

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月29日現在

機関番号：32651

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22880034

研究課題名（和文）黄色ブドウ球菌のバイオフィルムマトリックス構成タンパク質の同定と時空間的動態解析

研究課題名（英文）Identification and spatiotemporal dynamics of biofilm matrix component proteins in *Staphylococcus aureus*

研究代表者

杉本 真也（SUGIMOTO SHINYA）

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：60464393

研究成果の概要（和文）：

主要な院内感染菌である黄色ブドウ球菌は、医療器具の表面にバイオフィルムを形成し、難治性の感染症を引き起こす。本研究では、バイオフィルムにおいて黄色ブドウ球菌を包み込む構造体（バイオフィルムマトリックス）を構成するタンパク質の種類と局在性の変化を明らかにした。また、常在菌により産生されるバイオフィルム破壊酵素 Esp の作用機序を解明した。これらの成果は、黄色ブドウ球菌によるバイオフィルム感染症の予防法・治療法の開発につながるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：

*Staphylococcus aureus* exhibits a strong capacity to attach to the surface of implanted medical devices and forms multilayered communities of bacteria, called biofilm. *S. aureus* is a frequent cause of biofilm-associated infections that are a tremendous burden on our healthcare system. Here, we identified and characterized biofilm-matrix proteins which hold cells and contribute to bacterial accumulation in multiple layers. In addition, we found that extracellular serine protease Esp, secreted by a subset of commensal *Staphylococcus epidermidis*, inhibits nasal colonization of *S. aureus* via degradation of *S. aureus* surface proteins and host receptors that are crucial for biofilm formation and host-pathogen interactions. These findings not only provide novel insights into fundamental principles underlying *S. aureus* biofilm development, but may also indicate a novel direction for therapeutic intervention against biofilm infections.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：バイオフィルム、MRSA、セリンプロテアーゼ、プロテオーム解析、分子シャペロン、細胞骨格タンパク質、細胞外マトリックス、細菌間干渉

## 1. 研究開始当初の背景

主要な院内感染菌である黄色ブドウ球菌は、医療器具表面にバイオフィルムを形成し、難治性の感染症を引き起こす。近年では、薬剤耐性菌、特にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) が院内感染の原因菌として深刻な問題となっており、市中 MRSA の拡がりも懸念されている。バイオフィルムは抗生物質に高度の耐性を示し、その巨大な分子サイズのために免疫系・貪食細胞系の働きにも抵抗するため、バイオフィルム感染症の的確な治療法がないのが現状である。そこで、黄色ブドウ球菌バイオフィルムの形成阻害や除去によるバイオフィルム感染症の予防法・治療法の開発に期待が寄せられている。

これまでに、黄色ブドウ球菌のバイオフィルムマトリックス (菌体を包み込む構造体) の成分として細胞外多糖、タンパク質、DNA が存在し、生育環境や遺伝的背景の違いによってマトリックス成分が異なることが知られている (O' Gara, FEMS Microbiol. Rev., 2007, 270, 179-188)。バイオフィルムを構成する多糖類としては、PIA (polysaccharide intercellular adhesion) や PNAG (polymeric N-acetyl-glucosamine) などが知られており、それらの生合成遺伝子群 (*icaADBC*) も明らかとなっている。一方、バイオフィルム形成に関連するタンパク質については、細胞間接着タンパク質や細胞壁アンカータンパク質の存在が知られているが、マトリックスを構成するタンパク質 (BMCPs) については不明な点が多い。また近年、表皮ブドウ球菌 *Staphylococcus epidermidis* によって産生される細胞外セリンプロテアーゼ (Esp) が黄色ブドウ球菌のバイオフィルムを破壊することが明らかとなり (Iwase *et al.* Nature, 2010 465, 346-349)、バイオフィルム感染症の予防法の開発に期待が寄せられているが、Esp が標的とする BMCPs は不明である。

## 2. 研究の目的

黄色ブドウ球菌の BMCPs を明らかにすることは、単に黄色ブドウ球菌のバイオフィルム形成メカニズムの一端を明らかにするだけにとどまらず、Esp の標的タンパク質や作用機序の解明を通して新しいバイオフィルム感染症予防法の開発にもつながるものと期待される。そこで本研究では、黄色ブドウ球菌の BMCPs を同定し、それらの機能や局在性の変化を解析する。得られた知見をもとに、Esp の標的タンパク質と作用機序についても明らかにする。

