

論文内容の要旨

論文題目 黄色ブドウ球菌膜表面蛋白質 EbpS の構造機能に 関する研究

氏名 中木戸 誠

【緒言】 黄色ブドウ球菌はグラム陽性菌の代表的な菌であり、多くの人の皮膚や鼻腔等に存在する常在菌である。通常はヒトに対しては、皮膚の化膿性疾患の原因となることが多い。しかし、現在では薬剤耐性を獲得した多くの菌株が市中に流布しており院内感染や日和見感染の原因として大きな社会問題となっている。また耐塩性により毒素型食中毒の引き起こすことなど非常に多彩な病原性を発揮することでも注目されている。黄色ブドウ球菌は菌体表層に多くの蛋白質を保有しており、宿主への付着・増殖といった感染の過程の中でこれらの蛋白質は重要な役割を果たしていると考えられるが、それらの多くの機能および物性に関する知見は依然として不十分である。

本研究では、黄色ブドウ球菌の菌体表面に存在する蛋白質の一つである Elastin binding protein of *Staphylococcus aureus* (EbpS) について着目した。EbpS はエラスチンへ結合する蛋白質として同定されたが、黄色ブドウ球菌のヒト細胞への接着は Fibronectin binding protein や ProteinA など、その他の菌体表層タンパクが初期付着に重要な役割を果たしていることが報告されていることから、EbpS の付着・定着の重要性については疑問視されている。しかし、EbpS は黄色ブドウ球菌の株間でほぼ完全に保存されていることから、EbpS は黄色ブドウ球菌の生育あるいは感染過程で必須の役割を果たしていると考えられる。そこで、大腸菌発現系を用いて発現・調製した組換え蛋白質を用いた、物理化学的手法を中心とした *in vitro* での実験と黄色ブドウ球菌あるいは化膿レンサ球菌を用いた *in vivo* の実験を組み合わせることにより、EbpS の構造・物性を明らかとするとともに、EbpS が黄色ブドウ球菌上で担っている機能について明らかとすることを目指した。

【実験】 *in vitro* の実験について、EbpS および過去に提案されている EbpS のトポロジーモデルに基づき、その機能ドメインと考えられる N 末端側ドメインのみを有する蛋白質（以下、EbpS-N とする）について、大腸菌発現系を用いて発現・調製した。得られた蛋白質を水溶液中あるいは細胞膜模倣環境を与えるとされる有機溶媒と水溶液の混合溶液中において CD スペクトルを測定することにより、これらの蛋白質の二次構造について解析した。また、EbpS は非常に多くの荷電残基を持つ領域を有していることから、金属イオンに関連した機能を持つ可能性が考えられたため、種々の金属イオンを添加し、動的光散乱・等温滴定型熱量測定・電子顕微鏡観察・小角 X 線散乱といった幅広い手法を駆使してその影響について解析した。

また、*in vivo* での機能を解析するため、黄色ブドウ球菌の EbpS 遺伝子破壊株を作製し、野生株と比較することにより、EbpS が菌体上で担っている機能について解析を行った。上記の *in vitro* の実験から、EbpS が特定の金属イオンに関連した機能を有していることが示唆されたため、これらの金属イオンの存在による影響についても解析を行った。また、過去に EbpS が宿主細胞

への接着に関与していることが提案されているため、ヒト細胞への侵入能を強く抑制した化膿レンサ球菌に EbpS を強制発現させ、ヒト細胞への付着能への寄与についても解析した。

