

機関番号：14401
 研究種目：若手研究 (A)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21689048
 研究課題名 (和文) A 群レンサ球菌の免疫回避機構の時空間的バイオイメージング解析
 研究課題名 (英文) Real-time nanoscale analysis of immune evasion molecules from *Streptococcus pyogenes* using bio-imaging technologies
 研究代表者
 寺尾 豊 (TERAO YUTAKA)
 大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
 研究者番号：50397717

研究成果の概要 (和文) : A群レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 感染の侵襲性症例では、感染部位に好中球の浸潤がほとんど認められない。そこで、*S. pyogenes*は補体や好中球の免疫システムを回避する病原因子を産生すると考えた。本研究では、*S. pyogenes*のプロテオーム解析を行い、補体に結合する分子およびNETs誘導因子やNETs分解酵素を同定した。さらに、種々のバイオイメージング機器を用いて、NETsリアルタイム観察系および補体分子のナノスケール観察系を構築し、*S. pyogenes*が免疫を回避する過程をリアルタイムかつナノスケールで解析した。

研究成果の概要 (英文) : Neutrophils are part of the initial group of immune cells recruited to the site of infection. However, in severe streptococcal infection including streptococcal toxic shock syndrome, few neutrophils have been found near *Streptococcus pyogenes*, which rapidly infects various organs in STSS patients. *S. pyogenes* is thought to be equipped with virulence factors to evade the neutrophil immune system. Previously, we found that complement C3b functioned as an opsonin is degraded in sera from patients with streptococcal toxic shock syndrome. Furthermore, it has been revealed that *S. pyogenes* is able to fragment neutrophil extracellular traps (NETs). In the present study, we investigated the mechanism of *S. pyogenes* evasion from neutrophils. Biacore analysis demonstrated that rSpeB and wild-type *S. pyogenes* rapidly degrade C3b. In a mouse model, bacterial survival rate was lower for the Δ speB mutant than the wild-type strain. Furthermore, histopathological observations showed that neutrophils infiltrated to the site of infection by the Δ speB mutant, whereas few migrated to the infection site in mice injected with the wild type and *S. pyogenes* continued to spread along the fascia. Time-lapse microscopic analysis revealed that digestion of NETs was seen by the wild-type strain, but not Δ speB mutant strain. Our results indicate that SpeB contributes to the escape of *S. pyogenes* from neutrophil immunity by degrading C3b and NETs at the site of initial infection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	12,000,000	3,600,000	15,600,000
2010年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
総計	20,400,000	6,120,000	26,520,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：感染症，細菌，微生物，免疫学，バイオ関連機器

1. 研究開始当初の背景

A 群レンサ球菌はヒトの口腔から感染し、咽頭炎や扁桃炎を引き起こすグラム陽性菌であるが、劇症型 A 群レンサ球菌感染症を引き起こすことでも注目を集めている。しかしながら、A 群レンサ球菌が免疫系を回避する機構の全容解明には至っていなかった。

その理由として、既存の細菌学・免疫学研究では、感染成立過程の特定の時点だけを解析することしかできなかったことが考えられた。ところが、本研究の申請直前に、高度バイオイメーjing機器が数多く登場してきた。その結果、ナノスケールかつリアルタイムでの生命現象の観察が可能となってきた。

2. 研究の目的

数年前から、肥満細胞や好中球の新たな細胞死形態である ETosis と、それに伴う「細胞外捕獲構造物 (Neutrophil extracellular traps; NETs)」による感染微生物捕獲システムが報告されていた。そこで、はじめに NETs 免疫システムの作動因子ならびに微生物排除機序について、ナノスケールおよびリアルタイムで形態学的に解析することにした。原子間力顕微鏡は設計上、タンパクやプラスミドの一分子まで観察できるが、湿潤条件下での使用には改良の余地が残されていた。そこで本研究期間中に、細胞や活性型タンパクを湿潤下で観察するための試料作製法の至適化も図ることにした。

