

論文の内容の要旨

論文題目: 黄色ブドウ球菌の病原性調節因子 CvfB の分子機能の解明
氏 名: 松本 靖彦

[序]

黄色ブドウ球菌は人に対して、日和見感染を引き起こす病原性細菌である。黄色ブドウ球菌により引き起こされる疾患は化膿症、髄膜炎、敗血症など多様である。黄色ブドウ球菌は宿主組織を破壊する様々な毒素や宿主免疫系からの防御因子を持ち、それらの発現を制御することにより、感染した宿主に対して様々な症状を引き起こすと考えられている。しかし、毒素など病原性因子の発現に至る制御機構には不明な点が多い。当研究室では無脊椎動物であるカイコの黄色ブドウ球菌感染モデルを利用し、新規病原性遺伝子 *cvfB* (conserved virulence factor B) を見い出している。*cvfB* 遺伝子は、A 群連鎖球菌、緑膿菌、リステリア菌などの病原性細菌において保存された遺伝子である。*cvfB* 遺伝子は、黄色ブドウ球菌の病原性毒素として知られる溶血毒素、プロテアーゼ、ヌクレアーゼの産生に寄与する。しかし、CvfB の分子機能は不明である。本研究の目的は、遺伝学的、及び生化学的解析により CvfB の機能を明らかにし、黄色ブドウ球菌の毒素産生機構の一端を解明することである。

[結果と考察]

1. *cvfB* 遺伝子は、病原性調節遺伝子 *agr* の発現を介する経路と介さない経路で毒素産生、及び病原性に寄与する

cvfB 遺伝子が溶血毒素の産生に關与することがすでにわかっている。本研究ではまず、*cvfB* 遺伝子が、溶血毒素をコードする *hla* 遺伝子の発現に寄与するかを検討した。レポーターアッセイによる解析から、*cvfB* 欠損株では、*hla* 遺伝子の発現が低下していた。また、*cvfB* 欠損株では、*hla* 遺伝子の発現を制御することが示されている *agr* 遺伝子の発現も低下していた。従って、*cvfB* 遺伝子は、*agr* 遺伝子の発現を介する溶血毒素産生に寄与すると考えられる。さらに、*cvfB*、*agr* 二重欠損株においては、*agr* 欠損株と比べて、溶血毒素、プロテアーゼ、DNase の産生(表.1)、並びにカイコやマウスに対する病原性が低下していた。これらの結果は、*cvfB* 遺伝子が *agr* 遺伝子の発現を介さない経路でも毒素産生、及び病原性に寄与することを示唆している。

Strains	Hemolysin (HU)	Protease (AU)	DNase (AU)
Δagr / vector	21 ± 1	11 ± 1	2.3 ± 1
$\Delta agr \Delta cvfB$ / vector	9 ± 1	6 ± 1	1.2 ± 1
$\Delta agr \Delta cvfB$ / <i>pcvfB</i>	16 ± 1	10 ± 1	2.4 ± 1

表1 *cvfB*,*agr* 二重欠損株は、*agr* 欠損株より毒素産生量が低下していた

2. CvfB タンパク質は、RNA 結合活性を有する

CvfB タンパク質の 64-144、及び 151-225 アミノ酸残基の領域に S1 RNA 結合ドメインと相同性のある領域が存在する。そこで私は、CvfB が RNA 結合活性を有するか検討した。ヒスチジン融合 CvfB を大腸菌で発現させ、ヒスチジンアフィニティーカラム、及び陰イオン交換カラムで精製した。CvfB タンパク質の挙動は、poly(U)に対する結合活性の挙動と一致していた(図 1)。この結果は、CvfB が RNA 結合活性を有するタンパク質であることを示唆している。

