

## 博士論文

論文題目 黄色ブドウ球菌のN-acetylglucosamine malate  
脱アセチル化酵素を介した糖尿病宿主に対する  
病原性発揮機構の解明

氏 名 石井 雅樹

博士学位論文

黄色ブドウ球菌の N-acetylglucosamine malate  
脱アセチル化酵素を介した糖尿病宿主に対する  
病原性発揮機構の解明

東京大学大学院 薬学系研究科  
微生物薬品化学教室

平成 24 年度入学 石井雅樹

# 目次

|   |    |
|---|----|
| 序章  | 1  |
| 第一節 生物の相互作用                                     |    |
| 第二節 ヒトのコミュニケーション                                |    |
| 第三節 薬学による課題の解決                                  |    |
| 第四節 糖尿病と黄色ブドウ球菌感染症                              |    |
| 第一章 黄色ブドウ球菌の <i>ddvA</i> 遺伝子とその糖尿病宿主に対する病原性への寄与 | 6  |
| 第二章 黄色ブドウ球菌の DdvA タンパク質の機能解析                    | 10 |
| 第三章 GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素活性と糖尿病宿主に対する病原性          | 15 |
| 第四章 DdvA タンパク質の相互作用因子 Dbp タンパク質の機能解析と病原性        | 19 |
| 終章 総括と今後の展望                                     | 23 |
| 材料と方法   | 31 |
| 参考文献  | 40 |
| 図表  | 52 |
| 謝辞  | 72 |

# 序章

## 第一節 生物の相互作用

生物は常に相互作用している。相互作用は分子間、細胞間、個体間など様々なスケールで引き起こされている。個体間の相互作用の中には、同種族間および他種族間での相互作用が含まれる。我々人間を例に取れば、ヒトとヒトとの会話、スポーツにおける競争、学問における議論が前者にあたる。また、ヒトがペットの亀やカブトムシを飼育すること、霜降和牛を食べること、不忍池のコイや上野公園のハトに餌をやることは後者にあたるだろう。このような生物種内、生物種間における相互作用がここまで生物を進化させる原動力となった。生物がこのように複雑で多様に進化してきたのは単なる火山の噴火や氷河期の到来や隕石の衝突では説明されない。そこには常に同種および他種との相互作用が存在したはずである。ある種の真菌は抗生物質を産生することで周辺の細菌が増殖できないようにすることで栄養素の争奪戦に勝利することができた。また、ある細菌は抗生物質を分解するタンパク質を産生することで奪われた栄養素を取り戻す事ができた。桑の葉には昆虫の成長を妨げる物質が含まれているが、カイコはその物質に抵抗性を持つことで、食草として桑を独占することができた。このように生物間相互作用は生物の進化および生死に大きく作用してきた。

## 第二節 ヒトのコミュニケーション

ヒトが他の生物と異なる点はなんであるか。この問いに対して、私はコミュニケーションによる情報の水平もしくは垂直伝達能の高さであると考え。確かに子供に狩りのやり方を教えるライオンがいるかもしれないし、カラスはゴミの在処を仲間伝えていているかもしれない。しかし情報を伝え、各個体間で相互作用するという点においてヒト以上に卓越した生物はいない。ヒトは言語を開発し、文字を作る事で、直接にはコミュニケーションを取り得ない時空間的に離れた相手とコミュニケ

ーションを取る手段を身につけた。ヒトは情報を言語に変換することで、突然変異と自然淘汰というシステムを用いずに環境に適応する術を手に入れた。この遺伝学的な進化を介さない教育という名の情報の垂直伝播によって、現在ヒトは爆発的にその人口を増加させ、寿命を延長させている。

しかし、ヒトが身につけたこのような情報の伝達法は、現在ヒトに様々な問題を突きつけている。自然淘汰を伴わない寿命の延長は、認知症や癌といった自然環境では稀な疾患を増加させた。また、急速な生活環境の変化は、糖尿病、高脂血症、肥満といった生活習慣病を増加させた。このような課題に対し、ヒトが取り得る解決策は情報の言語化と教育である。科学、特に薬学はこの手法により様々な疾患に対する解決策を導き出す手段となり得る。

### 第三節 薬学による課題の解決

薬学と一言でいっても、この中には多くの学問領域が混在している。では、一般に薬学における目標はなんだろうか。それは薬を介した人類の幸福の増進という事になるのだろう。では、そのためにはどのような手段が考えられるか。大きく分けてそこには医療薬学的な手段と基礎薬学的な手段が考えられる。基礎薬学はさらに有機化学的な手段と生物学的手段が考えられる。つまり全く新しい化合物の創出やより安価で簡便な化合物の合成法を開発することで、新規リード化合物を作出し、それを安価に提供することで、人類の幸福に貢献するという手段が有機化学的手段である。また、化合物が作用する宿主もしくは病原体について研究することで、薬剤の新たな標的を発見し、人類の幸福に貢献する手段が生物学的手段である。生物学的手段はつまり、生物の相互作用についての情報を蓄積することに他ならない。それは糖尿病患者の血中でグルコースがどのように身体に作用するかを検討することであり、病原体がどのように宿主に病原性を発揮するか検討することである。私

はこの生物学的な手段によって人類の幸福に貢献したいと考えている。

#### 第四節 糖尿病と黄色ブドウ球菌感染症

糖尿病は慢性的な高血糖を示す疾患である(Zimmet et al., 2001)。その患者数は全世界で4億人を越え、現在も増加し続けている(IDF, 2015)。糖尿病患者は感染症を併発することが知られている。糖尿病患者数の増加とともに併発して起こる感染症の予防および治療法の確立は重要である。黄色ブドウ球菌はヒトの皮膚や鼻腔に存在する常在菌である。黄色ブドウ球菌が健常人において重篤な感染症を発症することは稀であるが、糖尿病患者では敗血症、心内膜炎、足部潰瘍などの侵襲性の感染症を引き起こす(Jacobsson et al., 2007; Kanafani et al., 2009; Laupland et al., 2003)。病原性細菌の病原性を発揮する機構を理解し、それを担う分子(病原性因子)の機能を知ることは感染症の予防法および治療法を確立するために重要である。宿主環境中での増殖に必要な病原性因子は新規治療薬の標的となると期待される。さらに、病原性因子のタンパク質としての酵素活性を研究することは、その因子の病原性発現における働きを理解するばかりでなく、活性の阻害を指標とした新規治療候補化合物のスクリーニング系の構築にも有用である。

我々は、カイコの餌にグルコースを混ぜ与えることで、哺乳類の糖尿病状態を模擬した糖尿病モデルカイコを確立している(Matsumoto et al., 2014; Matsumoto et al., 2011)。また、様々な病原菌による感染モデルを確立している(Ishii et al., 2015b; Kaito et al., 2002)。さらにこれら二つのモデルを組み合わせることで、糖尿病カイコ感染モデルを確立した。この糖尿病モデルカイコを用いて、糖尿病宿主に対する病原性に必要な黄色ブドウ球菌の遺伝子を探索し、*ddvA* (*diabetic-state dependent virulence factor against silkworm A*)、*isdA* (*iron-regulated surface determinant A*)、*gdpS* (*GGDEF domain containing protein from Staphylococci*) の3つの遺伝子を見出している。これ

ら遺伝子を欠損した黄色ブドウ球菌は糖尿病モデルマウスに対する病原性の低下を引き起こすことを見出している。これら遺伝子のうち *isdA* 遺伝子についてはヘム鉄の取り込みに重要な働きを持つ事が知られている (Mazmanian et al., 2003)。また、近年 *gdpS* 遺伝子は黄色ブドウ球菌の病原性に関与するバイオフィーム形成や *sarS* 遺伝子を介したプロテイン A の発現に重要な機能を持つと報告されている (Chen et al., 2015; Fischer et al., 2014; Holland et al., 2008; Shang et al., 2009)。しかし DdvA タンパク質がどのように病原性に寄与するかは分かっていなかった。私はこの因子の機能を知る事で黄色ブドウ球菌の糖尿病宿主に対する新規の病原性発揮の分子機構を明らかにでき、最終的には糖尿病において併発する黄色ブドウ球菌感染症の治療標的となるのではないかと考え、この因子の病原性発揮機構について研究した。

## 第一章

黄色ブドウ球菌の *ddvA* 遺伝子とその糖尿病  
宿主に対する病原性への寄与

## 第一章 黄色ブドウ球菌の *ddvA* 遺伝子とその糖尿病宿主に対する病原性への寄与

糖尿病で併発する黄色ブドウ球菌感染症の病態理解および新規治療標的の探索のため、我々は黄色ブドウ球菌の糖尿病宿主に対する病原性因子の探索を行った。その際にカイコ<sup>1</sup>の黄色ブドウ球菌感染モデルを用いた。近年、我々はカイコにグルコースを含んだ餌を与えることで、体液中グルコース濃度の増加、インスリン低感受性、糖付加体の増加といった糖尿病でみられる諸症状を呈するカイコ糖尿病モデルを確立している。カイコ感染モデルとカイコ糖尿病モデルを組み合わせ、糖尿病カイコ感染モデル確立し、黄色ブドウ球菌の糖尿病宿主に対する病原性因子の探索を行った。糖尿病カイコに対しては病原性が変化せず、通常カイコに対しては病原性の低下する黄色ブドウ球菌の遺伝子破壊株を探索した結果、*ddvA*、*isdA*、*gdpS* の 3 種類の遺伝子破壊株を同定した。これら 3 つの遺伝子のうち *ddvA* 遺伝子は機能が分かっていなかった。そこで、黄色ブドウ球菌の新規病原性発揮機構を解明するため、*ddvA* 遺伝子の機能解明を目指した。

### ***ddvA* 遺伝子は通常マウスに比べ糖尿病マウスにおいてより病原性に寄与する**

黄色ブドウ球菌の *ddvA* 遺伝子破壊株は通常マウスおよび糖尿病モデルマウスに対して野生株に比べ病原性が低下することが過去の我々の研究から分かっていた。一方で、カイコ感染モデルを用いた検討で、黄色ブドウ球菌の *ddvA* 遺伝子破壊株は通常カイコに注射した場合には野生株と同程度の殺傷能を有するのに対して、糖尿病モデルカイコに注射した場合には野生株に比べ殺傷能の低下が見られた。このことから、*ddvA* 遺伝子が糖尿病宿主に対してより病原性に寄与するものと考えた。そこで定量的な指標である Lethal Dose 50 (LD<sub>50</sub>)を用いて、*ddvA* 遺伝子の糖尿病モデルマウスに対する病原性への寄与が通常マウスに比べ大きいかな否か検討した。

その結果、マウスは菌の投与量に依存して生存率が低下していた(Fig. 1A)。糖尿病モデルマウスに *ddvA* 遺伝子を投与した場合には、野生株を投与した場合に比べ8日目における LD<sub>50</sub> が 18 倍であった(Fig. 1B)。一方で、通常マウスに *ddvA* 遺伝子を投与した場合には、野生株を投与した場合に比べ8日目における LD<sub>50</sub> が 4.3 倍であった(Fig. 1B)。このことから *ddvA* 遺伝子は哺乳類の糖尿病モデル動物に対する黄色ブドウ球菌の病原性への寄与が健常な哺乳類に対する病原性への寄与に比べ大きいことが示唆された。

### **黄色ブドウ球菌の細胞内 *ddvA* mRNA 量は培地への Glucose により増加する**

私は *ddvA* 遺伝子が糖尿病宿主において病原性に寄与する機構として糖尿病宿主で量の増加している分子に *ddvA* 遺伝子が応答しているのではないかと考えた。そこで通常宿主に比べ糖尿病宿主に豊富に存在しているグルコースによって黄色ブドウ球菌の *ddvA* mRNA 量が増加するか否か検討した。培地にグルコースを添加しなかった群と、グルコースを 125、500、2000 mg/dl 添加した群の mRNA 量を定量した結果、500 および 2000 mg/dl の濃度において非添加群と比べ有意な *ddvA* mRNA 量の増

加が見られた(Fig. 2)。このことから、黄色ブドウ球菌の *ddvA* 遺伝子はグルコースに応答し、その発現量を増加させることが示唆された。

#### 小括

黄色ブドウ球菌の *ddvA* 遺伝子は哺乳類の糖尿病宿主に対して通常宿主に比べ病原性に大きく寄与する。また、*ddvA* 遺伝子はグルコースに応答し、mRNA 量が増加する。

## 第二章

### 黄色ブドウ球菌の DdvA タンパク質の機能解析

## 第二章 黄色ブドウ球菌の DdvA タンパク質の機能解析

糖尿病に併発する黄色ブドウ球菌感染症の病態の理解および治療標的探索のうえで、糖尿病宿主に対する病原性因子である *ddvA* 遺伝子もしくはそれにコードされるタンパク質が黄色ブドウ球菌の中でどのように働き病原性に寄与しているかを知ることが重要である。*ddvA* 遺伝子は黄色ブドウ球菌の機能未知遺伝子として得た遺伝子であり、それがコードするタンパク質の機能についての知見はなかった。そこで、*ddvA* 遺伝子にコードされる 222 アミノ酸からなる DdvA タンパク質の機能を解明するため、DdvA タンパク質の機能ドメインの探索を行った。

### **DdvA タンパク質は GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素である**

私は糖尿病宿主に対する病原性因子である *ddvA* 遺伝子がコードする DdvA タンパク質の機能を理解するために、そのドメイン検索を行った。結果、DdvA タンパク質は N-acetylglucosaminylphosphatidyl inositol de-N-acetylase domain を持つタンパク質であることがわかった。このドメインは N-acetylglucosamine (GlcNAc) 骨格を持つ基質を脱アセチル化することが知られている (Viars et al., 2014)。私は *ddvA* 遺伝子破壊株では GlcNAc 代謝に変化が起こっていると考えた。細胞内の GlcNAc 代謝物を検出するために、黄色ブドウ球菌の野生株および *ddvA* 遺伝子破壊株を [<sup>14</sup>C] - GlcNAc 添加培地で培養し、細胞分画したものを TLC により展開、オートラジオグラフィにより検出した。その結果、*ddvA* 遺伝子破壊株は細胞質画分の GlcNAc 代謝産物に野生株と異なる代謝物のパターンを持つことがわかった (Fig. 3)。また、 [<sup>14</sup>C] - GlcNAc 添加培地で培養した *ddvA* 遺伝子破壊株の細胞質画分と大腸菌で作成した DdvA-His タグ融合リコンビナントタンパク (DdvA-His) を混合し、*in vitro* 再構成を試みた結果、*ddvA* 遺伝子破壊株で見られた GlcNAc 代謝産物のパターンが野生株に見られる代謝物のパターンに変化した (Fig. 4)。このことから、*ddvA* 遺伝子破壊株における細胞質 GlcNAc 代謝物の変化は DdvA タンパク質の欠失により引き起こされることが示唆された。

DdvA-His の添加により変化する GlcNAc 代謝物にどのような化合物があるか知るために、DdvA タンパク質の相同因子を検索したところ、グラム陽性桿菌 *Bacillus subtilis* の BshB2 タンパク質が 49% の相同性を持つことが分かった。BshB2 タンパク質は GlcNAc-malate (GlcNAc-mal) を脱アセチル化する酵素として報告されている (Gaballa et al., 2010)。そこで DdvA タンパク質に GlcNAc-mal 脱アセチル化活性があるか否か検討することとした。野生株および *ddvA* 破壊株の細胞質画分に GlcNAc-mal を加えたところ、野生株の細胞質画分では GlcNAc-mal が減少した。さ

