

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460528

研究課題名(和文) ヒト特異的な病原性連鎖球菌が分泌する新規グリコシダーゼの病原性に果たす役割の解析

研究課題名(英文) Role of a novel secreted glycosidase for pathogenicity of a human-specific pathogenic streptococci.

研究代表者

友安 俊文 (Tomoyasu, Toshifumi)

徳島大学・大学院生物資源産業学研究部・准教授

研究者番号：20323404

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Streptococcus intermedius は、口腔内に常在する日和見感染菌で、主要病原因子インターメディリシン(ILY)を分泌する。本菌は、 β -ガラクトシダーゼ活性やN-アセチルグルコサミニダーゼ活性などを示す多基質酵素MsgAを保有する。また、MsgAはノイラミニダーゼ(NanA)と協力して糖鎖を分解する。本菌を牛胎児血清中で培養するとILYを高産生するのであるが、この原因がMsgAとNanAによる糖鎖分解産物“ガラクトース”によるものであることを明らかにした。また、FBSにヒト血漿を添加するとILY高産生が抑制され、これが血漿中の抗体によるものであることも明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus intermedius (SI) is a member of the normal flora of the human oral cavity and known as an opportunistic human pathogen secreting a cytolysin called intermedilysin (ILY) as a major pathogenic factor. We found a novel glycosidase in this strain which showed 4 glycosidase activities include in β -galactosidase and N-acetylglucosaminidase, and named as MsgA. We also showed MsgA and neuraminidase (NanA) could degrade glycans from glycoprotein into monosaccharides. Interestingly, a strong hemolytic activity mediated by ILY was observed when SI was cultured in fetal bovine serum (FBS) as compared to the standard culture medium. We showed that the reason of this overproduction of ILY was galactose which is released by MsgA and NanA from glycans in FBS. Moreover, addition of human plasma to the culture in FBS appeared to inhibit the stimulatory effect of FBS on ILY. We confirmed that human plasma contains immunoglobulins that can neutralize ILY, MsgA, and NanA activities.

研究分野：病原微生物学

キーワード：レンサ球菌 溶血毒素 グリコシダーゼ ガラクトース シアル酸

1. 研究開始当初の背景

Streptococcus intermedius (SI) は、アンギノーサス群連鎖球菌 (AGS) に属する嫌気性のヒトの口腔内常在菌だが、免疫力が低下したヒトなどに対して、日和見的に難治性の歯周病や、深部臓器に脳膿瘍や肝膿瘍などの重篤な感染症を引き起こす。この菌は、主要な病原因子としてコレステロール依存性細胞溶解毒素ファミリー (CDC) に属する細胞溶解毒素 *intermediolysin* (ILY) を分泌する。ILY は、他の CDC のように細胞膜上のコレステロールをレセプターとせず、細胞膜上に存在するヒト型 CD59 を特異的に認識するので、ヒト細胞のみに毒性を示す。従って、SI の病原性の評価は、ヒト血液などを用いた検討が必須であり、あまりなされておらず、その臨床的重要性の病因論的裏付けが遅れてきた菌種である。しかしながら上述した SI の臨床的重要性を鑑みると、この菌の感染防御法や治療法の開発は重要である。そこで我々は、この菌の病原性発現機構を理解する為に、ILY をコードする *ily* 遺伝子の発現制御機構についての詳細な解析を進めた。その結果、Catabolite control protein A (CcpA) や Lactose phosphotransferase system repressor (LacR) が、*ily* 発現を制御していることを発見した。従って、環境中にグルコースが存在すると *ily* 発現が CcpA によりカタボライト抑制され、またガラクトースが存在すると LacR による発現抑制が解除され ILY を過剰産生する。したがって、*ily* 遺伝子の発現量、すなわちこの株の病原性は細胞外に存在する糖の種類や量により大きく影響を受ける可能性が高い。さらに興味深いことに、SI は AGS の中で多種のグリコシダーゼ活性を保有しており、シアリダーゼ活性、 α -ガラクトシダーゼ (-Gal) 活性、 α -フコシダーゼ (-Fuc) 活性、 N -アセチルグルコサミニダーゼ (GlcNAcase) 活性、 N -アセチルガラクトサミニダーゼ (GalNAcase) 活性を示す。なお、シアリダーゼ活性は NanA によるものであることが報告されている。我々は、 α -Gal 活性、 α -Fuc 活性、GlcNAcase 活性、GalNAcase 活性が Multi-substrates glycosidase A (MsgA) によるものであることを発見・報告した (Imaki *et al.* 2014)。そこで我々は、MsgA と NanA が糖鎖を分解することで遊離してくるガラクトースなどの糖が ILY 発現量やこの菌の病原性に影響

を与えるのではないかと考え、その可能性についての検討を行っている。

2. 研究の目的

我々は、ウシ胎児血清 (FBS) で SI を培養すると通常の培地で培養したものと比較して、ILY による溶血活性が著しく増加することを発見した。一方、ヒト血漿中やそれを添加した FBS で SI を培養すると溶血活性の増加が抑制されることもわかった。そこで、これらの現象がどのようなメカニズムで起こるのかを明らかにする目的で本研究を企画した。