## 3. 研究の方法

バイオフィルム形成能の高い MRSA 臨床分離株のうちタンパク質性のバイオフィルムマトリックスを形成するものを選抜し、プロテオーム解析によりマトリックス中に含まれるタンパク質を同定した。このうち主要なものについて細胞表層での局在を蛍光免疫染色により解析した。また、精製した組換えタンパク質をバイオフィルム形成能の低い黄色ブドウ球菌株に添加し、バイオフィルム形成の促進効果を評価した。さらに、*S. epidermidis* が産生する Esp の高効率な精製法を確立し、Esp の標的分子の探索を行った。

## 4. 研究成果

### (1) BMCPs の同定

高濃度の塩処理により、バイオフィルムマトリックスを抽出し、そこに含まれるタンパク質をアミノ酸シーケンス解析、LC-MS/MS 解析により同定した (図 1)。その結果、131 種類のタンパク質が同定された (細胞質タンパク質 64%、分泌タンパク質 12%、膜タンパク質 6%、細胞壁タンパク質 3%、局在性不明タンパク質 15%)。この中には、Map (MHC class II analog protein)、Emp (extracellular matrix binding protein)、autolysin などの既知のバイオフィルム関連分泌タンパク質が含まれていたが、生命維持に重要な細胞質タンパク質も多数同定された。これらの細胞質タンパク質は、バイオフィルム形成時に溶菌等により細胞外へ漏出したものと考えられる。

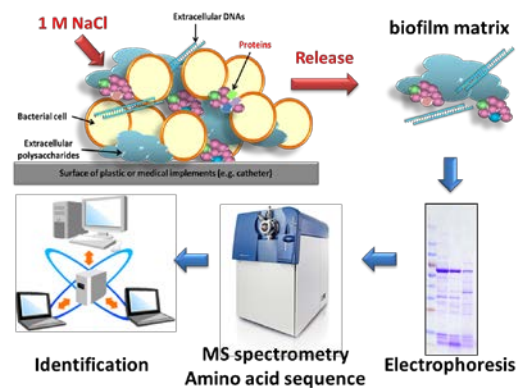


図 1. BMCPs の同定の流れ

### (2) BMCPs の機能解析

同定された BMCPs のうち、最も存在量の多かった Map と多数見出された細胞質タンパク質、特に生存に重要な分子シャペロン (DnaK, ClpB)、細胞骨格タンパク質 (FtsZ) に着目した。これらを組換えタンパク質として精製し、バイオフィルム形成との関連性を調べた結果、いずれも黄色ブドウ球菌のバイオフィ

ルム形成を有意に促進することを見出した(図2)。

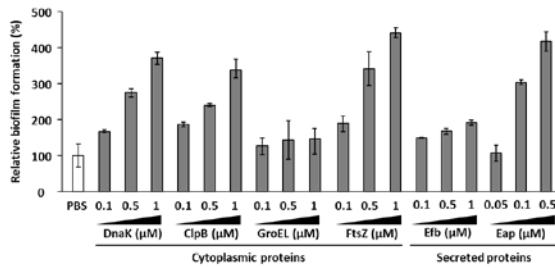


図2. 組換えタンパク質の添加による黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成の促進

さらに、DnaK と ClpB については抗体を作製し、細胞表層の局在量を臨床分離株間で比較した。その結果、バイオフィーム形成能の高い株で菌体表層の ClpB の局在が多いことを明らかにした。また、間接蛍光抗体法により、Map、DnaK、ClpB の局在を解析した。いずれも細胞表層の広範囲に局在することがわかった(図3)。

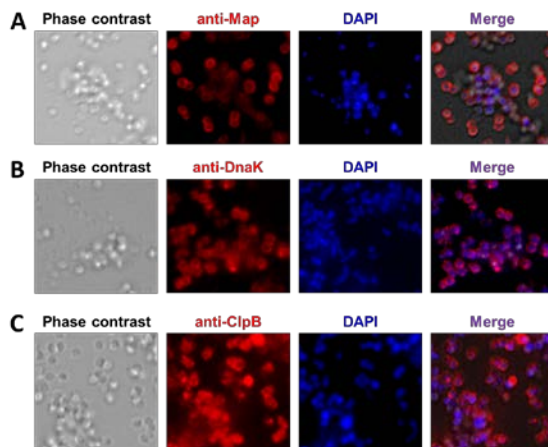


図3. 蛍光免疫染色による BMCPs の観察  
(A) Map、(B) DnaK、(C) ClpB の局在

### 3. バイオフィーム破壊酵素 Esp の作用機序の解明

まず、*Brevibacillus* 発現・分泌系を用い、*S. epidermidis* Esp の高効率発現・精製系を確立した。これにより、少量の培養液(20 ml)から大量の Esp 精製標品(約 5 mg)を効率的かつ容易に精製することが可能となった(Sugimoto *et al.* *J. Appl. Microbiol.* 2011, 111, 1406-1415)。さらに、精製した Esp が特異的に分解する黄色ブドウ球菌の細胞表層タンパク質を探索した。その結果、Esp は既知のバイオフィーム関連タンパク質 (AtI、Emp、FnBPA、Map、Spa など) と宿主への定着・病原性に重要なタンパク質 (Efb、IsdA、Sbi、SceD、SdrD など) を分解することが明らかとなった(図4)。また、新たにバイオフィーム形成に関与することが示唆された細胞質タ