【結果と考察】 組換え蛋白質として調製した EbpS-N の CD スペクトルは、リン酸バッファー中ではランダムコイル状の蛋白質に特有のスペクトルを示したのに対し、水と有機溶媒の混合溶液および有機溶媒中では α -ヘリックスあるいは β -シート特有のスペクトルへと変化した。このことから、EbpS-N は通常状態では特定の高次構造を有しておらず、周囲の環境に応じてその二次構造を様々に変化させる性質を持つことが示唆された。EbpS-N に種々の金属イオンを混合したところ、亜鉛イオン特異的に蛋白質が沈殿した。低濃度の亜鉛イオン存在下で動的光散乱、電子顕微鏡を用いて解析を行ったところ、低濃度の亜鉛イオン存在下では特定の大きさの会合体を形成すること、その形状が球状であることが明らかとなった (Figure 1)。また、等温滴定型熱量測定により、亜鉛イオンと EbpS-N の相互作用が大きな発熱反応を伴う特異的な結合であることが明らかとなった。これらの結果より、EbpS はその N 末端ドメインが亜鉛イオン存在下で球状の会合体を形成し、その内部に亜鉛イオンを包摂する機能を有する可能性が示唆された。

全長の EbpS を調製し、亜鉛イオンを添加した際の影響について解析を行った。動的光散乱より、EbpS は EbpS-N と同様に亜鉛イオン存在下で会合体を形成したが、その大きさは EbpS-N よりやや小さく、また、EbpS-N に比べてより低濃度の亜鉛イオン存在下で凝集体を形成することが明らかとなった。亜鉛イオン存在下/非存在下で EbpS の CD スペクトルを測定したところ、亜鉛イオン非存在下ではランダムコイル状の蛋白質に特有のスペクトルを示したが、亜鉛イオンの存在下では α -ヘリックスに特有のスペクトルへと変化した (Figure 2)。このことより、全長の EbpS もまた、通常では特定の高次構造を持たない天然変性蛋白質であり、リガンドである亜鉛イオン存在下において高次構造を形成し、機能を発揮することが示唆された。続いて、亜鉛イオン存在下/非存在下において小角 X 線散乱法によって EbpS の三次元構造を解析した。得られた散乱曲線から $P(r)$ 関数を算出し、さらに構造モデリングを行ったところ、EbpS は亜鉛イオンの存在/非存在下に関わらず、中空の円盤状の立体構造を持つことが示唆された。また、 $I(0)$ の値が通常の蛋白質溶液と比較して著しく高かったことから、その内部に亜鉛イオンを内包していること、さらに亜鉛イオンの濃度依存的に $I(0)$ の値が上昇したことから、亜鉛イオン濃度が高くなるのに伴い、EbpS の会合体内部に内包する亜鉛イオンの濃度が上がっていく、あるいは会合体が大きくなることが示唆された。

