

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：32710
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2012～2014
課題番号：24592782
研究課題名(和文) アンギノーサスグループレンサ球菌の外来遺伝子獲得および組換えの機構に関する検討

研究課題名(英文) Study of horizontal gene transfer and recombination mechanism in the anginosus streptococci

研究代表者
高尾 亞由子 (Takao, Ayuko)

鶴見大学・歯学部・学内講師

研究者番号：10163156
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)：遺伝子の獲得と伝播の機構を調べる目的で、Streptococcus intermedius のペプチドクオラムセンシング系関連遺伝子欠失株の形質転換効率、バクテリオシン産生能、バイオフィーム形成能を検討した。その結果、competence-stimulating peptide (CSP)作動性の遺伝子組換えに関わるcom遺伝子群と、bacteriocin-inducing peptide (BIP)作動性のバクテリオシン産生を誘導するblp遺伝子群とは互いに抑制する一方、バイオフィーム生育時の菌体外DNA量とバクテリオシン産生能の間には相関性が示唆された。制御をさらに解析中である。

研究成果の概要(英文)： The gene systems of com and blp regulate DNA recombination induced by competence-stimulating peptide (CSP) and bacteriocin production signaled by bacteriocin-inducing peptide (BIP), respectively. To know the mechanisms of horizontal gene transfer and natural recombination in Streptococcus intermedius, efficiency of transformation, efficacies of bacteriocin production and of biofilm formation were investigated using the gene deletion mutants.

The experimental results suggested that the systems of com and blp regulated negatively with each other. Statistical analysis showed that bacteriocin production on the plate cultured bacteria and extracellular DNA amount in the biofilm culture significantly correlated. Therefore, bacteriocin might positively affect to horizontal gene transfer by its bactericidal effect to the genetically related bacteria, while its production was suppressed by the competence-related gene regulation system.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：アンギノーサスレンサ球菌 クオラムセンシング ペプチドフェロモン 遺伝子組換え バクテリオシン
バイオフィーム形成

1. 研究開始当初の背景

(1) レンサ球菌の遺伝子組換えとペプチドクオラムセンシング

レンサ球菌属の中で、*Streptococcus pneumoniae*を含むミティスグループ、口腔やさまざまな身体部位での膿瘍から検出されるアンギノースグループ、ウ蝕原因菌として知られるミュータンスグループにおいては、ペプチドフェロモンである competence-stimulating peptide (CSP) 存在下、外来性 DNA の菌体内取り込みと遺伝子組換え頻度の上昇が認められる。この生理状態には、CSP 前駆体の ComC、CSP レセプターかつ histidine kinase (HK) の ComD、ComD からリン酸化を受ける DNA 結合因子の ComE、リン酸化 ComE により転写誘導される early *com* genes、さらに early *com* genes のひとつとして発現するシグマ因子 ComX に制御される late *com* genes が関与する。この過程のうち、外来性遺伝子の取り込みと組換えには late *com* genes にコードされる酵素群が必須である。

一方、自然組換えの頻度が高い菌として知られる *S. pneumoniae* では、別のクオラムセンシングペプチドである bacteriocin-inducing peptide (BIP) によって、*blp* genes が制御されている。*com* と *blp* の系は独立しているが、制御因子が結合するプロモーター配列には相互に類似性があるため、一部の遺伝子は、両方の系から転写制御を受けることが報告されている。BIP が結合する Histidine kinase は BlpH、これに活性化を受ける DNA 結合因子は BlpR である。BIP は名称通り、バクテリオシンの産生を制御しており、近縁菌の殺菌に関与する。したがって、近縁菌の DNA の供給に、バクテリオシン産生が関与していることも想定される。

(2) アンギノースレンサ球菌のペプチドクオラムセンシング遺伝子群

研究代表者は、アンギノースレンサ球菌の病原性検索の一環として、*S. intermedius* の菌種特異的なシアリダーゼ遺伝子 (*nanA*) をクローニングし、その遺伝子の直後に *comX* ホモログを見出した。本菌群に属する 3 菌種について調べた結果、各菌のゲノムには、すべて 3 コピーの *comX* ホモログが存在した (図 1)。レンサ球菌の中でもっとも *comX* のコピー数が多いこと、また、菌種によって、周辺 ORF 配列にバリエーションがあって菌の進化とともに変遷してきた可能性があることから、アンギノースレンサ球菌では、*comX* の機能とゲノムの変化による菌種の確立とが関連している可能性が示唆された。