らに *ddvA* 破壊株の細胞質画分と GlcNAc-mal を混合した液に DdvA-His を加えたものと加えてないものをそれぞれ ESI-MS に供したところ DdvA-His 添加依存に GlcNAc-mal のピークの減弱および GlcNAc-mal の脱アセチル化体である Glucosamine-malate (GlcN-mal) に一致するイオンピークが検出された (Fig. 5)。このことから DdvA タンパク質は黄色ブドウ球菌の GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素であることが示唆された。

#### ***DdvA* タンパク質の酵素活性には二価金属が必要である**

枯草菌と同属の炭疽菌の GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素 (BshB1) の酵素活性の発現には二価の金属イオンが必要であることが報告されている (Fang et al., 2013)。黄色ブドウ球菌の DdvA タンパク質の性状を理解するために、GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素活性に二価の金属イオンが必要か否か検討した。結果、黄色ブドウ球菌の *ddvA* 遺伝子破壊株の細胞質画分に DdvA-His を添加することにより見出される GlcNAc-mal の分解が二価金属イオンのキレート剤である 1,10-フェナントロリンの添加により抑制された (Fig. 6)。このことから、黄色ブドウ球菌の DdvA タンパク質による GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素活性には二価の金属イオンが必要であることが示唆された。

#### ***DdvA* タンパク質の金属配位に必要と推測されるアミノ酸は酵素活性に必要である**

DdvA タンパク質に相同性の高い結核菌の MshB は結晶構造が解かれている (McCarthy et al., 2004)。DdvA タンパク質の酵素活性中心を知ることを目的に、結核菌の MshB の金属配位に必要な 3 つのアミノ酸 (13 番目の H、16 番目の D、127 番目の H) と相同な DdvA タンパク質のアミノ酸をアラニンに置換した変異型 DdvA-His を作製した。また、同じく MshB において基質認識に重要なアミノ酸と相

同様な DdvA タンパク質のアミノ酸 3 つ（15 番目の D、124 番目の H、126 番目の D）をそれぞれアラニンに置換した変異型タンパク質を作製した（Fig.7A）。その結果、これら変異型タンパク質は野生型タンパク質に比べ GlcNAc-mal 分解活性が低下していた（Fig. 7B）。また、そのうち金属の配位に必要と推測される 13 番目のヒスチジンをアラニンに置換した（H13A）変異型タンパク質は *ddvA* 遺伝子破壊株の細胞質画分添加条件で GlcNAc-mal 脱アセチル化活性を示さなかった（Fig.8）。これらのことから DdvA タンパク質の金属配位に必要と推測されるアミノ酸は GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素活性に必要であると判断した。

#### 小括

黄色ブドウ球菌の DdvA タンパク質は GlcNAc-mal 脱アセチル化活性に必要である。また、その活性には二価金属イオンの DdvA タンパク質への配位が必要であることが示唆された。

## 第三章

GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素活性と  
糖尿病宿主に対する病原性

### 第三章 GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素活性と糖尿病宿主に対する病原性

タンパク質の酵素活性は多くの薬剤の標的的部位となっている。例えばヒトの高脂血症の治療薬のスタチン系薬剤は HMG-CoA 還元酵素を標的にしており、インフルエンザウィルスの治療薬であるタミフルはインフルエンザウィルス表面抗原のノイラミニダーゼを標的としている。ある酵素活性が目的の疾患に寄与しているかを知ることが重要である。第二章で DdvA タンパク質が GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素であることが示唆された。この活性が病原性に寄与しているか否か検討することで、GlcNAc-mal 脱アセチル化活性が糖尿病における黄色ブドウ球菌感染症の治療標的候補となるか否か知りたいと考えた。

### ***DdvA* タンパク質の酵素活性は糖尿病宿主に対する病原性に必要である**

私は *DdvA* タンパク質の GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素活性が糖尿病宿主に対する病原性に寄与するか否か検討するために、二章で作製した GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素活性の低下した変異型 *DdvA* タンパク質 (H13A) をコードする *ddvA* 遺伝子を *ddvA* 遺伝子破壊株に導入し、糖尿病宿主に対する病原性を検討した。黄色ブドウ球菌の野生株にベクターを導入した群に比べ、*ddvA* 遺伝子破壊株にベクターを導入した群では糖尿病カイコに対する LD<sub>50</sub> の増加、つまり病原性の低下が見られた (Fig. 9A)。*ddvA* 遺伝子破壊株に野生型の *ddvA* 遺伝子を導入すると病原性の低下は相補された。一方で、変異型 *DdvA* タンパク質をコードする *ddvA* 遺伝子を導入した *ddvA* 遺伝子破壊株では病原性の低下の相補は見られなかった。また、野生株にベクターを導入した株に比べ *ddvA* 遺伝子破壊株にベクターを導入した株では細胞質内に GlcNAc-mal の蓄積が見られた (Fig. 9B)。*ddvA* 遺伝子破壊株に野生型の *ddvA* 遺伝子を導入するとこの GlcNAc-mal の蓄積は減弱した。一方で、変異型 *DdvA* タンパク質をコードする *ddvA* 遺伝子を導入した *ddvA* 遺伝子破壊株では蓄積の減弱の程度が少なかった。これらのことから黄色ブドウ球菌の GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素活性が病原性に寄与することが示唆された。

### ***GlcNAc-mal* 合成酵素は糖尿病宿主に対する病原性に必要である**

*DdvA* タンパク質の GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素活性中心のアミノ酸が糖尿病宿主に対する病原性に必要なことから、*DdvA* タンパク質の細胞質内の基質である GlcNAc-mal 量の減少か、産物である GlcN-mal の産生が黄色ブドウ球菌の糖尿病宿主に対する病原性に寄与することが推測される。そこで、黄色ブドウ球菌の GlcNAc-mal 合成酵素 (*BshA*) をコードする遺伝子の破壊株を作成し、その糖尿病宿主に対する病原性を検討した。黄色ブドウ球菌の *bshA* 遺伝子破壊株は糖尿病宿主に対

する病原性が低下していた (Fig.10)。このことから、GlcNAc-mal 量の減少ではなく GlcN-mal の産生が糖尿病宿主に対する病原性に寄与することが示唆された。

#### 小括

黄色ブドウ球菌の DdvA タンパク質の GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素は糖尿病宿主に対する病原性に寄与することが示唆された。また、DdvA タンパク質の基質である GlcNAc-mal の合成酵素をコードする遺伝子の破壊株は糖尿病宿主に対する病原性が低下した。これらのことは DdvA タンパク質の産物である GlcN-mal の産生が糖尿病宿主に対する病原性に寄与していることを示唆している。

## 第四章

DdvA タンパク質の相互作用因子  
Dbp タンパク質の機能解析と病原性

#### 第四章 DdvA タンパク質の相互作用因子 Dbp タンパク質の機能解析と病原性

タンパク質の性状を知るためにより精製された系で酵素活性を測定することは非常に重要である。細胞破碎液のような粗精製画分でのアッセイは他の分子の影響が大きく、正確に目的のタンパク質の活性などを理解することが難しくなる。また、ハイスループットな系を用いた標的タンパク質の阻害剤探索を行う場合においても擬陽性や偽陰性を導く可能性が高くなり系の精度を下げることに繋がる。

ここまでの検討で、DdvA タンパク質の GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素活性は、*ddvA* 遺伝子破壊株の細胞質画分の添加依存に見られた (Fig.11)。また、*ddvA* 遺伝子破壊株の細胞質画分を加熱した後に DdvA-His とともに GlcNAc-mal と反応させたところ GlcNAc-mal の分解は見られなかった。このことから、私は DdvA タンパク質の GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素活性には *ddvA* 遺伝子破壊株の細胞質画分中に存在する熱感受性の相互作用因子が必要なのではないかと考えた。

### ***Dbp* タンパク質は *DdvA* タンパク質の相互作用因子である**

黄色ブドウ球菌の *DdvA* タンパク質の GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素活性に必要な *ddvA* 遺伝子破壊株細胞質中の分子を探索するために、*DdvA* タンパク質の相互作用因子の同定を試みた。*DdvA*-His と *ddvA* 破壊株の細胞破砕液をコバルトカラムを用いてプルダウンアッセイに供した。得られたプルダウンサンプルをウェスタンブロットティング解析に供し、抗 His-tag 抗体を用いて染色した。結果、精製した *DdvA* タンパク質を流したレーンのバンドと比べ強度の大きくなったバンドが存在した (Fig.12A)。別の CBB 染色したゲルこのバンドと同泳動度のバンドを切り出した (Fig.12B)。SDS-ポリアクリルアミド電気泳動に供した結果、*DdvA*-His の分子量に一致する 28 KDa のタンパク質の他に約 13kDa に相当するバンドが見出された (Fig.13)。このタンパク質を Peptide Mass Fingerprinting 解析に供した結果、黄色ブドウ球菌のゲノム上にコードされる機能未知タンパク質の部分配列 (17.6%) に一致した。私はこの *DdvA* の相互作用因子を *DdvA* binding protein (*Dbp*)と命名した。*Dbp* タンパク質は 119 アミノ酸からなる 13.6 KDa のタンパク質だった。また、*dbp* 遺伝子は黄色ブドウ球菌のゲノム上で *ddvA* 遺伝子の上流に隣接しており、オペロンを形成していた。

### ***DdvA* タンパク質とその相互作用因子 *Dbp* タンパク質は GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素のサブユニットである**

*DdvA* の相互作用因子である *Dbp* が GlcNAc-mal 脱アセチル化活性に必要なか否か検討するために、*Dbp* と GST を融合させたリコンビナントタンパク質 (*Dbp*-GST) を作成し、*DdvA*-His と混合して、GlcNAc-mal の脱アセチル化活性を検討した。結果、*DdvA* と *Dbp*-GST を混合したサンプルでは GlcN-mal の産生が確認できた (Fig.14)。一方、*Dbp* タンパク質単独や *DdvA* タンパク質単独では見られなかった。このことから、

私は DdvA タンパク質とその相互作用因子 Dbp タンパク質が GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素のサブユニットであると判断した。

#### ***dbp* 遺伝子は糖尿病宿主に対する病原性に必要である**

これまでの検討から GlcNAc-mal 脱アセチル化活性が黄色ブドウ球菌の糖尿病宿主に対する病原性に必要なことが示唆されていた。そこから、私は GlcNAc-mal 脱アセチル化活性に必要な Dbp タンパク質も黄色ブドウ球菌の糖尿病宿主に対する病原性に必要ではないかと考えた。そこで、黄色ブドウ球菌の *dbp* 遺伝子の欠損株を作成し、病原性を検討した。結果、*dbp* 遺伝子欠損株は糖尿病カイコに対する病原性が低下していた (Fig.15A)。また、*dbp* 遺伝子欠損株は細胞質に GlcNAc-mal の蓄積が見られた (Fig.15B)。このことから *dbp* 遺伝子は糖尿病宿主に対する病原性に必要であると判断した。

#### **小括**

黄色ブドウ球菌の DdvA タンパク質の相互作用因子として分子量 14 KDa の Dbp タンパク質を見出した。Dbp タンパク質は DdvA タンパク質とともに黄色ブドウ球菌の GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素として機能した。また、*dbp* 遺伝子は黄色ブドウ球菌の糖尿病宿主に対する病原性に必要であった。これらのことは、黄色ブドウ球菌の Dbp タンパク質が DdvA タンパク質と共に GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素のサブユニットとして働き糖尿病宿主に対する病原性に寄与することを示唆する。

## 終章

### 総括と今後の展望

## 総括

黄色ブドウ球菌は糖尿病患者において重篤な感染症を引き起こすが、糖尿病宿主に高病原性を引き起こす詳しい分子機構は分かっていなかった。本研究から、黄色ブドウ球菌が糖尿病宿主に対してどのような分子機構を介して病原性を発揮しているのか、その一端が明らかになった。糖尿病宿主に対する黄色ブドウ球菌の病原性因子である DdvA と Dbp タンパク質は GlcNAc-mal を脱アセチル化する反応を触媒する酵素のサブユニットであることが示唆された (Fig. 17)。

## *ddvA* 遺伝子の糖尿病宿主に対する病原性の寄与

*ddvA* 遺伝子破壊株は通常カイコに対しては病原性に寄与しなかったが、糖尿病モデルカイコに対しては野生株に比べ病原性が低下した。一方、*ddvA* 遺伝子破壊株は通常マウスおよび糖尿病マウスに対してはどちらに対しても病原性の低下が見られた。本研究から、糖尿病モデルマウスに対しては通常マウスに比べ *ddvA* 遺伝子の病原性への寄与が大きいことが示唆された。一方でカイコに対する黄色ブドウ球菌の感染実験の結果とは異なっていた。このことはカイコ体液中和マウス血中のグルコース濃度の違いと *ddvA* 遺伝子のグルコース応答性および GlcNAc-mal がグルコースから産生されることにより説明されるのではないかと考えている。つまり、通常のカイコは体液中の糖の大半をトレハロースが占めており、体液中のグルコース濃度は 10 mg/dl 未満である (Wyatt and Kalf, 1957)。一方、マウスを含む哺乳類の血糖の大半はグルコースであり、その濃度は約 100 mg/dl になる。この差のために *ddvA* 遺伝子が通常マウスでは応答していることが推測される。また、DdvA タンパク質の基質である GlcNAc-mal は UDP-GlcNAc およびリンゴ酸から GlcNAc-mal 合成酵素により合成される (Upton et al., 2012)。UDP-GlcNAc は生体内においていくつかの経路を経てグルコースから合成されることが知られている (Walsh and Howe, 2002)。また、実験的にも GlcNAc-mal が Glucose から

代謝されることを確認した(Fig.16)。これらのことから、マウスに感染し、血中にある黄色ブドウ球菌細胞内においては基質である GlcNAc-mal 量も増加していることが推察される。これらのことから通常マウスにおいては DdvA タンパク質による GlcN-mal の産生量が通常カイクに比べ大きく病原性に寄与するのではないかと考えられる。

細胞の糖代謝や病原性に関わる黄色ブドウ球菌の転写因子として Carbon catabolite protein A (CcpA)が知られている(Seidl et al., 2006)。ccpA 遺伝子の欠損株を使ったトランスクリプトーム解析の結果では *ddvA* 遺伝子の 2 倍以上の発現量変化は見られていない(Seidl et al., 2009)。このことは、*ddvA* 遺伝子の発現制御が CcpA によらないことを示唆している。近年、枯草菌の BshB が thiol/oxidative stress global regulator (Spx)に制御されていることが報告された(Gaballa et al., 2013)。私が見出した *ddvA* の発現調節もこの転写因子に制御されているかもしれない。

#### **DdvA タンパク質と糖尿病宿主に対する病原性**

二章の結果から DdvA タンパク質が GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素であることが示唆された。枯草菌で報告されていた GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素である BshB は BshB1 と BshB2 の二つのアイソフォームがある(Gaballa et al., 2010)。DdvA タンパク質は BshB2 と相同性が高く BshB1 との相同性は比較的低い。枯草菌の BshB1 にあたるタンパク質は黄色ブドウ球菌にはない。このことから、私は黄色ブドウ球菌の GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素活性はこのタンパク質のみによって担われていると考えている。DdvA タンパク質は炭疽菌の BshB1 と同様に二価の金属イオンをその活性に必要とすることが本研究から見出された。炭疽菌の BshB1 の酵素活性は  $Zn^{2+}$ 、 $Ni^{2+}$ 、 $Co^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ を添加した場合において見られているが、金属イオンに対する詳細な特異性は今のところわかっていない(Fang et al., 2013)。宿主環境における金属獲得機構が黄色ブドウ球菌の病原性において重要であると考えられている(Cassat and Skaar, 2012)。私は DdvA タンパク質に対

