

助成番号 0826

黄色ブドウ球菌のカルジオリピン発現誘導による耐塩性メカニズム

森川 一也¹, 林 英生²¹筑波大学大学院人間総合科学研究科, ²中国学園大学現代生活学研究科

概要 黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) はヒトの鼻腔や皮膚に常在するが、多様な病原性を示し、易感染性宿主に対しては特に重篤な症状を起こしうる病原細菌でもある。様々な薬剤に対する耐性を比較的容易に獲得し、メチシリン耐性株 (MRSA) が院内感染因子として世界的に問題になっている。

本菌の大きな特徴として、高い浸透圧、たとえば、10%の食塩が存在する環境中、でも生育・増殖する能力が挙げられる。この能力によって、高濃度の食塩が添加された食品中でも生存し、食中毒を引き起こす。1970年代には *S. aureus* の「耐塩性の分子機構」が細菌生理学的なアプローチで解析され、特に細胞膜を構成するリン脂質成分が耐塩性に重要な役割を果たすことが示唆されていた。しかしながら、リン脂質成分がどのように変動してどの程度耐塩性に寄与しているか、その詳細は明らかになっていない。そこで本研究では、特にカルジオリピンの環境応答性に焦点をあてて、本菌の耐塩性の分子機構を検討した。

リン脂質成分の変動を再検討した結果、定常期にかけて増加する成分がカルジオリピンであることが確認された。分子遺伝学的な解析によって、カルジオリピン合成遺伝子を二種類同定することに成功し、これらの二重破壊株ではカルジオリピンを全く合成できないことを明らかにした。さらに、カルジオリピンが、1) 高塩濃度環境での増殖自体には必須ではないが、2) 高塩濃度での長期生存および高浸透圧ショックに対する生存に重要であることを明らかにした。また、二種類のカルジオリピン合成酵素のうち、一つは、高塩濃度環境下で特異的に働いている可能性を示唆する結果を得た。

1. 研究目的

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) はヒトの鼻腔や皮膚に常在するが、免疫力が低下した宿主に対しては多様な病原性を示す病原細菌でもある。様々な薬剤に対する耐性を比較的容易に獲得し、メチシリン耐性株 (MRSA) が院内感染因子として世界的に問題になっている。現在ではバンコマイシン耐性をも獲得した例が報告されはじめ、抗生物質が全く効かない *S. aureus* の出現を想定した新たな征圧法開発が必要な状況にある。

本菌の大きな特徴として、高い浸透圧、たとえば、10%の食塩が存在する環境中でも生育・増殖する能力が挙げられる。この能力によって、高濃度の食塩が添加された食品中でも生存し、食中毒をしばしば引き起こす。1970年代には *S. aureus* の「耐塩性の分子機構」が細菌生理学的なアプローチで解析され、特に細胞膜を構成するリン脂質成分・カルジオリピンが耐塩性に重要な役割を果たすこと

が示唆され、また浸透圧環境に応答して特定のリン脂質成分の存在量が増加することが見出されていた (Kanemasa *et al.*, 1972) (Kanemasa *et al.*, 1976)。しかしながら、リン脂質成分がどのようなメカニズムで変動してどの程度耐塩性に寄与しているかは全く分かっていない。本研究は、特に細胞膜の環境応答性に焦点をあてて、*S. aureus* の環境適応、特に耐塩性の分子機構を検討することを目的とした。

2. 研究方法

黄色ブドウ球菌の培養には LB 培地を基本として用い、塩濃度を変更した。遺伝子破壊株の作成は温度感受性プラスミドを利用した相同組換え体の選別による (Arnaud *et al.*, 2004)。脂質抽出・Thin layer chromatography・リン脂質の検出は定法に従った (Kanemasa *et al.*, 1972)。ただし、脂質抽出直前にリゾスタ