3. 研究の方法

申請者らがこれまでに同定した A 群レンサ球菌由来の補体 C3b および C5a 分解酵

素系が作動し、自然免疫に関与する分子や細胞の働きを阻害する過程を「新世代バイオイメーjing機器」でリアルタイム観察する。次年度は、初年度のバイオイメーjing機器の解像機能を更新し、リアルタイムかつナノスケール下でタンパク一分子レベルまで病原因子の作用機序を検索した。

また、新規の観察手法である高速スキャン型原子間力顕微鏡ならびにタイムラプス蛍光顕微鏡下で好中球と A 群レンサ球菌を共培養し、NETs ならびに A 群レンサ球菌の各種病原因子の発現過程と動きを観察した。

4. 研究成果

タイムラプス型顕微鏡システムと蛍光顕微鏡装置を用いて、レンサ球菌が NETs を誘導する機構および回避する分子を明らかにした。さらに、高速スキャン型の原子間力顕微鏡を用いて、感染免疫現象を解析する試料調製方法ならびに実験系を確立した。原子間力顕微鏡を感染症研究に応用した事例は国内外ともに報告は無い。また、解析を行うためのオプションの高速スキャン型システムおよび実験系も申請者が共同研究で企業と開発を進めたものである。

すなわち、細菌感染とヒト免疫システム作動の全過程をリアルタイムかつ分子レベルで観察する本研究は、細分化の進んだ現在の生命科学研究領域において新規性が高く、先行的・独創的な研究手技と分野を切り開いたと言える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1. Ogawa, T., Terao, Y., Okuni, H., Ninomiya, K., Sakata, H., Ikebe, K., Maeda, Y., and Kawabata, S. : Biofilm formation or internalization into epithelial cells enable *Streptococcus pyogenes* to evade antibiotic eradication in patients with pharyngitis. *Microb. Pathog.*, in press (2011 出版予定 ; 査読有り) .
2. Ogawa, T., Terao, Y., Sakata, H., Okuni, H., Ninomiya, K., Ikebe, K., Maeda, Y., and Kawabata, S. : Epidemiological characterization of *Streptococcus pyogenes* isolated from patients with multiple onsets of pharyngitis. *FEMS Microbiol. Lett.* **318**: 143–151, 2011 (査読有り) .
3. Okahashi, N., Nakata M., Sakurai A., Terao Y., Hoshino T., Yamaguchi Y., Isoda R., Sumitomo T., Nakano K., Kawabata S., and Ooshima T.: Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to salivary amylase and promote the biofilm formation. *Microb. Pathog.*, **50**: 148-154, 2011 (査読有り) .
4. Sumitomo, T., Nakata M., Higashino M., Jin Y., Terao Y., Fujinaga Y., and Kawabata S. : Streptolysin S contributes to group A streptococcal translocation across an epithelial barrier. *J. Biol. Chem.*, **286**: 2750-2761, 2011 (査読有り) .
5. Nakagaki, H., Sekine S., Terao Y., Toe M., Tanaka M., Shizukuishi S., Ito H., Kawabata S., McGhee JR., Fujihashi K., and Kataoka K.: *Fusobacterium nucleatum* envelope protein, FomA, is immunogenic and binds to salivary statherin-derived peptide. *Infect. Immun.*, **78**: 1185-1192, 2010 (査読有り) .
6. Okahashi, N., Nakata M., Sakurai A., Terao Y., Hoshino T., Yamaguchi Y., Isoda R., Sumitomo T., Nakano K., Kawabata S., and Ooshima T.: Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to fibronectin and contribute to cell adhesion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **391**:1192-1196, 2010 (査読有り) .
7. Yamaguchi, M., Minamide M., Terao Y., Isoda R., Ogawa T., Yokota S., Hamada S. and Kawabata S.: Nrc of *Streptococcus pneumoniae* suppresses capsule expression and enhances anti-phagocytosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **390**: 155-160, 2009 (査読有り) .
8. Terao, Y., Isoda R., Murakami, J. Hamada, S. and Kawabata, S.: Molecular and biological characterization of novel *gtf* regulation-associated genes in *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol. Immunol.*, **24**: 211-217, 2009 (査読有り) .
9. Nakata, M., Köller, T. , Moritz, K., Ribardo, D., Jonas, L., McIver, K. S., Sumitomo, T., Terao, Y., Kawabata, S., Podbielski, A. and Kreikemeyer, B.: Mode of expression and functional characterization of FCT-3 pilus region encoded proteins in the *Streptococcus pyogenes* serotype M49. *Infect. Immun.*, **77**: 32-44, 2009 (査読有り) .

〔学会発表〕（計 31 件）

1. Sumitomo T, Nakata M, Terao Y, and Kawabata S. Streptolysin S contributes to group A streptococcal paracellular translocation across epithelial cells. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity. September 7-10, 2010. Awaji, Hyogo, Japan.
2. Ogawa T, Terao Y, Ohkuni H, Ninomiya K, Sakata H, Ikebe K, Maeda Y, and Kawabata S. Characterization of *Streptococcus pyogenes* isolated from patients with recurrent pharyngitis. 88th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research. July 14-17, 2010. Barcelona, Spain.
3. Yamaguchi M, Terao Y, Nishino K, Yamaguchi A, Hamada S, and Kawabata S. *Streptococcus pneumoniae* evades neutrophil phagocytosis through its surface protein PfbA. 110th General Meeting of American Society for Microbiology. May 23-27, 2010. San Diego, USA.
4. Isoda R, Terao Y, Nakata M, Sumitomo T, and Kawabata S. Neonatal exposure induced commensal-like immune-response against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in mice. 87th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research. April 1-4, 2009. Miami, USA.
5. Kataoka K, Nakagaki H, Terao Y, Toe M, Sekine S, Fujihashi K, Kawabata S, and Shizukuishi S. FomA specific-salivary secretary-IgA inhibits *Fusobacterium nucleatum* binding to statherin. 87th General Session & Exhibition of the International

Association for Dental Research. April 1-4, 2009. Miami, USA.

6. Sumitomo T, Nakata M, Terao Y, and Kawabata S. Group A *Streptococci* translocates across epithelial barrier via intercellular junction cleavage. 109th General Meeting of American Society for Microbiology. May 17-21, 2009. Philadelphia, USA.
7. Terao Y, Yamaguchi M, Ogawa T, Kawabata S. Cysteine protease SpeB enables *Streptococcus pyogenes* to evade neutrophil immunity. FEMS 2009 3rd Congress of European Microbiologists. June 28-July 2, 2009. Gothenburg, Sweden
8. Yamaguchi M, Terao Y, Hamada S, and Kawabata S. Role of *Streptococcus pneumoniae* PfbA in adhesion to human epithelial cells and resistance to neutrophil phagocytosis. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. September 8-11, 2009. Awaji, Hyogo, Japan.

〔図書〕（計 2 件）

1. 寺尾 豊, 川端重忠. 口腔微生物学・免疫学第三版, 医歯薬出版社（浜田茂幸, 川端重忠, 西原達次, 菅井基行, 中川一路編）, p89-92, 2010.
2. 寺尾 豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌のサイババル・ストラテジー, 蛋白質核酸酵素増刊号, 共立出版, 54: 982-987, 2009.

〔その他〕

ホームページ等
<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~mcrbio/kenkyuuterao1.html>

下記の民間企業の勉強会において, 研究成果の

アウトリーチ活動を推進した。

「第11回団法人山崎香辛料振興財団研究成果セミナー」，エスビー食品㈱，平成23年3月2日，東京都。

補体シンポジウムにて，研究成果を発表し，「最優秀発表賞」を受賞した（平成22年9月10～11日，福島市）。

平成21年度大阪大学大学院歯学研究科 研究科長賞を受賞した（平成22年3月31日）。

6. 研究組織

(1)研究代表者

寺尾 豊 (TERAO YUTAKA)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：50397717