

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861746

研究課題名(和文) 溶血性口腔連鎖球菌が産生するストレプトリジンSホモログの病原因子としての真価

研究課題名(英文) Investigation for the pathogenic potential of streptolysin S homolog secreted from beta-hemolytic oral streptococci

研究代表者

田端 厚之(Tabata, Atsushi)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・助教

研究者番号：10432767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト口腔内常在細菌叢を構成するアンギノサス群連鎖球菌(AGS)の溶血性サブグループにおいて、これまで不明であった溶血因子がペプチド性溶血毒素ストレプトリジンS(SLS)のホモログであることを明らかにした。また、溶血性Streptococcus anginosus subsp. anginosusのSLSホモログ依存的な細胞障害性について検討した結果、赤血球に対する細胞障害性と比較すると作用は穏やかだが、被検菌との共培養条件下で培養細胞に細胞障害が誘導されることを確認した。以上の結果から、溶血性AGSにおいてSLSホモログの細胞障害因子としての関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed that a homolog of streptolysin S (SLS), a typical peptide-type hemolytic factor secreted from Pyogenic group streptococci, was the  $\beta$ -hemolytic factor of  $\beta$ -hemolytic Anginosus group streptococci ( $\beta$ -AGS). Moreover, the investigation of cytotoxicity of  $\beta$ -hemolytic S. anginosus subsp. anginosus ( $\beta$ -SAA) dependent on the SLS homolog showed that relatively milder than hemolysis but distinguishable cell damage was induced in human oral squamous cell carcinoma under the co-culture condition with  $\beta$ -SAA. These results suggest the participation of SLS homolog secreted from  $\beta$ -AGS not only in  $\beta$ -hemolysis but also in cytotoxicity of  $\beta$ -AGS.

研究分野：医歯薬学

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

## 1. 研究開始当初の背景

(1) アンギノサス群連鎖球菌 (AGS) は、*Streptococcus anginosus* subsp. *anginosus* (SAA)、*S. anginosus* subsp. *whitleyi* (SAW)、*S. constellatus* subsp. *constellatus* (SCC)、*S. constellatus* subsp. *pharyngis* (SCP)、*S. constellatus* subsp. *viborgensis* (SCV)、そして *S. intermedius* (SI) から構成されるヒト口腔内常在性の連鎖球菌である。これまでの一般的な見解として、AGS の病原性は低く、“病原菌”としてはほとんど認識されていない状況であった。しかしながら、臨床現場から分離される AGS の中には、血液寒天培養において明瞭な溶血性を示す株が散見されると共に、近年では口腔内や深部臓器における感染症や疾患と関連し、様々な疾患部位からの分離例が報告されている。このような背景から、AGS の溶血性サブグループの臨床的な意義について、近年再認識されつつある。

(2) AGS の病原性や病原因子に関する研究は、AGS の分類に混乱が多かったことが原因となり、ヒトに対して明確な病原性を示す他の代表的な連鎖球菌 (A 群連鎖球菌 *S. pyogenes*、B 群連鎖球菌 *S. agalactiae*、肺炎連鎖球菌 *S. pneumoniae* など) と比較すると圧倒的に乏しく、AGS の溶血性サブグループが保有する溶血因子についても、SI が分泌するヒト細胞特異的な作用特性を示す膜孔形成毒素であるコレステロール依存性細胞溶解毒素インターメディリシン以外は、全くの未知であった。

(3) 我々は、AGS の溶血性サブグループの潜在的な病原性について正しく評価するために、すでに溶血因子が特定されてその実態が明らかになっている SI 以外の溶血性 AGS を対象に、これまでに溶血因子の探索を行ってきた。その結果、SAA の溶血株において、化膿性連鎖球菌などが保有し、赤血球膜に作用して溶血活性を示すペプチド性溶血毒素であるストレプトリジン S (SLS) の産生に関わる *sag* オペロンのホモログが染色体上に存在することを初めて見出し、その翻訳産物の溶血因子としての機能を明らかにした (引用文献)。この発見は、AGS の溶血性サブグループが保有する新規病原因子としての SLS ホモログの存在に注目する契機となり、新たな研究展開により溶血性 AGS の SLS ホモログに依存した細胞障害性や病原性に関する知見の蓄積が期待されている。

## 2. 研究の目的

AGS の溶血性サブグループが産生するペプチド性溶血因子 SLS ホモログに依存した細胞障害性に関する基盤情報を得ることを目的とし、下記の各事項について検討を行った。

