

2. コロニースプレッディング阻害因子 δ 溶血毒素の同定

コロニースプレッディング阻害活性を指標とした精製を行い、硫酸沈殿、熱処理後可溶性画分回収、透析、陽イオン交換カラム分画により、標品を得た。最終精製標品は、分子量約 4kDa のタンパク質が単一のバンドを形成し、最終精製段階のホスホセルロースカラム画分においてこのタンパク質の挙動と阻害活性の挙動が一致していた(図 2)。N 末端アミノ酸配列決定により、このタンパク質は δ 溶血毒素(Hld)と同定された。 δ 溶血毒素をコードする *hld* 遺伝子の破壊株における培養上清中のコロニースプレッディング阻害活性は、野生株に比べ約 10 分の 1 に低下していた。これらの結果は、 δ 溶血毒素がコロニースプレッディング阻害因子である事を示している。また、*hld* 遺伝子破壊株は野生株に比べ高いコロニースプレッディング能力を示した。従って、黄色ブドウ球菌は δ 溶血毒素を分泌して自らのコロニースプレッディング能を負に制御していることが明らかとなった。

3. コロニースプレッディング阻害因子 Map の同定

hld 遺伝子破壊株の培養上清中にわずかではあるが、コロニースプレッディング阻害活性が残存することから、 δ 溶血毒素以外の阻害因子がこの株の培養上清中に存在すると考えられた。そこで、この *hld* 遺伝子破壊株の培養上清を出発材料として、再びコロニースプレッディングに対する阻害活性を指標に精製を行った。硫酸沈殿、透析、陽イオン交換カラム分画を行い、活性と挙動を共にする分子量約 50 kDa のタンパク質を得た(図 3 Peak2)。N 末端アミノ酸配列決定によりこのタンパク質は MHC class II タンパク質と相同性を有する細胞外タンパク質 Map であることが判った。*map* 遺伝子と *hld* 遺伝子の 2 重破壊株の培養上清中のコロニースプレッディング阻害活性は、*hld* 遺伝子単独の破壊株よりもさらに 2 分の 1 に低下していた(図 4)。以上の結果は、黄色ブドウ球菌が分泌する Map は黄色ブドウ球菌のコロニース

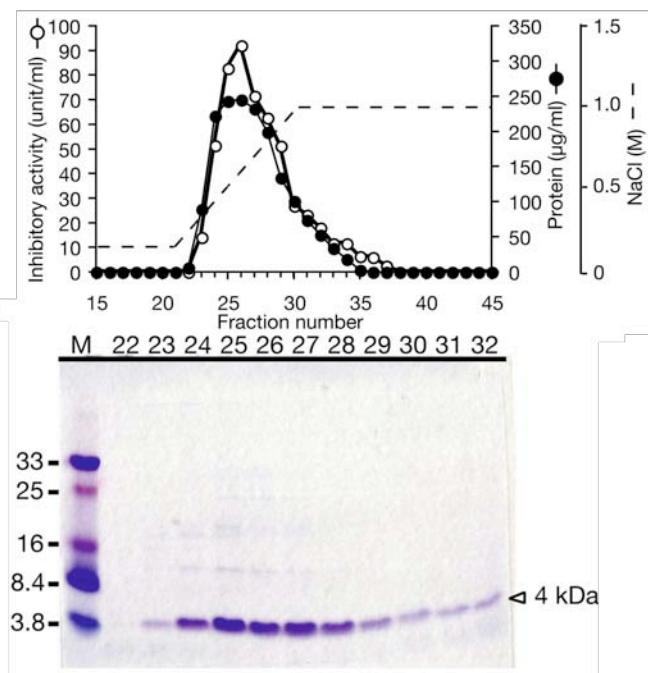


図 2 分子量約 4kDa のタンパク質の挙動とコロニースプレッディング阻害活性の挙動

(上) 陽イオン交換カラム溶出画分における阻害活性(白丸)、タンパク質量(黒丸)、塩濃度(点線)を示す。

(下) 溶出画分(22-32)について SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分析した。

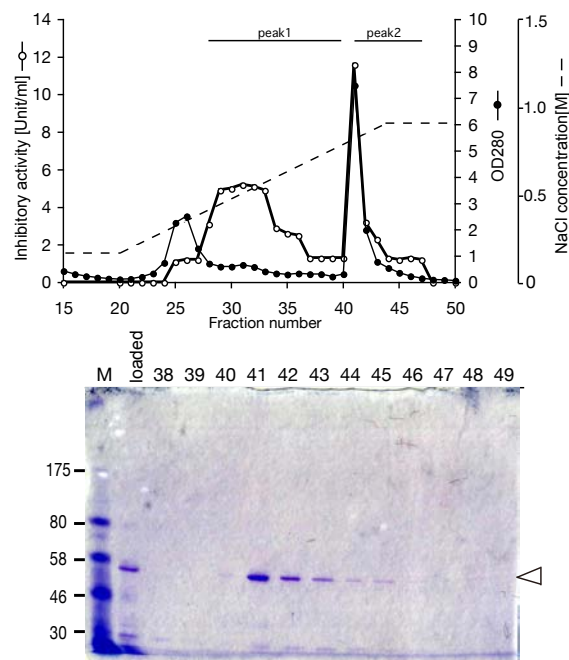


図 3 分子量約 50kDa のタンパク質の挙動とコロニースプレッディング阻害活性の挙動

(上) 陽イオン交換カラム溶出画分における阻害活性(白丸)、タンパク質量(黒丸)、塩濃度(点線)を示す。

(下) 溶出画分(38-49)について SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法により分析した。

