

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07023

研究課題名(和文) A群レンサ球菌の分泌毒素Ngaの新規機能による宿主制御機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of host control mechanism by novel function of Nga, a secreted toxin of group A Streptococcus

研究代表者

野澤 孝志 (Nozawa, Takashi)

京都大学・医学研究科・准教授

研究者番号：10598858

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：A群レンサ球菌の分泌毒素Ngaによる宿主制御の分子メカニズムの解明を目的とした。ゲノムワイドなスクリーニングにより、Ngaは統合的ストレス応答を介したストレス顆粒形成を誘導することを明らかにした。さらに、ストレス顆粒のプロテオーム解析から、タンパク質毒性ストレスを介した小胞体-ゴルジ体間輸送経路が阻害されることで、ゴルジ体の断片化につながっていることが明らかとなった。ゴルジ体の断片化は、ケモカイン分泌や上皮細胞層の恒常性維持、抗原提示経路といった様々な免疫機能の破綻をもたらした。以上の結果から、分泌毒素Ngaによる宿主のストレス応答を介した病原性発揮機構が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

A群レンサ球菌による劇症型感染症は国内でも年々増加しており、本菌の病原性発揮機序の解明は学術的だけでなく社会的意義も大きい。中でも、本研究で着目した分泌毒素Ngaは、本菌の病原性に密接に関わる毒素であり、この毒素による免疫破綻機構の一端を明らかにできたことは、今後の新規治療法の開発において重要な基盤的知見となると考えている。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the molecular mechanism of host regulation by Nga, a secreted toxin of group A Streptococcus, and to reveal a novel mechanism of virulence exerted by group A Streptococcus. Genome-wide screening revealed that Nga induces stress granule formation via the integrated stress response (ISR). Furthermore, proteomic analysis of stress granules revealed that the ER-Golgi transport pathway mediated by proteotoxic stress is disrupted, leading to Golgi fragmentation. Golgi fragmentation resulted in the disruption of various immune functions such as chemokine secretion, epithelial cell layer homeostasis, and antigen presentation pathways. These results reveal a mechanism of pathogenicity exerted by the secreted toxin Nga through the host stress responses.

研究分野：細菌学

キーワード：A群レンサ球菌 分泌毒素 ストレス応答 ストレス顆粒

1. 研究開始当初の背景

A 群レンサ球菌は、ヒトに咽頭炎や化膿性皮膚感染症、劇症型溶血性レンサ球菌感染症 (streptococcal toxic shock syndrome ; STSS)を引き起こすグラム陽性細菌で、感染部位によって多彩な臨床症状を引き起こす。特に、近年増加傾向にある STSS においては、重度の敗血症、播種性血管内凝集性症候群様の病態を特徴とし、病態の進行が急激で死亡率も高いため、有効な治療法や予防法の確立が求められている。STSS 患者から分離される菌株の多くは血清型 M1、M3、M28 等の菌株が占め、これらの菌株が本菌の病原性と密接に関連していると考えられている。また近年では、M89 のうち、系統的に分けられた M89-clade-3 (M89-C3)株が、上気道炎や化膿性感染症、そして劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者から世界的に高頻度で分離されており、注目を集めている(Zhu et al., JCI. 2015; Turner et al., mBio. 2019)。

M89-C3 株の特徴として、i) nga/slo オペロンのプロモーター領域における 3つのアミノ酸変異による nga/slo の発現量増加、ii) 莢膜合成酵素の has オペロンの欠失、の 2つが挙げられている (Turner et al., mBio. 2019)。i)のアミノ酸変異については、強毒株で知られる M1 株においても同様の変異が見られ、この変異を修復した株では白血球による殺菌機構への抵抗性や、マウスを用いた咽頭炎・壊死性筋膜炎モデルにおける病原性が低下することが報告されている(Zhu et al., JCI. 2015)。SLO(Streptolysin O)と Nga(NAD-glycohydrolase)は以前から重要な病原因子として知られていたが、こうした近年の知見からその重要性が再認識されている。また、ii) に関して、これまで莢膜による抗貪食作用は A 群レンサ球菌の病原性に寄与することが知られていたが、M89-C3 株の場合、has オペロンの欠失により莢膜を失い、宿主細胞内へ取り込まれやすくなっていると予測される。つまり、M89-C3 株は、宿主細胞内へ高頻度に侵入し、SLO/Nga を高発現することで感染拡大を果たしているものと予測される(Zhu et al., mBio. 2015)。こうした知見を踏まえ、A 群レンサ球菌、特に近年流行している M89-C3 株の感染動態の解明には、宿主細胞内における SLO/Nga を介した宿主制御、免疫回避機構が必須であると考えられる。

