

黄色ブドウ球菌の病原性に働く新規ホスホジエステラーゼ CvfA の分子機能の解析

長田 真規子

【序】

病原性細菌の感染は、毒素や組織への接着因子などの病原性因子が厳密な制御下で発現することによって達成される。日和見感染症の原因菌である黄色ブドウ球菌では、毒素の発現を直接制御する転写因子に関してはよく研究されているが、転写因子の上流で働く機構についての理解は不十分である。特に、複数の病原性細菌に保存された転写因子 Agr は中心的な病原性制御因子として捉えられているが、その周辺制御因子に細菌間で保存されたものは知られておらず、Agr の発現を調節する中心経路の理解はなされていない。

当教室では、感染モデル動物であるカイコを用いて、未同定の病原性関連遺伝子のスクリーニングを行っている。その結果、機能未知遺伝子である *cvfA* (conserved virulence factor A) がカイコに対する殺傷力に必要な遺伝子として同定された。*cvfA* 遺伝子はマウスに対する殺傷力にも寄与する。また *cvfA* 遺伝子は、多くの病原性細菌に保存された遺伝子であり、A 群連鎖球菌においても病原性に必要である。さらに *cvfA* 遺伝子は、転写因子 Agr の発現に寄与する。このことから CvfA は、複数の細菌に保存された病原性発現機構の上流において働くと考えられる(図 1)。

そこで私はこの CvfA の機能を明らかにすることで、病原性発現機構を理解することを目的として本研究に着手した。

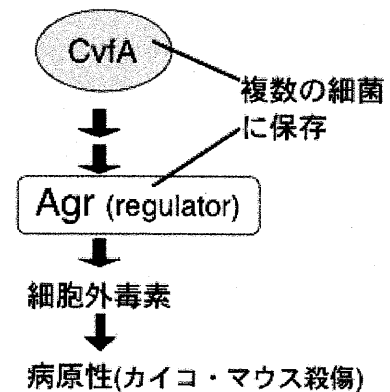


図 1. CvfA は既知の病原性制御因子の上位で働く

【方法と結果】

1) ホスホジエステラーゼ活性を指標とした CvfA タンパク質の精製

CvfA タンパク質には一次配列上、膜貫通ドメイン、RNA 結合ドメイン、ホスホハイドロラーゼドメインが存在する (図 2)。CvfA タンパク質を大腸菌に大量発現させたところ、その膜画分において CvfA の発現に依存したホスホジエステラーゼ活性が検出された。そこで、この活性を指標に CvfA タンパク質の精製を試みた (表 1)。膜を界面活性剤 Tween20 によって可溶化することにより、可溶性画分にホスホジエステラーゼ活性を回収することができた。さらにクロマトグラフィーにより精製を進めた。精製の各過程において比活性が上昇することを確認した。最終段階である MonoQ カラムクロマトグラフィーにおいて、ホスホジエステラーゼ活性とタンパク質の挙動が一致した (図 4)。さらに最終標品は、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、CvfA の分子サイズに単一のバンドを示した (図 3)。以上の結果より私は、CvfA タンパク質がホスホジエステラーゼとして精製されたと判断した。

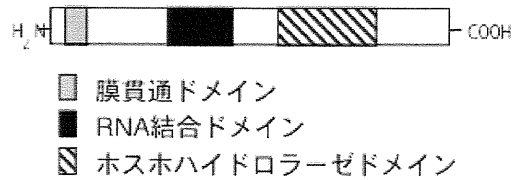


図 2. CvfA タンパク質の構造

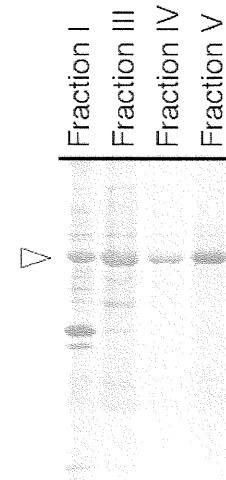


図 3. 各精製段階のタンパク質

Fraction	Protein (mg)	Total activity ($\times 10^{-2}$ $\mu\text{mol}/\text{min}$)	Yield (%)	Specific activity ($\times 10^{-2}$ $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$)
I membrane	25	35	100	1.4
II 1.5% OG-washed membrane	7.8	23.3	67	3.0
III 2.5% Tween20 solubilized	2.3	15.5	44	6.8
IV DEAE-toyopearl column	1.08	18.4	53	17.1
V MonoQ column	0.37	8.39	24	22.9