(1) AGS の溶血性サブグループが保有する溶血因子の実態を明らかにするために、すでに我々が明らかにしている SAA 以外で、未だ溶血因子が未知である菌種 (SAW、SCC、SCP、および SCV) における溶血因子の特定とその配列情報に関する検討を行った。

(2) AGS の溶血性サブグループの中でも特異な SLS ホモログ合成関連遺伝子群 (*sag* オペロン：化膿性連鎖球菌などが保有する典型的な *sag* オペロンは 9 遺伝子より構成される) を有する溶血性 SAA (SLS ホモログをコードしている遺伝子が重複して存在することにより 10 遺伝子で構成されている *sag* オペロンを有する) を対象とし、SLS ホモログに依存的な細胞障害性とその分子メカニズムに関する検討を行った。

## 3. 研究の方法

(1) AGS の溶血性サブグループにおける溶血因子の確認：

溶血因子が明らかにされていない AGS の溶血性サブグループについて、SLS ホモログの本体をコードする遺伝子である *sagA* ホモログの存在をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) で確認すると共に、SCC の溶血性株である W277、そして溶血性を示す SAW MAS624、SCP 基準株 MM9889a<sup>T</sup>、SCV 基準株 SK1359<sup>T</sup> の *sag* オペロンホモログおよびその周辺領域の配列を、プライマーウォーキング法によって明らかにした。

上記によって明らかにした配列情報を NCBI のデータベースに登録されている AGS の非溶血性株 (SAA C1051 および SCC 基準株 SK53<sup>T</sup>) のドラフトゲノム情報と比較することによって、AGS の溶血性サブグループが保有する *sag* オペロンホモログを構成する各遺伝子の情報、および *sag* オペロンホモログ周辺の遺伝子配座についても検討した。

(2) 溶血性 SAA における SLS ホモログ依存的な細胞障害性に関する検討：

-SAA (NCTC 10713<sup>T</sup>) の培養上清の細胞障害性について、ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株 HSC-2 (RIKEN Cell Bank 株：RCB1945) を対象とし、細胞膜障害に伴う乳酸脱水素酵素 (LDH) の漏出を指標として評価した。

HSC-2 と -SAA との共培養に伴う細胞障害性については、ミトコンドリア脱水素酵素の活性を指標とした MTT 変法での細胞障害性の評価やミトコンドリア膜ポテンシャルの測定、さらに LDH の漏出や核酸染色蛍光色素であるヨウ化プロピジウム (PI) の細胞内透過、および細胞膜ポテンシャル変化を指標とした細胞膜損傷について検討した。また、-SCC (W277) との共培養に伴う細胞障害性についても、ヒト肝癌由来細胞株 HepG2 (RIKEN

Cell Bank 株：RCB1886) を対象として検討した。

さらに、臨床における疾患に関連した AGS の分離例を参考にし、生体内環境を想定した -SAA の SLS ホモログの産生について検討を行うために、SAA の通常の培養条件 (Brain Heart Infusion: BHI 培地を用いた培養条件) に対して、血清成分 (ウシ胎児血清: FBS) 存在下での培養条件における SLS ホモログの産生と細胞障害性の検討も行った。

#### 4. 研究成果

(1) AGS の 溶血性サブグループにおける溶血因子の確認:

化膿性連鎖球菌群 (*S. pyogenes* など) や 溶血性 SAA が保有する *sagA* ホモログに保存されている配列領域を標的として PCR を行った結果、溶血性を示す AGS 株において増幅断片が確認された。そこで、W277 ( -SCC ), MM9889a<sup>T</sup> ( -SCP ), SK1359<sup>T</sup> ( -SCV ) および MAS624 ( -SAW ) の *sag* オペロンホモログおよびその周辺領域の配列を明らかにし、*sag* オペロンホモログの構成遺伝子についてこれまでに明らかにしている NCTC 10713<sup>T</sup> ( -SAA ) と比較を行った。

*sag* オペロンの周辺構造についても、SAA と SCC の非溶血株 (それぞれ non -SAA および non -SCC )、さらに SLS を産生する代表的な化膿性連鎖球菌である *S. pyogenes* ( SPy ) および *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* ( SDy ) との比較検討も行った。その結果、-SAA 以外の 溶血性 AGS では、化膿性連鎖球菌が保有している典型的な 9 遺伝子で構成された *sag* オペロンのホモログを保有していることが確認されると共に、それら ( 図 1 の黒で示す遺伝子領域 ) は非溶血性 AGS ( non -SAA および non -SCC ) の特定の染色体領域 ( 図 1 の\*と\*\*の間の領域 ) に存在し、化膿性連鎖球菌 ( SPy および SDy ) とは明らかに異なる染色体構造となっていることが確認された。なお、いくつかの 溶血性 AGS の *sag* オペロンホモログの前後には挿入配列と推測される領域 ( 図 1 の濃いグレーで示す遺伝子領域 ) が確認されており、AGS における *sag* オペロンホモログの獲得 (あるいは欠落) メカニズムの観点から興味深い情報を得た。

