

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23792114

研究課題名（和文）薬剤耐性遺伝子伝播の抑制法開発に関する基礎研究

研究課題名（英文）Basic researches on the restraint method development of the drug-resistant gene transmission.

## 研究代表

森崎 弘史（MORISAKI HIROBUMI）

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：30317581

研究成果の概要（和文）：*Streptococcus mitis* の choline binding protein E（CbpE）の機能解析を行った。その結果、CbpE はコリン結合βガラクトシダーゼや、形質転換の際に働く溶菌酵素である CbpD の機能調節に関与する可能性が示された。これらの結果から、CbpE が形質転換の調節において重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Functional analyses of choline-binding protein E（CbpE）was performed. As a result, it was revealed that CbpE is involved in the functional regulation of choline-binding β-galactosidase and of CbpD, an autolytic enzyme that functions in genetic transformation. These results suggested that CbpE play important roles in the regulation of genetic transformation.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,300,000	690,000	2,990,000

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：choline-binding protein E・*Streptococcus mitis*

## 1. 研究開始当初の背景

これまで医療や畜産などの分野で広域抗菌スペクトル薬の使用を続けてきた結果、様々な細菌種で薬剤耐性菌が増加してきている。さらに近年では、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌、多剤耐性緑膿菌、多剤耐性アシネトバクターなど、これまで使用されてきたほとんど全ての抗菌薬に対して抵抗性を示す薬剤耐性菌が増加し、大きな社会問題となっている。このような薬剤耐性菌の増加に対しては、既存の薬剤を改良するような方法ではあまり効果が期待できないため、新た

な視点から対処法を開発することが急務と考えられる。

細菌の遺伝子伝播メカニズムの1つである形質転換は薬剤耐性遺伝子の菌種を越えた拡散に重要な役割を果たすと考えられる。ヒトの主要な死因である肺炎は、多くは *S. pneumoniae* の感染によるものと考えられており、世界中で毎年約 160 万人がこの菌の感染症により死亡するといわれている。*S. pneumoniae* の薬剤耐性菌も増加してきており、我が国の臨床分離株の半数程度がペニシリンに耐性あるいは低感受性となっている。

さらに近年ではペニシリンやセフェム類だけでなく、テトラサイクリン、ニューキノロン、マクロライド、を含む広範囲の抗菌薬に対し耐性を獲得した多剤耐性 *S. pneumoniae* の増加が世界的な問題となりはじめている。*S. pneumoniae* 感染の予防法としては莢膜多糖を抗原とするワクチンが実用化されているが、すべての多糖抗原型に有効ではないことや、形質転換により多糖抗原型が変化してしまうことなどから、未だ改良の余地が残されている。これらのことから *S. pneumoniae* の薬剤耐性菌の増加を抑える方法を探ることはきわめて重要な課題と考えられる。

*S. pneumoniae* の形質転換については古くから研究されており *S. pneumoniae* 自身から形質転換を促進するペプチドフェロモン (competence-stimulating peptide: CSP) を産生することが明らかとなっている。*S. pneumoniae* を CSP で刺激すると 180 以上の遺伝子の発現が変化すると報告されているが、形質転換機序の詳細については未だ多くの不明な点が残されている。また、*S. pneumoniae* は形質転換の際に、ただ細胞外にある遺伝子を取り込むだけでなく、周囲の同種あるいは近縁種の細菌細胞を積極的に破壊し、その遺伝子を獲得しているということがわかり、その際に働く細胞壁溶解酵素 (LytA, LytC, CbpD) の存在も明らかになってきた。これらの細胞壁溶解酵素はいずれもコリン結合タンパク質 (Choline Binding Protein: Cbp) と呼ばれる細胞表層タンパク質群に分類され、細胞壁成分のホスホリルコリンと結合することで菌体表層に局在することがわかっている。これらの細胞壁溶解酵素は自己の細胞壁を分解する活性を持つため、発現するタイミングや酵素活性、局在性などが厳密に制御されていると考えられるが、それらの制御機構は未だ明らかにされていない。

本研究開始前に *S. pneumoniae* と極めて近縁の種である *Streptococcus mitis* を対象として Cbp の一つである CbpE の解析を行った。*S. pneumoniae* の CbpE はホスホリルコリン加水分解活性を持つことが報告されている。実験の結果から *S. mitis* の CbpE も同様の酵素活性を持つことがわかった。この活性により CbpE は細胞壁に含まれるホスホリルコリンの量や分布を調節し、他の Cbp の局在性や機能発現に影響を与える可能性が考えられる。興味深いことに、CbpE 欠損株を作製して解析したところ野生株と比較して CbpE 欠損株の形質転換率が 1/10 程度まで著しく低下することが明らかとなった。これらの結果は形質転換の際の細胞壁溶解に複数の Cbp が関与し、重要な役割を果たす可能性を示唆した。