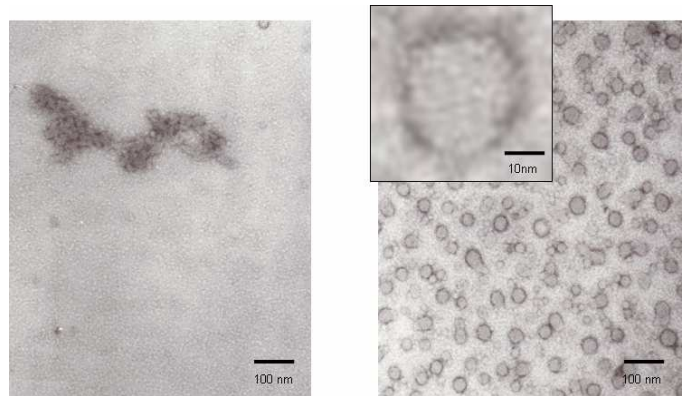


Figure 1 亜鉛イオン存在下 (右) および非存在下 (左) における EbpS-N の電子顕微鏡像

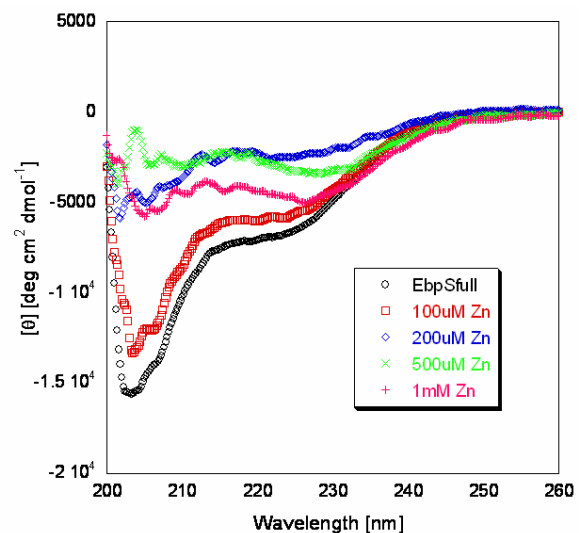


Figure 2 亜鉛イオンの添加による EbpS の CD スペクトル変化

EbpS の遺伝子を破壊した黄色ブドウ球菌の変異株を作製したところ、EbpS 遺伝子破壊株では菌の増殖速度が著しく低下した。原因として、EbpS が培地中からの栄養物質の取り込みを担っている可能性が考えられる。*in vitro* の実験結果から、EbpS の機能が亜鉛イオンと関連していると考えられるため、培養液中の金属イオンを

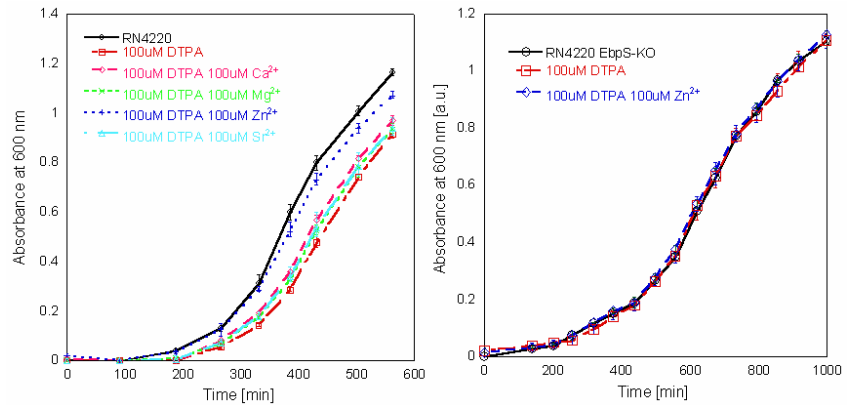


Figure 3 DTPA および種々の金属イオン存在下における野生株 (左) および EbpS 遺伝子破壊株 (右) の増殖曲線

DTPA によってキレートし、その影響について解析した (Figure 3)。野生株では、

DTPA の添加によって増殖速度が低下した。この増殖速度の低下は亜鉛イオンの添加によって回復したが、その他の金属イオン (Ca, Mg, Sr) の添加によっては回復しなかった。このことから、黄色ブドウ球菌の生育に亜鉛イオンは重要な役割を果たしており、培地中の亜鉛イオンを除くことによって黄色ブドウ球菌の増殖が抑制されることが示唆された。一方、EbpS 遺伝子破壊株では、DTPA の添加による増殖速度の変化は見られなかった。これは、黄色ブドウ球菌で EbpS が亜鉛イオンの取り込みを担っており、EbpS 遺伝子を破壊することによって培地中に存在する亜鉛イオンを取り込むことができなくなっていることに起因すると考えられる。

宿主細胞への付着における EbpS の寄与について解析するため、ヒト細胞への付着能を抑制させた化膿レンサ球菌株に EbpS を強制発現させた変異株を作成し、その付着能を検討した。EbpS の強制発現株ではヒト細胞への付着能が大幅に増加した (Figure 4) ことから、EbpS は黄色ブドウ球菌のヒト細胞への接着にも関与していることが示唆された。さらに、EbpS を強制発現させた化膿レンサ球菌の培地中に各種金属イオンを添加したところ、鉄イオンの存在下で菌体の凝集が観察された (Figure 5) ことから、EbpS は

