

Streptococcus suis の表層蛋白質に関する研究

大崎 慎人

Study on surface proteins of *Streptococcus suis*

Makoto OSAKI

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、*Sta. 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。*Sta. 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。それらのゲノム中には、通常2つ以上の*srtA* homologが存在し、また、これら*srtA* homologにコードされる蛋白質と*Sta. 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*Str. gordonii*についても、*Sta. 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、*Str.*

*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*Str. 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*Str. 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、遺伝子にコードされる蛋白質が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、菌体をmuramidaseで処理することで可溶化した細胞壁蛋白質の調製を行った。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。この遺伝子にコードされる蛋白質は、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、本蛋白質は、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*Str. 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。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、いずれの蛋白質も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と考えられた。

第2章では、*Str. 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、CWAPと細胞壁との結合におけるこれら遺伝子の役割を解析した。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間の相同性は低いことを踏まえ、*Str. 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*Str. 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110bp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。*Str. suis*の5つのSrt蛋白質と、*Sta. aureus* sortaseおよび*Str. gordonii* sortaseとを比較した結果、*Str. suis* SrtA蛋白質は*Str. 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蛋白質は、他の*Streptococcus*属菌の*gyrA*下流に位置する*srtA* homologにコードされる蛋白質に対して、55%~85%の相同性を示し、これらの蛋白質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*Str. suis srtA*で*srtA*破壊株を形質転換すると、このパ

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*が必要とされることを示した。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、*Str. 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*Str. 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、*Str. 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*Str. 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*と同等な機能を担うことが確認でき、これらは*srtA*の変異遺伝子であることが示された。*Str. 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、sortase遺伝子として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*Str. 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、本菌が環境の変化に適応し残存するための戦略に広く必要とされ、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、*Str. 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*Str. suis* CWAPの網羅的解析を併用して、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の研究が進行中であるが、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。