## 2. 研究の目的

本研究は、細菌遺伝子の伝播機構を標的とすることで薬剤耐性菌の蔓延を阻止する方法を開発することを最終的な目標とした。そこで、本研究では重要な病原細菌であり、形質転換能を有する肺炎レンサ球菌 *Streptococcus pneumoniae* の近縁種の *Streptococcus mitis* を対象とし、形質転換の際に働く細胞壁溶解酵素 (LytA, LytC, CbpD) や、その他の Cbp の機能発現への関与が示唆されている CbpE の機能を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) *S. mitis* の Cbp 欠損株の作製

*S. mitis* の Cbp のうちコリン結合βガラクトシダーゼ (β-gal) と CbpD の欠損株を作製することとした。標的遺伝子をダブルクロスオーバーによりテトラサイクリン耐性遺伝子 (Tc<sup>r</sup>) と完全に置換する方法 (図1) で欠損株を作製することとした。

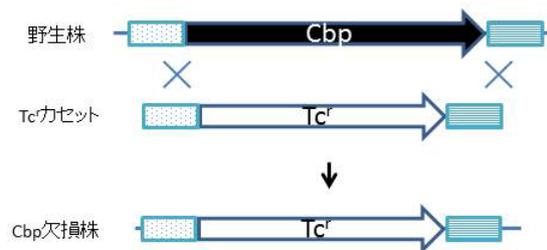


図1. Cbp欠損株の作製法

まず Tc<sup>r</sup> カセットを作製するために標的遺伝子上流配列、Tc<sup>r</sup>、標的遺伝子下流配列をそれぞれオーバーラップするようにデザインしたプライマーで増幅した。次に得られた3種類の増幅断片を鋳型として両端のプライマーで増幅し、Tc<sup>r</sup> カセットを得た。得られた Tc<sup>r</sup> カセットをウマ血清存在下で培養した *S. mitis* 野生株の培養液に添加し、形質転換を行った。この培養液をテトラサイクリン含有 BHI 寒天平板に塗抹・培養し Tc<sup>r</sup> を獲得したテトラサイクリン耐性株を選択した。得られたテトラサイクリン耐性株のゲノム DNA を抽出し PCR 法で標的遺伝子の欠損を確認した。

### (2) *S. mitis* の β-gal および CbpD のペプチド抗体の作製

*S. mitis* のゲノムデータベースの情報をもとに β-gal および CbpD の推定アミノ酸配列から抗原決定基となる部分を予測し、抗原ペ

プチドをデザインした。抗原ペプチドの配列はそれぞれ

$\beta$ -gal : CELSKEHPVHYHKLSYGAK

CbpD : CNANEWGYRARREGYRVDNR

となった。抗原ペプチドの合成およびペプチド抗体の作製は SIGMA 社に依頼した。

### (3) $\beta$ -gal 活性の測定

$\beta$ -gal 活性測定の基質は o-nitrophenyl- $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) を使用した。ONPG 溶液と限外ろ過濃縮した *S. mitis* の培養上清を混合して反応させ、反応の結果生じた o-nitrophenol を 420nm の吸光度を測定することで定量した。

### (4) 形質転換能の解析

*S. mitis* 野生株および CbpD 欠損株の形質転換能は大腸菌とレンサ球菌のシャトルプラスミド pVA838 を使用して評価した。まず、各菌株をウマ血清存在下で培養し、その培養液に pVA838 を添加して形質転換を行った。その後、培養液を適宜希釈し、薬剤無添加の BHI 寒天平板とエリスロマイシン添加 BHI 寒天平板に塗抹・培養した。エリスロマイシン添加 BHI 寒天平板上に出現した形質転換株のコロニー数を薬剤無添加の BHI 寒天平板上に出現した全コロニー数で除して形質転換率を算出した。

### (5) ウェスタンブロット解析

まず、*S. mitis* 野生株および変異株の培養上清をトリクロロ酢酸処理で濃縮し、SDS ポリアクリルアミド電気泳動で分離した。その後、ニトロセルロースメンブレンに転写し、一次抗体に抗 $\beta$ -gal および抗 CbpD 抗体を用い、二次抗体に HRP 標識抗ウサギ免疫グロブリン抗体を使用して検出を行った。