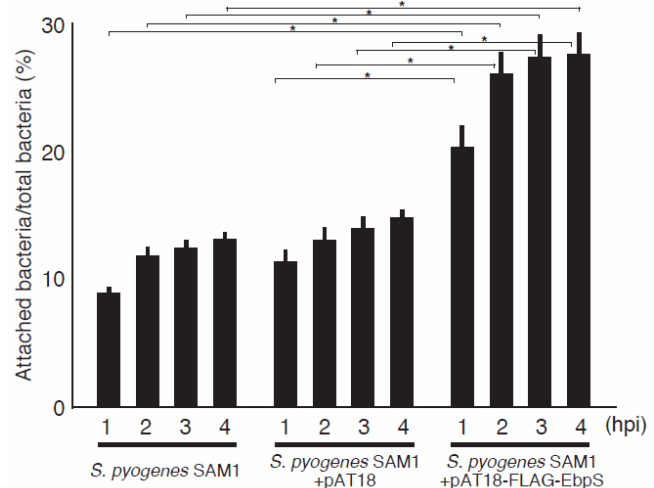


Figure 4 EbpS 強制発現による化膿レンサ球菌の付着能変化

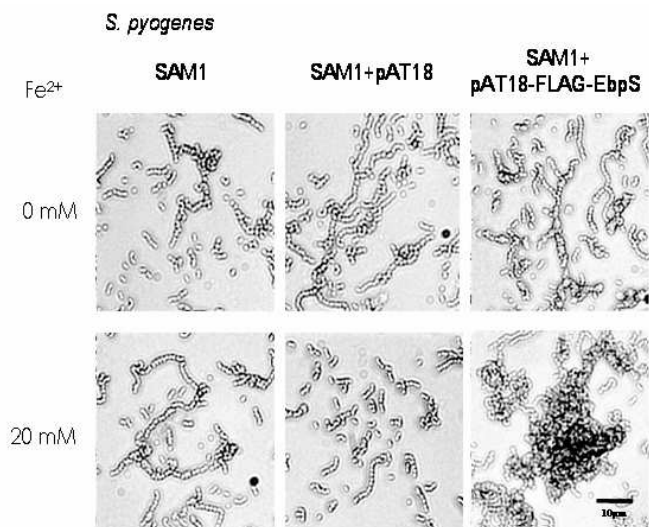


Figure 5 EbpS を強制発現させた化膿レンサ球菌の鉄イオン存在下での凝集形成

鉄イオンの存在下において菌体を集合させるという機能をも有していることが示唆された。

【結論】組換え蛋白質を用いた *in vitro* の実験と菌を用いた *in vivo* の実験を組み合わせることにより、EbpS が通常状態で特定の高次構造を持たない天然変性蛋白質であり、リガンドの有無を含む周囲の環境に応じて、その高次構造を様々に変化させることにより EbpS が菌体上で全く異なる複数の機能を担っていることが示唆された。これまで、天然変性蛋白質は高度な真核生物に多く、細菌等の下等生物ではあまり発達していないと考えられてきた。しかし、本研究により、黄色ブドウ球菌が膜表面に天然変性蛋白質を有しており、それが菌の生育および宿主細胞への感染に非常に重要な役割を果たしていることが示唆された。このことは、天然変性蛋白質という蛋白質の理解へ非常に強く貢献するものと考えられる。

また、本研究は黄色ブドウ球菌の亜鉛イオンの取り込みを担う蛋白質を示した最初の例である。EbpS が黄色ブドウ球菌のゲノム上で非常に強く保存されていること、EbpS をノックアウトした株では増殖速度が大きく減少したことから、黄色ブドウ球菌の生育において亜鉛イオンは非常に重要な役割を果たしていると考えられるため、本研究は黄色ブドウ球菌の感染対策、さらには黄色ブドウ球菌という生物の理解へと大きく貢献することが期待される。