

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20361

研究課題名(和文) アンギノース群連鎖球菌由来ストレプトリジンSホモログに特徴的な分子特性の解析

研究課題名(英文) Characterization of the molecular properties of streptolysin S homolog secreted from Anginosus group streptococci

研究代表者

田端 厚之(Tabata, Atsushi)

徳島大学・大学院生物資源産業学研究部・講師

研究者番号：10432767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト口腔内に常在するStreptococcus anginosus subsp. anginosus (SAA)が産生するペプチド性溶血毒素であるストレプトリジンS(SLS)のホモログによる細胞障害メカニズムを明らかにするために、そのツールとなるSLSホモログ組換え体の調製系について検討を行った。また、溶血性SAAと共培養したヒト由来株化細胞のマイクロアレイ解析による網羅的な遺伝子発現解析の結果より、SLSホモログ依存的な細胞の遺伝子発現変動を明らかにし、溶血性AGSが産生するSLSホモログによる細胞障害メカニズムの解明に向けた足がかりとなる結果を得た。

研究成果の概要(英文)：This study was conducted to reveal the detailed cytotoxic mechanism caused by the action of streptolysin S (SLS) homolog, a peptide hemolysin secreted from Streptococcus anginosus subsp. anginosus (SAA) normally habitual in the human oral cavity. As first, an in vitro preparation system for the recombinant SLS homolog was investigated to prepare the assay tool for the investigation of the cytotoxicity specifically induced by SLS homolog. In addition, the exhaustive gene expression analysis of the human cell line co-cultured with SLS homolog secreting -hemolytic SAA was conducted and showed some interesting variation of the gene expression profile induced by the action of SLS homolog. From this study, we get on base of the elucidation about the cytotoxic mechanism of SLS homolog secreted from -hemolytic SAA strain.

研究分野：連鎖球菌由来病原因子の機能および細胞応答反応の解析

キーワード：ストレプトリジンS 口腔連鎖球菌 アンギノース群連鎖球菌 病原因子 Streptococcus

1. 研究開始当初の背景

アンギノサス群連鎖球菌 (AGS) は、ヒト口腔内に常在する連鎖球菌の一種である。本菌群に属する連鎖球菌は、従来より病原性菌であるという認識が臨床現場においても乏しく、咽頭炎や猩紅熱、稀に劇症型の壊死性感染症の原因菌となる A 群連鎖球菌 (溶連菌、*Streptococcus pyogenes*) や、妊娠および出産時に管理が必要な B 群連鎖球菌 (*S. agalactiae*)、さらには、特に高齢者における細菌性肺炎の起病菌として広く認識され、今日では高齢者を対象としたワクチン接種による予防策が積極的に展開されている肺炎球菌 (*S. pneumoniae*) などと比較すると、その存在については明らかに軽視されていた。しかしながら、AGS の中には血液寒天培養において明瞭な β 溶血性を示す株が存在することが基礎研究や臨床現場でも確認されており、その潜在的な病原性に関して比較的容易に推測できる状況であった。

AGS に関する最新の分類体系によると、AGS は 5 種の亜菌種を含む 3 種の菌種、具体的には、*S. anginosus* subsp. *anginosus* (SAA) および subsp. *whitleyi* (SAW)、*S. constellatus* subsp. *constellatus* (SCC)、subsp. *pharyngis* (SCP) および subsp. *viborgensis* (SCV)、そして *S. intermedius* (SI) の各菌種から構成される (引用文献①)。この中で、グラム陽性の病原性細菌から産生される外毒素の一種で、膜孔形成性のタンパク質毒素であるコレステロール依存性細胞溶解毒素ファミリーに属するインターメディアリシンを産生する SI 以外の β 溶血性 AGS では、ヒトに対する病原性菌として認識されている A 群連鎖球菌 (SPy) が産生するペプチド性の溶血毒素であるストレプトリジン S (SLS) のホモログが唯一の β 溶血因子であることを、これまでに我々は見出している (引用文献②、③)。

さらに我々は、2013 年度から 2014 年度にかけて科学研究費助成事業 [若手研究 (B)] の助成を得て、 β 溶血性 SAA が産生する SLS ホモログが、溶血因子としてのみならず、培養細胞に対する細胞障害因子としても機能していることを示唆する結果を明らかにした。以上より、SLS ホモログは β 溶血性を示す AGS の新たな病原因子である可能性が考えられ、この SLS ホモログの培養細胞に対する障害作用の解明と共に、SLS ホモログを産生する β 溶血性 AGS の病原菌としての再認識が必要であると考えている。

2. 研究の目的

以上の背景のもとに、本研究では β 溶血性を示す AGS が産生する SLS ホモログの分子特性や培養細胞に対する作用特性を明らかにすることを目的として検討を行ってきた。特に、他の β 溶血性 AGS や化膿性連鎖球菌群とは異なり、2 分子の SLS ホモログ (SagA1 および SagA2 の活性型成熟化分子) を産生する

β 溶血性 SAA に注目し、先行して研究が展開されてその成果が報告されている SPy 由来の SLS の諸特性との比較検討を視野に入れつつ、 β 溶血性 SAA が産生する SLS ホモログに特徴的な分子特性および作用特性の解析を行った。具体的には、下記の項目について研究を計画し、検討を行った。

(1) SLS 産生菌の培養上清中に産生される SLS の野生型分子は精製が困難であり、これまでに効果的な精製法に関する報告は成されていない。しかしながら、 β 溶血性 SAA が産生する SLS ホモログの分子特性および作用特性について検討を行うためには、SLS ホモログの調製が必須である。そこで、SLS ホモログを組換え体として調製することが有効であると考え、SLS ホモログの組換え体の発現系およびその成熟化システムの構築について検討を行った。

(2) β 溶血性 SAA が示す細胞障害性における SLS ホモログの依存性についてさらに詳細に検討するために、遺伝子変異株を作製し、その細胞障害特性について検討を行った。

(3) SLS ホモログの細胞障害性に関して、その障害メカニズムの詳細について明らかにするために、SLS ホモログを作用させた培養細胞に生じている様々な応答反応を遺伝子発現レベルから検討することを目的として、遺伝子発現変動を網羅的に解析可能なマイクロアレイ解析を行った。

3. 研究の方法

(1) SLS ホモログ組換え体の調製システムの構築に関する検討：

SLS およびそのホモログ (SLS など) は、*sagA*~*sagI* の各遺伝子 (β 溶血性 SAA では 10 遺伝子、それ以外の菌種は 9 遺伝子) から構成される *sag* オペロンによりコードされた各遺伝子産物の寄与により生産される。

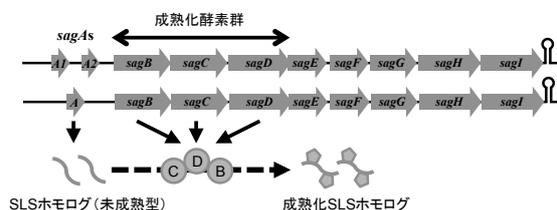


図 1. *sag* オペロンと SLS 成熟化を担う因子 (上側：SAA、下側：SPy)

特に、SLS などをコードする *sagA* 遺伝子に加え、SLS などにおける分子内ヘテロ環構造の形成に携わる *sagB*、*sagC*、および *sagD* の各転写翻訳産物、さらにリーダーペプチド部の切断除去に携わるとの報告がある *sagE* の転写翻訳産物は、SLS などを組換え体として調製するためには必要不可欠な因子である。

そこで、これらの因子を組換え体として調製し、活性型の SLS などを *in vitro* で合成するシステムの構築に向けて、検討を行った。

① まず、微生物を利用した組換え体発現システムとして一般的な大腸菌発現系を用いた検討を行った。 β 溶血性 SAA が産生する SLS ホモログの成熟化分子産生に必要な各ユニット (SagA1, SagA2, SagB~SagD, SagE, 図 1 参照) の His タグ化組換え体の発現系を構築して定法に従って誘導発現を行い、可溶化画分として得られた組換え体について酵素免疫測定法 (EIA) を用いて検討した。

② また、 β 溶血性 SAA 由来の SLS ホモログの比較検討分子の調製として、SPy 由来の成熟型 SLS の生産に必要な各ユニット (SagA~SagE, 図 1 参照) についても His タグ化組換え体の発現系を構築し、組換え体の可溶化発現について EIA を用いて同様に検討した。

(2) SLS ホモログ非産生型遺伝子変異株の構築とその特性に関する検討：

SLS ホモログに依存した細胞障害性について詳細に検討を行うために、遺伝子的背景が同じで SLS ホモログの産生能のみを欠如した遺伝子組換え株を作製し、その株を用いて検討を行った。

① β 溶血性 SAA (NCTC10713^T 株) における *sagA1* および *sagA2* のダブルノックアウト変異株を、受容能促進ペプチドによる SAA への効果的な遺伝子導入法と、薬剤耐性遺伝子カセットの導入を指標としたスクリーニングにより構築した。作製した SLS ホモログ遺伝子欠失株 (DD 株)、DD 株の比較対象であり、*sag* オペロンの上流部に薬剤耐性遺伝子カセットのみを挿入したコントロール株 (CT 株)、さらにそれらの親株である NCTC10713^T (WT 株) について、増殖特性や血液寒天培地上での培養による溶血特性の検討を行った。

② さらに、ヒト由来培養細胞 (ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株 HSC-2、およびヒト急性単球性白血病由来細胞株 THP-1) との共培養に伴う細胞障害性の確認も行った。

(3) ヒト由来株化細胞における SLS ホモログ依存的な遺伝子発現変動に関する検討：

① SLS ホモログを産生する β 溶血性 SAA との共培養に伴う細胞障害メカニズムについてより詳細かつ網羅的に検討を行うため、マイクロアレイ (Agilent SurePrint GE Unrestricted Microarrays) を用いて SLS ホモログの作用に依存的な遺伝子発現の変動に関する検討を行った。なお、マイクロアレイ解析については、徳島大学医学部総合研究支援センター先端医療研究部門に委託した。

4. 研究成果

(1) SLS ホモログ組換え体の調製システムの構築に関する検討：

① 一般的な微生物発現系である大腸菌を用いた成熟化 SLS ホモログ組換え体の *in vitro* 調製システムの構築に関して、 β 溶血性 SAA 由来の各因子の発現ベクターの構築は可能であった。しかしながら、続く組換え体の可溶化発現の検討結果より、各構成因子の中で SagB および SagE 組換え体の可溶性発現が困難であることが明らかとなった (表 1. 未発表データ)。

表 1. 大腸菌系の SAA 由来組換え体調製系

	SAA 由来因子					
	A1	A2	B	C	D	E
発現系の構築	○	○	○	○	○	○
組換え体可溶化発現	○	○	×	○	○	×

② 比較対象として調製を試みた A 群連鎖球菌由来の各因子に関しては、すべてについて発現ベクターの構築は可能であった。また、誘導発現した各因子は可溶化画分としての精製が確認されたが、その発現量は総じて少なく (“ Δ ” で表記)、*in vitro* 調製システムの構築に十分量の組換え体を供給可能なシステムの構築には、残念ながら至らなかった (表 2. 未発表データ)。

表 2. 大腸菌系の SPy 組換え体調製系

	SPy 由来因子				
	A	B	C	D	E
発現系の構築	○	○	○	○	○
組換え体可溶化発現	Δ	Δ	Δ	Δ	Δ

以上の検討結果を踏まえて、溶血活性を示す成熟化 SLS ホモログ組換え体の調製システムとしては、その産生株である β 溶血性 SAA に元来備わっている SLS ホモログの生産システム (*sag* オペロンの転写翻訳産物) を利用して *in vivo* 調製システムとして構築することが最も効果的であるという考えに至った。この新たな *in vivo* 調製システムを用いた SLS ホモログ組換え体の生産システムの確立に向け、引き続き検討を行っている。

(2) SLS ホモログ非産生型遺伝子変異株の構築とその特性に関する検討：

SLS ホモログを組換え体として調製し、それらを用いて SLS ホモログの作用に依存的な細胞の応答反応について検討を行うことが困難な状況に直面したことから、遺伝子的背景が同じで SLS ホモログの産生能のみを欠如した遺伝子組換え株を作製し、その株を用いて検討を行うこととした。

① そのために、 β 溶血性を示す SAA の基準株 (NCTC10713^T) を親株 (WT 株) として、各遺伝子変異株 (DD 株および CT 株) を構築し

た。これらの株はそれぞれ目的とする遺伝子変異を有し、血液寒天培養において、DD 株では *sagA1* および *sagA2* の両遺伝子の欠失に伴う非溶血性の表現型を、CT 株では WT 株と遜色の無い β 溶血性を、それぞれ確認した（データは示さず）。また、構築した両遺伝子変異株は、WT 株と同様の増殖特性を示した（データは示さず）。

② ヒト由来株化細胞（HSC-2 および THP-1）について、構築した両遺伝子変異株（CT 株および DD 株）との共培養に伴う細胞障害性を CellTox Green Cytotoxicity Assay (Promega) を用いて検討した。その結果、SLS ホモログの産生特性に依存した細胞障害性が、両細胞株において確認された（図 2. 緑色蛍光が確認される細胞は死細胞を示す：未発表データ）。

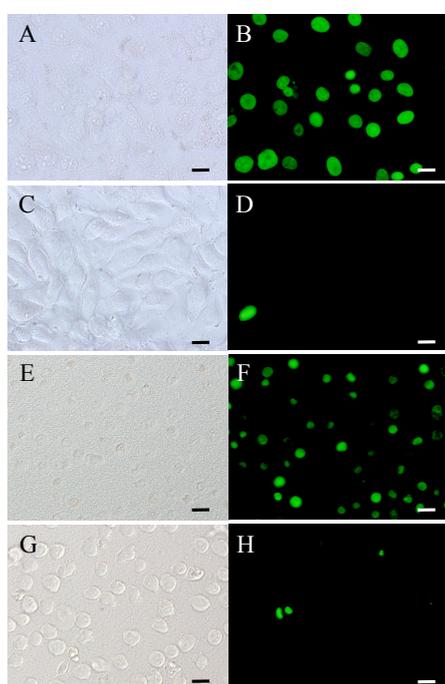


図 2. CellTox Green Cytotoxicity Assay による細胞障害性の評価
 A, B: CT 株と HSC-2 の共培養像
 C, D: DD 株と HSC-2 の共培養像
 E, F: CT 株と THP-1 の共培養像
 G, H: DD 株と THP-1 の共培養像
 明視野像：A, C, E, G
 蛍光像：B, D, F, H
 図中のスケールバーは 10 μ m を示す。

(3) ヒト由来株化細胞における SLS ホモログ依存的な遺伝子発現変動に関する検討：

① SLS ホモログを産生して細胞障害性を示す WT 株および CT 株、SLS ホモログ非産生性で明確な細胞障害性を示さない DD 株を被検菌とし、ヒト由来株化細胞（HSC-2 および THP-1）との共培養に伴い細胞に誘導される遺伝子発現変動を、マイクロアレイにより網

羅的に解析した。マイクロアレイ解析の結果については、被検菌との共培養を行わない細胞のみのサンプルにおける遺伝子発現をベースとして、2 倍以上の発現変動が確認される遺伝子を検討の対象とし、さらに DD 株との共培養サンプルと比較した際に CT 株や WT 株との共培養で 4 倍以上の発現変動が確認された遺伝子（プローブ）を抽出した。その結果、HSC-2 では 115 プローブ、THP-1 では 148 プローブについて 4 倍以上の発現量の増加が確認された。一方、HSC-2 で 63 プローブ、THP-1 で 114 プローブについて 4 倍以上の発現量の減少が確認された。抽出した各プローブについて、さらに HSC-2 および THP-1 で共に発現量の変動が確認された遺伝子をピックアップした結果、発現量の増加が確認されたプローブが 16 種、逆に発現量の減少が確認されたプローブが 5 種確認された（図 3. 未発表データ）。これらのプローブは、SLS ホモログ依存的な細胞の応答反応に直接的、あるいは間接的に関与している因子をコードしていることが推測された。

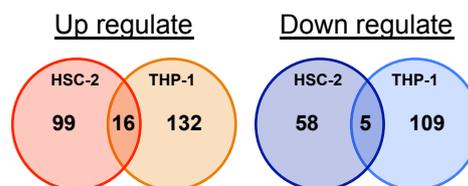


図 3. SLS ホモログ依存的な変動を示すプローブ数

興味深いことに、SLS ホモログの作用に対して発現量が増加した遺伝子（プローブ）として、具体的にはケモカインや転写因子、さらに核内受容体をコードする遺伝子が確認された（未発表データ）。よって、 β 溶血性 SAA の感染局所において産生される SLS ホモログは、細胞に対して膜障害を引き起こし、その膜障害に対する応答反応として、細胞側では積極的にケモカインなどの産生を促すような遺伝子発現変動が惹起されると考えられる。その結果、産生されたケモカインによって免疫担当細胞の動員が促されて、 β 溶血性 SAA の感染局所における早期の炎症の形成およびその排除に向けたイベントが行われていることが推測された。

本研究によって、これまで不明であった β 溶血性 SAA が産生する SLS ホモログに依存した細胞応答反応のメカニズムの一端を明らかにすることができたと考えている。今回の研究によって得られた知見を足がかりとして、 β 溶血性 SAA が産生する SLS ホモログ依存的な細胞応答反応の詳細を明らかにすべく、現在も引き続き検討を進めている。これら一連の検討を通して、 β 溶血性 SAA が産生する新規病原因子候補である SLS ホモログの分子特性や細胞への作用特性について明らかにし、SLS ホモログの産生と β 溶血性 SAA

の潜在的な病原性との関連について、さらに検討を進めていきたいと考えている。

<引用文献>

- ① Jensen A., Hoshino T., Kilian M. “Taxonomy of the Anginosus group of the genus *Streptococcus* and description of *Streptococcus anginosus* subsp. *whileyi* subsp. nov. and *Streptococcus constellatus* subsp. *viborgensis* subsp. nov.” Int J Syst Evol Microbiol., 2013, **63** (7):2506-19.
- ② Tabata A., Nakano K., Ohkura K., Tomoyasu T., Kikuchi K., Whiley R.A., Nagamune H. “Novel twin streptolysin S-like peptides encoded in the *sag* operon homologue of beta-hemolytic *Streptococcus anginosus*.” J Bacteriol. 2013, **195** (5):1090-9.
- ③ Tabata A., Sato Y., Maya K., Nakano K., Kikuchi K., Whiley R.A., Ohkura K., Tomoyasu T., Nagamune H. “A streptolysin S homologue is essential for β -haemolytic *Streptococcus constellatus* subsp. *constellatus* cytotoxicity.” Microbiology. 2014, **160** (5):980-91.

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計3件)

- ① 大塚 誠也、田端 厚之、友安 俊文、長宗 秀明、*Streptococcus anginosus* subsp. *anginosus* が保有する新規 Extra-chromosomal DNA の分子特性、第90回日本細菌学会総会、2017年3月19日～20日、仙台国際センター展示棟（宮城県仙台市）
- ② 田端 厚之、眞屋 健太郎、友安 俊文、長宗 秀明、アンギノーサス群連鎖球菌の新亜菌種が産生するストレプトリジンSホモログの細胞障害性、第69回日本細菌学会中国・四国支部総会、2016年10月15日、かがわ国際会議場（香川県高松市）
- ③ 大谷 浩美、田端 厚之、友安 俊文、長宗 秀明、 β 溶血性 *S. anginosus* subsp. *anginosus* の SLS ホモログ依存的な細胞障害性、第89回日本細菌学会総会、2016年3月24日、大阪国際交流センター（大阪府大阪市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田端 厚之 (TABATA, Atsushi)
徳島大学・大学院生物資源産業学研究所・
講師
研究者番号：10432767