SLO と Nga の遺伝子は、Nga の阻害因子遺伝子(sni)とともにオペロンを構成している。SLO はコレステロール依存性の膜孔形成毒素であり、様々な細胞に膜孔を形成し細胞傷害を与えるだけでなく、Nga を細胞質内に移行させる機能を併せ持つ。この SLO によりエフェクター(Nga 等)を移行させる機構は Cytolysin-mediated translocation と呼ばれ、細胞形質膜やエンドソーム膜からエフェクターを宿主細胞へ注入し、様々な宿主制御に寄与すると考えられている。Nga は高い NAD 加水分解活性 (NADase)を有し、宿主細胞内では、NAD 枯渇とそれに伴う ATP 減少を引き起こすことで細胞内酸性膜面分(リソソーム等)の中性化を引き起こし、リソソームによる殺菌を抑制することが知られている。また、この高い NAD 分解活性により、自身の菌体内では NAD 結合部位に Nga 阻害因子 SNI を結合させている。Nga はその高い毒性により、NADase 活性を保持した Nga の大腸菌や培養細胞での異所発現が不可能であり、臨床的重要性が高いに外毒素であるにもかかわらず、

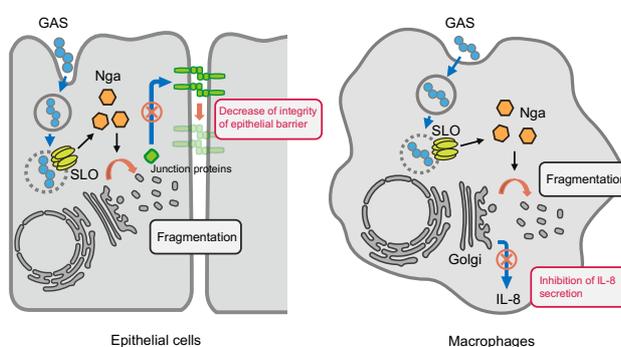


図1 侵入したA群レンサ球菌はNgaによりゴルジ体断片化を誘導し、宿主免疫経路を攪乱する

図1 侵入したA群レンサ球菌はNgaによりゴルジ体断片化を誘導し、宿主免疫経路を攪乱する

in vitro での Nga タンパク質の機能解析はほとんど進んでいない。最近我々は、Nga が細胞内の殺菌経路の一つであるオートファジーの誘導を阻害すること(Toh et al., Autophagy. 2019)、またゴルジ体を断片化することで、上皮組織のバリア機能の低下とマクロファージのケモカイン分泌経路の破綻を引き起こすことを明らかにした(Nozawa et al., mBio. 2020) (図 1)。こうした宿主への影響は、Nga 以外の NADase や阻害剤を用いた NAD 枯渇実験では再現できなかったことから、Nga に NADase 以外の機能が示唆された。我々は、Nga の遺伝子を Error-Prone PCR を用いた指向性進化法により人工改変することで、NADase 活性を欠失したにもかかわらず、オートファジー阻害やゴルジ体断片化誘導を示す Nga 変異体(Nga-mut①)を取得することに成功した。さらにこの Nga による宿主制御は、細胞外から SLO により細胞形質膜経路で細胞内移行した Nga では発揮されず、細胞内に侵入した菌から分泌された Nga もしくは細胞内で異所発現した Nga により示された(Nozawa et al., mBio. 2020)。これはすなわち、細胞内に侵入した菌が分泌した Nga に特異的かつ NADase 活性以外の未知の機能により宿主細胞内の免疫システムを制御していることを示している。このユニークな Nga の新規機能による宿主制御の分子メカニズムを解明することは、A 群レンサ球菌による新規の病原性発揮機構、特に流行株 M89-C3 株の感染機序の解明に繋がると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、申請者が近年明らかにした、Nga による宿主制御（オートファジー阻害やゴルジ体断片化誘導）が NADase 活性に依らないという予備知見を基に、Nga の標的宿主因子を探査し、宿主制御の分子メカニズムを明らかにすることで、Nga の新規機能を同定し、A 群レンサ球菌による新規の病原性発揮機構を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### Nga の標的宿主分子を同定する。

