

論文の内容の要旨

論文題目 *Streptococcus suis* の表層蛋白質に関する研究

氏名 大崎 慎人

グラム陽性病原細菌の表層蛋白質の中には、C末端領域に共通してLPXTG配列を保有し、本配列を介して細胞壁に共有結合する細胞壁結合蛋白質 (cell-wall-anchored protein ; CWAP) が多く存在する。これら CWAP は、菌の宿主組織への付着や、細胞への侵入等に密接に関与し、細菌の感染成立に必須とされる。従って、グラム陽性菌による感染症対策を考える上で、CWAP と細胞壁との結合機構に関する知見を得ることは重要である。

近年、*Staphylococcus aureus* をモデルとした研究により、CWAP と細胞壁との結合は、sortase と命名された酵素に媒介されることが明らかになった。そして、CWAP は、*S. aureus* 表層に提示される過程で、sortase による LPXTG 配列の特異的切断を受け、生じたポリペプチド末端がペプチドグリカンにアミド結合することで、細胞壁に配置固定されることが示された。この CWAP 配置固定機構が、他のグラム陽性菌にも共通して存在することを示すためには、それらの細菌における sortase の存在を明らかにすることが重要となる。*S. aureus* sortase をコードする *srtA* の類似遺伝子 (*srtA* homolog) は、ゲノム配列が決定されたグラム陽性菌の全てに存在する。しかし、それらのゲノム中には、通常 2 つ以上の *srtA* homolog が存在する。また、これら *srtA* homolog の産物と、*S. aureus* sortase との相同性は低い (25%以下)、その配列には活性中心と推定される構造が保存されている。これらの事実は、グラム陽性菌に、基質特異性が異なる複数の sortase または類似酵素が存在することを示唆している。しかし、個々の菌種におけるそれぞれの *srtA* homolog の役割について、詳細な解析はなされて

いなかった。

最近になり、口腔 *Streptococcus* である *S. gordonii* でも、*S. aureus* sortase と同様な機能を保有する sortase をコードする *srtA* homolog が同定され、*S. gordonii* の *srtA* と命名された。しかし、これら 2 菌種を除いて sortase の存在が証明された細菌はなく、グラム陽性菌の CWAP 配置固定機構に関する更なる研究が必要とされていた。そこで本研究で著者は、豚の病原細菌である *Streptococcus suis* の sortase および CWAP 配置固定機構について、一連の解析を行い、以下の成績を得た。

sortase の基質と予想される *S. suis* CWAP は、これまで muramidase-released protein (MRP) 以外に報告されておらず、また、グラム陽性菌細胞壁に結合する種々の蛋白質の中から、CWAP を分離する方法は確立されていなかった。そこで第 1 章では、新規 CWAP の同定を目的とした *S. suis* からの試料調整法の検討を行った。試料中の蛋白質を 2 次元電気泳動 (2D-PAGE) で展開し、その N 末端アミノ酸配列を決定した。この配列を基に構造遺伝子を同定し、その遺伝子産物が CWAP の特徴である C 末端領域の LPXTG 配列を保有することを指標にして、調整法の評価を行った。

まず、CWAP 調整法として一般に用いられる、菌体を muramidase で処理することで可溶化した細胞壁画分の調製を行った。2D-PAGE 像に現れた蛋白質スポットの 1 個について、構造遺伝子を同定した。この遺伝子の産物は、細菌のシステイン合成酵素である O-acetylserine lyase に有意な相同性を示し、更に、*Salmonella enterica* システイン要求性変異株を用いた相補試験で、その酵素活性が確認された。しかし、本産物は、LPXTG 配列をはじめとする、細胞壁への結合に必要な既知の構造を保有しなかった。この成績は、未知の様式で *S. suis* 細胞壁に結合する代謝酵素の存在を示唆するという点で興味深いだが、新規 CWAP の同定には用いた調整法が不適であることを示した。

そこで、細胞壁に共有結合しない蛋白質を除去するための方法を新たに考案した。すなわち、塩酸グアニジン不溶細胞壁成分を粗精製し、これを muramidase で消化した上清画分を調製した。2D-PAGE 像に現れた 20 個以上の蛋白質スポットのうち、8 個の N 末端アミノ酸配列を基に、4 つの構造遺伝子を同定した。その結果、これら遺伝子の 1 つは MRP を、残る 3 つは新規蛋白質 (SntA, SntB, および SntC) をコードすることが判明した。そして、いずれの遺伝子産物も C 末端領域に LPXTG 配列を保有した。以上の成績から、考案した調整法が CWAP の粗精製に有用であることが示され、また、得られた 2D-PAGE 像は *S. suis* CWAP の全体像を含むものと考えられた。

第 2 章では、*S. suis* の *srtA* homolog を同定し、その遺伝子領域の特徴を明らかにした。更に、遺伝子破壊株の作出と、CWAP の 2D-PAGE 解析とを併用し、遺伝子の機能を解析した。グラム陽性菌ゲノム中には複数個の *srtA* homolog が存在すること、また、*srtA* homolog の相同性は低いことを踏まえ、*S. suis* の *srtA* homolog の探索には、3 種類の手法 (他菌種の *srtA* homolog に共通する近傍遺伝子のクローニング、縮合プライマーを用いた PCR, およびゲノムライブラリーのランダムシーケンス) を用いた。その結果、基準株である NCTC10234 株