する金属イオンの供給が糖尿病宿主中での病原性発揮に重要なのではないかと考えている。

野生型の *ddvA* 遺伝子を *ddvA* 破壊株に導入することにより、糖尿病宿主に対する病原性の低下は相補された。一方、酵素活性の低下した変異型 DdvA タンパク質を導入した株では病原性の相補がみられなかった。このことは黄色ブドウ球菌の病原性に GlcNAc-mal 脱アセチル化活性が必要なことを示唆している。一方で、黄色ブドウ球菌の細胞にはペプチドグリカンや細胞壁タイコ酸など GlcNAc 骨格を持つ分子が多数存在している (Vollmer et al., 2008; Xia et al., 2010)。これらの分子は潜在的に DdvA タンパク質の基質となる可能性を持っている。つまり、DdvA タンパク質が、細胞壁成分であるペプチドグリカン中の GlcNAc やタイコ酸に結合している GlcNAc などを生体で脱アセチル化することで糖尿病宿主に対する病原性に寄与している可能性を残している。実際に他種の DdvA と同じスーパーファミリーに属するタンパク質には GlcNAc 骨格を持った GlcNAc-mal とは異なる化合物を脱アセチル化するものも存在する (Viars et al., 2014)。また、グラム陽性菌の *Latococcus lactis* やリステリア菌でペプチドグリカンの GlcNAc の脱アセチル化が溶菌タンパク質への耐性化に関わるという報告がある (Boneca et al., 2007; Meyrand et al., 2007)。しかし、GlcNAc-mal 合成酵素をコードする遺伝子の破壊株が糖尿病宿主に対する病原性が低下していることから、少なくとも DdvA タンパク質の担う病原性の一部は GlcNAc-mal の脱アセチル化を介しているとは私には考えている。他の分子を基質としている可能性については今後の検討課題であり、野生株と *ddvA* 遺伝子破壊株のメタボローム解析や細胞壁構成糖の性状解析の比較を行う事でどのような分子が基質となりうるのかを推測できるのではないかと考えている。

#### **DdvA タンパク質の相互作用因子 Dbp タンパク質の特徴**

本研究から、DdvA タンパク質による GlcNAc-mal の脱アセチル化は相互作用因子が必

要であることが分かった。さらに、GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素活性に必要な DdvA タンパク質の相互作用因子として機能未知タンパク質 Dbp を同定した。これまで報告されていた *Bacillus* 属の GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素である BshB はいずれも *in vitro* の試験で単独で GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素活性を示しており、GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素活性の発揮に特別な相互作用因子が必要な例は報告されていない(Fang et al., 2013)。DdvA タンパク質の相互作用因子 Dbp をコードする *dbp* 遺伝子は *ddvA* 遺伝子のオペロン上に存在している。オペロンによる遺伝子の同時制御が *ddvA* および *dbp* 遺伝子の機能においても重要な役割を果たしていると考えられる。*dbp* 遺伝子は黄色ブドウ球菌の他に *Staphylococcus* 属や *Bacillus* 属の菌に相同な遺伝子が存在する。Dbp タンパク質と相同なタンパク質があるにも関わらず、報告されている *Bacillus* 属の菌の BshB は単独で、GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素活性を示す(Fang et al., 2013; Parsonage et al., 2010)。また、好熱性菌である *Thermaerobacter marianensis* は *dbp* 遺伝子のオルソログと *ddvA* 遺伝子のオルソログの間に終始コドンを含まずに、ゲノム上の同じオープンリーディングフレーム内にこの二つの遺伝子を有したものが存在する。このことから、私はこれらの遺伝子が進化の過程で二つに分離することで何らかの機能が付与されたのではないかと考えている。例えば、Dbp タンパク質が DdvA タンパク質に結合するか否かで DdvA タンパク質の基質特異性が切り替わるなどの機能が付与されたのではないかと考えている。逆に、好熱性菌にとってはタンパク質の安定な高次構造を保つのに DdvA と Dbp が結合する方が都合が良いのではないかと考えている。

Dbp タンパク質は 119 アミノ酸と短いタンパク質であり、DUF1806 スーパーファミリーに属している。相同な領域を持つ機能既知タンパク質は知られていない。ただし、枯草菌のオルソログは機能未知タンパク質として結晶構造が解かれている(Protein Data Bank ID : 1NJH)。Dbp タンパク質がどのように DdvA タンパク質と共に GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素活性を示しているのか、今回の検討のみからはわからない。DdvA タ

ンパク質は 222 アミノ酸からなるタンパク質で炭疽菌の相同なタンパク質 BshB2 は 226 アミノ酸からなる。炭疽菌の BshB2 タンパク質には Dbp タンパク質と相同な領域は見られない。また炭疽菌の BshB2 タンパク質は単独で GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素活性を示す事から、酵素の触媒サブユニットは DdvA タンパク質にあり、Dbp タンパク質は制御サブユニットであると考えられる。おそらく Dbp は DdvA タンパク質に結合することで間接的に基質結合サイトと GlcNAc-mal のアフィニティーを高めているものと推測している。

#### ***GlcNAc-mal* と糖尿病宿主に対する病原性**

DdvA タンパク質の基質である GlcNAc-mal や産物である GlcN-mal は構造上、1 位の炭素鎖にリンゴ酸が結合しているため、1 位に UDP が結合した UDP-GlcNAc を基質として合成されるペプチドグリカンやタイコ酸の合成に黄色ブドウ球菌細胞内で直接用いられるとは考えにくい。DdvA タンパク質の産物である GlcN-mal は枯草菌などの *Bacillus* 族細菌を用いた研究からシステインを付加されることにより生体内で Bacillithiol となることが報告されている (Gaballa et al., 2010)。この Bacillithiol は枯草菌や黄色ブドウ球菌など一部のグラム陽性細菌の細胞に存在する低分子チオールである (Newton et al., 2009)。グルタチオン様の働きを持つ分子考えられており、これまでに抗酸化作用、低亜鉛イオン環境耐性、鉄-硫黄クラスターの形成促進などの機能が報告されている (Chi et al., 2011; Fahey, 2013; Fang and Dos Santos, 2015; Ma et al., 2014; Rosario-Cruz et al., 2015)。また、結核には Bacillithiol の類縁体である Mycothiol が存在することが報告されており、結核の酸化ストレス防御に重要な役割を果たしていると考えられている (Newton and Fahey, 2002)。黄色ブドウ球菌にも Bcillithiol があることは報告されている (Newton et al., 2009)。*ddvA* 遺伝子破壊株では、DdvA タンパク質が欠損することで、GlcNAc-mal の脱アセチル化を介した GlcN-mal の産生を行う事ができず、

GlcN-mal から合成される Bacillithiol 量の低下が引き起こされていると考えられる。私は、*ddvA* 遺伝子破壊株における糖尿病宿主に対する病原性の低下が、Bacillithiol 量の低下による宿主環境中の酸化ストレス環境や低金属イオンストレス環境への耐性の低下によって一部が説明されると考えている。高血糖状態は酸化ストレスを亢進し、糖尿病患者は健常人に比べ強い酸化ストレス環境にあると考えられている (Forbes et al., 2008; Sheetz and King, 2002)。黄色ブドウ球菌はこのような環境で増殖するための防御機構としてこのようなシステムを持つと考えられる。ただし、*ddvA* 遺伝子破壊株では *in vitro* の試験では抗酸化ストレスに対する感受性や低金属イオン感受性などのフェノタイプは見られなかった。このことから、宿主中のように複数のストレスが複雑に菌に作用するような環境が *ddvA* 遺伝子破壊株の病原性の低下を引き起こすのではないかと考えている。

DdvA タンパク質の基質である GlcNAc-mal や産物である GlcN-mal が Glucose から作られる。このような糖尿病宿主由来の分子をストレスに対する応答システムとして機能させることで、糖尿病宿主環境中でも黄色ブドウ球菌は増殖でき、高い病原性を発揮できると考えている。

## 今後の展望

これまでに人間が生み出してきた感染症の治療薬のほとんどは *in vitro* における抗菌活性を指標に得られた化合物を *in vivo* の治療アッセイに供して見出されてきた。しかし宿主内における病原体の病原性発揮機構が明らかになるにつれ *in vivo* では *in vitro* とは異なる分子機構によって病原体が生存していることが明らかとなってきた。インフルエンザウィルス治療薬などで、宿主細胞からの遊離に関わる病原性因子を標的とした薬剤開発が行われ、結実している。細菌に対する治療薬としても、細菌の *in vivo* における病原性に着目した薬剤の探索が行われている (Rasko and Sperandio, 2010)。例えば、黄色ブドウ球菌の病原性因子である SrtA の機能を阻害する薬剤が合成した化合物や、天然物由来の化合物から得られ、黄色ブドウ球菌が感染したマウスに延命効果がある事が示されている (Wang et al., 2015; Zhang et al., 2014)。また、DdvA タンパク質と同じスーパーファミリーに属する結核の GlcNAc-Ins 脱アセチル化酵素 (MshB) は結核の Mycothiol の前駆体である GlcNAc-inositol (GlcN-Ins) を合成する (Newton et al., 2000; Newton et al., 2006)。この MshB タンパク質の酵素活性を阻害する化合物がいくつか報告されている (Gammon et al., 2010; Metaferia et al., 2007)。本研究により、黄色ブドウ球菌の DdvA タンパク質が GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素であることを見出し、その酵素活性を検出することが可能となった。また、この GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素活性が病原性に寄与することが分かった。さらに、DdvA タンパク質の酵素活性には相互作用因子である Dbp タンパク質が必要なことが明らかになった。私は今後、本研究で得られた結果をもとに、MshB タンパク質阻害剤の知見をふまえて化合物ライブラリーなどで GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素活性を阻害する化合物を探索することで黄色ブドウ球菌の糖尿病宿主に対する病原性を治療するための新たな薬剤の開発が可能になると考えている。

## 材料と方法

## 菌株と菌の培養

本研究で使用した菌株は Table 1 に記載した。黄色ブドウ球菌は Newman 株および遺伝学的実験のために RN4220 株を用いた(Duthie and Lorenz, 1952; Peng et al., 1988)。遺伝学的実験のために用いた大腸菌 JM109 株はタカラバイオより購入したものをを用いた(Yanisch-Perron et al., 1985)。

黄色ブドウ球菌は特に記載のない場合には Trypticase soy broth (TSB ; Becton, Dickinson & Company) 培地で 37°C の好氣的条件 (150 rpm) で培養した。TSB のロット毎に Newman 株が正常に増殖することを確認した(Ishii et al., 2015a)。必要に応じて、クロラムフェニコール 12.5 µg/ml、カナマイシン 50 µg/ml 存在下で培養した。

## 黄色ブドウ球菌の遺伝子破壊株、遺伝子欠損株および相補株の作製

遺伝子破壊株の作製には黄色ブドウ球菌のターゲッティングベクターである pCK20 のマルチクローニングサイトに標的遺伝子の部分配列に相同な DNA 領域を Newman 株のゲノムをテンプレートとしてクローニングした(Ichihashi et al., 2003)。また、遺伝子欠損株の作製には、まず、カナマイシン耐性遺伝子を含む DNA 領域を、pSF151 を鋳型としてターミネーターを除くようにして増幅した。次に標的遺伝子上流および下流領域約 1 kb を Newman 株のゲノムをテンプレートとしてクローニングした。カナマイシン耐性遺伝子および標的遺伝子上流下流の配列にあたる DNA 断片を混合し、PCR 法により結合させた DNA 断片を得た。得られた DNA 断片を黄色ブドウ球菌のターゲッティングベクターである pKOR3α の Sma I サイトに挿入した。作製したベクターを黄色ブドウ球菌の実験株 RN4220 株にエレクトロポレーション法により導入した(Inoue et al., 2001; Peng et al., 1988)。このとき、2.3 kv、100 Ω、25 µFD の条件でパルスした。選択培地には 12.5 µg / ml のクロラムフェニコール添加培地を用いた。得られた RN4220 の薬剤耐性菌にファージ 80α を感染させ、得られたファージを用いて Newman 株にトラン

スダクションし、薬剤耐性株を得た。目的の遺伝子の破壊はサザンブロット法により検証した。

相補株の作製は、遺伝子の総長とプロモーター領域をクローニングした pNDKm ベクターを RN4220 に導入し、ファージ 80 $\alpha$  を用いて各遺伝子破壊 Newman 株にトランスダクションした。

### 点変異体の作製

点変異導入は以前の報告に従った(Li and Wilkinson, 1997)。野生型の ddvA 遺伝子が挿入されたプラスミドを鋳型に PCR により変異型 DNA 鎖を作製した。Dpn I 処理により鋳型 DNA を分解した後、大腸菌に形質転換し、プラスミドの形で増幅した。変異の確認はシーケンス解析で行った。

### カイコ飼育

カイコの飼育は以前の報告に従って行った(Hamamoto et al., 2004; Kaito et al., 2002)。愛媛蚕種株式会社から購入した芙・蓉×つくば・ね品種の卵を、消毒した後、27°C のインキュベーター内で孵化させて飼育した。飼料には、日本農産工業株式会社から購入した抗生物質入りの人工飼料であるシルクメイト 2S を用いた。4 齢眠のカイコを分離し、1 終夜絶食させて脱皮したものを 5 齢 1 日目として実験に用いた。

### カイコ感染実験

5 齢 1 日目のカイコに、1 匹あたり 1.1 g の人工飼料（抗生物質を含まない、日本農産工業株式会社）を与えて終夜 27°C でインキュベートした。餌を与えたカイコに終夜培養した菌液の希釈液をカイコの第五節背側から 1 ml のシリンジおよび 27 ゲージの注射針を用いて 50  $\mu$ l 注射した。24 時間後に生存しているカイコの数数を数えた。ここでは、ピ

ンセットもしくはチップの先でカイコの頭部をつつき、反応がないものを死亡していると判定した。注射と平行に、菌液を希釈し、TSB 寒天培地に塗布し 37°C で終夜培養し、出現したコロニー数 (CFU : Colony Forming Unit) をカウントすることで生菌数とした。カイコに注射した生菌数とカイコの生存率の関係を片対数グラフにプロットして曲線でなめらかにつないだとき、曲線上で生存率 50 %となる菌数を求め、菌の半数致死量 (LD<sub>50</sub>) [CFU/larva] を求めた。

### 糖尿病モデルカイコ

抗生物質を含まない人工飼料に 10%のグルコースを添加し均一になるまで十分に混和したものを高グルコース餌として用いた。5 齢 1 日目のカイコに、1 匹あたり 1.1 g の高グルコース餌を与えて 18 - 24 時間 27°C で飼育したものを糖尿病モデルカイコとして用いた。

### マウス感染実験

9-10 週齢の C57 / BL6J のオスのマウス (各群 5 匹) に PBS で希釈した菌液 100  $\mu$ l を尾静脈注射した。注射後のマウスの生存数を経時的に観察した。黄色ブドウ球菌の LD<sub>50</sub> は 8 日後の点で決定した。

### 糖尿病モデルマウス

8-9 週齢の C57 / BL6J のオスのマウスに 0.1M クエン酸バッファー (pH4.5) に 7.5mg/ml の濃度で希釈したストレプトゾトシンを 500  $\mu$ l 腹腔内に単回投与した。血糖値が 200-400mg/dl のものを糖尿病モデルマウスと判断し実験に用いた。