Nga の標的宿主因子を同定するために、Nga がタンパク質間相互作用を介する可能性と介さない可能性を考慮し、i) 質量分析による Nga 相互作用因子の探索、ii) ゲノムワイド CRISPR 活性化スクリーニング、の 2 つのアプローチにより、Nga の宿主因子を同定する。

i) 申請者が取得した Nga 変異体（NADase 活性を持たず宿主制御（オートファジー阻害、ゴルジ体断片化誘導）を示す Nga-mut①と宿主制御を示さない Nga-mut②）の発現体を用いて、質量分析により宿主相互作用分子を同定する。

ii) mCherry-Nga-mut①とオートファジーの活性を評価できる GFP-LC3 もしくはゴルジ体のマーカー GFP-GM130 をレポーターとして安定発現させた培養細胞を用いて（Nga-mutA により GFP-LC3/-GM130 シグナルが低下）、標的遺伝子の発現を活性化するゲノムワイドな CRISPR スクリーニングを行う。Deactivated Cas9 (dCas9) とアクチベーター (VPH) の複合体 (dCas9-VPH) と、ヒトの約 19,000 遺伝子のプロモーター領域に各 5 種類の sgRNA をデザインされたライブラリーを用いてスクリーニングを行い、GFP シグナルが回復した細胞を FACS にて取得し、次世代シーケンシング解析により sgRNA 配列を取得することで、標的遺伝子を同定する。

### Nga による宿主制御分子メカニズムを明らかにする。

上記項目で同定した Nga 相互作用因子、もしくは標的宿主因子に関して、Nga-mut①/mut②との in vitro、in cell での結合性試験や、共焦点顕微鏡観察や細胞分画による細胞内局在解析、ノックダウン・ノックアウト解析を行うことで、Nga が阻害する標的宿主因子の機能を解析する。また、Nga による宿主因子へのタンパク質修飾を検証するために、精製した反応タンパク質を質

量分析により解析する。A群レンサ球菌の培養細胞感染モデルには、劇症型感染症由来の M89-C3 の KUN-0014944 株とヒト中咽頭由来不死化細胞を用いる。

#### 4. 研究成果

相互作用分子の探索ならびにゲノムワイドなスクリーニングの結果、Nga は統合的ストレス応答 (integrated stress response, ISR)

を引き起こしていることが明らかとなった。実際、感染細胞では ISR により eIF2 $\alpha$  のリン酸化が亢進し、ストレス顆粒の形成が誘導された (図 2)。統合的ストレス応答やそれによるストレス顆粒の形成は、宿主のグローバルな遺伝子発現制御や、免疫シグナリングの局所的な制御にも関わることから、この機能解析を進めることとした。

次に、eIF2 $\alpha$  キナーゼのノックダウン解析により、アミノ酸飢餓で活性化する GCN2 と小胞体ストレスで活性化する PERK の 2 つのキナーゼが A 群レンサ球菌感染時の eIF2 $\alpha$  リン酸化とストレス顆粒形成に関与していることが示された (図 3)。

そこで、ストレス顆粒の構成タンパク質の網羅的な解析を行うため、ストレス顆粒マーカータンパク質 G3BP1 に、改変型アスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APEX2) を融合させたものを安定発現した細胞を構築した。APEX2 は、基質であるビオチンフェノールと過酸化水素から高反応性のラジカルを産生し、これが近傍のチロシン残基などと反応することで近接タンパク質をビオチン標識する。これにより、ストレス顆粒に集積するタンパク質の網羅的な同定を試みた。

G3BP1-APEX2 発現細胞に菌を感染させビオチン化反応を誘導し、ビオチン化タンパク質の精製、精製タンパク質の質量分析を行なった結果、感染に反応して G3BP1 近傍に COPII タンパク質 (SEC16, SEC23, SEC24, SEC31) が集積していることが示唆された (図 4)。免疫染色法や

蛍光タンパク質融合体の顕微鏡観察により、これらの COPII タンパク質は、感染時、ストレス顆粒に局在していることが明らかとなった。つまり、ER exit site (ERES) からゴルジ体へ輸送されるべき小胞が、感染で誘導されたストレ