に5つの *srtA* homolog を見出し、これらを *srtA*, *srtB*, *srtC*, *srtD*, および *srtE* と命名した。*srtA* は DNA gyrase subunit A 遺伝子 (*gyrA*) 下流に位置し、この配置は *S. gordonii srtA* および他の *Streptococcus* 属菌の *srtA* homolog と共通した。*srtB*, *srtC*, および *srtD* は、*srtA* と異なる領域でタンデムに並び、約 110 bp の順列繰り返し配列が3つ周囲に存在した。*srtE* は、トランスポゼース様偽遺伝子を伴い、他とは異なる領域に存在した。これら5つの *S. suis* 遺伝子の各産物と、*S. aureus sortase* および *S. gordonii sortase* とを比較した結果、*S. suis srtA* 産物は *S. gordonii sortase* に65%の相同性を示すことが判明した。前述のように、*srtA* homolog 産物間の相同性は通常低いことから、これは特筆すべき値であった。更に、*srtA* 産物は、他の *Streptococcus* 属菌で *gyrA* 下流に位置する *srtA* homolog の産物に、55%~85%の相同性を示し、これらの産物は共通した機能を保有することが示唆された。

続いて、*srtA*, *srtBCD*, および *srtE* を、それぞれ抗生物質耐性遺伝子で置換した遺伝子破壊株を作出した。遺伝子破壊株および親株から CWAP を粗精製し、その 2D-PAGE 像に現れた蛋白質スポットパターンを解析した。親株と比較して、*srtA* 破壊株では、MRP, SntA, SntB, および SntC に該当するスポットを含む、15個以上のスポットが消失した。そして、発現ベクターに連結した *S. suis srtA* で *srtA* 破壊株を形質転換すると、このパターンの変化は完全に復帰した。この結果は、これらの CWAP と細胞壁との結合には、*srtA* の機能が必要であることを示した。一方、*srtA* 破壊株で消失したスポットは、*srtBCD* または *srtE* 破壊株には存在し、*srtBCD* および *srtE* は、これらの CWAP と細胞壁との結合に関与しないことが示された。以上の成績から、*S. suis* の5つの *srtA* homolog のうち、*srtA* が多くの CWAP の細胞壁への配置固定に必要とされる、すなわち *srtA* が *sortase* 遺伝子であると結論した。また、他の *Streptococcus* 属菌でも同様に、*sortase* 遺伝子は *gyrA* 下流に位置すると推定した。更に、粗精製した CWAP の 2D-PAGE と、*sortase* 遺伝子破壊株の作出とを併用した解析手法は、グラム陽性菌 CWAP を網羅的に同定する系として利用可能と考えられた。

第3章では由来および系統の異なる *S. suis* 株を用いて、*srtA* の保存状況を解析した。NCTC10234 株 *srtA* は *gyrA* 下流に位置することから、*S. suis* 株の当該領域の解析を行った。その結果、用いた59株全ての *gyrA* 下流に *srtA* homolog が存在することが判明した。このうち、NCTC10234 株 *srtA* を含む56株の *srtA* homolog は高い保存性を示した。一方、残る3株の *srtA* homolog と NCTC10234 株 *srtA* とを比較すると、塩基配列相同性は70%~75%で、推定アミノ酸配列相同性も78%~84%と、顕著な変異がみられた。そこで、発現ベクターに連結したこれら3株の *srtA* homolog で *S. suis srtA* 破壊株を形質転換し、遺伝子相補試験を行った。その結果、いずれの遺伝子も、NCTC10234 株 *srtA* と同等な機能を保有することが確認でき、これらは *srtA* の変異遺伝子であることが示された。*S. suis srtA* 変異遺伝子の配列について詳細な比較解析を行った結果、その変異座位は遺伝子全域に分布し、*srtA* 配列を基にした分子系統樹形は、16S rRNA 遺伝子または *chaperonin 60* 遺伝子の配列を基にした既報の樹形と類似することが判明した。以上の成績は、株の進化の過程で蓄積した点変異により *srtA* 配列に多様性が生じたが、遺伝子の機能は保存されていることを示し、本菌種

における *srtA* の生物学的重要性を示すものである。また、用いた *S. suis* 株は健康豚由来株も含むことから、*srtA* の媒介する CWAP 配置固定機構は、*S. suis* が環境の変化に適応し生存するための普遍的な戦略に必要とされ、病原性の発揮はその中の一例であると考察した。

本研究では、*S. suis* に 5 つの *srtA* homolog を見出し、その特徴を明らかにした。更に、遺伝学的手法と、新たに考案した方法で粗精製した *S. suis* CWAP の網羅的解析とを併用して、本菌の *sortase* 遺伝子同定に成功した。また、本菌種に *sortase* の媒介する CWAP 配置固定機構が普遍的に存在することを明らかにし、*sortase* の進化に関する知見を得た。現在、多くのグラム陽性菌で *sortase* の研究が進行中だが、それらの研究に先駆けて、本研究で得られた成績は、グラム陽性菌、特に *Streptococcus* 属菌の *sortase* に関する重要な情報および解析手法を提供するものとなった。