### 定量的 RT-PCR による *ddvA* 遺伝子の発現量解析

黄色ブドウ球菌 Newman 株の終夜培養液をグルコースを 0 から 2000mg/dl 添加した Luria-Bertani 培地で 100 倍に希釈し、37°C で OD=0.5 に達するまで培養した。これを遠心して菌体を回収し、RNAprotect Bacteria Reagent (QIAGEN) 中に懸濁し 5 分後に PBS で wash した。組換えリゾスタフィンにより溶菌させた細胞は再液から RNeasy Mini Kit(QIAGEN) を用いて RNA を抽出した。RQ1 RNase-Free DNase(Promega)を用いてサンプルから DNA を除去した後、加熱により DNase を失活させた後、Taqman Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems) を用いて cDNA を合成した。RT-PCR は得られた cDNA を鋳型とし、SYBER Premix EXTaq (TAKARA Bio) と RT-PCR 用に設計したプライマーを用いて行った。内部標準として 16SrDNA を用いた。

### 黄色ブドウ球菌の細胞内 GlcNAc-mal の蓄積

37°C 終夜培養した各黄色ブドウ球菌株の菌液を [<sup>14</sup>C] -GlcNAc (パーキンエルマー) を添加した TSB 培地で 100 倍希釈した。37°C で 2 時間培養した菌液を遠心し、菌体を回収した。回収した菌体を生理食塩水で wash し、細胞分画した。菌体を Digestion 溶液 (50 mM Tris/HCl(pH7.5), 145 mM NaCl, 300 mg/ml ラフィノース, 0.2 mg/ml Lysostaphin, 4 unit/ml DNase I (Takara)) に懸濁し 37°C で 30 分反応させた。10 K rpm で 10 分遠心した上清を細胞壁画分とした。沈殿を 20 unit /ml Dnase I , 50mM Tris/HCl に懸濁し、氷上で 20 分間インキュベートした、5 K rpm で 10 分間遠心した上清を 32 K rpm で 30 分間遠心し、上清を細胞質画分、沈殿を PBS に懸濁したものを細胞膜画分とした。得られた細胞画分をシリカゲル 60 の TLC 板(Merck Millipore) に スポットし、展開した。展開溶媒は BuOH : MeOH : アンモニア=5 : 4 : 3 の溶媒を用いた。展開後乾燥させた TLC 板をイメージングプレートに当て、[<sup>14</sup>C] -GlcNAc

代謝物のスポット由来の放射線を蛍光として検出した。GlcNAc-mal のスポットの位置は、調製した GlcNAc-mal をシリカゲル 60 の TLC 板にスポットし、展開して、糖検出試薬である Aniline-Diphenylamine 試薬により検出し、得られたスポットの位置で決めた。

### GlcNAc-mal の調製

GlcNAc-mal の合成は以前の報告を一部改良して行った(Gaballa et al., 2010)。枯草菌の GlcNAc-mal 合成酵素をコードする遺伝子 *bshA* を枯草菌の実験室株 168 株のゲノムを用いて PCR 法により増幅した(Kunst et al., 1997)。増幅した断片を pET28a ベクターのマルチクローニングサイトに挿入した。調製したプラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) pLysS 株に導入した。上記株を 37°C で一晚培養後、これを Luria-Bertani 培地で希釈して 37°C で 2.5 時間培養した。終濃度 0.5 mM の IPTG を添加して 37°C でさらに 2 時間培養し、遠心により菌体を回収した。回収した菌体を 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8.0), 0.5 M NaCl に懸濁し凍結融解を一度行い、0.4 mg/ml の Lysozyme を添加し再度凍結融解したものをソニケーションに供した。遠心した上清を TALON Metal Affinity Resin (クロンテック)にて調製した。調製した BshA タンパク質の活性は UDP-GlcNAc と反応させた時の UDP の産生で確認した。UDP-GlcNAc およびリンゴ酸を BshA タンパク質と混合し、37°C で 8 時間インキュベートした。インキュベートしたサンプルに反応溶液と等量のアセトニトリルを加えた。遠心した上清を遠心エバポレーターにより乾固し、ブタノールで wash した後、メタノールで溶解した画分を蒸発乾固し、50mM Tris/HCl (pH7.5)に溶解し、NaOH を用いて pH を 7 に調製したものを GlcNAc-mal 溶液として用いた。得られた GlcNAc-mal は ESI-MS により質量を確認した。

### DdvA-His の調製

黄色ブドウ球菌の *ddvA* 遺伝子を Newman 株のゲノムを用いて PCR 法により増幅した。増幅した断片を pET28a ベクターのマルチクローニングサイトに挿入した。調製したプラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) pLysS 株に導入した。上記株を 37°C で一晚培養後、これを Luria-Bertani 培地で希釈して 37°C で 2.5 時間培養した。終濃度 1 mM の IPTG を添加して 16°C でさらに終夜培養し、遠心により菌体を回収した。回収した菌体を 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8.0), 0.5 M NaCl に懸濁し、0.4 mg/ml の Lysozyme を添加し再度凍結融解したものをソニケーションに供した。遠心した上清を TALON Metal Affinity Resin (クロンテック)にて調製した。

### Dbp-GST の調製

黄色ブドウ球菌の *dbp* 遺伝子を Newman 株のゲノムを用いて PCR 法により増幅した。増幅した断片を pGEX4T-3 ベクターのマルチクローニングサイトに挿入した。調製したプラスミドを大腸菌 BL21 (DE3) pLysS 株に導入した。上記株を 37°C で一晚培養後、これを Luria-Bertani 培地で希釈して 37°C で 2.5 時間培養した。終濃度 1 mM の IPTG を添加して 16°C でさらに終夜培養し、遠心により菌体を回収した。回収した菌体を 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 8.0), 0.5 M NaCl に懸濁し、0.4 mg/ml の Lysozyme を添加し再度凍結融解したものをソニケーションに供した。遠心した上清を Glutathione sepharose 4B (GE healthcare)にて調製した。さらに、Amicon ultra-0.5 ml (Merck Millipore) で濃縮した。

### GlcNAc-mal の分解活性

調製した DdvA-His を [<sup>14</sup>C] -GlcNAc を添加した培地で培養した *ddvA* 破壊株の細胞質画分に添加し 37°C で 1 時間から終夜反応させ、シリカゲル 60 の TLC 板にス

ポットし、展開した。金属イオンのキレート剤である 1, 10-phenanthroline を添加する実験では、予め、DdvA-His と終濃度 1mM の 1,10-phenanthroline を混合し、10 分後に GlcNAc-mal と反応させた。展開溶媒は BuOH : MeOH : アンモニア=5 : 4 : 3 の溶媒を用いた。展開後乾燥させた TLC 板をイメージングプレートに当て、 $[^{14}\text{C}]$ -GlcNAc-mal のスポット由来の放射線を蛍光として検出した。

### GlcNAc-mal 脱アセチル化活性

DdvA-His を終濃度 4  $\mu\text{g/ml}$ 、Dbp タンパク質を終濃度 222  $\mu\text{g/ml}$  用いて、各タンパク質サンプルと調製した GlcNAc-mal を終濃度 2mM で混合し、37°C で 8 時間もしくは 24 時間反応させた。得られたサンプルに等容量のアセトニトリルを加え、遠心した上清をネガティブイオンモードで ESI-TOF MS microTOF (Bruker) に供した。GlcNAc-mal イオンおよび GlcN-mal イオンのピークはそれぞれ 336 および 294  $m/z$  に見られた。

### DdvA タンパク質の相互作用因子の同定

*ddvA* 破壊株を終夜培養した菌液を TSB にて 100 倍希釈した。OD<sub>600</sub>=2 まで 37°C で培養し、遠心により集菌した。培養液 1L 当たり 0.5mg のリゾスタフィンを添加した 4ml の PBS に懸濁し、37°C で 1 時間インキュベートした。ソニケーションした後、遠心した上清を 0.45  $\mu\text{m}$  のフィルターに通し細胞破碎液とした。1ml の細胞破碎液と DdvA-His 20 $\mu\text{g}$  を混合し 37°C で 2 時間インキュベートした。このサンプルを PBS で平衡化した TALON resin 300 $\mu\text{l}$  に添加し、PBS で 3ml にメスアップした後、4°C で 1 時間インキュベートした。遠心で resin を回収し、PBS で二回 wash した後 10mM イミダゾール/PBS で wash して、150mM イミダゾール/PBS で溶出した。限外ろ過膜により濃縮した溶出サンプルを 15% の Native PAGE に供し、western blotting もし

くは CBB 染色した。CBB 染色したゲルから目的のバンドをメスで切り出し、15% の SDS-PAGE に供し、CBB 染色した。相互作用因子と推定されるバンドを切り出して、Peptide MS Fingerprinting (PMF) 解析に供した。得られたピークから、PMF 解析の解析ソフトである MS-Fit もしくは Mascot を用いてタンパク質を同定した。

## 参考文献

Boneca, I.G., Dussurget, O., Cabanes, D., Nahori, M.A., Sousa, S., Lecuit, M., Psylinakis, E., Bouriotis, V., Hugot, J.P., Giovannini, M., *et al.* (2007). A critical role for peptidoglycan N-deacetylation in *Listeria* evasion from the host innate immune system. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 997-1002.

Cassat, J., and Skaar, E. (2012). Metal ion acquisition in *Staphylococcus aureus*: overcoming nutritional immunity. *Semin Immunopathol* *34*, 215-235.

Chen, C., Zhang, X., Shang, F., Sun, H., Sun, B., and Xue, T. (2015). The *Staphylococcus aureus* protein-coding gene *gdpS* modulates *sarS* expression via mRNA-mRNA interaction. *Infect Immun* *83*, 3302-3310.

Chi, B.K., Gronau, K., Mader, U., Hessling, B., Becher, D., and Antelmann, H. (2011). S-bacillithiolation protects against hypochlorite stress in *Bacillus subtilis* as revealed by transcriptomics and redox proteomics. *Mol Cell Proteomics* *10*, M111 009506.

Duthie, E.S., and Lorenz, L.L. (1952). Staphylococcal coagulase; mode of action and antigenicity. *J Gen Microbiol* *6*, 95-107.

Fahey, R.C. (2013). Glutathione analogs in prokaryotes. *Biochim Biophys Acta* *1830*, 3182-3198.

Fang, Z., and Dos Santos, P.C. (2015). Protective role of bacillithiol in superoxide stress and Fe-S metabolism in *Bacillus subtilis*. *Microbiologyopen* *4*, 616-631.

Fang, Z., Roberts, A.A., Weidman, K., Sharma, S.V., Claiborne, A., Hamilton, C.J., and

Dos Santos, P.C. (2013). Cross-functionalities of *Bacillus* deacetylases involved in bacillithiol biosynthesis and bacillithiol-S-conjugate detoxification pathways. *Biochem J* 454, 239-247.

Fischer, A., Kambara, K., Meyer, H., Stenz, L., Bonetti, E.J., Girard, M., Lalk, M., Francois, P., and Schrenzel, J. (2014). GdpS contributes to *Staphylococcus aureus* biofilm formation by regulation of eDNA release. *Int J Med Microbiol* 304, 284-299.

Forbes, J.M., Coughlan, M.T., and Cooper, M.E. (2008). Oxidative stress as a major culprit in kidney disease in diabetes. *Diabetes* 57, 1446-1454.

Gaballa, A., Antelmann, H., Hamilton, C.J., and Helmann, J.D. (2013). Regulation of *Bacillus subtilis* bacillithiol biosynthesis operons by Spx. *Microbiology* 159, 2025-2035.

Gaballa, A., Newton, G.L., Antelmann, H., Parsonage, D., Upton, H., Rawat, M., Claiborne, A., Fahey, R.C., and Helmann, J.D. (2010). Biosynthesis and functions of bacillithiol, a major low-molecular-weight thiol in Bacilli. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107, 6482-6486.

Gammon, D.W., Steenkamp, D.J., Mavumengwana, V., Marakalala, M.J., Mudzungu, T.T., Hunter, R., and Munyololo, M. (2010). Conjugates of plumbagin and phenyl-2-amino-1-thioglucoside inhibit MshB, a deacetylase involved in the biosynthesis of mycothiol. *Bioorg Med Chem* 18, 2501-2514.

Hamamoto, H., Kurokawa, K., Kaito, C., Kamura, K., Manitra Razanajatovo, I., Kusuhara, H., Santa, T., and Sekimizu, K. (2004). Quantitative evaluation of the therapeutic effects

of antibiotics using silkworms infected with human pathogenic microorganisms.

*Antimicrob Agents Chemother* 48, 774-779.

Holland, L.M., O'Donnell, S.T., Ryjenkov, D.A., Gomelsky, L., Slater, S.R., Fey, P.D., Gomelsky, M., and O'Gara, J.P. (2008). A staphylococcal GGDEF domain protein regulates biofilm formation independently of cyclic dimeric GMP. *J Bacteriol* 190, 5178-5189.

Ichihashi, N., Kurokawa, K., Matsuo, M., Kaito, C., and Sekimizu, K. (2003). Inhibitory effects of basic or neutral phospholipid on acidic phospholipid-mediated dissociation of adenine nucleotide bound to DnaA protein, the initiator of chromosomal DNA replication. *J Biol Chem* 278, 28778-28786.

IDF (2015). IDF DIABETES ATLAS.

Inoue, R., Kaito, C., Tanabe, M., Kamura, K., Akimitsu, N., and Sekimizu, K. (2001). Genetic identification of two distinct DNA polymerases, DnaE and PolC, that are essential for chromosomal DNA replication in *Staphylococcus aureus*. *Mol Genet Genomics* 266, 564-571.

Ishii, M., Matsumoto, Y., and Sekimizu, K. (2015a). Compounds in a particular production lot of tryptic soy broth inhibit *Staphylococcus aureus* cell growth. *Drug Discov Ther* 9, 178-183.

Ishii, M., Matsumoto, Y., and Sekimizu, K. (2015b). Usefulness of silkworm as a model animal for understanding the molecular mechanisms of fungal pathogenicity. *Drug Discov*

Ther 9, 234-237.

Jacobsson, G., Dashti, S., Wahlberg, T., and Andersson, R. (2007). The epidemiology of and risk factors for invasive *Staphylococcus aureus* infections in western Sweden. *Scand J Infect Dis* 39, 6-13.

Kaito, C., Akimitsu, N., Watanabe, H., and Sekimizu, K. (2002). Silkworm larvae as an animal model of bacterial infection pathogenic to humans. *Microb Pathog* 32, 183-190.

Kanafani, Z.A., Kourany, W.M., Fowler, V.G., Jr., Levine, D.P., Vigliani, G.A., Campion, M., Katz, D.E., Corey, G.R., and Boucher, H.W. (2009). Clinical characteristics and outcomes of diabetic patients with *Staphylococcus aureus* bacteremia and endocarditis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 28, 1477-1482.

Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V., Bertero, M.G., Bessieres, P., Bolotin, A., Borchert, S., *et al.* (1997). The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*. *Nature* 390, 249-256.

Laupland, K.B., Church, D.L., Mucenski, M., Sutherland, L.R., and Davies, H.D. (2003). Population-based study of the epidemiology of and the risk factors for invasive *Staphylococcus aureus* infections. *J Infect Dis* 187, 1452-1459.

Li, S., and Wilkinson, M.F. (1997). Site-directed mutagenesis: a two-step method using PCR and DpnI. *Biotechniques* 23, 588-590.

Ma, Z., Chandrangsu, P., Helmann, T.C., Romsang, A., Gaballa, A., and Helmann, J.D.

(2014). Bacillithiol is a major buffer of the labile zinc pool in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 94, 756-770.

Matsumoto, Y., Ishii, M., Ishii, K., Miyaguchi, W., Horie, R., Inagaki, Y., Hamamoto, H., Tatematsu, K., Uchino, K., Tamura, T., *et al.* (2014). Transgenic silkworms expressing human insulin receptors for evaluation of therapeutically active insulin receptor agonists. *Biochem Biophys Res Commun* 455, 159-164.