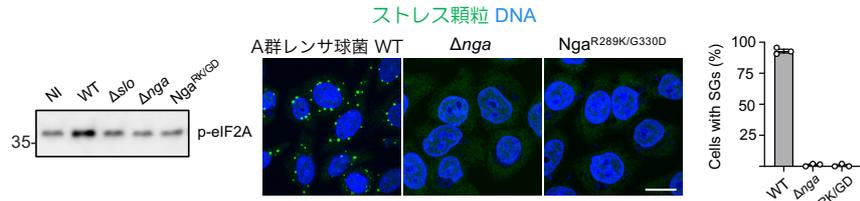


図2 A群レンサ球菌感染で誘導されたeIF2 $\alpha$ リン酸化とストレス顆粒 (緑のドット)

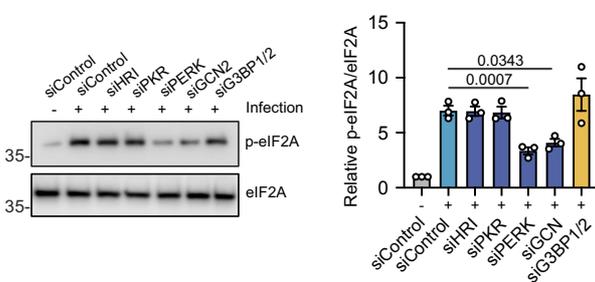
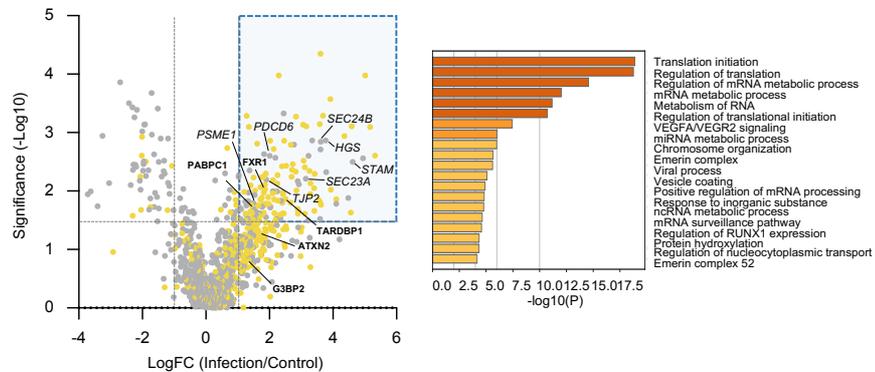


図3 GCN2とPERKを介したeIF2 $\alpha$ リン酸化



Novel SGs candidates



ABI1	LRRFIP1	PSME1	STAM	WDR77
AP2B1	MAT2A	PTBP2	TAGLN2	ZC3H15
AP3D1	NMT1	PTPN11	TBC	ZYX
CACYBP	OR11A1	RAB7A	TBL3	
CNN	PARP1	RRM1	TFG	
CRIP1	PDCD4	RUVBL2	TJP2	
FLNA	PDCD6	RWDD4	TMEM43	
FTSJ1	PDI6	SCRIB	UHRF1	
HGS	PPP2R2D	SEC23A	USP9Y	
IMPDH	PRDX2	SEC24B	WARS1	

図4 A群レンサ球菌感染誘導ストレス顆粒のプロテオーム解析

ス顆粒に局在してしまっていることが示唆された。

最近、小胞体ストレスなどで核内の TDP43 が細胞質へ移行して凝集体を形成する際、TDP43 は ERES に集積し、凝集化に移行すること、そしてこの ERES での TDP43 の蓄積により ER-Golgi 間の小胞輸送が阻害されることが報告された。A 群レンサ球菌の感染細胞の TDP43 を観察したところ、TDP43 は感染によって形成した細胞質のストレス顆粒に蓄積していた (図 5)。すなわち、Nga による小胞体ストレスによって TDP43 の細胞質への移行と凝集化により、ER-Golgi 間輸送が阻害され、ゴルジ体の断片化につながっていると考えられた。

ER-Golgi 間の輸送を司る Rab GTPase である Rab1A を過剰発現させることで、ER-Golgi 間輸送を亢進させた結果、一部の Rab1A はストレス顆粒に局在化したものの、感染時のゴルジ体の断片化は有意に抑制された。この結果から、Nga による宿主ゴルジ体断片化の誘導は、ER-Golgi 間輸送阻害が原因であることが示唆された。

今回の研究で、A 群レンサ球菌感染細胞では、さまざまな宿主ストレス応答が惹起されていることが明らかとなってきた。ストレス応答機構は本来、ストレス環境から生体を保護する目的で誘導されているが、今回の結果だけでは、生体防御における機能は未だ不明である。今後、ストレス応答を介した病原性発揮機構と宿主の生体防御機構の双方からの視点で解析を進めることで、新たな病原体-宿主相互作用の解明が期待できる。