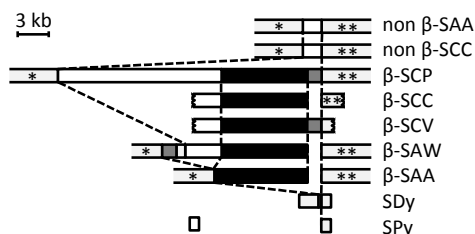


図 1 溶血性 AGS が保有する *sag* オペロンホモログの染色体上における位置関係

以上の結果から、SAA ( およびインターメディアリシンを 溶血因子として保有する SI ) 以外の 溶血性 AGS についても、染色体上に *sag* オペロンホモログが存在することが明らかとなった。また、その *sag* オペロンホモログの転写・翻訳・修飾産物である SLS ホモログがそれらの株の細胞障害性 ( 溶血性 ) に寄与していることが推測された。

(2) 溶血性 SAA における SLS ホモログ依存性の細胞障害性に関する検討:

-SAA の SLS ホモログ依存性の細胞障害性について検討を行うため、まず NCTC 10713<sup>T</sup> の培養上清が示す細胞障害性を評価した。その結果、NCTC 10713<sup>T</sup> の培養上清中には赤血球を溶血させるに十分な SLS ホモログが産生されているにもかかわらず、ヒト口腔扁平上皮癌由来細胞株 HSC-2 に対する明確な細胞障害性は確認されなかった ( 表 1、溶血活性については低浸透圧処理により完全溶血させたサンプルを 100%、細胞障害性については細胞溶解液で処理した細胞での結果を 100% として算出、未発表データ )。しかしながら、HSC-2 と SAA を共培養した場合では、顕微鏡観察において SLS ホモログに依存した細胞障害性が観察された ( 図 2、未発表データ )。よって、-SAA の SLS ホモログ依存性の細胞障害性に関する検討は、-SAA と対象細胞の共培養条件において行う必要性が明らかとなった。

表 1 SAA 培養上清による細胞障害性

被検菌	% 溶血活性	% 細胞障害性
-SAA	94.2 (5.1)	14.7 (0.9)
non -SAA	4.4 (1.0)	16.6 (2.6)

n=3、括弧内は標準偏差

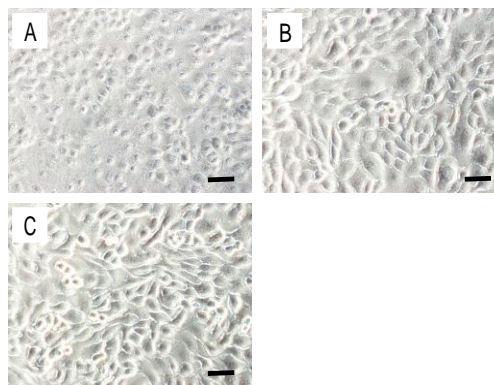


図 2 SAA との共培養条件における細胞観察像

(スケールバー: 50μm)

(A) -SAA との共培養細胞像

(B) non -SAA との共培養細胞像

(C) 対照細胞像 ( 菌との共培養無し )

上記の結果を受けて、MTT 変法を用いて -SAA と HSC-2 との共培養に伴う細胞障害性を評価した結果、-SAA 株との共培養条件では HSC-2 の生存率の低下が観察されたが、同条件における non -SAA 株との共培養では

HSC-2 の生存率の低下は確認されなかった (表2の『% 細胞生存率』、SAA と共培養していない対照細胞での結果を 100%として算出、未発表データ)。また、-SCC と HepG2 との共培養に伴う細胞障害性を評価した結果においても、-SCC 株との共培養条件では HepG2 の生存率は顕著に低下したが、同条件における non -SAA 株との共培養では十分な生存率を維持していた (図3)。

MTT 変法はミトコンドリア由来脱水素酵素の活性を指標として細胞死を評価する方法であることから、さらにミトコンドリア膜ポテンシャルについての検討を行った。その結果、-SAA との共培養条件ではミトコンドリア膜ポテンシャルの顕著な低下が確認されたが、同条件における non -SAA との共培養条件では確認されなかった (表2の『% 膜ポテンシャル』、SAA と共培養していない対照細胞での結果を 100%として算出、未発表データ)。

