黄色ブドウ球菌はどのような機構で ストレスに耐えるか？

太田 敏子

筑波大学基礎医学系微生物
〒305 茨城県つくば市天王台1-1-1

〔受理：1996年1月31日〕

はじめに

約40億年前に生命が誕生して以来、生命はさまざまな環境変化にさらされてきた。生命体はそのつど、環境の激変に耐え、それらから自らを守るために防御反応を進化させて適応してきた。今も、生命体の生死をかけた生き残り戦略は絶え間なく続けられている。細菌は、生命が膜で囲まれた細胞として機能した最古の単細胞生物である。1個の細胞の死はそのまま生命体の死を意味する。したがって、細菌の防御反応としてのストレス応答のしくみは細菌が生き残るためにきわめて重要な位置を占めている。細菌が生き残れるかどうかは外界の変化に対して素早く対応できることにかかると。すなわち、1つの基質に基づく代謝系を他の代謝系へいかに早く切り替えるかにかかると。それゆえ、細菌の世界では柔軟性と合理性とが要求される。近年、このストレス応答を担っている一群の蛋白質（HSP）が明らかにされた。これらの蛋白質は細菌からヒトまできわめてよく保存されており、細胞の生存に中心的な役割を果たしていることがうかがえる。

黄色ブドウ球菌は各種の病原因子を産生し、ト

ランスボゾン、プラスミドおよびISエレメント（挿入配列）など変わりやすい遺伝的要素をもち分子レベルでの解析が難しい。本稿では、黄色ブドウ球菌のHSPを中心に、筆者らのグループが解析しているストレス応答の機構に関する最近の知見を私見をまじえながら解説してみたい。

1. HSP とは何者？

細胞の生存にとって都合の悪い種々のストレスに対して自らを守る実体は、一過性に急激に合成される一群の蛋白質で、ストレス蛋白質と総称される。そのうち熱により誘導されるものは熱ショック蛋白質（Heat Shock Protein : HSP）と呼ばれる。まだ、その全容が明らかにされたわけではないが、最近の研究によりHSPは必ずしもストレス時だけでなく、正常の状態にある細胞の中でもつくられており、その多くはストレス応答以外の機能をも営んでいることが解ってきた(3)。細胞内では蛋白質の構造はいろいろな局面で多様に变化する。合成されたばかりのポリペプチド鎖が折り畳まれるとき、蛋白質が種々の膜を通過するとき、熱などの環境の変化にさらされたとき、蛋白質の役割がおわって分解されるときなどである。このように蛋白質の構造が大きく変化するときには介助役としての分子シャペロン、すなわちHSPが必要とされることが解ってきた。合成から分解までの、種々の蛋白質の一生を解き明かすことは生命の本質の理解にほかならない。その一

Toshiko OHTA

How does *Staphylococcus aureus* Adapt to Environmental Stresses?

Institute of Basic Medical Sciences, University of Tsukuba, Tsukuba, Ibaraki 305

生につねに寄り添う HSP もまた生命の影の仕掛人ということになる。

シャペロンには分子量によっていくつかのファミリーが知られており、その機能と局在性はさまざまである。これらは細菌から高等動植物まで広く分布するが、種特異的なものもいくつかある。ここでは、原核生物のシャペロンに的を絞る。細菌では大腸菌で多くのシャペロンについてよく研究されている。表 1 にそれらをまとめた。代表的シャペロンである GroEL の細胞内での存在様式は、その精製蛋白質の分子量や電子顕微鏡による解析から 7 量体を形成しており、しかも 7 量体が二重構造をとって機能していることが明らかにされている (図 1) (11)。近年、大腸菌の GroEL が結晶され、その解析からさらに微細な構造も解りつつある (2)。また、生体内における多彩な機能ゆえに、HSP すなわち分子シャペロンは医学の分野にもさまざまな局面でその名を聞くことになる。

2. 黄色ブドウ球菌はストレスに耐えて細胞内に HSP 群を産生する

黄色ブドウ球菌を高温度によるストレス条件下で培養すると、50°C がその生存限界温度であり、

増殖は 50% 以下に抑えられる。そこで、常温 (37°C) で培養した菌を 46°C に数分間さらして熱ショックをかけ、菌体内蛋白質の変動を二次元電気泳動により分析してみた。それによると、熱ショック後には少なくとも十数種類の蛋白質についてその発現量が増強された (図 2 A) (10)。これらのうち比較的増強量の多い 8 種類の蛋白質について N 末端を分析したところ、5 種類は大腸菌などで同定されている HSP の仲間であることが解った。HSP は熱のみならず有機溶媒や重金属イオン存在下でもその発現が増強される。しかも興味深いことに、黄色ブドウ球菌をアルカリ性にさらすと、その細胞質中に顕著に発現増強する分子量約 20 kDa の蛋白質が見出された (図 2 B)。筆者らはこれをアルカリショック蛋白質 (ASP) と命名してその機能を調べている (7)。おそらく、これも未知のストレス応答蛋白質の一つであろう。黄色ブドウ球菌の HSP は、大腸菌と比べると常温でも相当量発現産生される。好熱菌 *Bacillus stearothermophilus* や有機溶媒中で生存する *Clostridium acetobutylicum* においても同様である。これらの菌は薬剤、高温および有機溶媒など細胞にとって過酷な環境で生存していることが共通している。これよりさらに過酷な状況に

