ球菌以外の病原性細菌の病原性にそれらの新規病原性遺伝子が寄与するかをA群連鎖球菌と緑膿菌を用いて検討する。

3. 研究の方法

cvfA、*cvfB*、*cvfC*遺伝子欠損株がいかなる遺伝子発現変化を引き起こすかをトランスクリプトーム解析により明らかにする。また、それぞれの遺伝子産物の一次構造から生化学的活性を類推し、リコンビナントタンパク質を精製する事により、生化学的活性を明らかにする。以上の解析から、黄色ブドウ球

菌がCvfA、CvfB、CvfCによって病原性を発現するにいたる分子機構が明らかになる。さらに、*cvfA*、*cvfB*、*cvfC*遺伝子と相互作用する因子を遺伝子欠損株から検索する。

4. 研究成果

本研究で我々はマイクロアレイ解析により、*cvfA* 遺伝子の発現の有無が転写レベルで影響を与える遺伝子の同定を試みた。*cvfA* 遺伝子がグローバルな遺伝子発現に影響を与える事が明らかとなった。以前の我々の報告と一致して、*cvfA* 欠損株では、*agr* 遺伝子座の発現が低下していた。今回新たに *cvfA* 欠損株では、病原性因子の発現制御に働く *sarS* 遺伝子の発現が上昇し、*sarV* 遺伝子、及び *sarX* 遺伝子の発現が低下していることが見出された。また、フィブロネクチン結合タンパク質をコードする *fnbA* 遺伝子、莢膜の合成に働く *cap* オペロン、セリンプロテアーゼをコードする *splFD* 遺伝子、メタロプロテアーゼをコードする *aur* 遺伝子の発現量が *cvfA* 欠損株において低下していた。さらに、*cvfA* 遺伝子欠損株においては、アミノ酸の合成に関わる遺伝子群、解糖系の酢酸代謝、及びクエン酸回路に関わる遺伝子群、トランスポーターを構成する遺伝子群の発現量が変動していた。従って、*cvfA* 遺伝子はアミノ酸代謝やエネルギー代謝に関わる遺伝子群と病原性因子をコードする遺伝子群の両方の発現に寄与する遺伝子であると考えられる。*cvfA* 遺伝子欠損株の表現型が、エキソヌクレアーゼをコードする *pnpA* の欠損により回復することを見出した。*CvfA* による RNA の3'末端の修飾がエキソヌクレアーゼ PnPA による分解を免れていることが示唆された。この RNA 分解抑制機構は、RNA3'末端修飾を介した新たな RNA 分解制御機構であると考えられる。

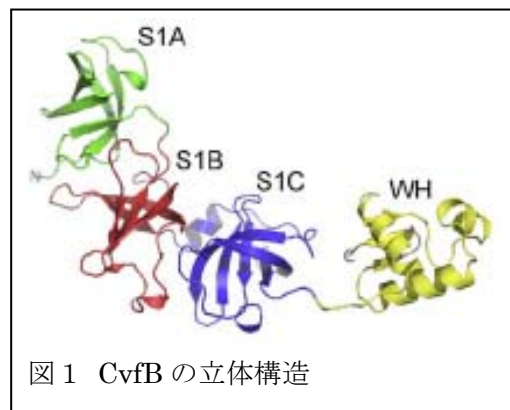


図1 CvfBの立体構造

CvfB については、結晶構造解析から、新規構造を有する RNA 結合タンパク質である

ことが明らかとなった (図1)。

cvfC オペロンは 4 つの遺伝子 cvfC-1、cvfC-2、cvfC-3、cvfC-4 遺伝子から構成されるオペロンである (図2)。cvfC オペロン破壊株はカイコ、マウスに対する病原性が低下する。本研究において、マイクロアレイ解析および定量的 RT-PCR 解析により、cvfC オペロン破壊株で 21 遺伝子の発現が変動していることが判明した。cvfC オペロン破壊株においては、病原性の関与が報告されている因子をコードする遺伝子として、RNAIII (病原性制御因子)、capB (莢膜多糖合成酵素)、oppB (トランスポーター)、hla (溶血毒素) の発現が減少し、sarS (病原性制御因子) の発現が上昇していた。また代謝に関わる酵素

