

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590531

研究課題名(和文) A群レンサ球菌における二成分制御系センサー蛋白質のネットワークの解明に関する研究

研究課題名(英文) Analysis of the networks of the two-component sensor proteins in *Streptococcus pyogenes*

研究代表者

長谷川 忠男 (HASEGAWA, Tadao)

名古屋市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10314014

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：A群レンサ球菌の、外界からのストレス感知にネットワークを構成し機能する二成分制御系について解析を行った。酸の感知には、複数のセンサー蛋白質が関連しており、これらは酸化ストレスの感知や、バイオフィーム産生にも関連していることが示唆された。ある種のセンサー蛋白質を検討し、病原因子獲得に有利に働く可能性を有する新規の株を見出した。更に一人の劇症型感染症患者の複数の組織から分離された株の解析により、CovSセンサー蛋白質が無菌部位への侵入に大きな役割を果たしていることが確認された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the two-component regulatory systems that function by forming networks to sense the environmental stresses in *Streptococcus pyogenes*. Our analyses suggested that several sensor proteins are involved in sensing acid and also in oxidative stress and biofilm formation. We have found novel isolates that are considered to gain more virulence-associated factors by the analysis of one sensor protein. In addition we confirmed that CovS sensor protein plays important roles that *S. pyogenes* invades to aseptic tissues from septic tissues by the analysis of the several isolates from a single streptococcal-toxic-shock-syndrome patient.

研究分野：細菌学

キーワード：A群レンサ球菌 二成分制御系因子 環境ストレス 病原性

1. 研究開始当初の背景

(1) A 群レンサ球菌は小児の急性咽頭炎の主要な起炎菌であるとともに劇症型レンサ球菌感染症など多彩な病態を引き起こすことが知られている。劇症型レンサ球菌感染症は典型的にはいわゆる人喰いバクテリア症と呼ばれる壊死性筋膜炎を始めとする全身性の重篤な病態を引き起こす再興感染症として問題となっている疾患である。この菌の病原性を考える場合、病原因子として産生する毒素が重要な役割を果たしていることは疑う余地がない。我々はこの観点から A 群レンサ球菌が引き起こす病態の理解を目的として、劇症型レンサ球菌臨床分離株を種々のストレス条件下で培養し、菌体外に分泌される毒素蛋白質を二次元電気泳動と質量分析を用いて検討してきた。これらの毒素の中には、宿主の微生物に対する防御機構に拮抗する目的で産生されているものもあり、特に DNA 分解酵素は好中球から放出される NETs (neutrophil extracellular traps) を分解することにより、宿主の防御機構から逃避するという点で重要である。種々のストレスには抗生物質によるストレスも含まれ、我々は劇症型感染症治療に利用されるクリンダマイシンに対する A 群レンサ球菌の反応、それに関与する分子解析を行った。これらの反応には外界の変化を感知し、適切に遺伝子発現を制御する機能が重要な役割を果たしている。一般に細菌には二成分制御系という遺伝子発現制御系が存在する。二成分制御系とは外界の環境変化を感知するセンサー蛋白質と、そのセンサー蛋白質のもつ histidine kinase 活性によって修飾されるレギュレーター蛋白質からなり、それらをコードする遺伝子は対を成してゲノム上に存在する。A 群レンサ球菌のゲノム解析によって、最初にゲノム情報が明らかになった SF370 株では 13 種類の二成分制御系の存在が示唆された。これまで個々の二成分制御系、特にレギュレーター蛋白質の解析は精力的に解析されている。しかしセンサー蛋白質がどのような外界の情報を感知するかなど、センサー蛋白質の解析はあまり進んでいない。

(2) 外界からのストレスには先にあげた抗生物質を含む抗菌物質ストレス、pH 変化、酸化ストレス、温度ストレスなど様々なものがある。酸に対する対応は宿主の食細胞中での影響や、Manetti らの報告によれば糖代謝の結果として生じる酸が、線毛やバイオフィーム形成に関連していることが明らかにされている。我々はすべての二成分制御系のセンサー蛋白質をノックアウトした株を樹立し、酸に対する影響を検討した。この実験で採用した解析方法では Spy1622 センサー蛋白質 (YvqE) が酸に対する抵抗性に関与し、かつ病原性にも関与することが明らかになった。一方 Spy1622 とホモログである蛋白質は A 群レンサ球菌以外のグラム陽性菌にも存在する。

Mascher らは枯草菌におけるホモログを LiaS と呼び、細胞壁ストレス応答に関与すると報告している。同じく黄色ブドウ球菌におけるホモログの VraS は、薬剤耐性に関与する報告がある。一方 LiaS は *S. mutans* において研究が進んでおり、酸に対する耐性に関与している。しかし *S. mutans* における研究から酸の感知に関しては、LiaS 以外のセンサー蛋白質、VicK, CiaH も関与し、LiaS との関連が示唆されている。これらの VicK, CiaH ホモログは A 群レンサ球菌においても、Spy529, Spy1236 として存在しており、我々はすでにそれらの関与の可能性を示唆するデータを得ていた。また A 群レンサ球菌の CovS センサー蛋白質も酸耐性に関与するという報告がある。このように菌が外界環境を感知する機構は複雑に絡みあっており、単一のセンサー蛋白質を解析しても、どのような外界の刺激を感知しているかを明らかにすることは困難である可能性がある。一方この CovS の変異が病原性に深く関与していることも明らかになっている。CovS 以外のセンサー蛋白質についてもゲノム株 SF370 などの非劇症株と、劇症型感染症由来株ではアミノ酸の変異が認められるものもあり、これらの変異が病態と関連している可能性がある。以上よりセンサー蛋白質のネットワークの解明が菌の宿主への適応性、更には病原性との関連を明らかにすることにつながると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、複数存在する二成分制御系センサー蛋白質が、いかなる感知機構ネットワークを形成し、機能するかを明らかにすることを目的とした。特に外界からのストレスの中で Spy1622 が関与する酸のほか、抗生物質ストレス、酸化ストレスなど、宿主の細菌に対する防御機構に深く関与する因子に対して A 群レンサ球菌がどのように、センサー蛋白質を統合して対応しているかを明らかにすること、さらに *in vivo*, *in vitro* における二成分制御系の病原性への関与を明らかにすることを試みた。そのために以下に挙げる項目を具体的に解明することを目的とした。

- (1) 複数の咽頭炎由来臨床分離株と、劇症型レンサ球菌株においてセンサー蛋白質をコードする遺伝子変異の有無。更にその変異が病原性にもたらす影響の解明
- (2) 種々の培養条件下での酸を感知する二成分制御系センサー蛋白質の同定
- (3) 酸化ストレスを感知する二成分制御系センサー蛋白質の同定
- (4) 酸、酸化ストレスを感知するとともにその結果として生じるバイオフィームを始めとする蛋白質発現への関与の検討
- (5) 単一患者の異なる組織からの分離菌が得られれば、それらにおける二成分制御系の相違、機能的な意義の解明

3. 研究の方法

(1) 劇症型、咽頭炎由来 A 群レンサ球菌の二成分制御因子をコードする遺伝子の塩基配列の比較

A 群レンサ球菌の M1 タイプのゲノム株 SF370 において、二成分制御因子をコードする遺伝子群が 13 存在する。近年分離された複数の劇症型株、咽頭炎由来株に関して、二成分制御系のレギュレーター蛋白質、センサー蛋白質をコードする領域を PCR によって増幅し、塩基配列を決定した。

から二成分制御系と隣接した restriction modification system をコードする領域を欠損した領域が見出されたことより、このタイプの欠損の有無をすべての菌において調べるとともに、欠損株においては電気ショック法によるトランスフォーメーション効率の検討を行った。

劇症型感染症患者由来株のうち、2 か所以上の組織から菌が分離された場合はそれぞれの菌の遺伝子解析を行い、感染症進展における二成分制御系因子の関与を検討した。

一人の患者から分離された複数の臨床分離株より、*covS* 配列の違いが見出されたことより、それぞれの株が産生する培養上清蛋白質の解析を SDS-PAGE を用いて行うとともに、*covS* 遺伝子の導入実験を行い、*covS* の機能解析を行った。