Matsumoto, Y., Sumiya, E., Sugita, T., and Sekimizu, K. (2011). An invertebrate hyperglycemic model for the identification of anti-diabetic drugs. *PLoS One* 6, e18292.

Mazmanian, S.K., Skaar, E.P., Gaspar, A.H., Humayun, M., Gornicki, P., Jelenska, J., Joachmiak, A., Missiakas, D.M., and Schneewind, O. (2003). Passage of heme-iron across the envelope of *Staphylococcus aureus*. *Science* 299, 906-909.

McCarthy, A.A., Peterson, N.A., Knijff, R., and Baker, E.N. (2004). Crystal structure of MshB from *Mycobacterium tuberculosis*, a deacetylase involved in mycothiol biosynthesis. *J Mol Biol* 335, 1131-1141.

Metaferia, B.B., Fetterolf, B.J., Shazad-Ul-Hussan, S., Moravec, M., Smith, J.A., Ray, S., Gutierrez-Lugo, M.T., and Bewley, C.A. (2007). Synthesis of natural product-inspired inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis* mycothiol-associated enzymes: the first inhibitors of GlcNAc-Ins deacetylase. *J Med Chem* 50, 6326-6336.

Meyrand, M., Boughammoura, A., Courtin, P., Mezange, C., Guillot, A., and Chapot-Chartier, M.P. (2007). Peptidoglycan N-acetylglucosamine deacetylation

decreases autolysis in *Lactococcus lactis*. *Microbiology* 153, 3275-3285.

Newton, G.L., Av-Gay, Y., and Fahey, R.C. (2000).

N-Acetyl-1-D-myo-inosityl-2-amino-2-deoxy-alpha-D-glucopyranoside deacetylase (MshB) is a key enzyme in mycothiol biosynthesis. *J Bacteriol* 182, 6958-6963.

Newton, G.L., and Fahey, R.C. (2002). Mycothiol biochemistry. *Arch Microbiol* 178, 388-394.

Newton, G.L., Ko, M., Ta, P., Av-Gay, Y., and Fahey, R.C. (2006). Purification and characterization of *Mycobacterium tuberculosis*

1D-myo-inosityl-2-acetamido-2-deoxy-alpha-D-glucopyranoside deacetylase, MshB, a mycothiol biosynthetic enzyme. *Protein Expr Purif* 47, 542-550.

Newton, G.L., Rawat, M., La Clair, J.J., Jothivasan, V.K., Budiarto, T., Hamilton, C.J., Claiborne, A., Helmann, J.D., and Fahey, R.C. (2009). Bacillithiol is an antioxidant thiol produced in Bacilli. *Nat Chem Biol* 5, 625-627.

Parsonage, D., Newton, G.L., Holder, R.C., Wallace, B.D., Paige, C., Hamilton, C.J., Dos Santos, P.C., Redinbo, M.R., Reid, S.D., and Claiborne, A. (2010). Characterization of the N-acetyl-alpha-D-glucosaminyl l-malate synthase and deacetylase functions for bacillithiol biosynthesis in *Bacillus anthracis*. *Biochemistry* 49, 8398-8414.

Peng, H.L., Novick, R.P., Kreiswirth, B., Kornblum, J., and Schlievert, P. (1988). Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol* 170, 4365-4372.

- Rasko, D.A., and Sperandio, V. (2010). Anti-virulence strategies to combat bacteria-mediated disease. *Nat Rev Drug Discov* 9, 117-128.
- Rosario-Cruz, Z., Chahal, H.K., Mike, L.A., Skaar, E.P., and Boyd, J.M. (2015). Bacillithiol has a role in Fe-S cluster biogenesis in *Staphylococcus aureus*. *Mol Microbiol* 98, 218-242.
- Seidl, K., Muller, S., Francois, P., Kriebitzsch, C., Schrenzel, J., Engelmann, S., Bischoff, M., and Berger-Bachi, B. (2009). Effect of a glucose impulse on the CcpA regulon in *Staphylococcus aureus*. *BMC Microbiol* 9, 95.
- Seidl, K., Stucki, M., Ruegg, M., Goerke, C., Wolz, C., Harris, L., Berger-Bachi, B., and Bischoff, M. (2006). *Staphylococcus aureus* CcpA affects virulence determinant production and antibiotic resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 50, 1183-1194.
- Shang, F., Xue, T., Sun, H., Xing, L., Zhang, S., Yang, Z., Zhang, L., and Sun, B. (2009). The *Staphylococcus aureus* GGDEF domain-containing protein, GdpS, influences protein A gene expression in a cyclic diguanylic acid-independent manner. *Infect Immun* 77, 2849-2856.
- Sheetz, M.J., and King, G.L. (2002). Molecular understanding of hyperglycemia's adverse effects for diabetic complications. *JAMA* 288, 2579-2588.
- Upton, H., Newton, G.L., Gushiken, M., Lo, K., Holden, D., Fahey, R.C., and Rawat, M. (2012). Characterization of BshA, bacillithiol glycosyltransferase from *Staphylococcus aureus* and *Bacillus subtilis*. *FEBS Letters* 586, 1004-1008.

Viars, S., Valentine, J., and Hernick, M. (2014). Structure and function of the LmbE-like superfamily. *Biomolecules* 4, 527-545.

Vollmer, W., Blanot, D., and de Pedro, M.A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* 32, 149-167.

Walsh, T.R., and Howe, R.A. (2002). The Prevalence and Mechanisms of Vancomycin Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Annual Review of Microbiology* 56, 657-675.

Wang, L., Bi, C., Cai, H., Liu, B., Zhong, X., Deng, X., Wang, T., Xiang, H., Niu, X., and Wang, D. (2015). The therapeutic effect of chlorogenic acid against *Staphylococcus aureus* infection through sortase A inhibition. *Front Microbiol* 6, 1031.

Wyatt, G., and Kalf, G. (1957). The chemistry of insect hemolymph II. Trehalose and other carbohydrates. *The Journal of general physiology* 40, 833-847.

Xia, G., Kohler, T., and Peschel, A. (2010). The wall teichoic acid and lipoteichoic acid polymers of *Staphylococcus aureus*. *Int J Med Microbiol* 300, 148-154.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33, 103-119.

Zhang, J., Liu, H., Zhu, K., Gong, S., Dramsi, S., Wang, Y.T., Li, J., Chen, F., Zhang, R., Zhou, L., *et al.* (2014). Antiinfective therapy with a small molecule inhibitor of *Staphylococcus aureus* sortase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 13517-13522.

Zimmet, P., Alberti, K.G., and Shaw, J. (2001). Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* 414, 782-787.

## 発表論文

1. Usefulness of silkworm as a model animal for understanding the molecular mechanisms of fungal pathogenicity.

Ishii M, Matsumoto Y, Sekimizu K.

*Drug Discov Ther.* 2015 Aug;9(4):234-7

2. Compounds in a particular production lot of tryptic soy broth inhibit *Staphylococcus aureus* cell growth.

Ishii M, Matsumoto Y, Sekimizu K.

*Drug Discov Ther.* 2015 Jun;9(3):178-83.

3. Fluorescence imaging for a noninvasive *in vivo* toxicity-test using a transgenic silkworm expressing green fluorescent protein.

Inagaki Y, Matsumoto Y, Ishii M, Uchino K, Sezutsu H, Sekimizu K.

*Sci Rep.* 2015 Jun 10;5:11180.

4. Diabetic silkworms for evaluation of therapeutically effective drugs against type II diabetes.

Matsumoto Y, Ishii M, Hayashi Y, Miyazaki S, Sugita T, Sumiya E, Sekimizu K.

*Sci Rep.* 2015 May 29;5:10722.

5. Transgenic silkworms expressing human insulin receptors for evaluation of therapeutically active insulin receptor agonists.

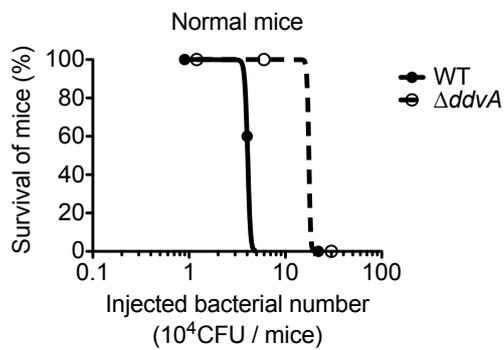
Matsumoto Y, Ishii M, Ishii K, Miyaguchi W, Horie R, Inagaki Y, Hamamoto H,

Tatematsu K, Uchino K, Tamura T, Sezutsu H, Sekimizu K.

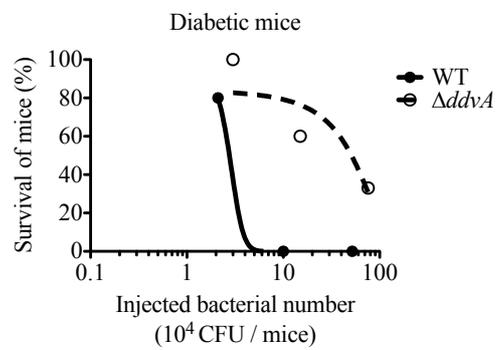
*Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Dec 12;455(3-4):159-64.

## 图表

A



B



C

| Host          | LD50 of WT | LD50 of $\Delta ddvA$ | Fold differences |
|---------------|------------|-----------------------|------------------|
| Normal mice   | 4.1        | 18                    | 4.3              |
| Diabetic mice | 2.8        | 51                    | 18               |

Fig. 1 黄色ブドウ球菌の *ddvA* 遺伝子は糖尿病宿主に対する病原性に寄与する  
黄色ブドウ球菌の野生株および *ddvA* 遺伝子破壊株の段階希釈した菌液を通常マウス (A) および糖尿病マウス (B) に尾静脈から注射し、8 日目におけるマウスの生存数をプロットした。感染 8 日目における黄色ブドウ球菌野生株および *ddvA* 遺伝子破壊株の LD<sub>50</sub> を示した (C)。

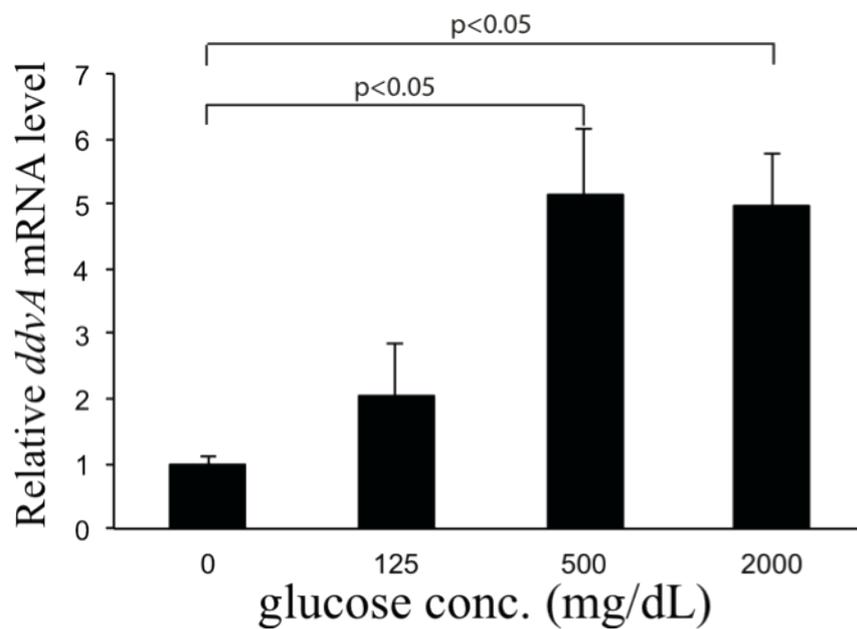


Fig. 2 グルコース添加により黄色ブドウ球菌の *ddvA* 遺伝子 mRNA 量の増加する  
 黄色ブドウ球菌の野生株をグルコースを 0 から 2000 mg/dl になるように添加した  
 LB 10 培地で培養後、定量的 RT-PCR 法により *ddvA* mRNA 量を定量した。

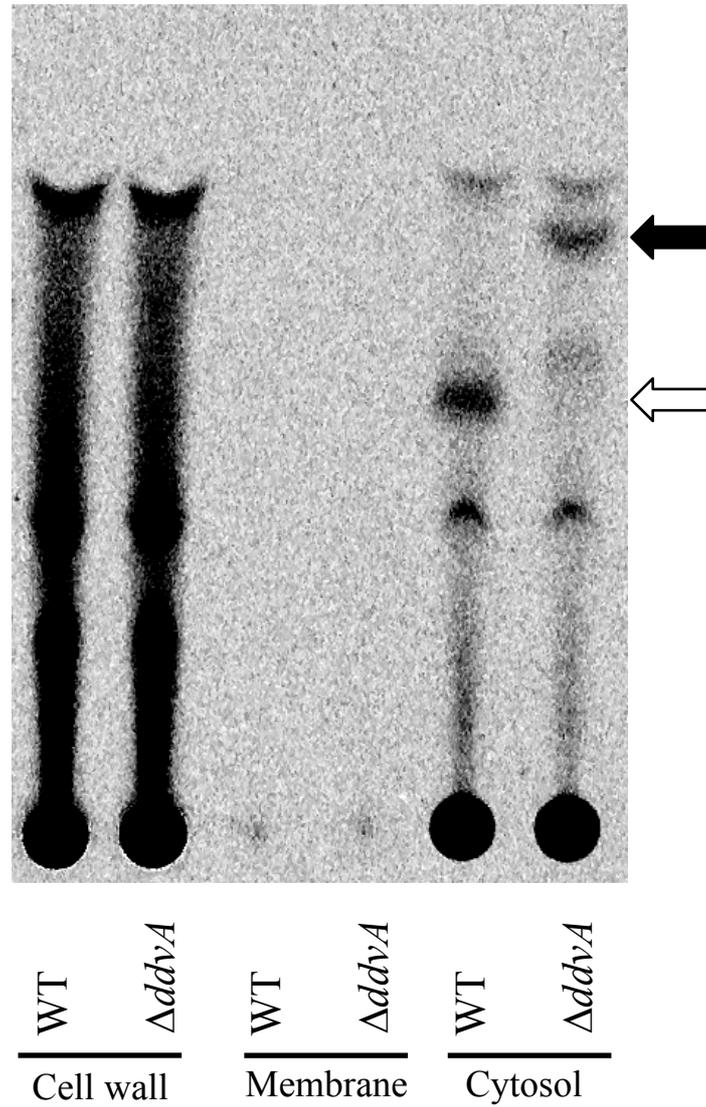
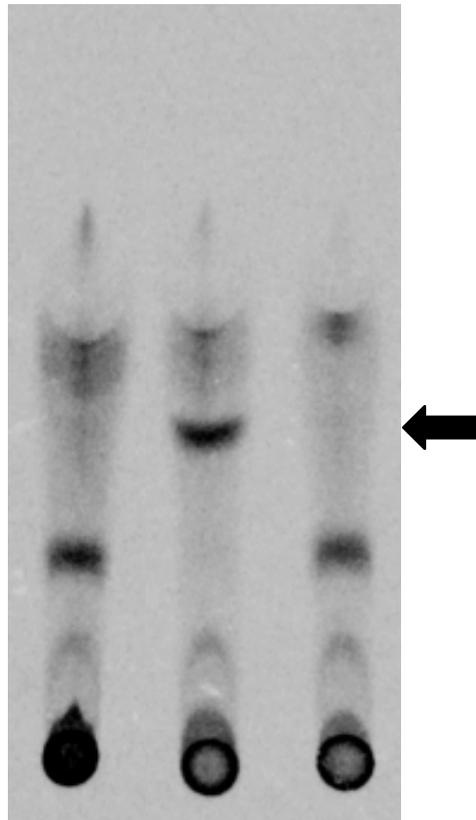


