The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | 肺炎球菌のコリン結合タンパク質が病原性に果たす役割の解析 |
| Author(s) | 東, 孝太郎 |
| Citation | 平成28年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書. 2017 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/60320 |
| rights | |
| Note | |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

申請先学部　　歯学部
採択番号　　No.　4

# 平成２８年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| ふりがな<br>氏　　名 | ひがし　こうたろう<br>東　孝太郎 | 学部<br>学科 | 歯学部<br>歯学科 | 学年 | 4 年 |
| ふりがな<br>共　同<br>研究者名 | あきやま　りょう<br>穐山　凌 | 学部<br>学科 | 歯学部歯学科 | 学年 | 3 年 |
| | | | | | 年 |
| | | | | | 年 |
| | | | | | 年 |

| | | | |
|---|---|---|---|
| アドバイザー教員<br>氏名 | 山口　雅也 | 所属 | 歯学研究科 |
| 研究課題名 | 肺炎球菌のコリン結合タンパク質が病原性に果たす役割の解析 | | |
| 研究成果の概要 | 研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。 | | |

【研究目的】

近年わが国では死因別死亡率の第 3 位に肺炎があり、市中肺炎の起因菌の多くを占めるのが肺炎球菌である。また乳幼児では中耳炎、副鼻腔炎、髄膜炎などの原因菌の一つである。現在日本で使用されている肺炎球菌 23 価莢膜多糖体ワクチンは有用であるが、その効果の持続性には問題があり、新たなワクチンの開発が期待されている。我々は口腔細菌学教室での基礎配属実習で肺炎球菌の細胞壁中に存在するタンパク質である Choline-binding protein (Cbp) についての研究を行い、肺炎球菌 (*Streptococcus pneumoniae* TIGR4) において *cbpL* 遺伝子欠失株と *cbpJ* 遺伝子欠失株の作製に成功した。この研究をさらに発展させ、病原性の有無や標的タンパクの性状を明らかにすることによって新しい肺炎球菌ワクチン開発の基盤研究になると考えた。

肺炎球菌の表層タンパクであるコリン結合タンパク質 (Cbp) の遺伝子欠失株をつくり、標的タンパク質の定着、侵入に関する病原性、宿主免疫機構に対する免疫反応性などの機能を解析する。

莢膜多糖体ワクチンの欠点を克服するために菌体表層タンパク質を抗原としたワクチン開発が必要である。そのワクチン抗原の候補となるタンパク質の性状を明らかにすることを目標とする。これによって将来のタンパク質抗原ワクチン開発の基盤となりうることに本研究の意義がある。

【研究計画】

1.　肺炎球菌遺伝子欠失株の作製

(1) 標的遺伝子の上流および下流 1000 bp 程度の相同配列とスペクチノマイシン耐性遺伝子 (*aad9*) の 3 つの配列をそれぞれ PCR 法で増幅する。

(2) PCR 法で *aad9* 遺伝子を間に挟むように 3 つの配列を結合し増幅する。

(3) できた DNA を肺炎球菌と混合し、コンピテンス刺激ペプチドを用いた形質転換を行う。

(4) 形質転換処理後の菌をスペクチノマイシン入りの寒天培地で培養する。

(5) 生えてきた菌は標的遺伝子が *aad9* と置き換わっている可能性があるため、コロニーダイレクト PCR を行う。

(6) アガロースゲルで電気泳動し、分子量の違いで遺伝子が欠失できているかを調べる。

2.　マウスへの感染実験（肺組織、血液組織）

(1) 遺伝子欠失株 (KO 株) と野生株 (WT 株) をそれぞれ数匹ずつのマウスに感染させる。

(2) 感染後、14 日間の死亡率を比較する。また、同様の感染実験を行い、感染 24 時間後の全マウスについて、組織中の菌数の変化、免疫細胞の数の変化、サイトカイン量の変化などを測定、解析し、統計学的有意差があるかどうかを調べる。

【研究経過・成果】

実験方法

<u>ゲノムデータベースを利用したコリン結合タンパク質の選出</u>

肺炎球菌のゲノムデータベースから、既報のコリン結合タンパク質である自己溶解酵素 LytA のアミノ酸配列を取得した。LytA のアミノ酸配列についてモチーフ検索することでコリン結合リピート配列を選出した。得られたコリン結合リピート配列を用いて BLAST 検索をすることにより、肺炎球菌 TIGR4 株のコリン結合タンパク質群を選出した。

<u>バイオインフォマティクス解析</u>

選出したコリン結合タンパク質群について、これまでに機能が報告されていない 3 種類のタンパク質を選出した。これらのコリン結合タンパク質について、肺炎球菌の菌株間における分布と Signal P server を利用したシグナル配列の予測、MOTIF サイトを利用したドメイン検索を行った。

遺伝子欠失株の作製

選出した 2 種類のコリン結合タンパク質について、肺炎球菌の TIGR4 株を親株とする遺伝子欠失変異株の作製を行った。対象となる遺伝子の上流および下流の遺伝子配列によってスペクチノマイシン耐性遺伝子 *aad9* を挟み込み、PCR によって結合させて増幅させた。増幅させた遺伝子断片をコンピテンス刺激ペプチドを用いて肺炎球菌に導入した。遺伝子欠失の確認は、抽出したゲノム DNA を用いた PCR 法にて行った。