表 1. 大腸菌シャペロンの種類

HSP	分子量	遺伝子 (分)	性質・機能
DnaK	69,000	<i>dnaK</i> (0.3)	ATP 分解, 自己リン酸化, DNA 複製, 蛋白質の折りたたみ, 会合, 分解, 膜透過, ストレス応答制御
DnaJ	41,000	<i>dnaJ</i> (0.3)	2 量体, DNA に結合, 膜に局在, DNA 複製, DnaK と共同作用
GrpE	22,000	<i>grpE</i> (57)	DNA 複製, DnaK と共同作用, 増殖に必須
GroEL	57,000	<i>groEL</i> (94)	14 量体, ATP 分解, 蛋白質の折りたたみ, 会合, 膜透過, 分解, 増殖に必須
GroES	10,000	<i>groES</i> (94)	7 量体, 蛋白質の折りたたみ, 会合, 膜透過, 分解, 増殖に必須
Lon	87,000	<i>lon</i> (10)	4 量体, ATP 依存性プロテアーゼ
ClpP	22,000	<i>clpP</i> (10)	ATP 依存性プロテアーゼの蛋白質分解サブユニット
ClpB	96,000	<i>clpB</i> (57)	ClpA (ATP 依存性プロテアーゼの制御サブユニット) のアナログ
σ^{70}	70,000	<i>rpoD</i> (67)	転写開始因子, 増殖に必須
σ^{32}	32,000	<i>rpoH</i>	転写開始因子
LysU	61,000	<i>lysU</i> (94)	リジン tRNA 合成酵素
HtpG	71,000	<i>htpG</i> (11)	不明
HtpI	48,000	<i>htpI</i> (97)	不明
HtpY	21,000	<i>htpY</i>	転写制御

図1. シャペロンの分子構造。(文献2および3より引用)
大腸菌のシャペロン GroEL 結晶構造モデルと好熱古細菌のシャペロン TF55 の電子顕微鏡像。

さらすと、HSP 群の発現量はもっと増強される。このことからこれら HSP 群が自らを守るための防御機構をつかさどることが容易に予想できる。このように黄色ブドウ球菌の細胞内では、環境ストレスから自らを守るために各種のストレス蛋白質がその量と種類で対抗してネットワークを張りめぐらしているようである。多くの場合、ストレス環境で生育する菌はグラム陽性菌なのである。これは後に述べる環境の変化に対する応答のしくみとも関連してくる。

3. 黄色ブドウ球菌の *hsp* 遺伝子はオペロン構造をとっている

ゲノムはその調節を含む蛋白合成のプログラムであるとする、ゲノムの転写を制御すれば蛋白質がうまく共役するようにその発現を調節することができる。そこで、まずそのプログラムを見ることが必要となる。そのために、筆者らのグループでは代表的な *hsp* 遺伝子群をクローニングした。それら遺伝子の構造を調べてみると、HSP60 は *hsp10* と *hsp60* を (9)、HSP70 は 5' 末端から *orf37*, *hsp20* (*grpE*), *hsp70* (*dnaK*), *hsp40* (*dnaJ*), および *orf35* の構造遺伝子をそれぞれこの順に含んでおり、クラスターを成していた (図3) (10)。このうち、*orf37* と *orf35* の構造遺伝子は黄色ブドウ球菌で新たに発見され、ノ

ゼン解析によりこれらも熱ショック遺伝子であることが確認された。それぞれ上流の調節領域を調べてみると、 σ^{70} 認識型のプロモーター配列と相同性の配列があり、それぞれ1つのオペロンとして転写単位を形成していた。オペロン構造は大腸菌とは異なっており、*Bacillus subtilis* (12) や *Clostridium acetobutylicum* (8) とよく類似していた。細菌ではゲノム発現の経済性の観点から1代謝系の遺伝子群はたがいに隣接してクラスターを成しているが、*hsp* 遺伝子群もその例にもれない。オペロン上の HSP 群はシャペロンとして働く際に順次反応していくことが知られている。新たに見出された *orf37* と *orf35* の機能は不明であるが、おそらくこれらもシャペロン反応の一ステップを担っているのであろう。