表2 SAA との共培養に伴うミトコンドリア障害性

	-SAA	non -SAA
% 細胞生存率	24.8 (14.0)	99.6 (0.6)
% 膜ポテンシャル	35.8 ( 2.5)	94.9( 4.4)

n=3、括弧内は標準偏差

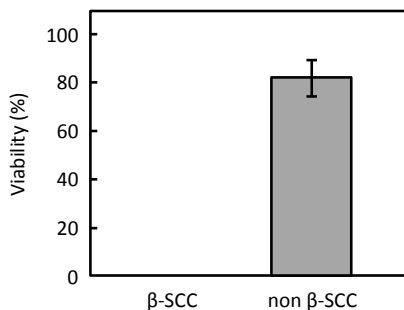


図3 SCC との共培養後の細胞生存率

次に、一般的な培養細胞の細胞膜障害性の評価に用いられる LDH の漏出を指標とした検討により、-SAA との共培養に伴う SLS ホモログ依存性の細胞障害性の評価を行った。その結果、-SAA との共培養条件における細胞膜障害性は non -SAA との共培養条件と比較すると確認されるものの、MTT 変法を用いた細胞生存率の測定結果 (表2の『% 細胞生存率』) と照らし合わせて考えると、意外にもその差はそれほど顕著ではなかった (表3の『% 膜障害性 (LDH 漏出)』、細胞溶解液で処理した細胞での結果を 100%として算出、未発表データ)。

SLS ホモログ依存性の細胞膜障害性についてさらに検討するために、核酸染色蛍光色素である PI の細胞内透過についても検討を行った。その結果、-SAA との共培養条件において、細胞膜の障害を示す PI の細胞内透過が確認された (表3の『% 膜障害性 (PI 透過)』、酸処理で死滅させた細胞での結果を 100%として算出、未発表データ)。

最後に、細胞膜ポテンシャルの変化についても検討を行った。その結果、-SAA との共培養条件において細胞膜ポテンシャルの低下が確認された。(表3の『% 膜ポテンシャル』、SAA と共培養していない対照細胞での結果を 100%として算出、未発表データ)。

表3 SAA との共培養に伴う細胞障害性

	-SAA	non -SAA
% 膜障害性 (LDH 漏出)	20.4 (2.5)	11.4 (0.5)
% 膜障害性 (PI 透過)	26.3 (2.6)	0.1 (0.2)
% 膜ポテンシャル	63.9 (0.5)	93.2 (5.0)

n=3、括弧内は標準偏差

以上の結果から、SLS ホモログ依存性の溶血性 AGS の細胞障害性は、細胞膜に対してタンパク質などの高分子成分まで透過性となるような顕著な膜障害性を示す膜孔形成性毒素の作用と比較すると穏やかであるものの、細胞膜や細胞内のミトコンドリアに影響を及ぼし、その結果として細胞障害性が示されている可能性が示唆された。-SAA が産生する SLS ホモログ依存性の細胞障害性のメカニズムの詳細を明らかにするために、現在も引き続き検討を行っている。

AGS は口腔内常在性の連鎖球菌であるが、疾患との関連が推測される株の分離は口腔以外の部位から成されることが多い。従って、AGS は常在部位である口腔内ではなく、生体内の非常在部位 (疾患関連部位) という特殊な環境下において病原性を発揮している可能性が示唆された。そこで、生体内環境に注目して 溶血性 AGS の SLS ホモログ依存性の細胞障害性について検討を行うために、まずは生体内 (血中や組織内など) を模した条件の一つとして、血清成分 (ウシ胎児血清; FBS) 存在下における -SAA の SLS ホモログ依存性の細胞障害性について検討を行った。その結果、血清成分存在条件においては、-SAA の SLS ホモログ依存性の溶血活性の増強と共に、溶血活性が維持される効果を確認した (表4、低浸透圧処理により完全溶血させたサンプルを 100%として算出、未発表データ)。

表4 血清成分存在下における -SAA の溶血活性

	% 溶血活性	
	6 時間培養	12 時間培養
BHI	28.4 (0.4)	2.6 (2.5)
BHI+10%(v/v) FBS	90.1 (2.9)	84.5 (0.8)

n=3、括弧内は標準偏差

この結果は、生体内環境において -SAA が産生する SLS ホモログ依存性の細胞障害性の増強、およびその活性の維持を示唆するものである。これは、SLS ホモログを産生する -SAA は、それらの常在部位である健康な口腔内ではさほど悪影響を及ぼさないが、口腔内の創傷部位、さらにはその創傷部位を介して偶発的に侵入した血中や深部臓器などの組