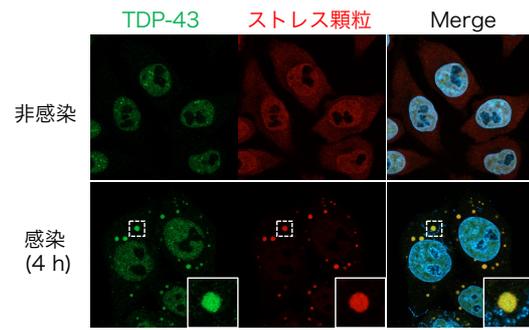


図5 TDP43の細胞内局在

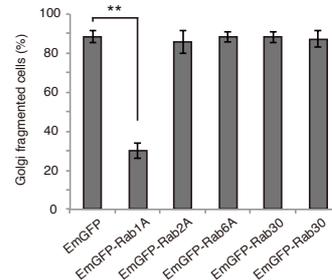
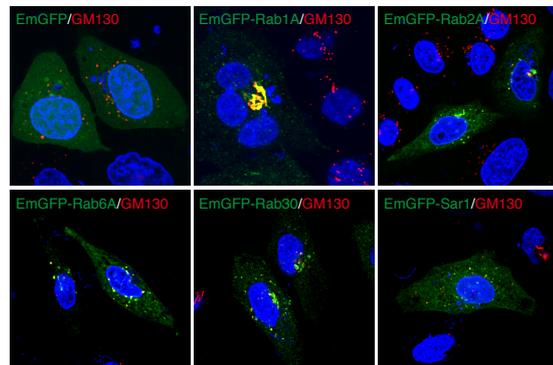


図6 Rab1Aの過剰発現により、感染によるゴルジ体断片化が抑制された

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Miyako Hikichi, Hirotaka Toh, Atsuko Minowa-Nozawa, Takashi Nozawa, Ichiro Nakagawa.	4. 巻 2022
2. 論文標題 Guanylate-Binding Protein 1 Regulates Infection-Induced Autophagy through TBK1 Phosphorylation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Microbiol	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2022/8612113.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Aikawa C, Kawashima K, Fukuzaki C, Nakakido M, Murase K, Nozawa T, Tsumoto K, Nakagawa I.	4. 巻 566
2. 論文標題 Single-chain variable fragment (scFv) targeting streptolysin O controls group A Streptococcus infection	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun .	6. 最初と最後の頁 177-183
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.06.021.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Murase K, Aikawa C, Nozawa T, Nakatake A, Sakamoto K, Kikuchi T, Nakagawa I.	4. 巻 11
2. 論文標題 Biological Effect of Streptococcus pyogenes-Released Extracellular Vesicles on Human Monocytic Cells, Induction of Cytotoxicity, and Inflammatory Response	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Cell Infect Microbiol .	6. 最初と最後の頁 711144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2021.711144.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 A. Yamada, M. Hikichi, T. Nozawa, I. Nakagawa.	4. 巻 22
2. 論文標題 FBXO2/SCF ubiquitin ligase complex directs xenophagy through recognizing bacterial surface glycan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 EMBO Rep.	6. 最初と最後の頁 e52584
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.202152584.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nozawa T, Toh H, Iibushi J, Kogai K, Minowa-Nozawa A, Satoh J, Ito S, Murase K, Nakagawa I.	4. 巻 6
2. 論文標題 Rab41-mediated ESCRT machinery repairs membrane rupture by a bacterial toxin in xenophagy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-023-42039-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iibushi J, Nozawa T, Toh H, Nakagawa I.	4. 巻 10
2. 論文標題 ATG9B regulates bacterial internalization via actin rearrangement.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 109623
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2024.109623	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 野澤孝志、中川一路
2. 発表標題 Rab GTPase ネットワークによるオートファゴソーム修復経路
3. 学会等名 第32回日本生体防御学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野澤孝志、中川一路
2. 発表標題 A群レンサ球菌によるオートファゴソーム膜傷害とその修復機構
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学 大学院医学研究科 微生物感染症学分野ホームページ  
<http://www.bac.med.kyoto-u.ac.jp/>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	相川 知宏  (Aikawa Chihiro)  (70725499)	京都大学・医学研究科・助教    (14301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------