フィン処理によって細胞壁を破壊した。

3. 結果と考察

3.1 リン脂質変動様式の検証

1970年代の研究によって、黄色ブドウ球菌のリン脂質のうちカルジオリピンが増殖相後期～定常期にかけて増加すること、また高塩濃度環境でも増加することが示唆されてきたが、統一した解析系での検証はなされていなかった。そこで、我々は本菌の増殖相・高塩濃度環境にตอบสนองするリン脂質プロフィールの変動様式を再検証することから始めた(図1)。

菌株としては、全ゲノム配列が解読されている N315 株を用いた。対数増殖期から定常期にかけて増加する成分(図1成分1)および、高塩濃度で若干の増加が見られる成分(図1成分2)が見られたが、これらは同一の成分ではなかった。以前の報告より定常期で増加する成分はカルジオリピンであることが確認されていたので、高塩濃度で増加する成分2の同定を試みた。薄層クロマトグラフィーで分離した当該成分を抽出し、MALDI-TOF-MSにより解析した結果、その分子量は915であった(図2)。脂質代謝マップ(KEGG Pathway)を検索した結果、本成分は phosphatidylglycerophosphate (PGP) であることが示唆された。すなわち、定常期で増加する成分はカルジオリピンであり、高塩濃度で増加する成分は PGP であった。

3.2 リン脂質合成酵素ホモログ群の分子遺伝学的解析

図3にリン脂質の合成経路を示す。黄色ブドウ球菌のカルジオリピン合成酵素、PGP合成酵素は未知であるが、大腸菌や枯草菌ではこれらを触媒する酵素が同定されており、そのホモログが本菌にも見出される。PGP合成酵素の黄色ブドウ球菌でのホモログは SA1126 遺伝子に、カルジオリピン合成酵素ホモログは *cls1* 遺伝子および *cls2* 遺伝子にコードされる。*cls1* と *cls2* はパラログである。まず、これらの破壊株を作成し、リン脂質成分の変化を検証した。

PGP合成酵素は枯草菌では必須遺伝子であることが示唆されていたので、そのホモログ SA1126 の破壊株はコンディショナルミュータントとして作成した。本株では IPTG 存在下では SA1126 が発現するが、IPTG 非存在下では発現しない。予想に反して、SA1126 破壊株は IPTG 非存在下でもその増殖速度は変化せず、また PGP の消失はみられなかった(図4A)。今後の課題として SA1126 の完全破壊

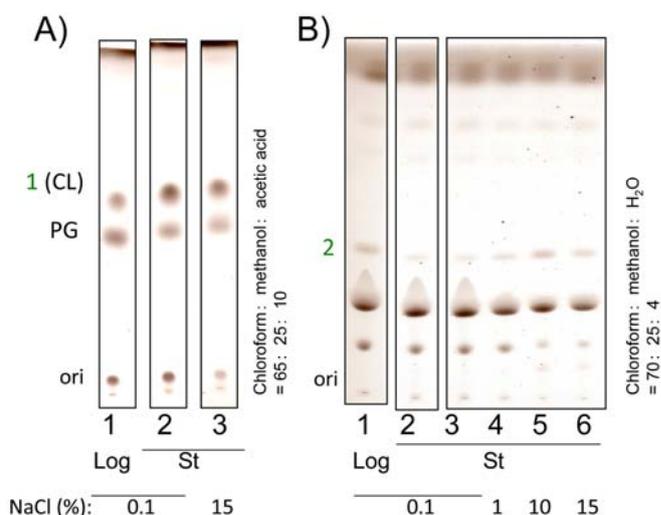


図1. *S. aureus* N315 のリン脂質成分比較。対数増殖期(Log)・定常期(St)の別、NaCl 濃度を各レーン番号の下に記す。展開液の組成はパネル右に示した。成分1(カルジオリピン, CL)は定常期で増加し、成分2は高塩濃度で増加した。PG:フォスファチジルグリセロール。

