

論文内容要旨

Staphylococcus aureus の表皮剥脱毒素 ETA 遺伝子

プロモーター領域の解析

統合健康科学部門 小児歯科学

(主指導教員：香西 克之 教授)

統合健康科学部門 小児歯科学

(副指導教員：光畑 智恵子 助教)

基礎生命科学部門 細菌学

(副指導教員：久恒 順三 助教)

岩本 優子

論文内容要旨

論文題目

Staphylococcus aureus の表皮剥脱毒素 ETA 遺伝子プロモーター領域の解析

学位申請者 岩本 優子

黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* は、ヒトの皮膚、鼻腔、口腔などに存在するグラム陽性の常在菌であり、多様な疾患をおこすことが知られている。その中に、幼児や新生児皮膚に水疱を形成し、局所的な皮膚の剥脱を認める伝染性膿痂疹(Bullous impetigo)や、全身性の表皮剥脱を認めるブドウ球菌性熱傷様皮膚症候群(Staphylococcal Scalded Skin Syndrome; SSSS)がある。その水疱形成や表皮剥脱を引き起こす病原因子は、表皮剥脱毒素(Exfoliative toxin; ET)である。ET は、血清学的に ETA、ETB、ETD の 3 種が同定されており、いずれもセリンプロテアーゼ活性を有し、皮膚の表皮上層の細胞間接着を担うデスモグレイン 1 を選択的に切断して細胞間接着を脆弱にし、顆粒層付近で表皮剥脱、水疱形成を引き起こすことが知られている。ETA はブドウ球菌性水疱症から分離された *S. aureus* が産生する主要な ET である。しかし、*eta* 遺伝子の発現調節メカニズムについてはほとんど明らかにされていない。そこで、*eta* 遺伝子のプロモーター領域周辺に注目し、遺伝子発現に関連する因子を見出し、その制御メカニズムについての解析を行った。

eta 遺伝子上流領域に 2 か所のパリンδροーム様構造をみつけ、双方または一方ずつの配列欠損株を作製したところ、どれも ETA の産生量が著しく減少したことから、この領域が ETA 産生に重要であることを明らかにした。配列解析の結果、5'側に位置するパリンδροーム様構造は二成分制御系 SaeRS の response regulator である SaeR の認識配列、3'側はカタボライト制御に関与する転写調節因子 CcpA の認識配列に高い相同性を有することを見出した。

そこで、伝染性膿痂疹由来の ETA 産生株 TY34(WT)を用いて、*saeR* と *ccpA* の機能について調べるため、遺伝子欠損株および相補株を作製し、Real time (RT)-PCRにより *eta* 遺伝子の転写量を評価、また抗 ETA 抗体を用いた Western blottingにて ETA 産生量の評価を行った。その結果、*saeR* 遺伝子欠損株 (Δ *saeR*) においては、遺伝子およびタンパクレベルにおいて ETA の産生は検出限界以下であったが、相補株では、ETA の発現が WT と同程度まで回復した。一方、*ccpA* 遺伝子欠損株 (Δ *ccpA*) では、WT と比較してその発現は遺伝子およびタンパクレベルにおいて 10~20%程度に減少し、相補株ではそれらの

WT よりも著しく高かった。このことから、SaeR、CcpA は *eta* 発現を促進的に制御することが明らかとなった。

*in vivo*における ETA 産生 *S. aureus* の表皮剥脱活性は新生児マウス感染実験を用いて評価できる。WT を用いた場合に感染後約 6 時間で表皮剥脱活性が見られる条件で、 Δ *saeR* では全く表皮剥脱活性が認められず、 Δ *ccpA* においては WT と比較して表皮剥脱の遅延が認められた。これらの結果より、*in vivo*においても SaeR および CcpA によって ETA は促進的に制御されることが分かった。

続いて、SaeR と CcpA の 2 種の調節因子が直接 *eta* 上流領域に結合しているかどうかを調べるために、ゲルシフトアッセイを用いて解析した。SaeR と CcpA の認識配列を含む *eta* 上流領域の DNA 断片は、SaeR あるいは CcpA を加えると、上方へのシフトが確認でき、SaeR および CcpA はこの領域に直接結合することが示唆された。

さらに、*eta* 遺伝子上流の調節因子結合配列について調べた。パリンδροーム様構造中に存在する SaeR および CcpA の認識配列をそれぞれ様々に変異させた株を作製した。SaeR 認識配列については、数塩基の置換によって ETA 産生が全く認められなくなった。新生児マウス感染実験においても、全く活性が認められなかった。一方、CcpA 認識配列については数~十数塩基置換されると WT に対して ETA 産生が減少し、*in vivo*においても ETA 産生の減少に応じて活性が低下した。つまり、SaeR は認識配列を置換したことでその領域への結合ができなくなり、ETA の発現を ON にする機構が働かなくなった可能性が示唆された。CcpA は、認識配列を半数以上置換した株で、ETA の産生量が Δ *ccpA* と同等となったことから、配列の変異により ETA 産生に対する促進作用がなくなったと考えられた。これらの結果より、どちらの調節因子に関しても、*eta* 遺伝子上流領域に存在するそれぞれの認識配列が発現調節 OK に重要であるということが明らかになった。

以上の解析より、SaeR および CcpA は ETA 産生に対し促進的な調節をしていることが明らかになった。SaeR は ETA の産生において必須の因子と結論付けられ、ETA の産生に関しては ON/OFF というデジタルな制御をしていると示唆された。一方、CcpA による促進的な制御は ETA 産生量の調節を介して、水疱形成の重症度に影響するのではないかと考えられた。SaeR は環境因子に応答して働く二成分制御系のひとつであり、CcpA も糖取り込み系とリンクして働くことが報告されている。*S. aureus* は、ETA の産生に関して *eta* 遺伝子上流領域へのこれら調節因子の結合によって、外的環境に応じた毒素産生調節を行っている事が示唆された。