Fig. 3 *ddvA* 遺伝子破壊株は細胞質画分の GlcNAc 代謝産物に野生株と異なる代謝物のパターンを持つ

黄色ブドウ球菌の野生株および *ddvA* 遺伝子破壊株を [<sup>14</sup>C] - GlcNAc 添加培地で培養し、細胞を分画後、TLC で展開、オートラジオグラフィーで検出した。黒矢印は GlcNAc-mal を示す。白矢印は GlcN-mal と推測される GlcNAc 代謝物。



|          |         |               |   |
|----------|---------|---------------|---|
| DdvA-His | -       | -             | + |
|          | WT      | $\Delta ddvA$ |   |
|          | Cytosol |               |   |

Fig. 4 DdvA-His タンパク質は $\Delta ddvA$  株の細胞質中の GlcNAc 代謝物を分解する。  
 黄色ブドウ球菌の野生株および *ddvA* 遺伝子破壊株を [ $^{14}\text{C}$ ] - GlcNAc 添加培地で培養し、細胞質画分を調製後、TLC で展開、オートラジオグラフィーで検出した。黒矢印は GlcNAc-mal を示す。

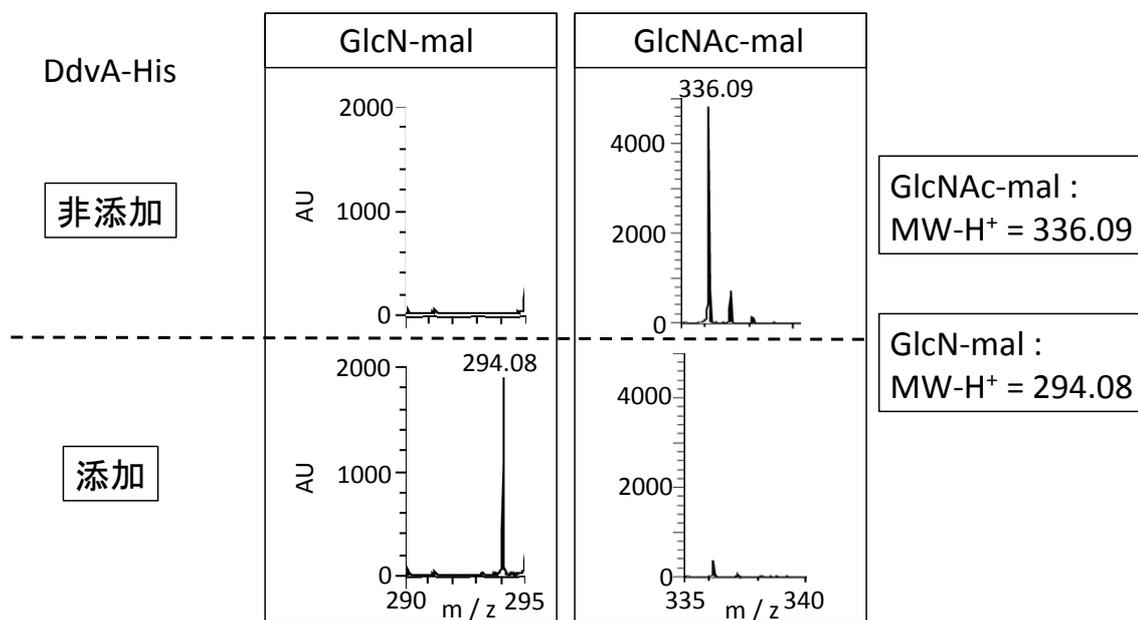
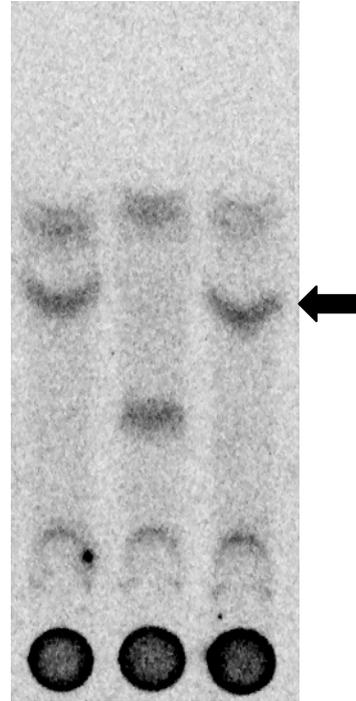


Fig. 5 DdvA-His は GlcNAc-mal の脱アセチル化に必要である。

DdvA-His 非添加（上段）および添加（下段）条件で *ddvA* 遺伝子破壊株の細胞質画分と GlcNAc-mal を 37°C で反応させ、ESI-MS により GlcNAc-mal および GlcN-mal を検出した。



|                     |                       |   |   |
|---------------------|-----------------------|---|---|
| DdvA-His            | -                     | + | + |
| 1,10-phenanthroline | -                     | - | + |
|                     | <hr/>                 |   |   |
|                     | $\Delta ddvA$ cytosol |   |   |

Fig. 6 DdvA による GlcNc-mal の分解には二価の金属イオンが必要

[<sup>14</sup>C] -GlcNAc を添加した培地で培養した *ddvA* 破壊株の細胞質画分に DdvA-His を 1, 10-phenanthroline で前処理したものと、していないものをそれぞれ混合し、GlcNAc-mal と 37°C で反応させた。TLC で展開後、オートラジオグラフィーで検出した。

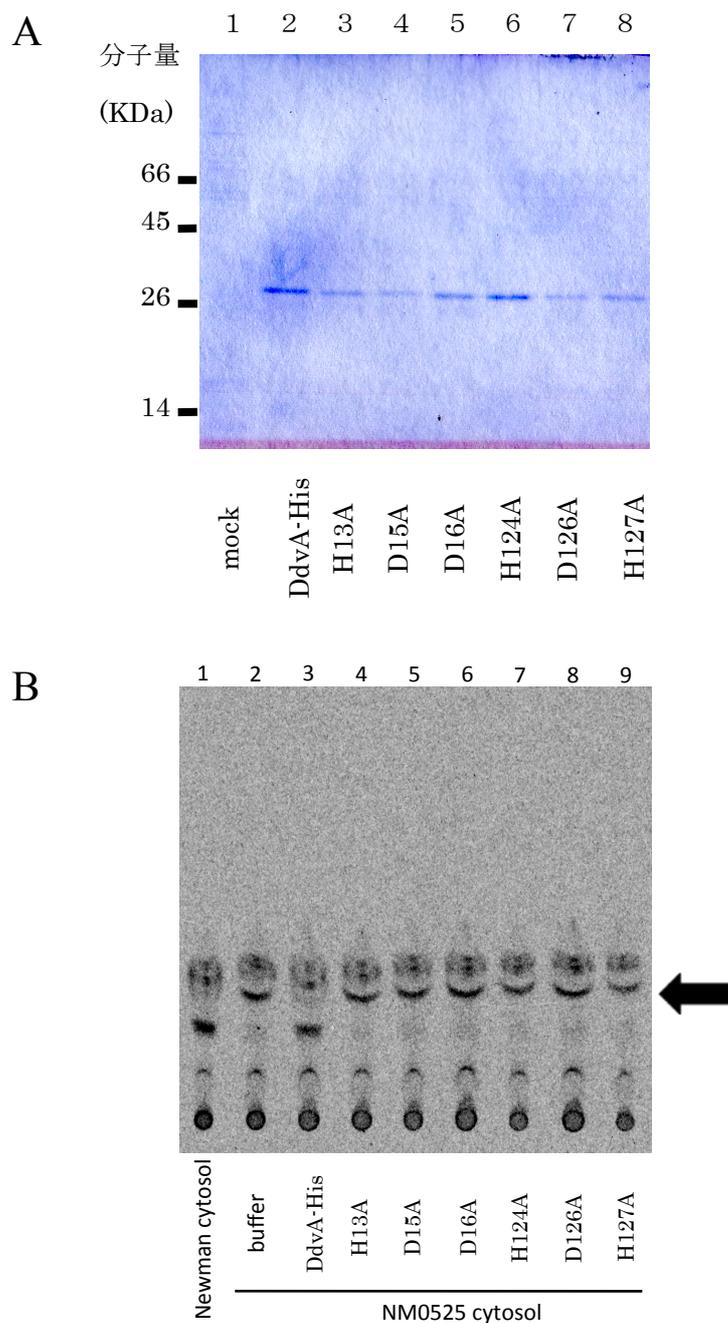


Fig. 7 酵素活性に必要と推測されるアミノ酸をアラニンに置換した変異型 DdvA は GlcNAc-mal 分解能が低下している。

調製した変異型 DdvA タンパク質の SDS-PAGE 像 (A)、 $[^{14}\text{C}]$  - GlcNAc 添加培地で培養した *ddvA* 破壊株細胞質に各変異型 DdvA タンパク質を添加し、 $37^\circ\text{C}$  で反応させ TLC で展開、検出した (B)。黒矢印は GlcNAc-mal を示す。

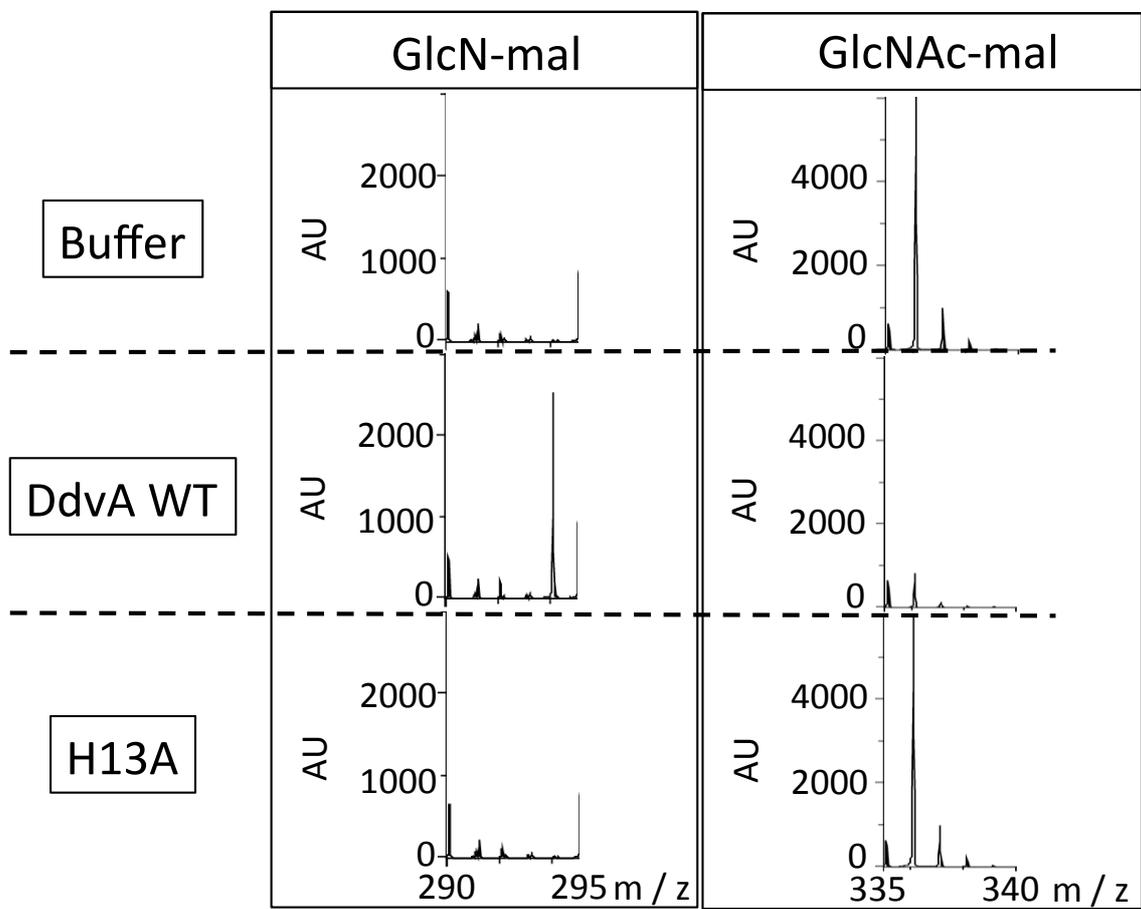
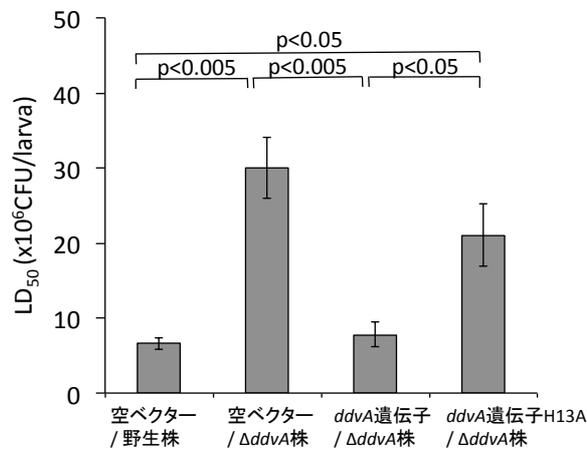


Fig. 8 金属イオンの配位に必要と推測される13番目のヒスチジンをアラニンに置換した変異型 DdvA は GlcNAc-mal 脱アセチル化活性が低下している

DdvA-His 非添加（上段）、添加（中段）もしくは変異型 DdvA 添加（下段）条件で *ddvA* 遺伝子破壊株の細胞質画分と GlcNAc-mal を 37°C で反応させ、ESI-MS により GlcNAc-mal および GlcN-mal を検出した。

A



B

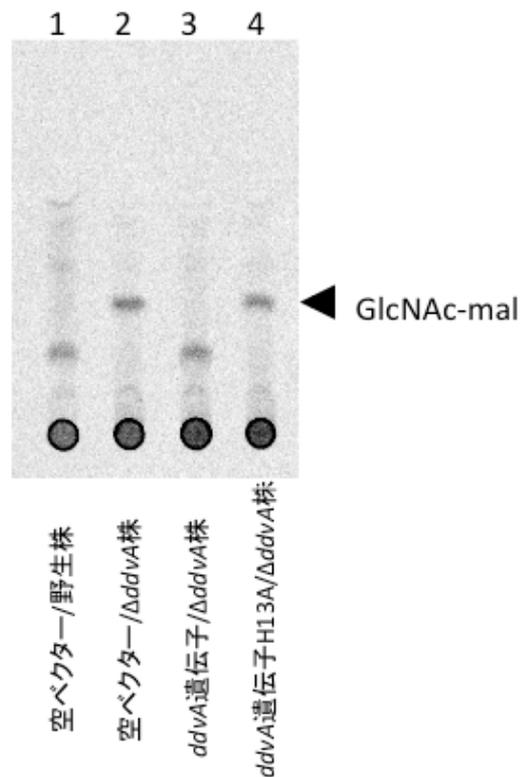


Fig. 9 GlcNAc-mal 脱アセチル化活性の低下した遺伝子を導入した黄色ブドウ球菌は病原性が低下している

糖尿病カイコに対する黄色ブドウ球菌各株の LD<sub>50</sub> (A)、各株の細胞質中の GlcNAc 代謝物 (B)。黒矢印は GlcNAc-mal を示している。