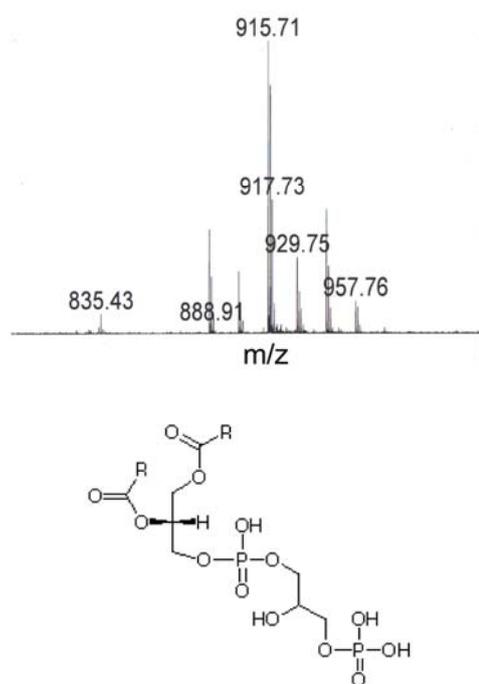


図2. 図1で検出した成分2の質量分析結果。主要成分の分子量は915であり、アシル基の長さに応じた分子種が観察される。フォスファチジルグリセロリン酸(PGP)の分子量に一致する。PGPの分子式を下に示す。

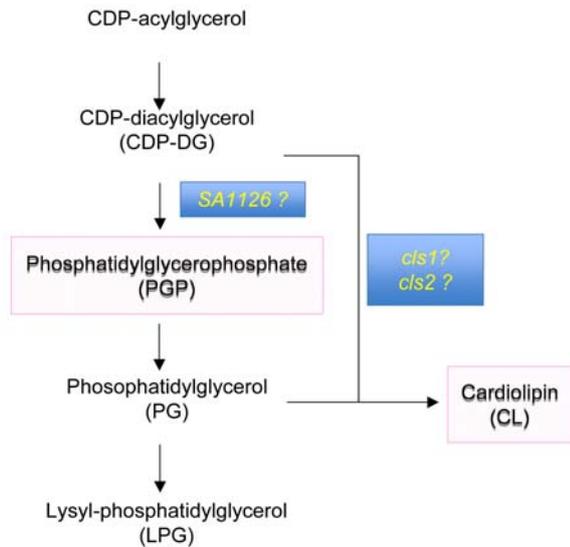


図 3. 黄色ブドウ球菌のリン脂質合成経路 (KEGG Pathway より改変)。相同性検索より、SA1126 が PGP 合成酵素であることが予測された。カルジオリピン合成酵素のホモログとしては二種類の遺伝子 (*cls1*, *cls2*) が存在した。

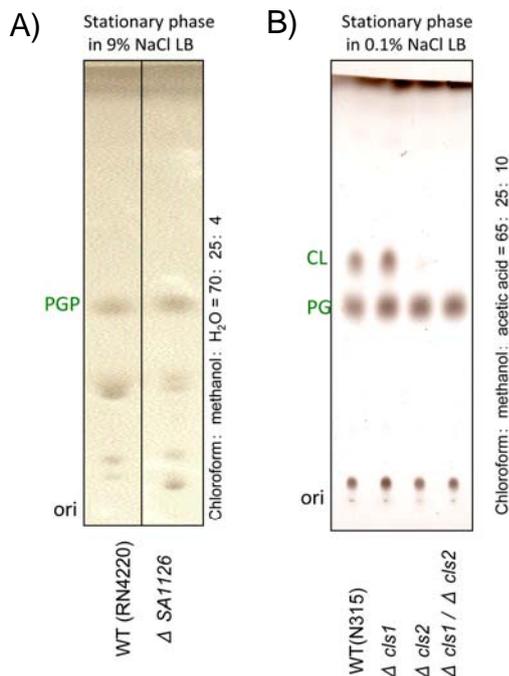


図 4. 各遺伝子破壊株におけるリン脂質成分解析。A) SA1126 コンディショナルレプレーターでは PGP の消失は見られなかった。B) *cls* 遺伝子の破壊により、カルジオリピンシグナルが消失した。特に二重破壊株ではこの後の実験においても全くカルジオリピンが検出されない。*cls1* と *cls2* 破壊株のカルジオリピン量は条件により変動する(後述)。