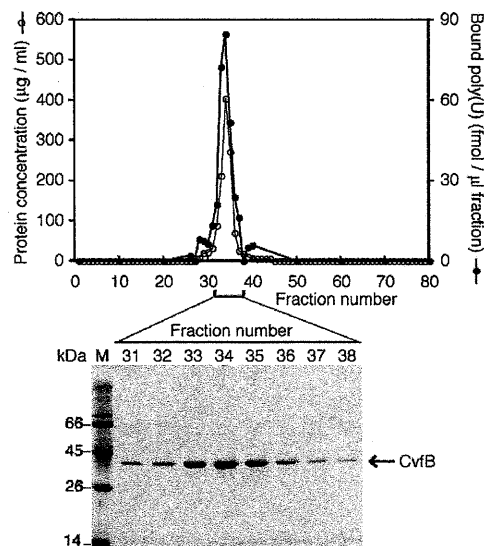


図 1 陰イオン交換クロマトグラフィーにおける poly(U)結合活性とタンパク質濃度(上段)、及び SDS 電気泳動像(下段)。

3. CvfB タンパク質の RNA 結合活性は、黄色ブドウ球菌の溶血毒素産生に必要である

種々の変異型 CvfB を用いて、poly(U)と結合するために必要な領域、及び溶血毒素産生に必要な領域の同定を試みた。その結果、CvfB と poly(U)との結合には、150-300 アミノ酸残基の領域が必要であること、及び溶血毒素産生には、それに加えてさらに 63-149 アミノ酸残基の領域が必要であることがわかった。poly(U)結合活性を持たない変異型 CvfB は、調べた限り、すべて溶血活性を示さなかった(図 2)。この結果は、黄色ブドウ球菌の毒素産生に CvfB

の RNA 結合活性が必要であることを示唆している。変異型 CvfB(CvfB-5)は、poly(U)結合活性を持つが、溶血毒素産生ができない。この結果は、poly(U)結合活性以外の機能も CvfB の溶血毒素産生に必要なであることを示唆している。

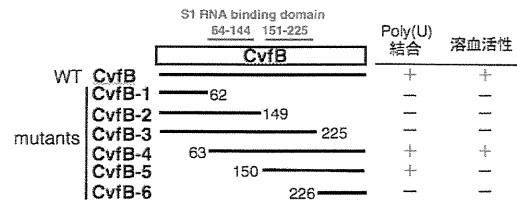


図 2 CvfB の poly(U)結合、及び溶血毒素産生に必要な領域の同定

4. CvfB は、30S リボソームタンパク質 S9(RpsI)と結合する

CvfB タンパク質の分子機能をさらに理解する目的で、CvfB と結合する因子の同定を試みた。抗 CvfB 抗体を用いて免疫沈降を行ったところ、約 14kDa のタンパク質が検出された。マスペクトル解析から、この約 14kDa のタンパク質画分には、30S リボソームタンパク質 S9(RpsI)と SA1528 の二つのペプチドが含まれていた。次に、GST pull down 法により、CvfB が 30S リボソームタンパク質 S9、及び SA1528 と結合するかを検討した。抗 CvfB 抗体により、30S リボソームタンパク質 S9(RpsI-GST)では、バンドが検出されたが、SA1528(SA1528-GST)、及び GST では、バンドが検出されなかった。この結果は、CvfB が 30S リボソームタンパク質 S9 と結合することを示唆している (図 3)。30S リボソームタンパク質 S9 は、30S リボソーム複合体の構成因子の一つであることから、CvfB が 30S リボソームと複合体を形成するかを検討した。その結果、30S リボソーム画分に CvfB タンパク質を検出することができた。この結果は、CvfB が 30S リボソームと複合体を形成することを示唆している。

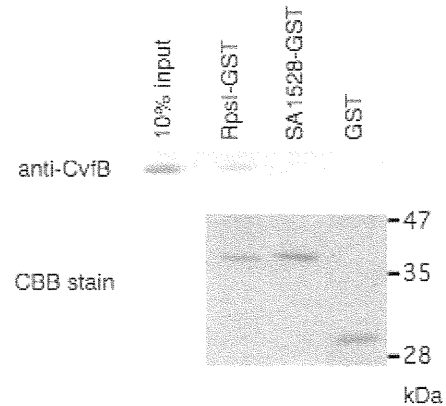


図 3 CvfB と 30S リボソームタンパク質 S9(RpsI)の結合

5. CvfB と 30S リボソームタンパク質 S9 の結合の毒素産生への寄与

変異型 CvfB、及び変異型 30S リボソームタンパク質 S9 を用いた解析から、CvfB タンパク質の C 末端領域である 226-300 アミノ酸領域と 30S リボソームタンパク質 S9 の C 末端領域である 66-130 アミノ酸領域とが結合することが示唆された。CvfB と結合可能な 30S リボソームタンパク質 S9 の C 末端領域の過剰発現は、野生型においては、溶血活