一方、本菌群の CSP は、部分的なバリエーションを除外すれば 2 種類存在するが、一方がより普遍的であり、また、自身とは異なるタイプの CSP では形質転換が誘導されないことが報告されている。菌種に関わらず、同じペプチドフェロモンでコンピーテンス状態

が誘導される菌であれば、同一環境下、同時にコンピーテンス状態になり、相互の遺伝子交換が起こるチャンスが作られることが想定される。その一方で、アンギノースレンサ球菌の各菌種には固有の生化学的性状や病原性が存在していることからみて、グループ内における相互の遺伝子の交換頻度は、種や亜種が消滅するほどには高くないことも予想された。

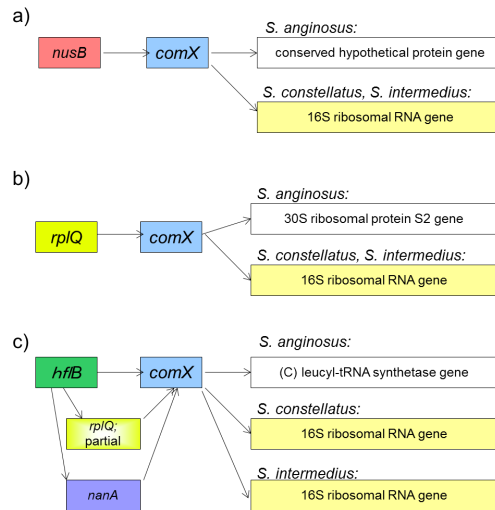


図 1 . アンギノースレンサ球菌の 3 か所の *comX* ホモログと周辺 ORF 配置

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本課題では、(1) アンギノースレンサ球菌の *com* 遺伝子群の機能を、菌の遺伝子交換や菌の相互作用を中心に検討を行うこと、また、公開されたゲノム情報から、アンギノースレンサ球菌にも *blp* genes のホモログが存在し、BIP によるクオラムセンシングの存在が示唆されたことから、(2) CSP および BIP が菌の性状におよぼす影響を検討すること、(3) これらを総合して、菌のクオラムセンシングが遺伝子交換および菌同士の拮抗作用にどのように寄与しているかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

本課題では、菌種特異的な病原因子を数多く保持する菌種で、かつ、認識する CSP にバリエーションが少ない *S. intermedius* (基準株) を使用した。

(1) 遺伝子欠損株の作製

CSP 作動性の early *com* 遺伝子群 (*comC*, *comD*, *comE*, *comX*)、BIP 作動性の *blp* genes (*blpA*, *blpB*, *blpC*, *blpR*, *blpH*)、外部ストレス作動性の *cia* 遺伝子群 (*ciaR*, *ciaH*, *htrA*) の欠失株を作製した。CSP 添加条件下、薬剤耐性マーカーで各 ORF の内部を部分置換した不活性化フラグメントを添加して形質転換させ、薬剤添加培地に発育した遺伝子欠失株を回収した。

(2) 形質転換能の検討

ヒアルロニダーゼ遺伝子の一部を薬剤マーカーで置換した断片を作製、(1)同様の手法で菌に添加、形質転換を行った。総菌数に対する薬剤耐性菌数の割合を形質転換効率とした。

(3) バクテリオシン産生能の検討

被験菌を培地上にスポットしたのち、バクテリオシン感受性の *S. constellatus* subsp. *pharyngis* (指示菌) を懸濁した BHI ソフトアガーを重層した。48時間培養後、被験菌周囲に形成された指示菌の発育阻止帯のサイズを測定した。

(4) バイオフィーム形成能の検討

マイクロプレート上に菌を接種して培養後、菌の生育、プレート上への付着は濁度にて、バイオフィーム形成量は Alamar Blue の蛍光測定およびクリスタルバイオレット染色量にて、バイオフィーム DNA 量は Qubit 試薬による蛍光量にて、測定した。

4. 研究成果

(1) *com*, *blp*, *cia* 遺伝子群欠失株の形質転換能 (図2)

ペプチドフェロモン無添加ではいずれの株にも形質転換は認められず、CSP 添加時の形質転換には、*comD*, *comE* および *comXb* (図1参照) の保有が重要と考えられた。一方、*blp* 遺伝子群および *cia* 遺伝子群の欠失株では形質転換能は上昇傾向を示した。また、BIP 添加時には、*comDE*, *blpC* 以外の *blp* 遺伝子群、および 2 コピー以上の *comX* が保持された株のみ、形質転換能を示した。