複数の分離株の *emm* タイピングを行うと同時に MLST 解析を行い、起源が同じであることを実証した。

(2) 5%CO₂ 存在下での酸性条件を感知するセンサー蛋白質の同定

我々がこれまでに樹立した 1529 由来 13 種類のセンサー蛋白質ノックアウト株を用いて、5%CO₂ 存在下での酸性条件下 (pH 6.0) で菌を培養し、一定時間後生存している菌数をプレート培養によって測定し、関与するセンサー蛋白質を同定した。ノックアウト株に遺伝子を相補した株も樹立し、遺伝子の特異性を確認した。またこの現象が 1529 株特異的ではないことを否定するため、MDYK, MDN という別の劇症型患者由来株で同じセンサー蛋白質ノックアウト株を樹立し、確認を行った。

で見出されたセンサー蛋白質の特徴の文献的検討から酸化ストレスを感知するセンサー蛋白質である可能性が見出されたので H₂O₂ 存在下で培養し、酸化ストレスを感知するか否かを検討した。

(3) 酸性条件下でのバイオフィーム産生の解析

解析する菌を 96 穴プレートで培養し、一定時間後クリスタルバイオレットで染色、エタノールで溶出し吸光度を測定した。

4. 研究成果

(1) 2010 年以降に分離された *emm1* タイプ

の劇症型感染症臨床分離株において、すべてのセンサー蛋白質の塩基配列の決定を試みた。その過程において、Spy1910 センサー蛋白質が欠損している株の存在を見出した。欠損部位の詳細な解析によって近接する restriction modification system をコードする領域も欠損していることが明らかとなった。この領域の欠損している株は *emm1* 株に限られるものの、2010 年以降の分離株では 57% に、劇症型株に限れば 71% に欠損が認められた。Spy1910 センサー蛋白質欠損の意義は不明であったが、restriction modification system の欠損は外来遺伝子の取り込みが容易であることがトランスフォーメーション実験により明らかとなり、新たな病原因子獲得に有利に働く可能性が示唆された。

(2) 複数の組織から菌が分離された劇症型感染症患者 2 人の解析を行った。一人はすべてが *emm1* タイプ、もう一人はすべてが *emm89* タイプの菌であった。*emm1* タイプの菌の解析では分離組織で菌に顕著な差は認められなかった。もう一人の *emm89* タイプの場合、血液、髄液、関節液、咽頭、痰から分離された 5 種類の臨床分離株のセンサー蛋白質の塩基配列を解析した。MLST 解析によって起源は同じ菌であると考えられた。血液、髄液、関節液という本来の無菌部位から分離された菌の二成分制御系センサー蛋白質 *covS* には咽頭、痰から分離された菌の *covS* とはアミノ酸変異を伴う、1 か所の塩基配列の違いが存在していた。この違いによって、産生する蛋白質の変化も認められた。A 群レンサ球菌が無菌部位へ侵入する際に、CovS が大きな役割を果たしていることが確認された。CovS の意義を G 群レンサ球菌においても検証し、この領域には遺伝的な多様性が存在すること、一部の菌ではトランスポゾンの挿入により機能破壊が起こっているものも存在し、種々のレンサ球菌における重要性も示唆された。

(3) 大気中の培養では酸に対して YvqE (Spy1622) センサー蛋白質の関与を従来示していた。異なる環境下として、5% CO₂ 存在下での酸に対する影響を検討した。我々が樹立していたすべての二成分制御系センサー蛋白質ノックアウト株の解析によって、CiaH (Spy1236) センサー蛋白質が関与していることを見出した。またこの CiaH は酸化ストレスにも関与していることが明らかとなった。

(4) 酸を感知することが示唆されている Spy1622 は酸性条件下でバイオフィーム産生に関与していることが示唆された。またこのバイオフィーム産生には別のセンサー蛋白質 Spy1588 の関連していることが示唆された。

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)

Zhang Y, Okada R, Isaka M, Tatsuno I, Isobe K, Hasegawa T. Analysis of the roles of NrdR and DnaB from *Streptococcus pyogenes* in response to host defense. APMIS. 2015, 123(3) 252-259. doi: 10.1111/apm.12340, 査読有

Okada R, Matsumoto M, Zhang Y, Isaka M, Tatsuno I, Hasegawa T. Emergence of type I restriction modification system-negative *emm1* type *Streptococcus pyogenes* clinical isolates in Japan. APMIS. 2014, 122(10); 914-921. doi: 10.1111/apm.12230, 査読有