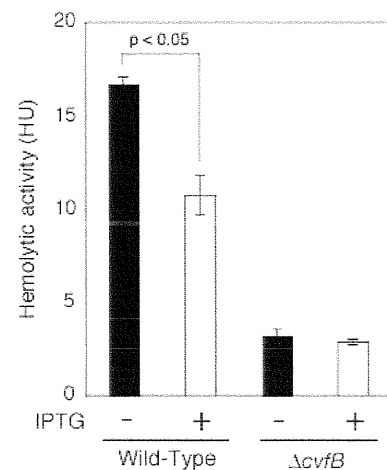


図 4 30S リボソームタンパク質 S9 の C 末端領域の過剰発現による溶血活性の低下

性の低下を導くが、*cvfB* 欠損株においては、溶血活性の低下を導かなかった(図 4)。この結果は、CvfB と 30S リボソームタンパク質 S9 との結合が 30S リボソームタンパク質 S9 の C 末端領域の過剰発現により阻害され、溶血毒素産生が低下したことを示唆している。

[まとめ]

本研究において得られた知見から、私は、黄色ブドウ球菌の毒素産生機構について、以下のようなメカニズムを考えている。まず、CvfB が病原性因子の mRNA と結合する。次に、CvfB と 30S リボソームタンパク質 S9 とが結合することにより、mRNA にリボソーム複合体が導入される。その後、*agr* 遺伝子の発現を介する経路と介さない経路で、溶血毒素を産生させる(図 5)。私は、このモデルで CvfB が病原性因子の mRNA にリボソームを導入する効率を上げることにより、毒素産生に関与する病原性因子の翻訳を促進すると考えている。30S リボソームタンパク質 S9 は、細胞増殖に必要なタンパク質であることが大腸菌で示されているが、病原性への関与についての報告はない。また、リボソームタンパク質と結合することにより毒素の産生を調節する因子の報告例はない。本研究を通じて、私は、病原性因子をコードする mRNA とリボソームの複合体形成段階における毒素産生の調節という新しい考え方を提案したい。

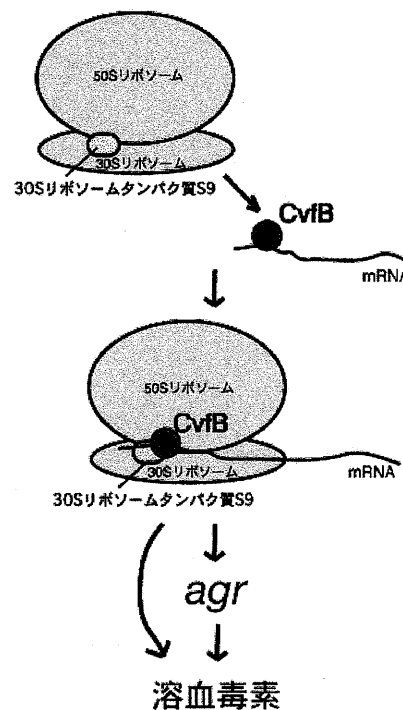


図 5 CvfB と 30S リボソームタンパク質 S9 の結合による毒素産生モデル

[発表論文]

1. Matsumoto Y, Kaito C, Morishita D, Kurokawa K, Sekimizu K. *Infect Immun.* 75, 1964-72 (2007)
2. Kaito C, Morishita D, Matsumoto Y, Kurokawa K, Sekimizu K. *Mol Microbiol.* 62 1601-17 (2006)
3. Hossain MS, Hamamoto H, Matsumoto Y, Razanajatovo IM, Larranaga J, Kaito C, Kasuga H, Sekimizu K. *J Biochem (Tokyo).* 140, 439-44 (2006)
4. Kaito C, Kurokawa K, Matsumoto Y, Terao Y, Kawabata S, Hamada S, Sekimizu K. *Mol Microbiol.* 56, 934-44 (2005)