ンパク質も Esp により分解されることが分かった。さらに、Esp は細菌-宿主間相互作用に重要な宿主タンパク質(フィブロネクチン、フィブリノーゲン、ビトロネクチン)を分解することも明らかにした。Esp はこれらのタンパク質を分解することにより、黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成や宿主への定着を阻害すると考えられる。

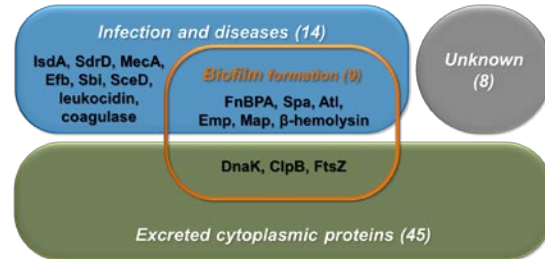


図4. Esp の標的タンパク質  
括弧内の数字はタンパク質の種類の数

以上の結果より、黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成に重要なタンパク質の一部を明らかにした。さらに、Esp により特異的に分解されるタンパク質を明らかにすることで、常在菌-病原菌間あるいは宿主-病原菌間相互作用のメカニズムの一端を解明することが出来た。これらの知見は、バイオフィーム感染症の予防法・治療法の開発につながるものと期待される。

### 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1件)

① Shinya Sugimoto\*, Tadayuki Iwase, Fumiya Sato, Akiko Tajima, Hitomi Shinji, and Yoshimitsu Mizunoe\*  
Cloning, expression and purification of extracellular serine protease Esp, a biofilm-degrading enzyme, from *Staphylococcus epidermidis*.  
*J. Appl. Microbiol.* 111, 1406-1415, 2011  
査読有り

(\* corresponding author)

〔学会発表〕(計5件)

① Shinya Sugimoto, Takeo Iwamoto, Koji Takada, Fumiya Sato, Tadayuki Iwase, Akiko Tajima, Ippei Hironaka, Ken-ichi Okuda, Hitomi Shinji, and Yoshimitsu Mizunoe  
*Staphylococcus epidermidis* Esp degrades novel biofilm matrix proteins in *Staphylococcus aureus* biofilms.  
第85回日本細菌学会総会, 長崎, 2012年3月27-29日.

② Ken-ichi Okuda, Shinya Sugimoto, Tadayuki Iwase, Fumiya Sato, Akiko Tajima, Hitomi Shinji, and Yoshimitsu Mizunoe Cloning, expression and purification of extracellular serine protease Esp, a biofilm-degrading enzyme, from *Staphylococcus epidermidis*.

2012 Annual Conference of the Association for General and Applied Microbiology, Tubingen, Germany, 2012年3月18-21日.

③ Shinya Sugimoto, Takeo Iwamoto, Fumiya Sato, Akiko Tajima, Tadayuki Iwase, Hitomi Shinji, and Yoshimitsu Mizunoe Proteomic survey for *Staphylococcus aureus* biofilm matrix proteins: extracellular AAA+ chaperone ClpB contributes to the biofilm formation.

9th International Conference on AAA Proteins, Kumamoto, 2011年11月6日-10日.

④ 杉本 真也, 岩本 武夫, 佐藤 文哉, 田畠 亜希子, 岩瀬 忠行, 進士 ひとみ, 水之江 義充

細胞外分子シャペロンによる黄色ブドウ球菌のバイオフィーム形成機構

日本細菌学会関東支部総会, 東京, 2011年10月6-7日.

⑤ Shinya Sugimoto, Tadayuki Iwase, Fumiya Sato, Akiko Tajima, Hitomi Shinji, Yukiko Yoshizawa, and Yoshimitsu Mizunoe Efficient and economic extracellular production and purification of *Staphylococcus epidermidis* Esp using a *Brevibacillus choshinensis* secretion system.

International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, Sapporo, 2011年9月6-10日.

[その他]

ホームページ等

<http://square.umin.ac.jp/saikin/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉本 真也 (SUGIMOTO SHINYA)

東京慈恵会医科大学・医学部・助教

研究者番号：60464393

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし