

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592700

研究課題名(和文) A群レンサ球菌 ncRNAによる病原性調節機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of virulence regulatory mechanism of group A streptococcal ncRNA

研究代表者

中田 匡宣 (Nakata, Masanobu)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90444497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：A群レンサ球菌は感染部位において病原因子群の発現を調節し、化膿性疾患を起こす。近年、RNA自身による転写・翻訳制御が注目されている。その機構の1つであるノンコーディングRNAに着目し、ノンコーディングRNA候補群の欠失株を用いて標的となるmRNAの検索を行った。また、転写因子をコードすると考えられる必須遺伝子について、ノンコーディングRNAであるリボスイッチを遺伝子上流に組み込み、機能解析を行った。必須遺伝子の翻訳を抑制した結果、変異株の成長は抑制され、菌体は異常な表層構造と細胞形態を呈した。これらの結果から、リボスイッチは必須遺伝子の機能解析に有効であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus pyogenes regulates expression of virulence factors in infection sites, and causes purulent diseases. Recently, transcriptional and translational regulations by RNA have been noted. In this study, non-coding RNA candidates were searched in Streptococcus pyogenes, and target mRNAs of non-coding RNAs were investigated using constructed mutant strains. Moreover, regarding the essential gene encoding a transcriptional regulator, a riboswitch was introduced upstream of the gene, and the function of the essential gene was analysed. When the translation rate of the gene was reduced in the mutant strain, the growth was markedly inhibited. Moreover, the mutant showed an abnormal cellular morphology and irregular superficial structure. Our results indicate that riboswitch-based translational control is useful for analysis of essential factors of Streptococcus pyogenes.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：A群レンサ球菌 ncRNA

1. 研究開始当初の背景

A 群レンサ球菌 (Group A streptococci; GAS) は、局所性化膿性疾患として咽頭炎や膿痂疹を起こすだけでなく、二次性続発疾患としてリウマチ熱や急性糸球体腎炎を惹起する。さらに、頻度は低いながら、壊死性筋膜炎やショック症状を伴う劇症型 GAS 感染症の罹患により、高率で死亡することが報告されている。局所性および全身性の感染を呈し、感染病態は急性や慢性の経過を辿る。このレンサ球菌種による感染で特徴的なことは、皮膚や咽頭・上気道等の多様な解剖学的部位に多岐にわたる疾患を引き起こすことである。これは、GAS が産生する病原因子群や宿主因子等に起因すると考えられる (Cunningham MW, *Clin Microbiol Rev* 13: 470-511, 2000)。また、病態を発症するためには、感染部位において、GAS が病原因子群の発現を巧みに調節することが必要不可欠である (Kreikemeyer B. *et al.*, *Trends Microbiol* 11: 224-232, 2003)。GAS の感染による病態発症の機序は完全に解明されておらず、有効な治療法と予防法の確立が待ち望まれている。申請者らは血清型特異的に存在する転写因子や表層タンパクに焦点を当て、GAS の病原性への関与を明らかにしてきた (Nakata M. *et al.*, *Infect. Immun.* 77: 32-44, 2009, Nakata M. *et al.*, *Mol Microbiol* 57: 786-803, 2005, Kreikemeyer B. *et al.*, *Infect Immun* 75: 5698-5710, 2007)。しかし、転写因子による発現調節機構だけでは説明不可能な現象がこれらの研究で認められた。そこで、近年着目されている mRNA 自身による転写・翻訳制御に着目した。

2. 研究の目的

細菌における mRNA 転写・翻訳制御機構として、non-coding RNA (ncRNA) とリボスイッチに着目した。細菌で報告されている ncRNA の多くは、標的 mRNA と不完全な塩基対を形成することにより、標的 mRNA の翻訳を抑制する。リボスイッチは mRNA の一部であり、代謝産物などを認識して構造変化を起こし、翻訳や転写の効率を変化させる。ncRNA については、ncRNA の発現様式と標的となる mRNA を明らかにし、病原性との関連を検討することを目的とした。また、必須遺伝子の

解析に合成リボスイッチを使用できるかについて検討した。

3. 研究の方法

(1) GAS の ncRNA の解析

ncRNA 候補の抽出

臨床分離頻度が高い血清 M 型 3 型株を親株として使用した。既報のゲノム配列と商業的 ncRNA 予測プログラムを用いて推定 ncRNA を抽出した。

ncRNA 発現の解析

対数増殖期の菌液から全 RNA を抽出し、ノーザンプロット法を用いて ncRNA が転写されているかについて検討した。SP6 プロモーターもしくは T7 プロモーターからプローブとなる RNA を *in vitro* transcription 法により合成し、検出に用いた。ノーザンプロット解析の結果を参考にし、ncRNA の全長塩基数を推定した。また、配列解析により転写終結部位を予測した。

ncRNA 欠失株の作製

発現と転写部位を明らかにした ncRNA について、温度感受性ベクターを用いて、抗生物質耐性遺伝子を導入しないマーカーレスの欠失株の作製を行った。組換えにより野生型へ復帰するクローンを変異復帰株として、以後の解析に供した。ncRNA 欠失の最終的な確認をノーザンプロット解析により行った。

ncRNA 欠失株の表現型の解析

変異株のコロニー形態と成長速度を検討し、グラム染色により、細胞形態や連鎖の程度を観察した。溶血能、莢膜量、プロテアーゼ産生量等の病原性に関連する項目について解析を行った。

ncRNA 欠失による表層・分泌タンパク発現への影響を検討

欠失株と変異復帰株の培養液から培養上清画分と細胞壁画分に画し、それぞれについて、SDS-PAGE を行い、染色により差が認められたバンドを検索した。

(2) リボスイッチを用いた必須遺伝子の機能解析

Streptococcus pyogenes の血清型 M3 型株を用いた。標的遺伝子として、過去の研究で変

異株の作製が不可能であった転写因子（以後、SPTR と略す。）を選択した。翻訳制御可能なコンディショナル変異株の作製には、テオフィリンを認識する合成リボスイッチを使用した。温度感受性ベクターを用いて、合成リボスイッチを染色体 DNA 上の SPTR 遺伝子上流に組込んだ。培養液へのテオフィリン添加の有無が菌の生存に与える影響について検討した。細胞形態について、走査型電子顕微鏡を用いて観察した。

4. 研究成果

(1) GAS の ncRNA の解析

既報のゲノム配列と商業的の ncRNA 予測プログラムを用いて、血清型 M1 株において報告されている ncRNA 群を参照し、約 40 種の推定 ncRNA を抽出した。プロモーター部位が認められた推定 ncRNA について、転写をノーザンプロット解析により検討した結果、数種について発現が確認された。これらの ncRNA の欠失株は、通常の培養条件において、野生株と同様に生育した。野生株や復帰変異株と比較して、欠失株の細胞形態、溶血能、莢膜産生量などには変化が認められなかった。培養上清画分と細胞壁画分のタンパク構成について SDS-PAGE により解析を行った結果、ncRNA の欠失により複数のタンパクについて発現変化が認められた。以上の結果から、A 群レンサ球菌は複数種の ncRNA を産生し、ncRNA の作用により分泌タンパクの構成を変化させることが推察された。

(2) リボスイッチを用いた必須遺伝子の機能解析

SPTR 遺伝子上流に合成リボスイッチを組込んだ株をテオフィリン不含の培地で培養したところ、菌体の成長度は抑制された。テオフィリン含有培地で培養した場合と比較して、テオフィリン不含培地で培養した菌体は異常な表層構造と細胞形態を呈した。陰性コントロールとして近隣遺伝子のプロモーターにリボスイッチを導入した株では、テオフィリンの除去により、成長度の低下や菌体形態の異常は認められなかった。これらの結

果から、リボスイッチによる翻訳制御は細菌必須遺伝子の解析に有用であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 17 件)

Okahashi N, Sumitomo T, Nakata M, Sakurai A, Kuwata H, and Kawabata S. 2014. Hydrogen peroxide contributes to the epithelial cell death induced by the oral mitis group of streptococci. *PLoS One* 9: e88136. 査読有. doi: 10.1371/journal.pone.0088136.

Beulin DS, Yamaguchi M, Kawabata S, and Ponnuraj K. 2014. Crystal structure of PfbA, a surface adhesion of *Streptococcus pneumoniae*, provides hints into its interaction with fibronectin. *Int J Biol Macromol* 64: 168-173. 査読有. doi: 10.1016/j.ijbiomac.

Yamaguchi M, Terao Y, Mori-Yamaguchi Y, Domon H, Sakaue Y, Yagi T, Nishino K, Yamaguchi A, Nizet V, and Kawabata S. 2013. *Streptococcus pneumoniae* invades erythrocytes and utilizes them to evade human innate immunity. *PLoS One* 8: e77282. 査読有. doi: 10.1371/journal.pone.0077282.

Honda-Ogawa M, Ogawa T, Terao Y, Sumitomo T, Nakata M, Ikebe K, Maeda Y, and Kawabata S. 2013. Cysteine proteinase from *Streptococcus pyogenes* enables evasion of innate immunity via degradation of complement factors. *J Biol Chem* 288: 15854-15864. 査読有. doi: 10.1074/jbc.M113.469106.

Sumitomo T, Nakata M, Higashino M, Terao Y, and Kawabata S. 2013. Group A streptococcal cysteine protease cleaves epithelial junctions and contributes to bacterial translocation. *J Biol Chem* 288: 13317-13324. 査読有. doi: 10.1074/jbc.M113.459875.

Okahashi N, Nakata M, Sumitomo T, Terao Y, and Kawabata S. 2013. Hydrogen peroxide produced by oral streptococci induces macrophage cell death. *PLoS One* 8: e62563. 査読有. doi: 10.1371/journal.pone.0062563.

Ogawa T, Terao Y, Honda-Ogawa M, Hashimoto S, Ikebe K, Maeda Y, and Kawabata S. 2013. MicroRNA fragments derived from *Streptococcus pyogenes* enable activation of neutrophil phagocytosis: *in vitro* study. *Microbes Infect* 15: 212-218. 査読有. doi: 10.1016/j.micinf.2012.11.009.

Hoshino T, Fujiwara T, and Kawabata S. 2012. Evolution of cariogenic character in *Streptococcus mutans*: horizontal transmission of glycosyl hydrolase family 70 genes. *Sci Rep* 2: 518. 査読有. doi: 10.1038/srep00518.

Murakami J, Terao Y, Morisaki I, Hamada S, and Kawabata S. **2012**. Group A *Streptococcus* adheres to pharyngeal epithelial cells with salivary proline-rich proteins via GrpE chaperone protein. *J Biol Chem* 287: 22266-22275. 査読有. doi: 10. 1074/jbc. M112. 350082.

Mori Y, Yamaguchi M, Terao Y, Hamada S, Ooshima T, and Kawabata S. **2012**. α -enolase of *Streptococcus pneumoniae* induces formation of neutrophil extracellular traps. *J Biol Chem* 287: 10472-10481. 査読有. doi: 10. 1074/jbc. M111. 280321.

Kimura KR, Nakata M, Sumitomo T, Kreikemeyer B, Podbielski A, Terao Y, and Kawabata S. **2012**. Involvement of T6 pili in biofilm formation by serotype M6 *Streptococcus pyogenes*. *J Bacteriol* 194: 804-812. 査読有. doi: 10. 1128/JB. 06283-11.

Sumitomo T, Nakata M, Yamaguchi M, Terao Y, and Kawabata S. **2012**. S-carboxymethylcysteine inhibits adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human alveolar epithelial cells. *J Med Microbiol* 61: 101-108. 査読有. doi: 10. 1099/jmm. 0. 033688-0.

Nakata M, Kimura KR, Sumitomo T, Wada S, Suguchi A, Oiki E, Higashino M, Kreikemeyer B, Podbielski A, Okahashi N, Hamada S, Isoda R, Terao Y, and Kawabata S. **2011**. Assembly mechanism of FCT region type 1 pili in serotype M6 *Streptococcus pyogenes*. *J Biol Chem* 286: 37566-37577. 査読有. doi: 10. 1074/jbc. M111. 239780.

Okahashi N, Okinaga T, Sakurai A, Terao Y, Nakata M, Nakashima K, Shintani S, Kawabata S, Ooshima T, and Nishihara T. **2011**. *Streptococcus sanguinis* induces foam cell formation and cell death of macrophages in association with production of reactive oxygen species. *FEMS Microbiol Lett* 323: 164-170. 査読有. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02375.x.

Hoshino T, Kondo Y, Saito K, Terao Y, Okahashi N, Kawabata S, and Fujiwara T. **2011**. Novel epitopic region of glucosyltransferase B from *Streptococcus mutans*. *Clin Vaccine Immunol* 18: 1552-1561. 査読有. doi: 10.1128/CVI.05041-11.

Ogawa T, Terao Y, Okuni H, Ninomiya K, Sakata H, Ikebe K, Maeda Y, and Kawabata S. **2011**. Biofilm formation or internalization into epithelial cells enable *Streptococcus pyogenes* to evade antibiotic eradication in patients with pharyngitis. *Microb Pathog* 51: 58-68. 査読有. doi: 10. 1016/j. micpath.

Ogawa T, Terao Y, Sakata H, Ohkuni H, Ninomiya K, Ikebe K, Maeda Y, and Kawabata S. **2011**. Epidemiological characterization of *Streptococcus pyogenes* isolated from patients

with multiple onsets of pharyngitis. *FEMS Microb Lett* 318: 143-151. 査読有. doi: 10.1111/j.1574-6968.2011.02252.x.

[学会発表](計 21 件)

中田匡宣, 住友倫子, 浜田茂幸, 川端重忠. *Streptococcus pyogenes* が産生する FCT3 型線毛の発現調節機構の解析. 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26 ~ 28 日, 東京都江戸川区・タワーホール船堀.

住友倫子, 東野美晴, 中田匡宣, 川端重忠. Group A *Streptococcus* translocates across epithelial barrier via tricellular tight junctions. 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26 ~ 28 日, 東京都江戸川区・タワーホール船堀.

森田知里, 住岡龍一, 中田匡宣, 住友倫子, 岡橋暢夫, 浜田茂幸, 川端重忠. Wall-anchored nuclease of *Streptococcus sanguinis* contributes to evasion of innate immunity. 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26 ~ 28 日, 東京都江戸川区・タワーホール船堀.

毛利泰士, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. *Streptococcus pyogenes* の C3 様 ADP リボシルトランスフェラーゼ SpyA の機能解析. 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26 ~ 28 日, 東京都江戸川区・タワーホール船堀.

岡橋暢夫, 中田匡宣, 住友倫子, 寺尾豊, 川端重忠. 口腔レンサ球菌が産生する課酸素素がマクロファージの細胞死を誘導する. 第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 26 ~ 28 日, 東京都江戸川区・タワーホール船堀.

森田知里, 住岡龍一, 中田匡宣, 岡橋暢夫, 住友倫子, 川端重忠. *Streptococcus sanguinis* が産生するヌクレアーゼの機能解析. 第 66 回日本細菌学会関西支部総会, 2013 年 11 月 16 日, 吹田市・大阪大学微生物病研究所谷口記念講堂.

住友倫子, 中田匡宣, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌は宿主カルパインの活性化を介して上皮バリアを突破する. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 2013 年 9 月 20 ~ 22 日, 岡山市・岡山コンベンションセンター.

森田知里, 住岡龍一, 中田匡宣, 岡橋暢夫, 住友倫子, 川端重忠. *Streptococcus sanguinis* の菌体表層ヌクレアーゼは自然免疫からの回避に寄与する. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 2013 年 9 月 20 ~ 22 日, 岡山市・岡山コンベンションセンター.

Nakata M, Kawabata S. Mode of expression and assembly mechanism of Group A Streptococcal pili. The 12th Awaji International Forum on Infection and Immunity. September 10-13, 2013. Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji, Hyogo, Japan.

Sumitomo T, Nakata M, Higashino M, Terao Y,

and Kawabata S. Group A streptococcal pyrogenic exotoxin B cleaves epithelial junctions and contributes to bacterial translocation. 113th General Meeting of American Society for Microbiology. May 18-21, 2013. Colorado Convention Center, Denver, CO, USA.

住友倫子, 中田匡宣, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌の上皮バリア突破機構に関する宿主プロテアーゼの解析. 第 22 回 Lancefield レンサ球菌研究会, 2013 年 6 月 28~29 日, 東京都港区・ホテル島根イン青山.