株を作成して再検討する必要があるが、SA1126 の機能を補完する酵素が存在するのかもしれない。

カルジオリピン合成酵素遺伝子のホモログは二つ存在したので、それぞれの破壊株および二重破壊株を作成した(図 4B)。*cls1* 破壊株ではカルジオリピンの蓄積量は変化せず、また、*cls2* 破壊株では有意な減少が見られたが完全に消失することはなかった。二重破壊株では、カルジオリピンが検出されないレベルまで低下した。このことから、黄色ブドウ球菌では *cls1* と *cls2* の双方がカルジオリピン合成酵素の遺伝子であることが示唆され、さらに環境によるこれらの遺伝子の使い分けの可能性が示唆された。これに関しては 3. 4 章で述べる。

3. 3 高塩濃度での生存におけるカルジオリピンの重要性

カルジオリピンを合成できない株 (*cls1 cls2* 二重破壊株) を得ることができたので、これを用いてカルジオリピンの細胞増殖や高塩濃度下での生存における重要性を検討した。

カルジオリピンの蓄積量は定常期において増加する(図 1)ことから、細胞の増殖において何らかの役割を果たすことが予想された。大腸菌においてもカルジオリピンと細胞増殖の制御の関連が示されている。しかし、本菌においては親株とカルジオリピン欠損株の増殖速度には全く差が見られなかった(図 5)。また、定常期における生菌数 (cfu 値) にも変化は見られなかった(図 5A)。

次に、高塩濃度環境におけるカルジオリピンの重要性を検討した。15% 食塩存在下での親株とカルジオリピン欠損株の増殖曲線には変化がなかった。ところが、15% 食塩存在下の定常期における生菌数をみると、カルジオリピン欠損株では有意に生存率が減少していた(図 5B)。

図 6 では、高浸透圧ショックに対するカルジオリピンの重要性を検討した。細胞を低塩濃度の培地で培養し、これを 25% の食塩に曝して生存率を比較したところ、カルジオリピン欠損株は約 2 倍程度であるが感受性が上昇していた。以上のことから、カルジオリピンは高塩濃度での長期生存や高浸透圧ショック耐性において重要な成分であることが示唆された。