プレッディングを抑制する活性を有することを示している。

4. コロニースプレッディング阻害因子 PSM α の同定

map 遺伝子と *hld* 遺伝子の2重破壊株の培養上清中にも、コロニースプレッディング阻害活性が検出されることから、 δ 溶血毒素と Map タンパク質以外のコロニースプレッディング阻害因子の存在が示唆された。私は、 δ 溶血毒素と似た2次構造をもち、両親媒性を示す PSM α タンパク質がコロニースプレッディング阻害活性を有するのではないかと考え、検討した。その結果、PSM α タンパク質の添加により、黄色ブドウ球菌のコロニースプレッディングが阻害されることが明らかとなった。*psm α* 遺伝子、*map* 遺伝子、*hld* 遺伝子の3重破壊株では培養上清中にコロニースプレッディング阻害活性は野生株の0.3%まで低下した(図4)。よって、私は、 δ 溶血毒素、Map、及びPSM α が、黄色ブドウ球菌が細胞外に分泌するコロニースプレッディング阻害活性の大部分を担っていると結論した。

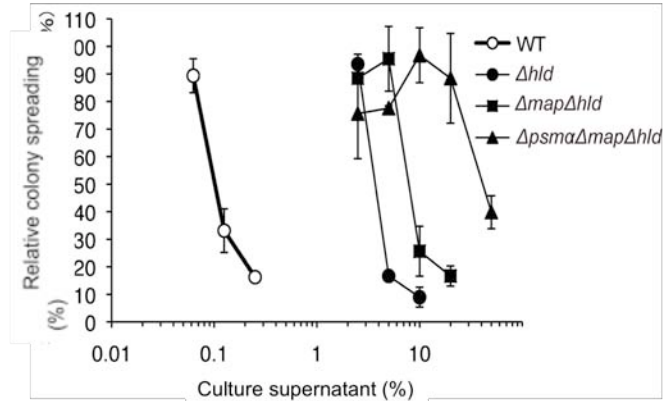


図4 遺伝子破壊した各黄色ブドウ球菌の培養上清中のコロニースプレッディング阻害活性

軟寒天培地への培養上清の添加割合(横軸)と無添加時を100%とした時のコロニースプレッディング距離(縦軸)を示す。

5. δ 溶血毒素によるコロニースプレッディング阻害機構の解析

培養上清中の活性の大部分を担った δ 溶血毒素について、そのコロニースプレッディング阻害機構の解析を行った。 δ 溶血毒素は疎水性に富んだ α ヘリックス構造を有する両親媒性ペプチドであり、界面活性作用を有することが知られている(図5A)。コロニースプレッディングは菌が集団を形成し広がっていく現象である。私は、 δ 溶血毒素の界面活性作用が菌体表面同士の相互作用を変化させ、コロニースプレッディングを阻害するのではないかと考え、検討した。

黄色ブドウ球菌は炭化水素であるヘキサデカンに吸着する性質を有することが知られている。 δ 溶血毒素の添加は黄色ブドウ球菌のヘキサデカンへの吸着量を減少させ

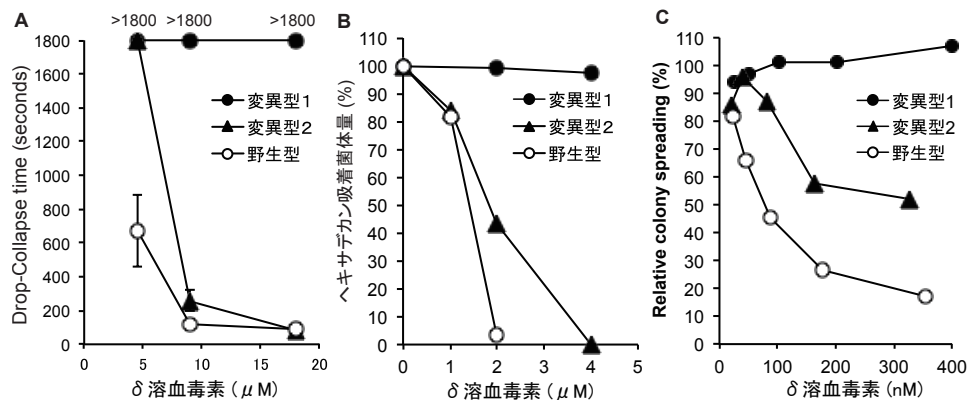


図5 野生型 δ 溶血毒素と変異型 δ 溶血毒素の界面活性、疎水性相互作用低下活性、コロニースプレッディング阻害活性

(A)各 δ 溶血毒素を添加した水滴が壊れるまでの時間を測定した。(B)ヘキサデカンと混合後、ヘキサデカン層に吸着した菌量を A_{600} により測定した。無添加時の吸着量を100%とし、各 δ 溶血毒素添加時の吸着量を算出した。(C)各 δ 溶血毒素を添加時のコロニースプレッディング距離を示す。