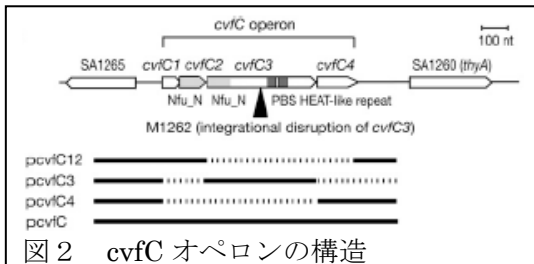


図2 cvfC オペロンの構造

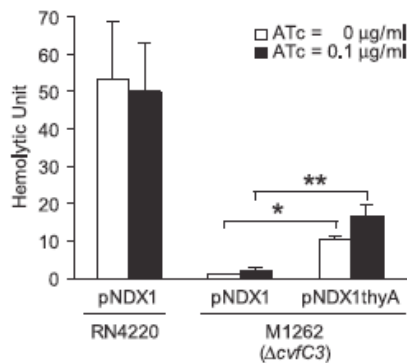


図3 cvfC 欠損株の溶血毒素産生量低下は thyA 遺伝子により相補される

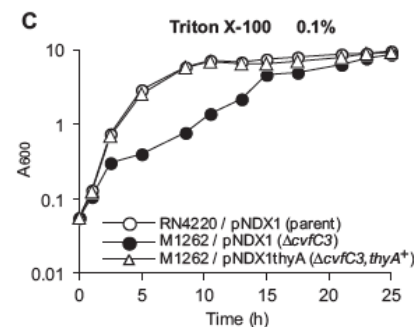


図4 cvfC 欠損株の界面活性剤感受性は thyA 遺伝子により相補される

をコードする遺伝子として purF (プリン合成酵素)、asd (アミノ酸合成酵素)、thyA (チ

ミジル酸合成酵素：ピリミジン合成酵素)、また機能未知トランスポーター、エネルギー代謝に関わる pflA (ギ酸アセチル基転移酵素活性化酵素)、lctE (乳酸脱水素酵素) 遺伝子の発現が減少していた。cvfC オペロンの導入により、cvfC オペロン破壊株における thyA 遺伝子の発現低下が回復した。cvfC オペロン破壊株のカイコ殺傷能低下および溶血活性の低下は thyA 遺伝子の導入により回復した (図3)。cvfC オペロン破壊株および thyA 遺伝子破壊株は界面活性剤添加時に増殖速度が低下した。cvfC オペロン破壊株における界面活性剤添加時の増殖能低下は thyA 遺伝子の導入により回復した (図4)。以上の結果は cvfC オペロンが thyA 遺伝子の発現促進を介して、溶血毒素の産生および界面活性剤耐性を導き、これにより動物個体に対する病原性に寄与することを示唆している。cvfC については、代謝関連遺伝子の発現に影響を与えることが明らかとなった。

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6件)

- (1) Matsumoto Y, Xu Q, Miyazaki S, Kaito C, Farr CL, Axelrod HL, Chiu HJ, Klock HE, Knuth MW, Miller MD, Elsliger MA, Deacon AM, Godzik A, Lesley SA, Sekimizu K, Wilson IA: Structure of a virulence regulatory factor CvfB reveals a novel winged helix RNA binding module. *Structure*. 18:537-47. (2010)
- (2) Ikuo M, Kaito C, Sekimizu K: The cvfC operon of *Staphylococcus aureus* contributes to virulence via expression of the thyA gene. *Microbial Pathogenesis*. (2010) in press.
- (3) Usui K, Miyazaki S, Kaito C, Sekimizu K: Purification of a soil bacteria exotoxin using silkworm toxicity to measure specific activity. *Microbial Pathogenesis*. 46:59-62. (2009)
- (4) Kaito C, Omae Y, Matsumoto Y, Nagata M, Yamaguchi H, Aoto T, Ito T, Hiramatsu K, Sekimizu K: A novel gene, *fudoh*, in the SCCmec region suppresses the colony spreading and virulence in *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE*. 3:e3921. (2008)
- (5) Nagata M, Kaito C, Sekimizu K: Phosphodiesterase activity of CvfA is required for virulence in *Staphylococcus aureus*. *J Biol Chem*. 283:2176-84. (2008)

- (6) Shiokawa K, Aso M, Kondo T, Uchiyama H, Kuroyanagi S, Takai J, Takahashi S, Kajitani M, Kaito C, Sekimizu K, Takayama E, Igarashi K, Hara H: Gene Expression in Pre-MBT Embryos and Activation of Maternally-Inherited Program of Apoptosis to be Executed at around MBT as a Fail-Safe Mechanism in *Xenopus* Early Embryogenesis. ***Gene Regul Syst Bio.*** 29;2:213-31. (2008)

[学会発表] (計 1 件)

Kaito C, Omae Y, Matsumoto Y, Nagata M, Yamaguchi H, Aoto T, Ito T, Hiramatsu K, Sekimizu K: A novel gene *fudoh* in *SCCmec* region regulates the colony spreading ability and virulence in *Staphylococcus aureus*

13th International Symposium on Staphylococci and Staphylococcal Infections
Cairns, Australia (2008.9.7-10) Oral presentation

[その他]

ホームページ

<http://www.f.u-tokyo.ac.jp/~bisei/research/kaito/kaito.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

垣内 力 (KAITO CHIKARA)

東京大学・大学院薬学系研究科・講師

研究者番号：60420238

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者