4. 黄色ブドウ球菌の *hsp* 遺伝子は調節領域のパリンドローム構造によってその発現が制御されている

黄色ブドウ球菌の HSP70 と HSP60 オペロンの上流領域をもう少し詳しく見てみると、2つの特徴が見られる。大腸菌で知られる σ^{32} 認識型のいわゆる熱ショックプロモーター配列 (13) はなく、 σ^{70} 認識型のプロモーター配列があることと、そのプロモーター配列と HSP 構造遺伝子との間に11塩基をはさんで逆方向反復配列 (パ

図2. A. 黄色ブドウ球菌の熱ショック前後における細胞内蛋白質の二次元電気泳動。
番号は熱ショック後に発現増強される蛋白質の位置を示す。
B. 黄色ブドウ球菌のアルカリストレス後における細胞内蛋白質の二次元電気泳動。
矢印はアルカリショック後に発現増強される蛋白質の位置を示す。

HSP60オペロン

HSP70オペロン

図3. 黄色ブドウ球菌の HSP60 と HSP70 オペロンの遺伝子構造。

リンδροーム) があることである (図4)。このパリンδροーム配列は DNA の二次構造に反映される。この配列は2つの HSP オペロンに共通であり, しかもグラム陽性菌の HSP オペロンにも非常によく保存されていた。黄色ブドウ球菌の構造遺伝子上流にはパリンδροームが見られることが多いが, その塩基配列は HSP オペロンのパリンδροームとは異なっている。これらのことから, このパリンδροームは HSP オペロンに特異的に存在している構造で, 熱応答の機構に関与し

ていることが予想される。そこで, このパリンδροームをもつ黄色ブドウ球菌の HSP 遺伝子を大腸菌内で発現させてみた。驚くべきことに, 大腸菌内では黄色ブドウ球菌の HSP 遺伝子は熱ショックには無関係に構成的に過剰発現することが解った。パリンδροーム配列を欠失した変異プラスミドの場合には熱誘導もかからず, 構成的過剰発現もされなかった (4)。*B. subtilis* では, このパリンδροーム配列に部位特異的な変異を導入すると, HSP の発現は熱ショックにより増強されないこ

図4. 各種細菌における HSP オペロンの上流構造。

図5. 黄色ブドウ球菌の熱ショック応答機構のモデル。

とを調べている (14)。黄色ブドウ球菌でもおそらく同じことであろう。このように、グラム陽性菌では *hsp* 遺伝子は調節領域のパリンドローム構造によってその発現が制御されているらしい。熱ショック応答の機構は明らかにグラム陰性菌とは異なっている。

5. 黄色ブドウ球菌は転写因子 σ^{70} ともう一つの転写因子が協力して熱ショックに応答している

これまでも述べたように、熱ショック遺伝子上流の調節領域には熱ショックプロモーターの構造はなく、 σ^{70} 認識型プロモーター構造とそれに続くパリンドローム構造が熱ショック時に関与することが解った。それでは、何がその構造を認識してその転写を制御するのだろうか？ 大腸菌では HSP 発現の正の調節因子、 σ^{32} が熱ショックプロモーター配列を認識してその転写を制御することが知られる (13)。しかしながら、グラム陽性菌では σ^{32} に相当する転写因子は同定されていない。そこで、黄色ブドウ球菌で唯一報告されている σ 因子である σ^{70} ホモログ (*plaC*) (1) について熱ショック応答に関与する可能性を検討したところ、熱ショック 5 分後に明らかに転写レベルで誘導されるバンドが検出された。この結果は、*plaC* が黄色ブドウ球菌の熱ショック応答に関与していることを強く示唆している。また、ゲルシフト法によりパリンドローム配列をもつ DNA に結合する因子を解析したところ、常温でその DNA に結合する因子の存在が示唆された (5)。

このように、黄色ブドウ球菌ではストレスにさらされた時に他の蛋白合成を抑えて優先的に HSP の転写を促す指令は RNA ポリメラーゼの構成サブユニット、 σ^{70} と DNA に結合する未知の因子の協力で成されるようである。その調節の

しくみの詳細は今後の研究を待たなければならないが、現段階で筆者らの考えているモデルを図5に示す。まず、熱ショックがかかると σ^{70} が過剰に転写される。これが翻訳されると、HSP オペロンの σ^{70} 認識型プロモーターを認識して結合し、熱ショック遺伝子の転写を促進する。一方、プロモーターのすぐ下流にあるパリンドロームには、制御因子が結合しており、通常は HSP オペロンの遺伝子の転写を抑制しているが、熱ショックにより解離し、過剰の σ^{70} による指令を受けてそれらの転写が開始される。その結果として過剰の HSP が産生される。つまり、この制御因子は負の調節因子として DNA に作用している。これが、筆者らの作業仮説である。現在、これらの因子を単離すべく努力を重ねている。