た(図 5B)。従って、 δ 溶血毒素は菌体表面と疎水性分子との疎水性相互作用を低下させることが示唆された。 δ 溶血毒素の界面活性作用による菌体表面同士の疎水性相互作用の低下がコロニスプレッディング阻害活性に必要なことを知る目的で、変異型 δ 溶血毒素を作出した(図 6)。この時、 α ヘリックス構造を破壊した変異型 δ 溶血毒素1は、コロニスプレッディング阻害活性を失い(図5C)、それとともに界面活性作用と疎水性相互作用を低下させる活性も消失していた(図5A,B)。また、N 末と C 末のアミノ酸を除いた変異型 δ 溶血毒素2のコロニスプレッディング阻害活性は減弱しており(図5C)、それとともに、界面活性作用と疎水性相互作用を低下させる活性も減弱していた(図5A,B)。以上の結果は、 δ 溶血毒素の界面活性作用による菌体表面の疎水性相互作用の低下が、コロニスプレッディング阻害に必要なことを示唆している。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26
野生型	M	A	Q	D	I	I	S	T	I	G	D	L	V	K	W	I	I	D	T	V	N	K	F	T	K	K
変異型1	M	A	Q	D	E	I	S	P	I	G	D	L	E	P	W	I	I	D	T	E	N	K	F	T	K	K
変異型2						I	I	S	T	I	G	D	L	V	K	W	I	I	D	T	V					

図 6 変異型 δ 溶血毒素のアミノ酸配列

[考察]

私は、黄色ブドウ球菌の培養上清中からコロニスプレッディング阻害因子の精製を行い、 δ 溶血毒素、Map、PSM α を同定した。 δ 溶血毒素と PSM α は哺乳類細胞に対する溶解活性を持ち、Map は T 細胞に結合して免疫機能を阻害する活性を有することが報告されている。本研究はこれらの黄色ブドウ球菌が分泌する毒素が黄色ブドウ球菌のコロニスプレッディングの負の調節に働いていることを明らかにした。細菌が分泌する毒素が自己の移動能力の調節に関与する例は知られておらず、本研究が初めて明らかにした。

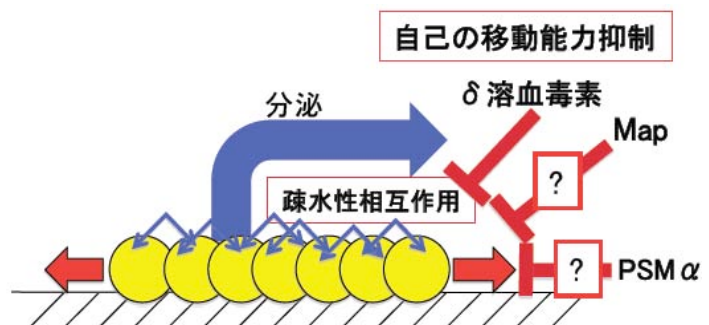


図7 黄色ブドウ球菌は自己の移動能力を低下させ宿主との共存を図る

黄色ブドウ球菌は細胞外に毒素を分泌し、自身のコロニスプレッディングを阻害することにより、宿主体内における移動能力を低下させ、自らの病原性を低下させているのではないかと私は考えている。このような病原性を抑える機構は、黄色ブドウ球菌の生存戦略として重要であると考えられる。今後、それぞれの阻害因子によるコロニスプレッディング阻害の黄色ブドウ球菌感染における意義を明らかにしていきたい。

[発表論文]

- (1) Kaito C, Omae Y, Matsumoto Y, Nagata M, Yamaguchi H, Aoto T, Ito T, Hiramatsu K, Sekimizu K. PLoS ONE. 2008; 3(12): e3921.
- (2) Kaito C, Saito Y, Nagano G, Ikuo M, Omae Y, Hanada Y, Han X, Kuwahara-Arai K, Hishinuma T, Baba T, Ito T, Hiramatsu K, Sekimizu K. PLoS Pathog. 2011 Feb 3;7(2):e1001267.
- (3) Ueda T, Kaito C, Omae Y, Sekimizu K. Microb Pathog. 2011 Sep;51(3):178-85.
- (4) Kaito C, Hirano T, Omae Y, Sekimizu K. Microb Pathog. 2011 Sep;51(3):142-8.