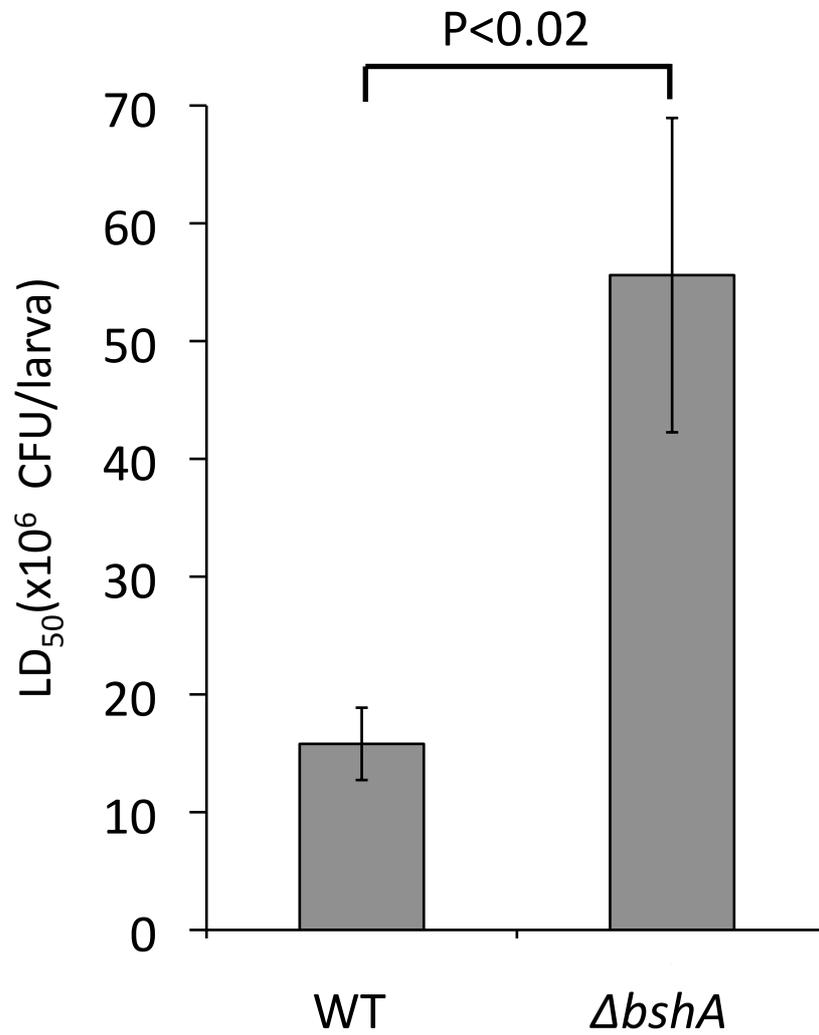


Fig. 10 黄色ブドウ球菌の GlcNAc-mal 合成酵素をコードする遺伝子の破壊株は糖尿病宿主に対する病原性が低下している

糖尿病カイコに対する GlcNAc-mal 合成酵素をコードする遺伝子の破壊株 ( $\Delta bshA$ ) の LD<sub>50</sub>。

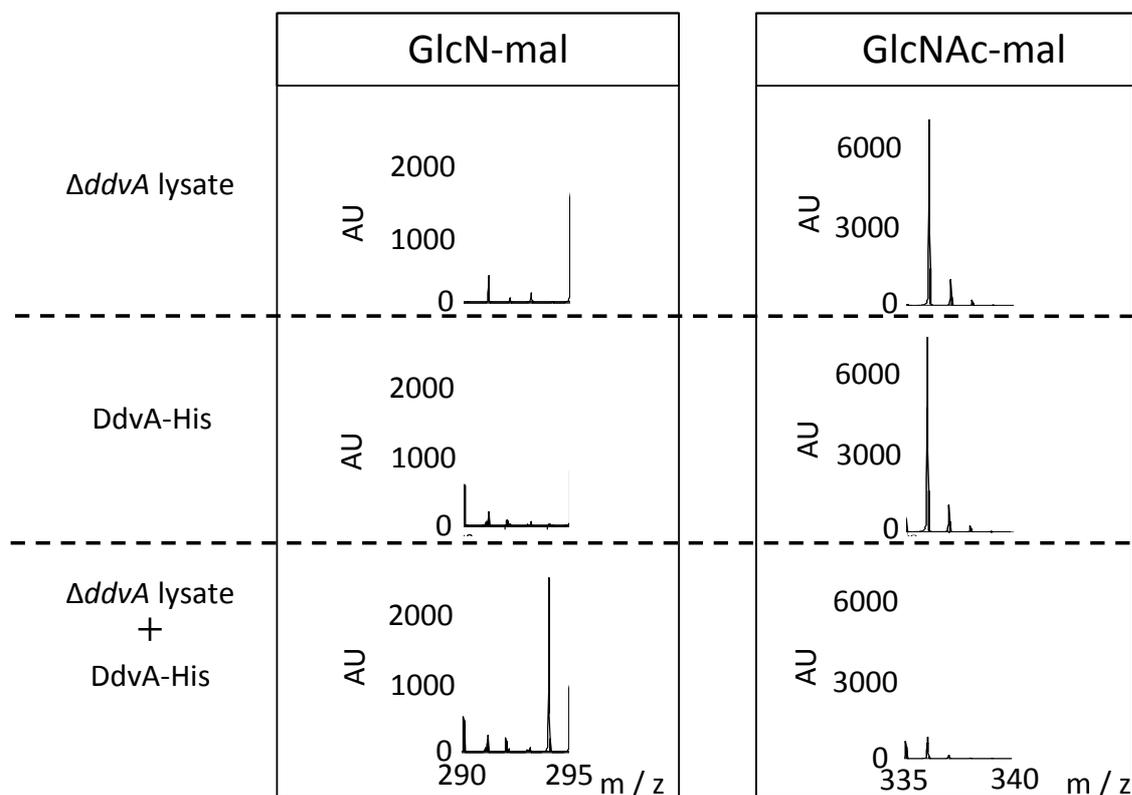


Fig. 11 DdvA-His の GlcNAc-mal 脱アセチル化には *ddvA* 破壊株の細胞質画分が必要である。

*ddvA* 遺伝子破壊株の細胞質画分（上段）DdvA-His（中段）もしくはその両方（下段）を添加した条件で GlcNAc-mal を 37°C で反応させ、ESI-MS により GlcNAc-mal および GlcN-mal を検出した。

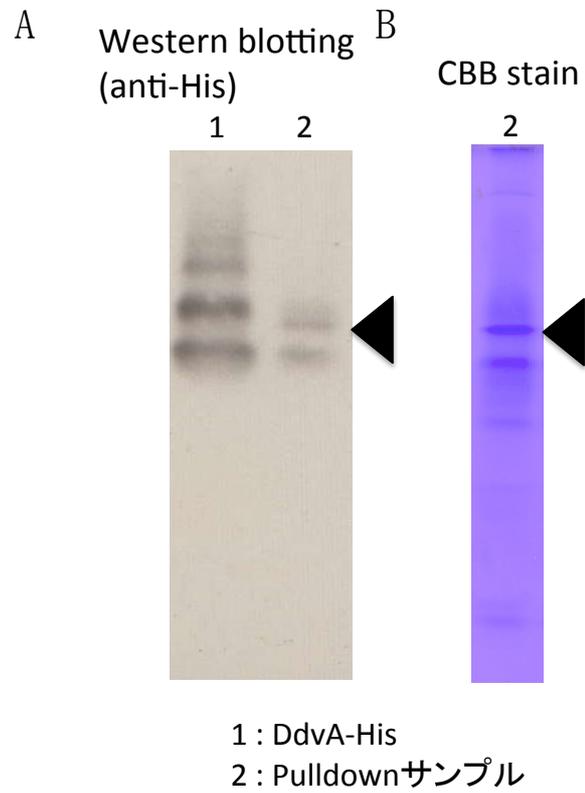
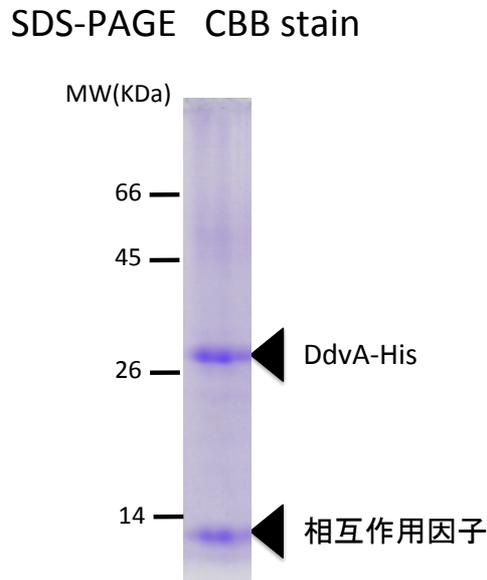


Fig. 12 プルダウンサンプルには DdvA-Hos とバンド強度の異なるバンドが見られた DdvA-His と *ddvA* 破壊株の細胞破砕液をプルダウンサンプルを  $\text{Co}^{2+}$ カラムを用いたプルダウンに供したサンプルを Native PAGE に供し、Western blotting (A) もしくは CBB 染色 (B) した。

A



B

```
MEPIKEQEVIDLLASFEHKPVYLHVETTNGAYANHFDQRVFN  
AGTFLRNIQITYTHAQLKGGNKEPYRIGLKLSNGGWVYVQGL  
THFEVNEHDEFIAGFN YEGQLAAALQISERPFNL
```

Fig. 13 DdvA-His は *ddvA* 破砕液中の Dbp タンパク質と相互作用する。

Native-PAGE で精製した DdvA タンパク質と異なるパターンを示したプルダウンサンプルを泳動したレーンのバンドを切り出し、SDS-PAGE に供し、CBB 染色した (A)。相互作用因子と推測されるバンドを Peptide MS Fingerprinting 解析に供して検出されたペプチド配列 (B のマゼンタの配列) と Dbp タンパク質の全長 (B)。

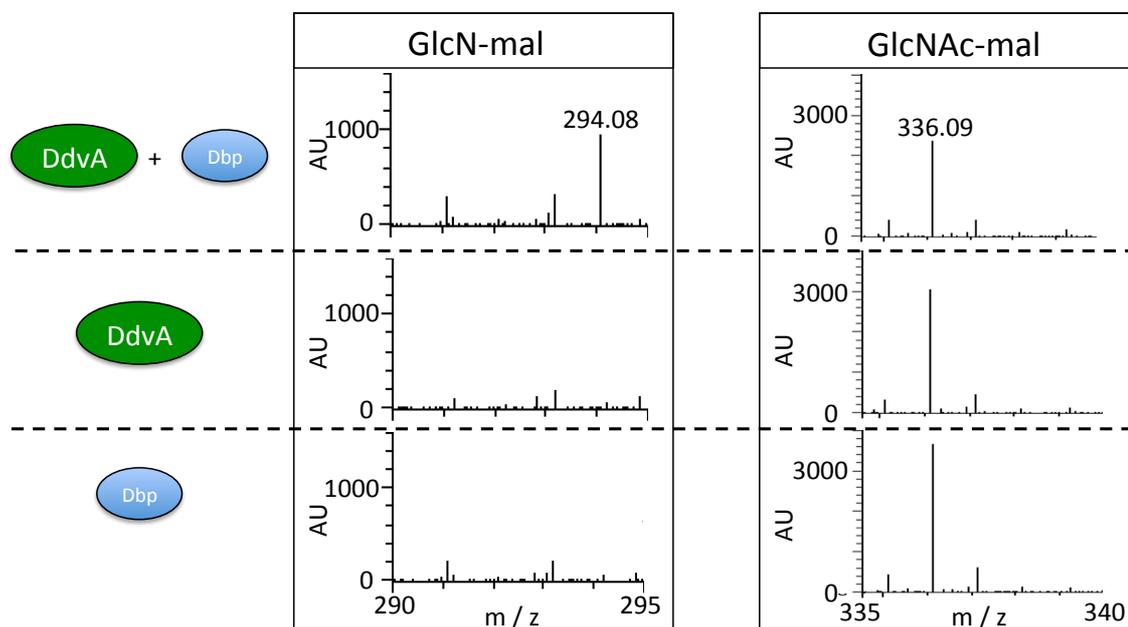


Fig. 14 Dbp タンパク質は GlcNAc-mal 脱アセチル化酵素のサブユニットである

DdvA-His（中段）Dbp-GST（下段）もしくはその両方（上段）を添加した条件で GlcNAc-mal を 37°C で反応させ、ESI-MS により GlcNAc-mal および GlcN-mal を検出した。

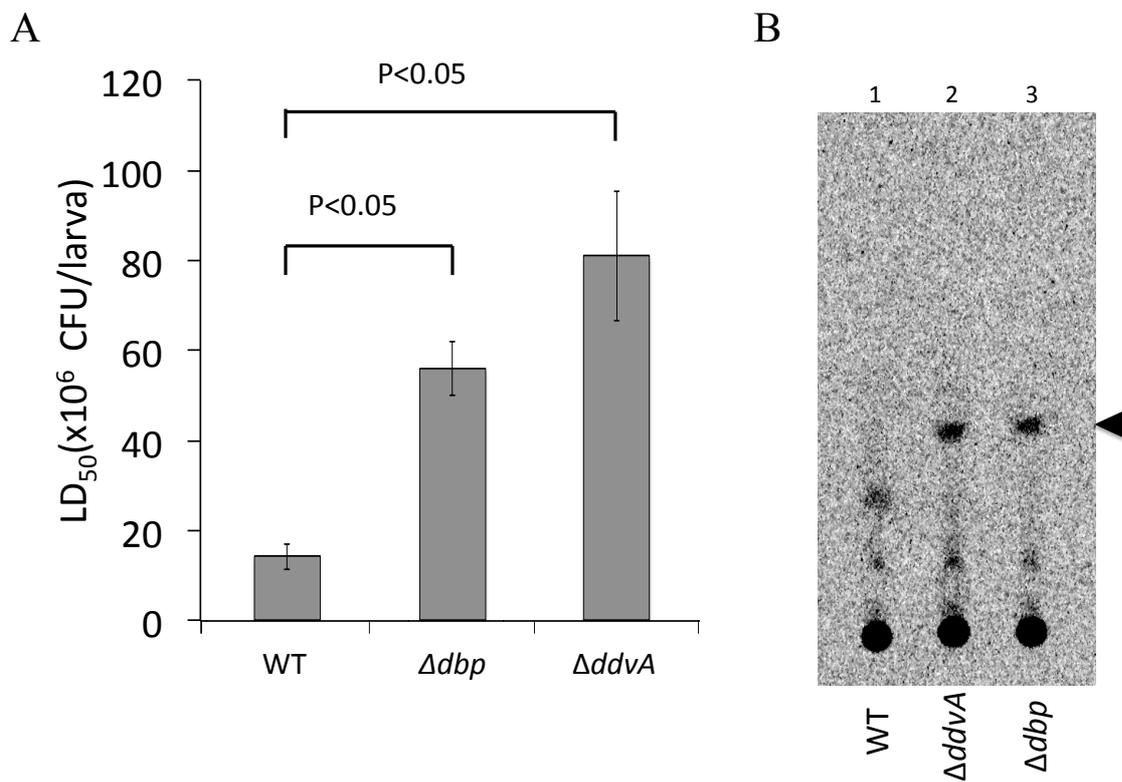


Fig. 15 *dbp* 遺伝子欠損株は糖尿病宿主に対する病原性が低下している

糖尿病カイコに対する野生株、*ddvA* 破壊株、*dbp* 欠損株の LD<sub>50</sub> (A)、各株の細胞質中の GlcNAc 代謝物 (B)。黒矢印は GlcNAc-mal を示している。