表 1. CvfA タンパク質の精製

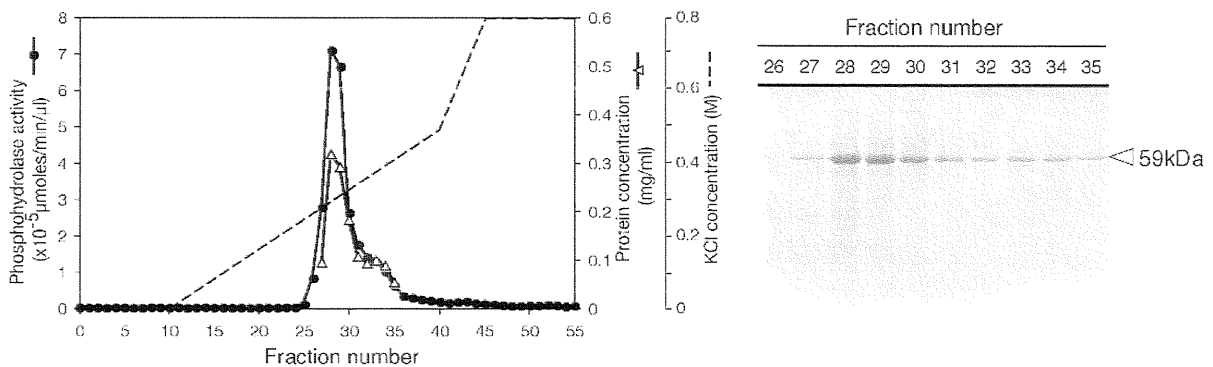


図 4. MonoQ カラムクロマトグラフィーにおけるホスホジエステラーゼ活性とタンパク質の挙動

2) 黄色ブドウ球菌の病原性における CvfA のホスホジエステラーゼ活性の必要性

ホスホハイドロラーゼドメインに点変異を導入した 5 種の変異型 CvfA タンパク質は、ホスホジエステラーゼ活性を示さなかった。これらの変異型 CvfA を発現させた黄色ブドウ球菌 *cvfA* 欠損株は、野生型 CvfA を発現させた株と比べてカイコに対する殺傷力が弱く、CvfA を発現しない株と同程度であった (図 5)。また、これらの変異型 CvfA を発現する菌の毒素産生能についても、*cvfA* 欠損株と同程度であった。以上の結果は、CvfA のホスホジエステラーゼ活性は、黄色ブドウ球菌の毒素産生および病原性に必要であることを示唆している。

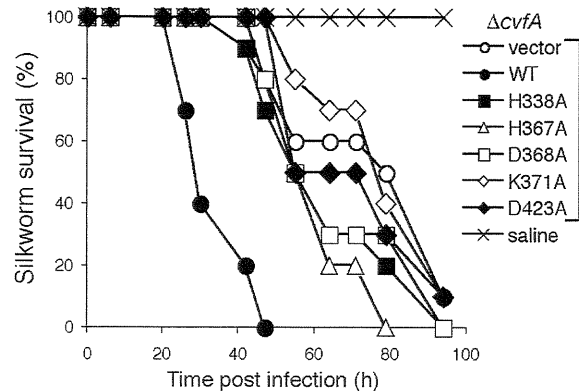


図 5. ホスホジエステラーゼ活性を示さない変異型 CvfA は、カイコに対する殺傷力を上昇させない

3) CvfA により分解される生体内分子の同定

CvfA は RNA 結合ドメインを有することから、黄色ブドウ球菌細胞内での CvfA の基質候補として核酸に着目した。ホスホジエステラーゼにより代謝されることが知られるサイクリックヌクレオチドについて検討したところ、CvfA は 2',3'-サイクリック AMP および GMP に対してホスホジエステラーゼ活性を示すことが分かった (図 6)。これらの基質に対する K_m 値は 15~17mM と、細胞内濃度に比べて非常に高い値であったことから、より反応性の高い別の基質があると考えられた。核酸の 2',3'-サイクリックホスホジエステル結合は、RNA がある種のエンドヌクレアーゼで切断された時に 3'末端に生じる構造として知られている。CvfA は、RNA 3'末端の 2',3'-サイクリックホスホジエステル結合に対しても分解活性を示し、さらにその反応の K_m 値は 1.1 μ M であった。以上の結果は、CvfA が RNA の 3'末端に対して作用することを示唆している。

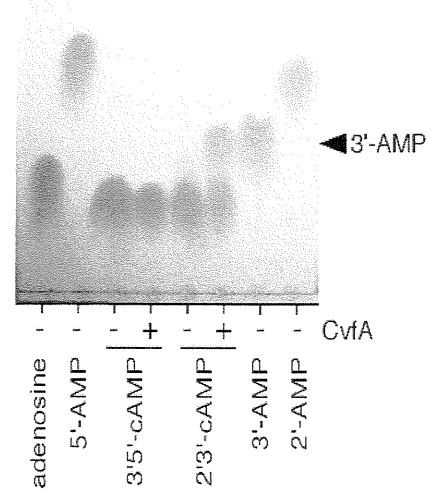


図 6. CvfA は 2',3'-サイクリックホスホジエステラーゼ活性を持つ

4) 黄色ブドウ球菌 *cvfA* 欠損株において発現変動する RNA の同定

CvfA が病原性発現に働く分子機構を知るために、*cvfA* 欠損株において発現量が変動している RNA の同定を試みた。*cvfA* 欠損株では、Agr およびその下流の毒素の他にも、病原性を制御する転写因子である Sar ファミリー (SarX, SarV, SarS) の発現量が変動していた。また *cvfA* 欠損株ではエネルギー代謝酵素の発現にも多く変動が見られた。病原性細菌が宿主内に侵入した際には、エネルギー代謝酵素の発現量が変動することが知られている。以上の結果は、CvfA が Agr, Sar など

の転写因子の発現やエネルギー代謝の制御という、病原性の発現に際して上流で機能することを示唆している。

CvfA は RNA の 3'末端に対して作用し、その構造変換を行うと考えられる。RNA 3'末端の構造変換は RNA の安定性を変化させる可能性があるため、*cvfA* 欠損株で発現変動する RNA の中に、CvfA のターゲットが含まれる可能性がある。そこで発現変動する RNA の中に、その安定性が変化するものが存在するかを検討した。その結果、*cvfA* 欠損株では Agr の mRNA の半減期が短縮していることを見出した (図 7)。この分子機構の1つの可能性として、Agr の mRNA の 3'末端の構造変換が CvfA によってなされて、Agr mRNA が安定化されるのではないかと考える。

【まとめと考察】

本研究で私は、細菌間で保存された新規病原性因子 CvfA がホスホジエステラーゼ活性を持つこと、CvfA のホスホジエステラーゼ活性は、黄色ブドウ球菌の病原性に必要であることを明らかにした。また CvfA は RNA 3'末端の 2',3'-サイクリックホスホジエステル結合を分解することを見出した。2',3'-サイクリックホスホジエステラーゼは多くの生物に存在する酵素であるが、原核生物における生理的意義は不明であった。本研究は、これが病原性に働くことを初めて提唱するものである。RNA 3'末端の 2',3'-サイクリック構造の解消は、末端部へヌクレオチドを付加するなどの修飾を可能にすることが、tRNA 成熟過程の末端修飾や一部の mRNA スプライシングについて知られている。このことから CvfA は、RNA 3'末端の構造変換を引き起こし、それによって Agr をはじめ下流の病原性制御機構へとシグナルを伝えていると考えられる (図 8)。本研究より私は、RNA 3'末端の構造変換が、複数の細菌において病原性制御の上流機構として働くことを提唱する。

【発表論文】 Nagata M, Kaito C, Sekimizu K. J. *Biol. Chem. in press.*

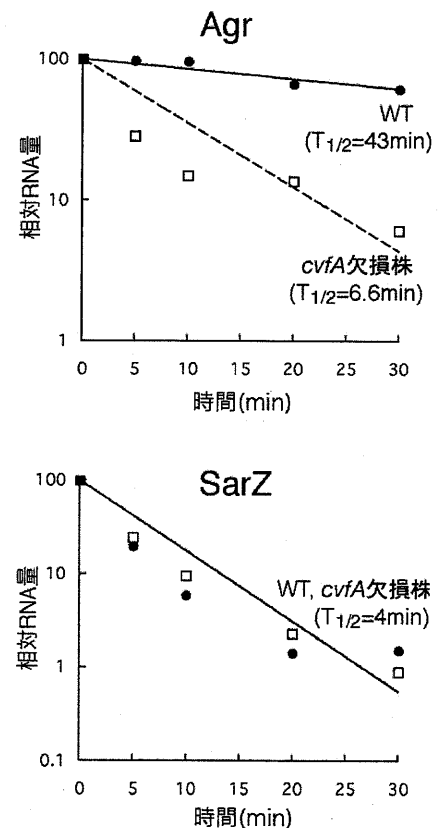


図 7. CvfA は Agr mRNA の安定化に働く

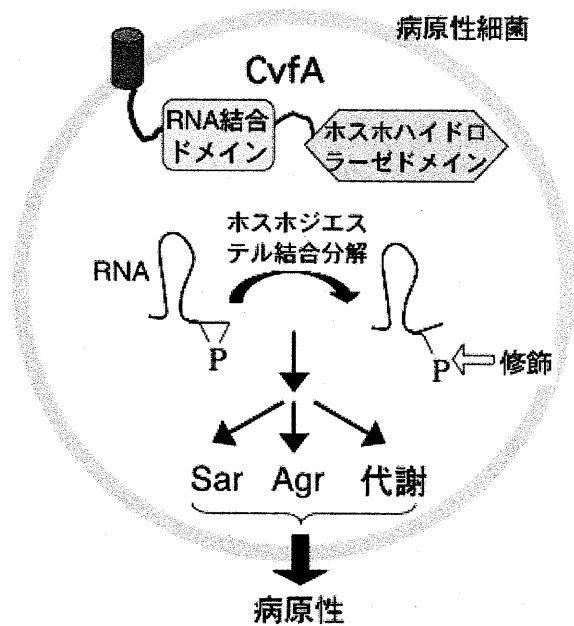


図 8. CvfA が病原性に働くモデル図