6. HSP は病原性にかかわるか？

院内感染菌として問題となっているメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: MRSA) は、ほとんどすべての β ラクタム剤に対して耐性を獲得した黄色ブドウ球菌である。メチシリン耐性能は高温で培養すると消失し、常温に戻して培養すると回復することが知られている。また、黄色ブドウ球菌が産生するほとんどの毒素は、*agr* 遺伝子によりそれらの発現が制御されているが、温度や pH などその遺伝子もまた制御を受ける。黄色ブドウ球菌のように常在菌でありながらヒトに病原性を発揮するものは、環境の変化に応じて病原因子の産生を調節している。しかし、その調節機構はまだ不明である。このような外界の環境の変化をキャッチして代謝系の交通整理に HSP が関与しているとすれば、上記の現象も説明できるかもしれない。

お わ り に

黄色ブドウ球菌の環境変化に应答するしくみを、分子のことばで説明しようとする研究は1970年代にすでに始まっていた。現在、筆者は筑波大学基礎医学系・林 英生教授の許でストレス応答蛋白質の研究をすすめている。彼こそ、20年前黄色ブドウ球菌の高濃度食塩に対する耐塩性がプロリンの輸送とカップルしていることを明らかにした(6)グループのうちの一人である。考えてみれば、これは不思議なめぐりあわせである。20年たった今、ようやくストレス応答の機構が遺伝子の調節のレベルで語られようとしている。まだ、その研究は緒についたばかりである。しかしながら、近年の科学技術の進歩は、これまでとは違った速さでその実体を明らかにしていくことであろう。

文 献

- 1) Basheer, R., Lordanescu, S. (1991): The *Staphylococcus aureus* chromosomal gene *plaC*, identified by mutations amplifying plasmid pT181, encodes a sigma factor. *Nucleic Acids Research*. **19**, 4921-4924.
- 2) Braig, K., Otwinowski, Z., Hegde, R., Boisvert, D.C., Joachimiak, A., Horwich, A.L., Sigler, P.B. (1994): The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8Å. *Nature* **371**, 578-586.
- 3) Hemmingsen, S.M., Woolford, C., Vies, S. M., Tilly, K., Dennis, D.T., Georgopoulos, C.P., Hendrix, R.W., Ellis, R.J. (1988): Homologous plant and bacterial proteins chaperone oligomeric protein assembly. *Nature* **333**, 330-334.
- 4) 本田京子, 太田敏子 (1994): 黄色ブドウ球菌の HSP オペロンの熱ショックプロモーターの解析. 第67回日本細菌学雑誌 **49**, p 131.
- 5) 出野英志, 太田敏子, 林 英生 (1995): 黄色ブドウ球菌における熱ショック応答を制御する転写因子. 第18回日本分子生物学会講演要旨集 p 455.
- 6) Koujima I., Hayashi H., Tomochika K., Okabe, A., Kanamasa, Y. (1978): Adaptational change in proline and water content of *Staphylococcus aureus* after alteration of environmental salt concentration. *Appl. Environ. Microbiology*. **35**, 467-470.
- 7) Kuroda, M., Ohta, T., Hayashi, H. (1995): Isolation and the gene cloning of an alkaline shock protein in Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **207**, 978-984.
- 8) Narberhaus, F., Bahl, H. (1992): Cloning, sequencing, and molecular analysis of the *groEL* operon of *Clostridium acetobutylicum*. *J. Bacteriol.* **174**, 3282-3289.
- 9) Ohta, T., Honda, K., Kuroda, M., Saito, K., Hayashi, H. (1993): Molecular characterization of the gene operon of heat shock proteins HSP60 and HSP10 in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**, 730-737.
- 10) Ohta, T., Saito, K., Kuroda, M., Honda, K., Hirata, H., Hayashi, H. (1994): Molecular characterization of the gene operon, S70, comprising *grpE*, *dnaK*, *dnaJ* homologues, and two new heat shock genes of *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **176**, 4779-4783.
- 11) Trent, J.D., Nimmesgern, E., Wall, J.S., Hartl, F.U., Horwich, A.L. (1991): A molecular chaperone from a thermophilic archaeobacterium is related to the eukaryotic protein t-complex polypeptide-1. *Nature* **354**, 490-493.
- 12) Wetzstein, M., Volker, U., Dedio, J., Lobau, S., Zuber, U., Schiesswohl, M., Herget, C., Hecker, M., Schumann, W. (1992): Cloning, sequencing and molecular analysis of the *dnaK* locus from *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **174**, 3300-3310.
- 13) Yura, T., Tobe, T., Ito, K., Osawa, T. (1984): Heat shock regulatory gene (*htpR*) of *Escherichia coli* is required for growth at high temperature but is dispensable at low temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **81**, 6803-6807.
- 14) Zuber, U., Schumann, W. (1994): CIRCE, a novel heat shock element involved in regulation of heat shock operon *dnaK* of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **176**, 1359-1363.