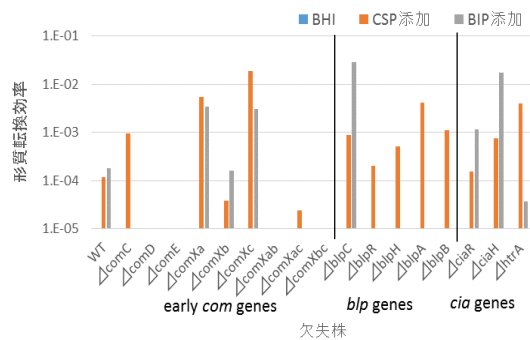


図2. 遺伝子欠失株の形質転換効率

以上の結果から、被験株の CSP 存在下の形質転換率が維持されるには 2 コピー以上の *comX* が必要で、*comXb* がとくに重要であると推定された。BIP も形質転換を誘導したが、*blp* 遺伝子群に加え、*com* 遺伝子群が機能している場合に限られることから、最終的に *com* 遺伝子群が作動することが形質転換を起こすためには必要と考えられた。したがって、2つのペプチドクオラムセンシング系には相互作用があることが示唆された。

(2) *com*, *blp*, *cia* 遺伝子群欠失株のバクテリオシン産生能 (図3)

comXa, *comXb* の欠失株にはペプチド非処理でもバクテリオシン産生が認められ、親株および *com* 遺伝子群の欠失株は BIP 添加時にバクテリオシン産生が誘導された。とくに *comCDE* 欠失株は親株よりも強いバクテリオシン活性を示した。*blp* 遺伝子群においては、BIP やバクテリオシンの輸送と成熟化に關与する *BlpAB* をコードする遺伝子 (*blpA*, *blpB*) の欠失によりバクテリオシン産生能が消失した。*blp* 系の制御因子をコードする *blpR* の欠損株は、CSP 存在下でバクテリオシンを産生し、BIP には応答を示さなかった。*cia* 遺伝子群欠失株はペプチド非添加時にバクテリオシンを産生した。

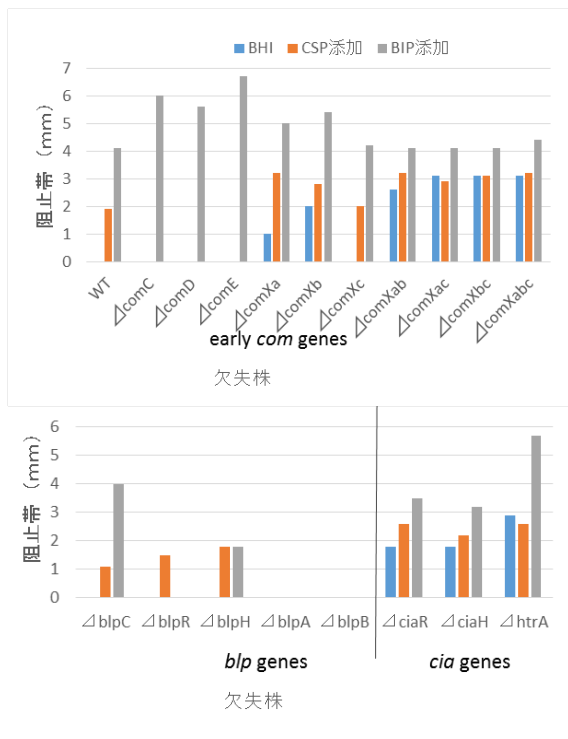


図3. 遺伝子欠失株のバクテリオシン産生

以上から、バクテリオシン産生は BIP のクオラムセンシングで作動する *blp* 遺伝子群により制御され、*blp* 遺伝子群の発現は、*early com* 遺伝子群、および *ComX* で誘導される *late com* 遺伝子群と相互抑制的関係にあることが示唆された。

(3) 遺伝子欠失株のバイオフィーム発育

菌同士の拮抗関係は、自然界において、バイオフィーム状発育時に生じると推定される。そこで、各遺伝子欠損株のバイオフィーム形成能と評価したところ、*comXa*, *comXb* の欠失株では、浮遊発育菌の過剰増殖および培養液 pH の低下が生じた。CSP, BIP の添加は、シグナル検知に関わる遺伝子群が正常な菌株で発育抑制を示したことから、ペプチドクオラムセンシングが、生育環境の悪化を防ぎ、