織において、SLS ホモログ依存的な細胞障害性を増強し、病原性を発揮している可能性が考えられた。

### (3) 総括：

本研究では、これまで明らかにされていなかった溶血性 AGS が保有する溶血因子の特定を行うと共に、溶血性 AGS の中でも特徴的な遺伝子構成の *sag* オペロンホモログを有する  $\beta$ -SAA における SLS ホモログ依存的な細胞障害メカニズムに関する検討を行った。その結果、溶血性 AGS はそれが保有する SLS ホモログに依存して細胞障害性を発揮することを示唆する結果が得られた。今回の検討結果より得られた SLS ホモログ依存的な細胞障害性は、他の連鎖球菌が産生し病原因子の一つと考えられているコレステロール依存性の膜孔形成毒素の作用と比較すると弱いものである。しかしながら、このような一見弱く（穏やかに）見える細胞障害性を示すという特徴が、溶血性 AGS が潜在的に保有する病原性に関する評価をこれまで曖昧にしてきた可能性が考えられた。従って、今回の研究で得られた、生体内環境を模した条件下において細胞障害性の増強および維持が確認されるなどの成果は、 $\beta$ -SAA の SLS ホモログ依存的な細胞障害性とその細胞障害性に起因する病原性の真価を考える上で重要且つ意義のある成果と言える。AGS は口腔内常在性の連鎖球菌として認識されてきたという経緯からこれまでに十分な研究が成されていなかったが、今回の溶血性 AGS における新たな細胞障害因子（溶血因子）としての SLS ホモログの確認を契機とし、AGS の病原因子および病原性の実態を明らかにすべく、さらに研究を継続、そして発展させていく必要がある。

### < 引用文献 >

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., Vol.195(5), 2013, 1090-1099, DOI: 10.1128/JB.01344-12

### 5 . 主な発表論文等

#### [ 雑誌論文 ] ( 計 2 件 )

Kawaguchi Y., Tabata A., Nagamune H., Ohkura K. Molecular analysis of *Streptococcus anginosus*-derived SagA peptides. Anticancer Res., 査読有, Vol.34(8), 2014, 4627-4631, <http://ar.iiarjournals.org/content/34/8/4627.full.pdf+html>

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  $\beta$ -haemolytic *Streptococcus constellatus* subsp. *constellatus* cytotoxicity. Microbiology, 査読有, Vol.160(5), 2014, 980-991, DOI: 10.1099/mic.0.075580-0

#### [ 学会発表 ] ( 計 4 件 )

眞屋健太郎、田端厚之、大倉一人、菊池賢、友安俊文、長宗秀明、「*S. anginosus* subsp. *whileyi* および *S. constellatus* subsp. *viborgensis* が保有する溶血因子の特性解析」、第 88 回日本細菌学会総会、2015 年 3 月 28 日、長良川国際会議場（岐阜県・岐阜市）

Tabata A., Nakano K., Sato Y., Maya K., Ohtani H., Ohkubo Y., Ohkura K., Kikuchi K., Whiley R.A., Tomoyasu T., Nagamune H., "Streptolysin S homologue of peptide hemolysin: novel beta-hemolytic factors distributed among beta-hemolytic Anginosus group streptococci", XIX Lancefield International Symposium on Streptococcal Diseases, Nov. 11<sup>th</sup>, 2014, Buenos Aires (Argentina)

田端厚之、眞屋健太郎、大谷浩美、佐藤裕士、中野晃太、大倉一人、菊池賢、友安俊文、長宗秀明、「溶血性アンギノサス群連鎖球菌が保有するストレプトリジン S ホモログの多様性」、第 46 回レンサ球菌研究会、2014 年 6 月 27 日、東京大学農学部弥生キャンパス（東京都・文京区）

田端厚之、中野晃太、大倉一人、菊池賢、友安俊文、長宗秀明、「溶血性 *Streptococcus anginosus* が保有するストレプトリジン S ホモログの特徴と細胞障害性への寄与」、第 22 回 Lancefield 連鎖球菌研究会、2013 年 6 月 28 日、ホテル島根イン青山（東京都・港区）

### 6 . 研究組織

#### (1) 研究代表者

田端 厚之 (TABATA, Atsushi)  
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス研究部・助教  
研究者番号：10432767