なお、枯草菌のカルジオリピンは高塩濃度での増殖に重要であることが報告されている。これに対して、黄色ブドウ球菌ではカルジオリピンは高塩濃度での増殖自体には

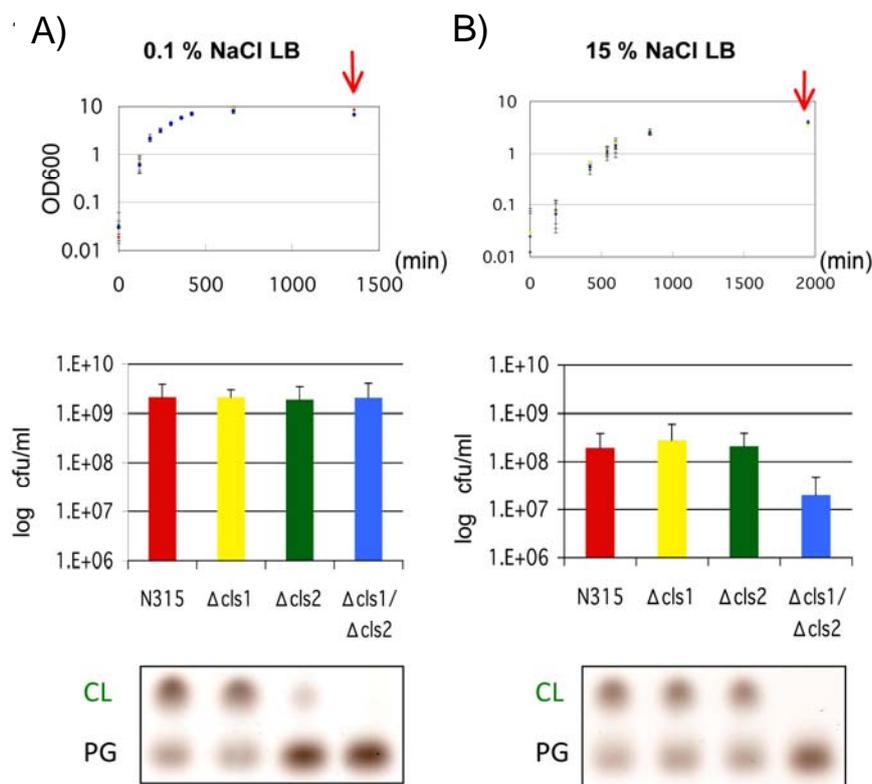


図 5. 各遺伝子破壊株の定常期における生存率。A) 0.1% NaCl 含有 LB 培地 B) 15% NaCl 含有 LB 培地 上段: N315, Δ cls1, Δ cls2, Δ cls1/ Δ cls2 各株の増殖曲線に有意な差は見られない。サンプリングポイントを赤矢印で示す。中段: 定常期における各株の生菌数を示す (log cfu/ml)。下段: 定常期におけるカルジオリピン蓄積量の比較。

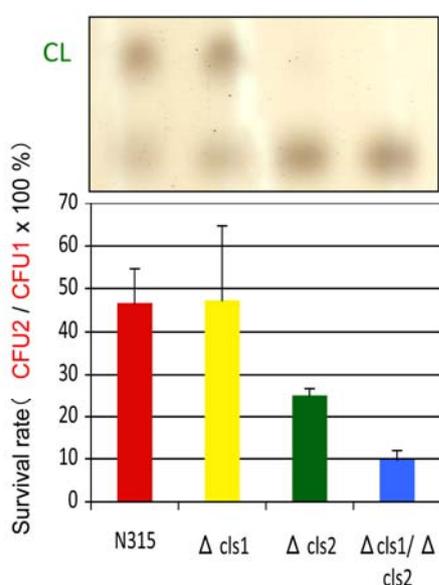


図 6. 高濃度 NaCl ショックに対する各株の生存率比較。1% NaCl 含有 LB 培地で培養した各株を 25% NaCl 含有 LB 培地に曝し、その後の生存率を CFU から算出した。上段には、25% NaCl 含有培地に曝す前の細胞から抽出した脂質の解析結果を示す。

必須ではないことが明らかになったが、このことから、黄色ブドウ球菌においては他の浸透圧調節系などがカルジオリピンの欠損を補っているのではないかとと思われる。

高塩濃度(9% 食塩)で定常期まで培養した N315 および各破壊株を低浸透圧(0.1% NaCl LB 培地)に移しても菌は増殖を開始し、濁度上昇の程度は株間で相違がなかった。

3. 4 二種類のカルジオリピン合成酵素の使い分けの可能性

図 7 に、各株の各条件でのカルジオリピン蓄積量をまとめる。*cls2* 破壊株(*cls1* カルジオリピン合成酵素遺伝子のみを持つ株)は低塩濃度下でカルジオリピンを合成しなかったが、高塩濃度でカルジオリピンを合成できるようになった。この現象は二重破壊株を用いることによって消えた。この結果から、Cls1 カルジオリピン合成酵素は高塩濃度下のみ働くと考えられる。また、普通の塩濃度下で、*cls1* 破壊株のカルジオリピン蓄積量は親株とほとんど変わらず、定常期に向かって増加する。従って、Cls2 カルジオリ