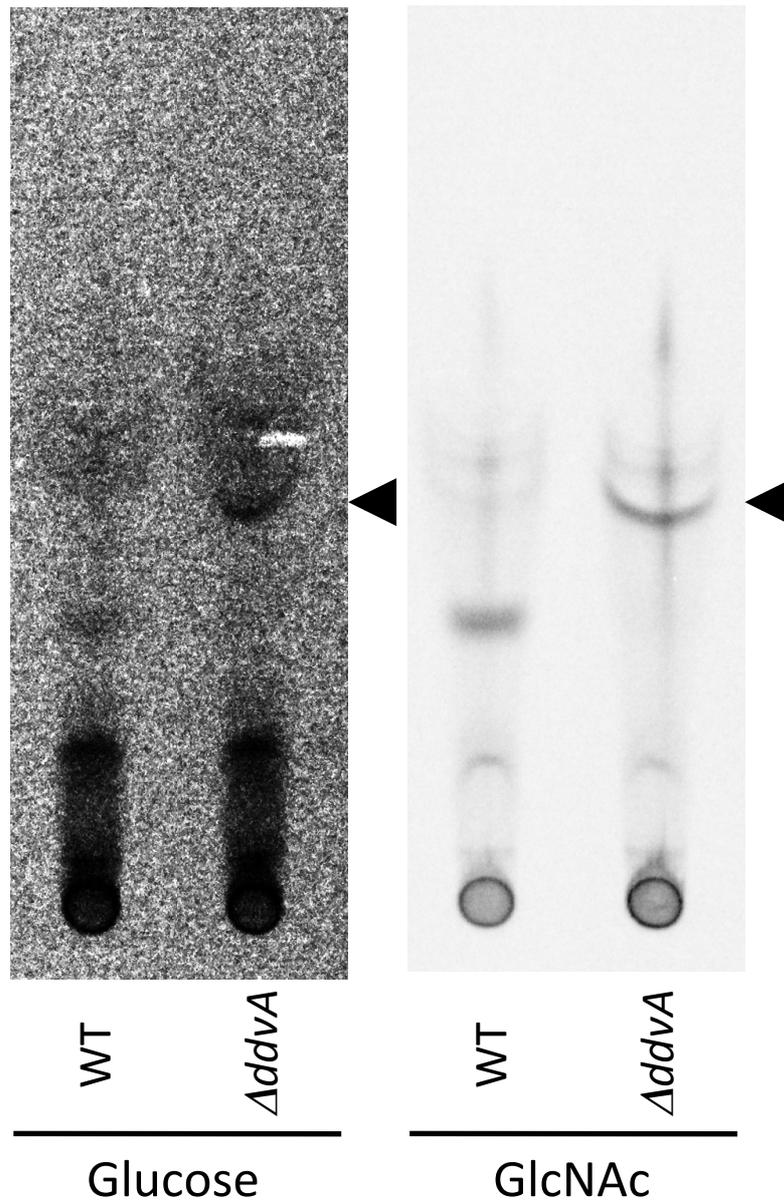


Fig. 16 *ddvA* 遺伝子破壊株の細胞質画分では Glucose 代謝物として GlcNAc-mal が蓄積している

黄色ブドウ球菌の野生株および *ddvA* 遺伝子破壊株を [ $^{14}\text{C}$ ] - Glucose (左図) もしくは [ $^{14}\text{C}$ ] - GlcNAc (右図) 添加培地で培養し、細胞を分画後、TLC で展開、オートラジオグラフィーで検出した。黒矢印は GlcNAc-mal を示す。白矢印は GlcN-mal と推測される GlcNAc 代謝物。

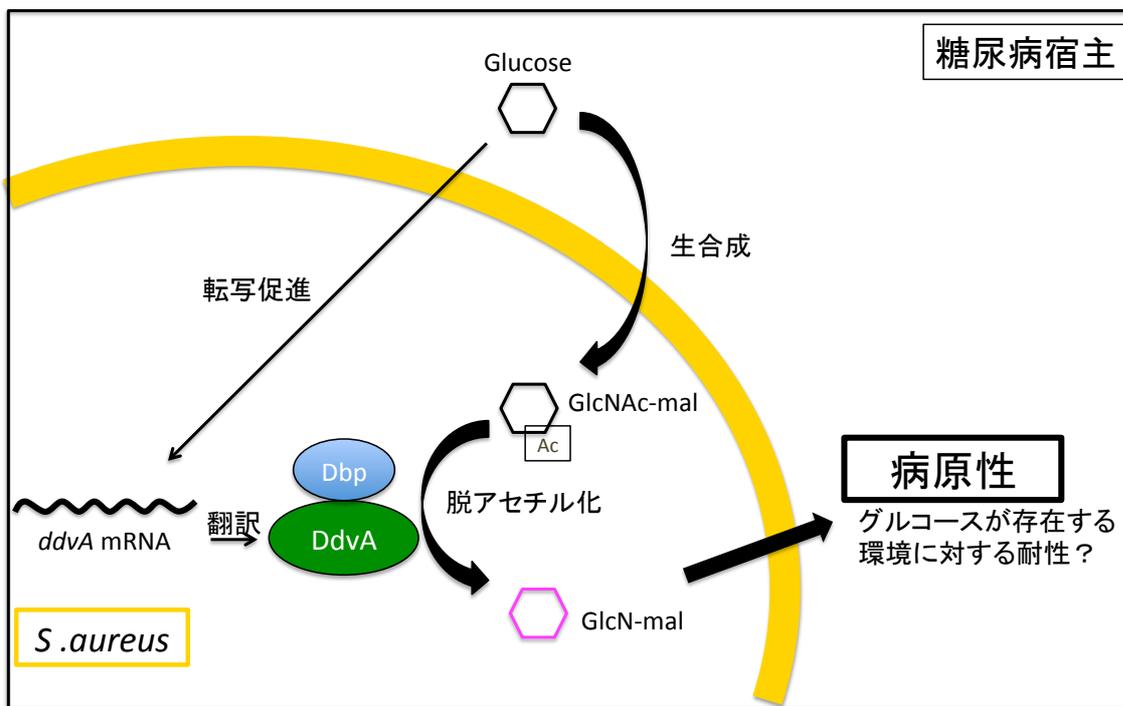


Fig. 17 本研究のモデル

**TABLE 1**

**List of bacterial strains and plasmids used**

| Strains or plasmids          | Genotypes or characteristics                                      | References      |
|------------------------------|---|-----------------|
| <b>Strains</b>               |   |                 |
| <i>Escherichia coli</i>      |   |                 |
| JM109                        | Host strain for cloning plasmid DNA                               | Takara Bio      |
| BL21(DE3)                    | Host strain for expression of recombinant protein                 | Takara Bio      |
| <i>Bacillus subtilis</i>     |   |                 |
| 168                          | Strain for extracting <i>genome</i>                               | Kunst, 1997     |
| <i>Staphylococcus aureus</i> |   |                 |
| RN4220                       | NCTC8325-4, restriction mutant                                    | Peng, 1988      |
| Newman                       | Laboratory strain, High clumping factor                           | Duthie, 1952    |
| NM0525                       | Newman <i>ddvA</i> ::pT0525                                       | This study      |
| NM0526                       | Newman <i>dbp</i> ::pT0526  | This study      |
| NM1291                       | Newman <i>bshA</i> ::pT1291                                       | This study      |
| <b>Plasmids</b>              |   |                 |
| pCK20                        | <i>S. aureus</i> integration deletion vector; Cm <sup>r</sup>     | Ichihashi, 2003 |
| pNDKm                        | <i>E. coli</i> - <i>S. aureus</i> shuttle vector; Km <sup>r</sup> | Matsuo, 2003    |
| pT0525                       | pCK20 with partial <i>ddvA</i> from Newman                        | This study      |
| pT0526                       | pCK20 with partial <i>dbp</i> from Newman                         | This study      |
| pT1291                       | pCK20 with partial <i>bshA</i> from Newman                        | This study      |
| pD496G                       | pNDKm with intact <i>ddvA</i> from Newman                         | This study      |
| pH13A                        | pNDKm with mutated <i>ddvA</i> (H13A)                             | This study      |
| pET-28a                      | T7 promoter based expression vector, Km <sup>r</sup>              | Novagen         |
| pGEX-4T3                     | tac promoter based expression vector, Amp <sup>r</sup>            | GE Healthcare   |
| pBsbshA                      | pET-28a with <i>bshA</i> from 168                                 | This study      |
| pddvA                        | pET-28a with <i>ddvA</i> from Newman                              | This study      |
| pET-H13A                     | pET-28a with mutated <i>ddvA</i> (H13A)                           | This study      |
| pET-D15A                     | pET-28a with mutated <i>ddvA</i> (D15A)                           | This study      |
| pET-D16A                     | pET-28a with mutated <i>ddvA</i> (D16A)                           | This study      |
| pET-H124A                    | pET-28a with mutated <i>ddvA</i> (H124A)                          | This study      |
| pET-D126A                    | pET-28a with mutated <i>ddvA</i> (D126A)                          | This study      |
| pET-H127A                    | pET-28a with mutated <i>ddvA</i> (H127A)                          | This study      |
| pdbp                         | pGEX-4T3 with <i>dbp</i> from Newman                              | This study      |

**TABLE 2****Primers used in this study**

| <b>Target</b>                | <b>Primer</b>          | <b>Sequence (5'-3')</b>                                |
|------------------------------|------------------------|--|
| <i>ddvA</i> -disruption      | F-ddvA-T               | GGAGGATCCCACATCCTGATGAAACC                             |
|                              | R-ddvA-T               | GAAGAATTCGTCTGCTGTTGCTTCGTGAT                          |
| <i>bshA</i> -disruption      | F-bshA-T               | CGCGAATTCATTTTATCACTTCAAATATCCCGTTT                    |
|                              | R-bshA-T               | CGCGGATCCTTAGTCCAAAGCTTTCTTTTCACTT                     |
| <i>dbp</i> -deletion         | F-U-db p-D             | TGGAACATCATCTTCGTTTTT                                  |
|                              | R-U-db p-D             | ATCACCTCAAATGGTTCGCTTCCTTACACTATCAATG<br>TGTTTTATCTTTC |
|                              | F-D-db p-D             | TACTGGATGAATTGTTTTAGAGGAGGCATCAACATGA<br>CTG           |
|                              | R-D-db p-D             | GTAAATCTGTCATTTTCGTTCTTAGTAGT                          |
| <i>ddvA</i> -complementation | Km-U-db p-D            | AGCGAACCATTTGAGGTGAT                                   |
|                              | Km-U-db p-D            | CTAAAACAATTCATCCAGTA                                   |
|                              | F-ddvA-C               | CGCTGCAGCACTTCAAATTA                                   |
| <i>ddvA</i> -promotor        | R-ddvA-C               | AACGACCTTCTCGTGTGAT                                    |
|                              | F-ddvA-P               | GAGGAGCTCCATTGTTTACATGCCTCCACA                         |
| <i>ddvA</i> -recombinant     | R-ddvA-P               | GGTGGTACCGGTTCCAACACGTTCACTCC                          |
|                              | F-BamHI <i>ddvA</i> -r | CGCGGATCCATGACTGACGAAAGACATGTATTAGTA<br>ATA            |
| <i>dbp</i> -recombinant      | R-XhoI <i>ddvA</i> -r  | GCGCTCGAGTTAAGATTTAAAGTGATATGTCCAATAT<br>GG            |
|                              | F-BamHI <i>dbp</i> -r  | CGCGGATCCGTGAACGTGTTGGAACCAATTA                        |
| Mutated <i>ddvA</i>          | R-XhoI <i>dbp</i> -r   | GCGCTCGAGCTATAAATTAATGGTCGCTCACTAA                     |
|                              | F-ddvA-H13A            | GTCCTGATGATGAAACCTTCT                                  |
|                              | R-ddvA-H13A            | TGGAAATATTACTAATAC                                     |
|                              | F-ddvA-D15A            | CTGATGAAACCTTCTCATCTG                                  |
|                              | R-ddvA-D15A            | CAGGATGTGGAAATATTACT                                   |
|                              | F-ddvA-D16A            | CTGAAACCTTCTCATCTGCAG                                  |
|                              | R-ddvA-D16A            | CATCAGGATGTGGAAATATT                                   |
|                              | F-ddvA-H124A           | GCTCCTGATCACGAAGCAACTG                                 |
|                              | R-ddvA-H124A           | TACTGCATATCCAGGATAAA                                   |
|                              | F-ddvA-D126A           | CTCACGAAGCAACAGCAGACG                                  |
|                              | R-ddvA-D126A           | CAGGATGTACTGCATATCCA                                   |
|                              | F-ddvA-H127A           | GCTGAAGCAACAGCAGACGCTGT                                |
|                              | R-ddvA-H127A           | ATCAGGATGTACTGCATATC                                   |
|                              | <i>ddvA</i> (qRT-PCR)  | Frt <i>ddvA</i>  |
| Rrt <i>ddvA</i>              |                        | TGCATCATTACTGAACGCAACTAA                               |
| <i>16S rDNA</i> (qRT-PCR)    | Frt16S                 | CAACGCGAAGAACCTTACCAA                                  |
|                              | Rrt16S                 | GCGGGACTTAACCCAACATCT                                  |

## 謝辭

薬学博士課程をとおしてご指導頂いた東京大学大学院薬学系研究科微生物薬品化学教室教授、関水久先生には深く御礼申し上げます。関水先生は、自然に対し疑問を持ち、それを素直に、そして積極的に洞察を加え、答えを導いて行く姿勢を自らお示しくださりました。また、研究者としてだけでなく、研究指導者として被教育者にどのように接し、何を伝えるべきかをお教えくださりました。セミナーおよびコロキウムにおいては、自らの研究の論理的な説明や、研究の新規性および意義を伝えることの重要性について熱意を持ってご教示頂きました。

研究室において、私の研究に常に鋭い意見をさせていただいた垣内力准教授には深く感謝申し上げます。特に本研究の初期に垣内准教授にさせていただいた指摘から、本研究は大きく進展いたしました。また、研究におけるコンセプトの重要性を繰り返し説いていただいた浜本洋助教に深く感謝申し上げます。

松本靖彦助教は私が薬学博士課程に入学する以前から今に至るまで、研究に関する考え方や、研究者として他人とどのようにコミュニケーションを取るべきかなど様々なことをお教えいただき深く感謝しております。特に本研究の遂行は松本先生の直接のご指導の上に成り立っており、研究を遂行する過程で研究の醍醐味や発想、忍耐力など研究者に必要なことを身を持ってお教えくださりました。

本論文の作製にあたり副査としてご指導下さりました東京大学大学院薬学系研究科堅田利明教授、楠原洋之教授、富田泰輔教授、名黒功講師に深く感謝申し上げます。

薬学博士課程 4 年間に関わった研究室の先輩・後輩方、同期の方々には大変感謝しております。卒業後も多くの先輩方には懇意にいただき、研究のアドバイスを頂いただけでなく、その研究に対する真剣な態度から私自身もモチベーションをもらいました。同期および後輩の方々とは様々な議論を行い、公私共に様々な面でお世話になりました。生物および創薬に対して強い興味を持つ多くの人と議論

する時間を得られたことは素晴らしい経験になりました。

研究を初めてお教え下さった東京薬科大学薬学部免疫学教室教授、大野尚仁先生、同准教授、安達禎之先生に深く感謝申し上げます。私が今研究を続ける事ができているのは、大野先生、安達先生が最初に研究する機会を与えてくださったからです。また、免疫学研究室の山中大介助教に深く感謝致します。学部学生時代はもとより、薬学博士課程に入学した後も良き理解者として多くの相談に乗って頂きました。

最後になりましたが、私の研究生活を経済的・精神的に支えて下さった両親、および家族に感謝します。長い薬学博士課程生活の間、ひたすら研究に打ち込む事ができたのは両親、家族の励ましや、支えがあったからです。ここまで私を育てていただきありがとうございます。

石井雅樹