菌数を制御していると考えられた。一方、バイオフィーム成分かつ形質転換の遺伝子ソースである菌体外 DNA の量は、ペプチド非存在下および CSP 添加時にバクテリオシン産生量と相関するが、BIP 添加時には相関性が失われることが示された。遺伝子欠失を含む全ファクターを分析した結果では、バクテリオシン産生量は、BIP 添加、細胞外 DNA 量と正、*comXb* の保有とは負の相関性を示した。

以上、今回の検討結果を総合的に見る限り、バクテリオシン産生から DNA 放出、形質転換までの流れには、相反的な制御系が関与しており、周辺に存在する競合菌の殺菌とそれに伴う DNA 放出、さらに外部 DNA の取り込みおよび組換えによる新規遺伝子獲得に至るまでの過程は、通常の発育条件下ではスムーズに連動していないことが示唆された。これは、アンギノサスレンサ球菌の近縁菌種間であっても、菌種固有の遺伝子群が維持されていることとも一致すると思われる。とくに *S. intermedius* では菌種固有の病原関連遺伝子が多く保持され、一部（ヒアルロニダーゼや活性型 *MsgA* など）のみ、グループ内菌種と共通していることから、実験的な形質転換で認められる以上に、遺伝子の菌種間水平伝播には、伝達の方向性が存在する可能性がある。

(4) 今後の展開

現在、*com*, *blp*, *cia* の遺伝子群の重複欠失株の性状を検討している。極端にバイオフィーム形成能が低下する株があることから、シグナリング経路を確認中であり、成果を発表予定である。

生育環境の情報を、細菌は二成分制御系を中心とするセンサーおよびレギュレーターによって感知し、常時、遺伝子発現を調節して生き残りを図っている。近縁菌種同士の遺伝子交換は、その戦略の一環で、一種のストレス応答と考えられる。複数存在するクオラムセンシング系の優位性や運動性の変化をもたらすトリガーについて、さらに興味を持たれる。

他菌種の遺伝子欠損株セットの作製およびこれらを用いた *S. intermedius* との遺伝子交換についても検討中であるが、一部菌種に CSP 存在下の形質転換の効率が非常に低いものが存在することが明らかになった。何等かの形質転換を惹起する因子または条件も想定し、ゲノム進化を総合的に解明することが必要と考えられる。

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)

Imaki H, Tomoyasu T, Yamamoto N, Taue C, Masuda S, Takao A, Maeda N, Tabata A, Whiley RA, Nagamune H. Identification and characterization of a novel secreted

glycosidase with multiple glycosidase activities in *Streptococcus intermedius*. J Bacteriol 査読有 2014;196:2817-26.

〔学会発表〕(計 5 件)

Takao A, Nagamune H, Maeda N. Influence of peptide pheromones on characteristics of *Streptococcus intermedius*. 第 88 回日本細菌学会、2015 年 3 月 26 日～28 日、長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)

Takao A, Nagamune H, Maeda N. Influence on signal peptide pheromones on transformation efficiency and bacteriocin production in *Streptococcus intermedius*. XIX Lancefield International symposium on streptococci and streptococcal diseases, 2014 年 9 月 9 日～12 日, Buenos Aires (Argentina).

Nagamune H, Tomoyasu T, Imaki H, Yamamoto N, Taue C, Masuda S, Takao A, Maeda N, Tabata A, Whiley RA. Characterization of a novel secreted glycosidase with multiple glycosidase activities, *MsgA*: A candidate key enzyme regulating growth and pathogenicity of *Streptococcus intermedius*. 2014 年 9 月 9 日～12 日, Buenos Aires (Argentina).

Takao A, Nagamune H, Maeda N. Influence of peptide pheromones on bacteriocin production in *Streptococcus intermedius*. 第 87 回日本細菌学会、2014 年 3 月 26 日～28 日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

Takao A, Nagamune H, Maeda N. Function of *comX* in *Streptococcus intermedius* to competence induction and biofilm formation. 第 86 回日本細菌学会、2013 年 3 月 18 日～20 日、幕張メッセ(千葉県千葉市).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高尾 亞由子 (TAKAO, Ayuko)

鶴見大学・歯学部・学内講師

研究者番号: 10163156