Masuno K, Okada R, Zhang Y, Isaka M, Tatsuno I, Shibata S, Hasegawa T. Simultaneous isolation of *emm89*-type *Streptococcus pyogenes* strains with a wild-type or mutated *covS* gene from a single streptococcal toxic shock syndrome patient. J Med Microbiol. 2014, 63(4), 504-507. doi: 10.1099/jmm.0.070300-0, 査読有

Tatsuno I, Isaka M, Okada R, Zhang Y, Hasegawa T. Relevance of the two-component sensor protein CiaH to acid and oxidative stress responses in *Streptococcus pyogenes*. BMC Res Notes. 2014, 7(1):189. doi: 10.1186/1756-0500-7-189, 査読有

Tatsuno I, Okada R, Zhang Y, Isaka M, Hasegawa T. Partial loss of CovS function in *Streptococcus pyogenes* causes severe invasive disease. BMC Res Notes. 2013, 6(1):126. doi: 10.1186/1756-0500-6-126, 査読有

Tatsuno I, Isaka M, Hasegawa T. Characterization of NADase-inactive NAD⁺ glycohydrolase in *Streptococcus pyogenes*. Advances in Microbiology. 2013, 3(1), 91-100. doi: 10.4236/aim.2013.31015, 査読有

〔学会発表〕(計9件)

張顔、松本昌門、井坂雅徳、立野一郎、長谷川忠男 新型の *emm1* タイプ A 群レンサ球菌におけるマクロライド耐性への MefA の関与 第 88 回日本細菌学会総会 長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)平成 27 年 3 月 27, 28 日

井坂雅徳、立野一郎、前山順一、長谷川忠男 A 群連鎖球菌が産生するバイオフィルムの構成成分の同定とその特性について 第 88 回日本細菌学会総会 長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)平成 27 年 3 月 26, 27 日

立野一郎、岡田涼、張顔、松本昌門、畑七奈子、井坂雅徳、長谷川忠男 近年出現し

た A 群レンサ球菌 *salR-salK* 欠損株に関する研究 第 46 回レンサ球菌研究会 東京大学(東京都・文京区)平成 26 年 6 月 27 日

井坂雅徳、立野一郎、前山順一、長谷川忠男 二成分制御因子による A 群連鎖球菌のバイオフィルム形成機構の解析 第 87 回日本細菌学会総会 タワーホール船堀(東京都・江戸川区)平成 26 年 3 月 27, 28 日

岡田涼、畑七奈子、脇本幸夫、長谷川忠男 近年出現した新規 A 群レンサ球菌の特性に関する研究 第 25 回日本臨床微生物学会総会 名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)平成 26 年 2 月 2 日

岡田涼、松本昌門、張顔、松井秀之、井坂雅徳、立野一郎、長谷川忠男 近年出現した新規 A 群レンサ球菌の特性に関する研究 第 50 回日本細菌学会中部支部総会 ホテル竹島(愛知県・蒲都市)平成 25 年 10 月 19 日

井坂雅徳、立野一郎、前山順一、長谷川忠男 A 群連鎖球菌二成分制御因子 SPY1622 のバイオフィルム形成機構の解析 第 86 回日本細菌学会総会 幕張メッセ国際会議場(千葉県・千葉市)平成 25 年 3 月 18-20 日

立野一郎、井坂雅徳、松井秀之、長谷川忠男 A 群レンサ球菌 *csrS* 遺伝子の変異と菌の病原性変化に関する研究 第 49 回日本細菌学会中部支部総会 金沢大学(石川県・金沢市)平成 24 年 11 月 9 日

井坂雅徳、立野一郎、市川麻理子、松井秀之、南正明、長谷川忠男 *S. pyogenes* 二成分制御因子 SPY1622 の酸感受およびバイオフィルム形成の作用機序について 第 21 回 Lancefield レンサ球菌研究会 大阪大学(大阪府・吹田市)平成 24 年 6 月 8 日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 忠男 (HASEGAWA Tadao)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
研究者番号: 10314014

(2) 研究分担者

立野 一郎 (TATSUNO Ichiro)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 50311642

井坂 雅徳 (ISAKA Masanori)
名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：40336673

(3)連携研究者
なし