Nakata M, Sumitomo T, and Kawabata S. Assembly mechanism of T6 pili and its involvement in biofilm formation. GAS Infections 2013. March 21-23, 2013, Residenza di Ripetta, Roma Italy.

中田匡宣, 住友倫子, 寺尾豊, 浜田茂幸, 川端重忠. *Streptococcus pyogenes* が産生する FCT3 型線毛の細胞壁架橋機構の解析. 第 86 回日本細菌学会総会, 2013 年 3 月 18~20 日, 千葉市・幕張メッセ.

住友倫子, 東野美晴, 小南明里, 中田匡宣, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌のシステインプロテアーゼ SpeB および Sib35 による上皮細胞間接着分子の分解. 第 86 回日本細菌学会総会, 2013 年 3 月 18~20 日, 千葉市・幕張メッセ.

本多真理子, 寺尾豊, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. *Streptococcus pyogenes* のシステインプロテアーゼ SpeB による補体免疫系回避機構. 第 86 回日本細菌学会総会, 2013 年 3 月 18~20 日, 千葉市・幕張メッセ.

森田知里, 住岡龍一, 中田匡宣, 岡橋暢夫, 本多真理子, 住友倫子, 川端重忠. *Streptococcus sanguinis* の細胞壁架橋型ヌクレアーゼの機能解析. 第 86 回日本細菌学会総会, 2013 年 3 月 18~20 日, 千葉市・幕張メッセ.

Sumitomo T, Nakata M, Higashino M, Terao Y, and Kawabata S. Group A streptococcal cysteine protease cleaves epithelial junctions and contributes to bacterial translocation. The 11th Korea-Japan International Symposium on Microbiology 2012. September 13-14. Buyeo Lotte Resort, Buyeo, Korea.

中田匡宣, 住友倫子, 東野美晴, 岡橋暢夫, 浜田茂幸, 寺尾豊, 川端重忠. Assembly mechanism of T6 pili in serotype M6 *Streptococcus pyogenes*. 第 85 回日本細菌学会総会, 2012 年 3 月 27~29 日, 長崎市・長崎ブリックホール.

住友倫子, 中田匡宣, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌の分泌型システインプロテアーゼである SpeB は上皮細胞間接着分子を分解する. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会. 2011 年 9 月 30 日~10 月 2 日,

岐阜市・長良川国際会議場.

Sumitomo T, Nakata M, Higashino M, Terao Y, and Kawabata S. Streptococcal pyrogenic exotoxin B contributes to cleavage of epithelial junctions. XVIII Lancefield International Symposium, September 4-8, 2011. Hotel Hilton Villa Igea Palermo, Palermo, Italy.

- ② 中田匡宣, 木村敬次 Richard, 住友倫子, 寺尾豊, 川端重忠. T6 線毛の形成機構とバイオフィーム形成への関与. 第 20 回 Lancefield レンサ球菌研究会. 2011 年 6 月 17~18 日, 名古屋市・愛知学院大学薬学部・大講義室.

[図書](計 3 件)

川端重忠. 2013. 序 - 注目される劇症型細菌感染症の現状と理解 -. 特集 1 「いわゆるヒト喰いバクテリアと劇症型感染症」. 医薬ジャーナル社 化学療法の領域. 29 (7): 26-27.

住友倫子, 川端重忠. 2013. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症の発症に寄与する細菌因子. 特集 1 「いわゆるヒト喰いバクテリアと劇症型感染症」. 化学療法の領域. 29 (7): 48-55.

中田匡宣, 川端重忠. 2013. 病原性レンサ球菌の二成分制御系シグナル伝達機構. 特集「細菌の病原遺伝子の発現調節機構」. 化学療法の領域. 29 (1): 42-50.

[その他]

ホームページ:

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~mcrbio/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 匡宣 (NAKATA, Masanobu)
大阪大学・歯学研究科・准教授
研究者番号: 90444497

(2) 研究分担者

川端 重忠 (KAWABATA, Shigetada)
大阪大学・歯学研究科・教授
研究者番号: 50273694

寺尾 豊 (TERAO, Yutaka)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 50397717

住友 倫子 (SUMITOMO, Tomoko)
大阪大学・歯学研究科・助教
研究者番号: 50423421