## 4. 研究成果

CbpE が細胞壁に含まれるホスホリルコリンを部分的に切断することでその量や分布を調節し他の Cbp の局在性を制御している

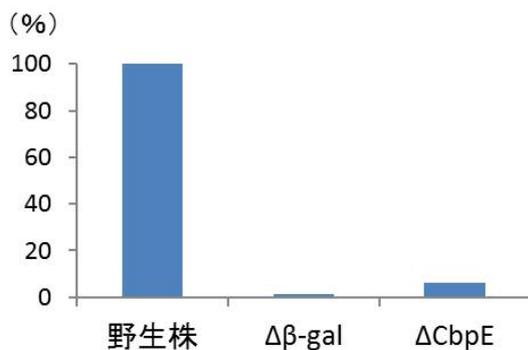


図2. *S. mitis* 培養上清中の $\beta$ -gal活性

という仮説のもと、まず、*S. mitis* の Cbp の1つである $\beta$ -gal の局在性に対する CbpE の関与を調べた。

*S. mitis* の野生株と CbpE 欠損株の培養上清中の $\beta$ -gal 活性を調べたところ CbpE 欠損株の $\beta$ -gal の相対活性は野生株の6%程度まで低下していた。(図2)さらに *S. mitis* の $\beta$ -gal 欠損株を作製し、同様に培養上清中の活性を測定したところ、 $\beta$ -gal 活性はほぼ完全に消失していた。(図2)なお、*S. mitis* の菌体を用いて $\beta$ -gal 活性を測定したところ CbpE 欠損株でも野生株と同程度の活性が検出されたことから CbpE を欠損することで $\beta$ -gal のタンパク質発現が消失しているわけではないことがわかった。

これらの結果から、今回検出した *S. mitis* 培養上清中の  $\beta$  ガラクトシダーゼ活性は Cbp である $\beta$ -gal にほぼ完全に由来すること、またその活性の培養上清における発現には CbpE の機能が重要であることが明らかとなった。

本研究開始前に *S. mitis* の CbpE 欠損株の形質添加効率が低下することがわかっていたため、形質転換に関わる Cbp の機能が CbpE によって調節されている可能性が考えられた。そこで、次に *S. mitis* の形質転換に

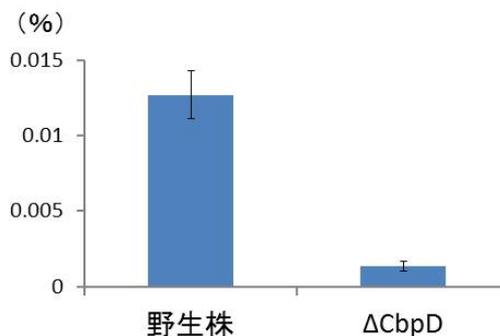


図3. *S. mitis* CbpD欠損株の形質転換率

関わりと予想される Cbp の一つである CbpD が実際に形質転換に関わるかを調べた。

*S. mitis* 野生株および CbpD 欠損株の形質転換能を比較した。その結果、CbpD 欠損株の形質転換率は野生株の10分の1程度まで低下した。(図3)

CbpD 欠損株の形質転換率は CbpE 欠損株の形質転換率とほぼ同程度であったことから、CbpE 欠損株における形質転換率の低下は CbpE を欠損したことによって CbpD の局在性の調節がなされなくなり、その結果 CbpD が正常に機能しなくなったことによるものであるという可能性が示唆された。

次に、CbpE 欠損株において他の Cbp の局在性が実際に変化しているかを調べるために $\beta$ -gal および CbpD のペプチド抗体を作製しウェスタンブロット解析を行った。しかし、

野生株および CbpE 欠損株の培養上清から  $\beta$ -gal と CbpD のどちらも検出されなかった。菌体表層画分を使用して同様のウェスタンブロット解析を行ったところやはり  $\beta$ -gal と CbpD のどちらも検出出来なかった。今回作製したペプチド抗体の性能の問題か、標的とする  $\beta$ -gal と CbpD タンパク質の発現量が少ないのか、原因は不明だが、今後タンパク質の検出条件などのさらなる検討が必要と思われる。

以上の結果から、CbpE が他の Cbp の機能発現に影響を与えることで形質転換の調節に関わっていることが示唆された。これまでに国内外において CbpE と他の Cbp の機能との関係を明らかにした報告はなく、今回得られた成果はきわめて意義深いと考えられる。今後さらに CbpE の機能解析を進めることで形質転換の阻害法を開発する基盤となる重要な結果が得られ、将来的には薬剤耐性遺伝子の蔓延防止と、既存の抗菌薬の臨床効果向上に寄与することが期待できる。

## 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)

[学会発表] (計 1 件)

発表者：森崎弘史、有本隆文、片岡嗣雄、谷口誠、深町はるか

発表標題：*Streptococcus mitis* の choline binding protein E 欠損株の性状

学会名：第 54 回歯科基礎医学会学術大会

発表年月日：2012 年 9 月 16 日

発表場所：奥羽大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森崎 弘史 (MORISAKI HIROBUMI)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：30317581