



Title	M6型A群レンサ球菌が産生する線毛の機能と発現機構の解析
Author(s)	木村, 敬次リチャード
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58417
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【33】

氏 名	木村 敬次 リチャード
博士の専攻分野の名称	博士（歯 学）
学 位 記 番 号	第 2 4 4 9 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 23 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学 位 論 文 名	M6型A群レンサ球菌が産生する線毛の機能と発現機構の解析
論 文 審 査 委 員	（主査） 教 授 川端 重忠 （副査） 教 授 大嶋 隆 准教授 和田孝一郎 講 師 田中 宗雄

論文内容の要旨

目的

A 群レンサ球菌 (Group A streptococci; GAS) はヒトを唯一の宿主とし、咽頭炎や膿瘍疹等の局所性化膿性疾患や、リウマチ熱や急性糸球体腎炎等の二次性続発疾患を惹き起こす。近年、GAS をはじめとする病原性グラム陽性球菌が線毛様構造物を産生することが報告されてきた。GAS の線毛遺伝子が位置する染色体領域 (FCT 領域) は、既報のゲノム配列の遺伝子構成を基に複数の型 (FCT 型) に分類されている。これまで、FCT II 型の線毛は付着因子として機能し、自己凝集やバイオフィーム形成に関与することが報告されており、線毛は病態の発症において重要な役割を担っていると推察される。本研究では、これまで詳細な解析が行われていない FCT I 型線毛の構造と発現機構について検討すると共に、その機能の検索を行い、病原性への関与を検討した。

方法

扁桃炎由来の M6 型臨床分離株である TW3558 株を以後の解析に用いた。既報の M6 型ゲノム配列を参照し、TW3558 株の FCT 領域とその近隣を含む全長約 12,000 塩基対の DNA 配列を解読した。線毛産生に関与する遺伝子群 (*tee6*, *fctX*, *srtB*) がポリシストロニックに転写されるかを RT-PCR 法により確認し、線毛遺伝子群の転写開始点を 5'RACE 法により決定した。線毛遺伝子の発現様式を検討するために、*srtB* の 3'側末端にルシフェラーゼ遺伝子を組込み、ルシフェラーゼ酵素活性を指標に線毛遺伝子の転写活性を検討した。また、FCT 領域に遺伝子が認められる転写因子 RofA が線毛の発現調節へ関与するかをリアルタイム RT-PCR 法とゲルシフトアッセイにより検討した。

解読した塩基配列を基に、*tee6*, *fctX*, *srtB*, および house-keeping sortase をコードする *srtA* のインフレーム欠失株を作製した。まず、線毛の構造を検討するため、T6 と線毛構成タンパクと考えられる FctX を異なる粒子径の金コロイドでそれぞれ標識し、全菌体を透過型電子顕微鏡で観察した。次に、各遺伝子の欠失と変異が線毛の構造と発現に与える影響を検討するために、各菌株の細胞壁画分における線毛タンパクの発現と培養上清への線毛の遊離をウェスタンブロット解析により検討した。さらに、機能検索として、各菌株のバイオフィーム形成能、自己凝集能、および菌体表層の疎水性を検討した。まず、ポリスチレンプレート上で各菌株を培養し、クリスタルバイオレットによる

染色と吸光度の測定により、バイオフィーム形成能を比較した。また、カバーガラス上に形成したバイオフィームの蛍光染色を行い、共焦点蛍光レーザー顕微鏡で観察した。次に、各菌株を対数増殖期まで振盪培養した後、静置し、培養液上層部の濁度を経時的に測定することにより凝集能を検討した。さらに、リン酸緩衝液に懸濁した菌体を *n*-ヘキサデカンと混和後、水層の濁度を測定し、各菌株の相対的な疎水性を算出した。最後に、線毛の病原性への関与を検討するため、自然免疫を有するカイコ幼虫の体液中に各菌株を感染させ、感染 24 時間後と 48 時間後に生死判定を行った。

結果と考察

TW3558 株の FCT 領域 DNA 配列を解読した結果、既報の配列と比較して、*rofA* 遺伝子内に 5 塩基の挿入が認められたが、線毛領域を含むその他の DNA 配列は相同であった。対数増殖期後期に最大となる線毛遺伝子群の転写は、*fctX* 開始コドンから 61 塩基上流に位置するアデニンから開始され、RofA により正に調節されることが示唆された。

免疫電子顕微鏡法と変異株を用いた解析から、T6 が主要構成タンパクであり、FctX は線毛副構成タンパクとして、線毛の先端に位置することが明らかとなった。SrtA と SrtB は T6 の重合に関与し、主に SrtB が FctX と T6 の複合体形成に機能することが示唆された。また、*srtA* の欠失により、培養上清への線毛の遊離が強く認められたことから、線毛の細胞壁への架橋には SrtA が必須であると考えられた。

線毛形成を担う各遺伝子の欠失により、バイオフィーム形成能は低下し、菌体凝集能は上昇した。供試した他の M6 型臨床分離株 4 株のうち 3 株について、*tee6* の欠失によりバイオフィーム形成能の低下と菌体凝集能の上昇が認められたことから、FCT I 型線毛はバイオフィーム形成に関与し、抗凝集因子として機能することが示唆された。また、*tee6* 欠失株表層の疎水性は野生株と比較して低下したことから、FCT I 型線毛は菌体表層の疎水性にも影響を与えることが推察された。さらに、カイコ感染実験において、*fctX* 欠失によりカイコ致死率が低下したことから、FctX が病原性に関与する可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、M6 型 *Streptococcus pyogenes* が産生する FCT I 型線毛の形成・発現機構およびその機能を解析したものである。分子生物学的手法ならびに免疫