マウス肺炎モデルにおける病原性の比較

肺炎球菌の野生株またはコリン結合タンパク質欠失変異株をマウスに経鼻感染させ、感染後 14 日間の生存率を比較した。

**結果**

BLAST 検索の結果から、肺炎球菌の TIGR4 株は 16 種類のコリン結合タンパク質を持つことが示された。文献検索の結果、16 種類のコリン結合タンパク質の内、CbpJ, CbpK, CbpL の機能が未知であることが明らかとなった。全ゲノムが解読されている肺炎球菌 28 株のデータベースを用いて、*cbpJ, cbpK, cbpL* の各遺伝子の分布を検索した。その結果、それぞれ 28 株中の 17 株、14 株、28 株に遺伝子が存在した。さらに、*cbpK* では遺伝子が存在する 14 株中 4 株に、*cbpL* では 28 株中 2 株にフレームシフト変異が存在した。一方、*cbpJ* についてフレームシフト変異を持つ株は存在しなかった。これらの結果から、肺炎球菌に広く分布しており、機能している可能性が高い *cbpJ* と *cbpK* について解析を試みた。

バイオインフォマティクス解析の結果、CbpJ, CbpL ともに推定シグナル配列を持つことが示された。また、CbpJ はコリン結合リピート配列以外の既報のドメインやモチーフを持たない一方で、CbpL はコリン結合リピート配列の他にカルシウム結合配列を持つことが示唆された。次に、肺炎球菌 TIGR4 株を親株として、*cbpJ* 遺伝子欠失変異株（Δ*cbpJ*）、*cbpL* 遺伝子欠失変異株（Δ*cbpL*）を作製した。各遺伝子欠失変異の確認は、精製したゲノム DNA と特異的プライマーを用いた PCR にて行った（図 1）。さらに、得られた肺炎球菌の株をそれぞれ CD1 マウスに経鼻感染させることで病原性を比較した。その結果、Δ*cbpJ* 株を感染させたマウスの生存率は、野生株（WT）感染マウスと比較して有意に高い（$P < 0.01$）結果が得られた。一方、Δ*cbpL* 株を感染させたマウスの生存率は、野生株（WT）感染マウスと比較して統計的な有意差は認められなかった（図 2）。

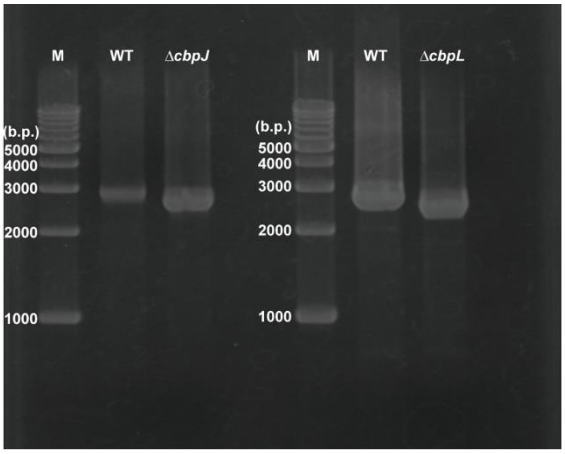


**図 1. PCR による遺伝子欠失変異の確認.**
M: DNA 分子量マーカー. WT: *S. pneumoniae* TIGR4 wild type strain. Δ*cbpJ*: *S. pneumoniae* TIGR4 Δ*cbpJ* strain. Δ*cbpL*: *S. pneumoniae* TIGR4 Δ*cbpL* strain.

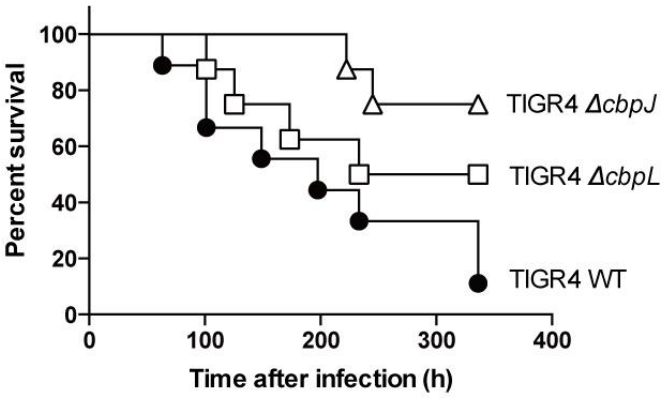


**図 2. 肺炎球菌を経鼻感染させたマウスの生存曲線.**

**結論**

バイオインフォマティクス解析による推定と、マウス肺炎モデルにおける結果から、肺炎球菌のコリン結合タンパク質 CbpJ が肺炎球菌の病原因子として機能することが示唆された。また、CbpL はマウス肺炎モデルにおいては病原性に大きな影響を与えない可能性が示された。今後は、CbpJ が肺炎球菌の病原性に寄与するメカニズムの解明を試みるとともに、ワクチン抗原としての可能性を検索する。