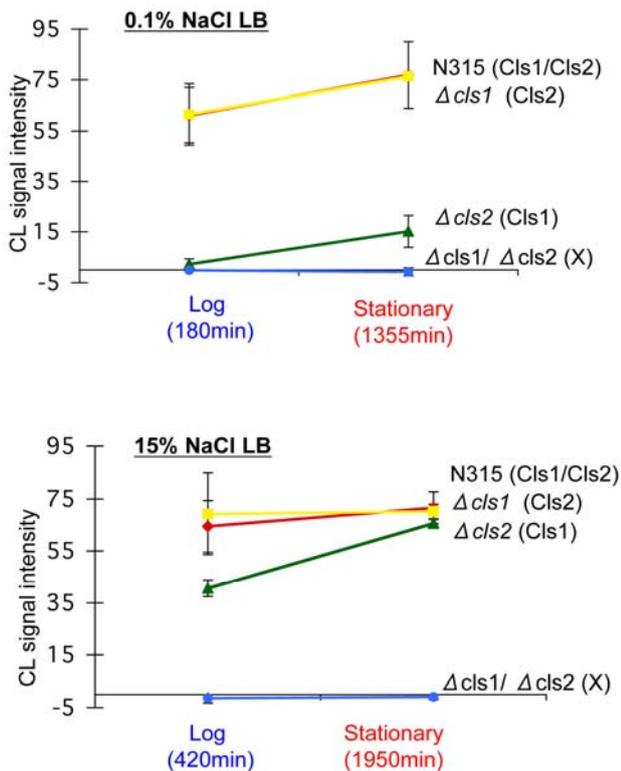


図 7. 各 *cls* 破壊株のカルジオリピン蓄積量のまとめ。上段:0.1% NaCl 含有 LB, 下段:15% NaCl 含有培地。

ピン合成酵素が通常時に主に働いていると思われる。

3.5 抗菌剤作用におけるカルジオリピンの関与

各種薬剤、特に浸透圧と関連する細胞壁合成阻害剤の効果を N315 および各遺伝子破壊株で比較した。

細胞壁合成阻害剤:バンコマイシン、テイコプラニン、セファロチン、セフメタゾール、セファゾリンに対する感受性は変化がなく、その他キノロン系薬剤(オフロキサシン、ノルフロキサシン、シプロフロキサシン、ナリジクス酸)、アルベカシンに対する感受性も変化がみられなかったが、唯一、細胞膜におけるリポ II サイクル(細胞壁コンポーネントを細胞外に輸送するシステム)を阻害するバシトラシンに対する感受性が、*cls1* 破壊株、*cls2* 破壊株双方で上昇していた。

また、以前からの我々の共同研究(Zhang *et al.*, 2005)により、抗菌ペプチドに対する感受性にカルジオリピンが関与する可能性が期待されたので、抗菌ペプチドの一種 ASABF- α に対する感受性を各株で測定したが、有意な変化は検出されなかった。

4. 展望

リポソームにカルジオリピンを加えることにより、浸透圧の変化に対する脂質膜の安定性が増すことが知られる(Nagamachi *et al.*, 1992)。また、枯草菌においてはカルジオリピン欠損が高塩濃度での増殖を低下させることが知られる(Lopez *et al.*, 2006)。黄色ブドウ球菌においても、カルジオリピンが高塩濃度環境への適応において重要な役割を果たす可能性が 1970 年代に指摘されていた(Kanemasa *et al.*, 1972)(Kanemasa *et al.*, 1976)。本研究では、カルジオリピンの蓄積量は、少なくとも N315 株では高塩濃度環境で顕著に増加することはなかったが、これは 209P 株を用いた過去の報告と異なる。しかしながら、カルジオリピンが黄色ブドウ球菌における高塩濃度耐性に関与することを示唆してきた細菌生理学的な結果と今回の研究結果には矛盾がなく、本研究ではカルジオリピンは高塩濃度での生存や高塩ショック耐性に重要であることを分子遺伝学的に明らかにすることに成功した。

本研究では *cls1* および *cls2* が共にカルジオリピン合成酵素として機能しうることをあきらかにすることができたが、複数酵素が存在することの意義については明らかになっておらず、今後の課題である。本研究で用いた実験条件では *cls1* 遺伝子を破壊することによる表現型(細胞増殖、定常期における生存率、カルジオリピン蓄積総量、高塩濃度ショック耐性)の変化は全く見られなかった。*cls1* が高塩濃度環境下でのみ機能することが何を意味するのかを明らかにすることができれば、本菌の二種のカルジオリピン合成酵素の役割が解明できるかもしれない。同時に、*cls2* が機能せず、*cls1* のみが機能しうる環境を探索することも、各酵素の使い分けを理解する上で重要であろう。

コンピュータによる局在予測では、*cls1* が細胞外、*cls2* が細胞内膜上に存在することが予想される。また、枯草菌ではカルジオリピンは細胞の極に局在することが観察されている(Kawai *et al.*, 2004)。これらは、二種のカルジオリピン合成酵素の局在の違いを示唆するものであるので、今後検討していく予定である。

謝辞

本研究の実験の多くは筑波大学大学院人間総合科学研究科の蔡孟需さん(M1)が行った。また、抗菌ペプチド耐性は農業生物資源研究所の加藤祐輔先生に測定し

ていただいた。

参考文献

- Arnaud M, Chastanet A, Debarbouille M (2004) New vector for efficient allelic replacement in naturally nontransformable, low-GC-content, gram-positive bacteria. *Appl Environ Microbiol* 70:6887-6891.
- Kanemasa Y, Takatsu T, Sasai K, Kojima I, Hayashi H (1976) The salt-resistance mechanism of *Staphylococcus aureus* examined by salt-sensitive mutants. *Acta Med Okayama* 30:271-276.
- Kanemasa Y, Yoshioka T, Hayashi H (1972) Alteration of the phospholipid composition of *Staphylococcus aureus* cultured in medium containing NaCl. *Biochim Biophys Acta* 280:444-450.
- Kawai F, Shoda M, Harashima R, Sadaie Y, Hara H, Matsumoto K (2004) Cardiolipin domains in *Bacillus subtilis* marburg membranes. *J Bacteriol* 186:1475-1483.
- Lopez CS, Alice AF, Heras H, Rivas EA, Sanchez-Rivas C (2006) Role of anionic phospholipids in the adaptation of *Bacillus subtilis* to high salinity. *Microbiology* 152: 605-616.
- Nagamachi E, Hirai Y, Tomochika K, Kanemasa Y (1992) Studies on osmotic stability of liposomes prepared with bacterial membrane lipids by carboxyfluorescein release. *Microbiol Immunol* 36:231-234.
- Zhang H, Morikawa K, Ohta T, Kato Y (2005) *In vitro* resistance to the CSalphabeta-type antimicrobial peptide ASABF-alpha is conferred by overexpression of sigma factor *sigB* in *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 55:686-691.

No. 0826

Cardiolipin Synthases Are Critical to Survive under High NaCl Concentration in *Staphylococcus aureus*

Kazuya Morikawa¹ and Hideo Hayashi²

¹ Graduate School of Comprehensive Human Sciences, University of Tsukuba

² Chugoku Gakuen University

Summary

Staphylococcus aureus naturally inhabits on the nasal cavity of warm-blooded animals, but is also an opportunistic human pathogen. It is well known as a salt resistant bacterium, and can proliferate even under 10 ~ 15% NaCl concentration. Some studies in 1970's have described that its phospholipids, cardiolipin (CL) and phosphatidylglycerol (PG), are differentially accumulated depending on the growth conditions, such as the distinct growth phases and the salt concentration, implying the possible importance of the phospholipid dynamics in the stress tolerance. In this study, we aimed to clarify the significance of the CL dynamics in the survival under the high salt environment as well as the regulatory mechanism(s) of the CL synthesis.

Our analysis using *S. aureus* strain N315 indicated that the CL increased towards the stationary phase in line with the previous study. However, it was unexpected that it did not significantly increased under high salt condition. The disruption of two homologues of *B. subtilis* CL synthase genes diminished the CL synthesis. CL was not necessary for the growth irrespective to the salt concentrations, but was critical for the prolonged survival under high salinity and for the resistance against hypertonic shock. In addition, one of the *cls* genes was found to specifically work under high salinity, implying the possible distinct roles of the two *cls* genes in *S. aureus*.