3. 研究の方法

(1) 培地

SI の培養には MOPS 緩衝化 BHI (MOPS-BHI)、ヒト血漿、FBS ないしはこれにヒト血漿 2% を添加したものをを用いた。

(2) 使用した菌株と培養条件

SI 歯垢由来株 PC574 (ILY 低産生株)、PC574 の *ily* 遺伝子の下流にウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子 (*rluci*) を挿入した PC574 *ily-rluci*、PC574 の *msgA* 遺伝子を破壊した PC574 *msgA*、PC574 株の *nanA* 遺伝子を破壊した PC574 *nanA* とそれらの変異を相補した株を使用した。培養は、嫌気条件下で行った。

(3) MsgA の精製

細胞外に分泌された MsgA を陽イオン交換カラムとゲル濾過カラム (Superdex S200, GE Healthcare) を用いて精製した。

(4) NanA の精製

C 末端側の疎水領域と LPSTG 細胞壁選別シグナルを削除した His-NanA C を大腸菌内で発現させ、Ni-NTA カラムと陽イオン交換カラムを用いて精製した。

(5) MsgA と NanA のグリコシダーゼ活性

活性は、4-methylumbelliferyl を結合した蛍光基質を用いて測定した。

(6) ルシフェラーゼ活性

Renilla Luciferase Assay System (Promega) を用いて測定した。活性値は、培養液の OD₆₀₀ で補正した。FBS で培養した際のルシフェラーゼ活性を 100 とした。

(7) 溶血活性

96 穴プレートに 1% ヒト赤血球懸濁液 (in 0.1% BSA) を分注し、等量の段階希釈した培養上清 (培養液の OD₆₀₀ が一定になるように補正) または精製 ILY タンパク質を添加した。必要に応じてこの反応液にヒト血漿やヒト抗体を加えた。この反応液を、プレートシェーカーで震盪しながら (1000rpm) 37°C で 1 時間保温した後に、OD₆₅₀ を測定した。

(8) 糖濃度の測定

FBS を各 1nM の MsgA と NanA で 37°C、36 時間処理した後に遊離したガラクトースとシアル酸の量を測定した。

4. 研究成果

(1) MsgA の精製

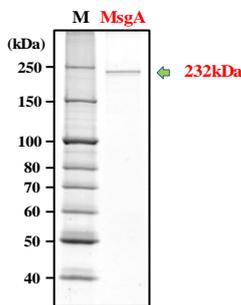


Fig. 1 MsgA の精製結果

精製 MsgA の純度を SDS-PAGE により調べた。その結果、MsgA 以外の夾雑タンパク質はほとんど認められず、ほぼ純粋なタンパク質が得られていることを確認した (Fig. 1)。

(2) MsgA のキネティックパラメータ

MsgA が保有している 4 種類のグリコシダーゼ活性のキネティックパラメータを測定した (Table 1)。

Table 1

	K_m (mM)	k_{cat}/K_m ($s^{-1}mM^{-1}$)
-Gal	0.548	446.5
-Fuc	2.613	24.6
GlcNAcase	0.024	5591.7
GalNAcase	0.144	321.5

その結果、MsgA は -Gal や GlcNAcase の基質に対して高い親和性と分解活性を示すことがわかった。しかしながら、-Fuc や GalNAcase の基質に対しては弱い活性しか示さなかった。これらの結果から、MsgA の主な酵素活性は -Gal 活性と GlcNAcase 活性であると考えられる。また、MsgA には -Gal と -Fuc 活性を示すドメインと、GlcNAcase と GalNAcase 活性を保有する 2

つのドメインが存在することも確認した。したがって、各活性の至適温度が異なり、-Gal と -Fuc 活性が 40°C、GlcNAcase と GalNAcase 活性は 58°C と 55°C であった。

(3) FBS 中での ILY 発現量

我々は、PC574 (ILY 低産生株) を FBS () で培養すると、MOPS-BHI () で培養した場合より溶血活性が著しく増加することを発見した (Fig. 2)。

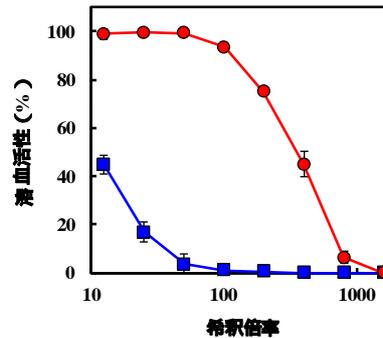


Fig. 2 培養上清中の溶血活性

また、ELISA を用いてこの条件下での ILY の産生量の増加を確認した。さらに、PC574 *ily-rluci* の株を用いて FBS 中での *ily* 発現量を、ルシフェラーゼ活性を指標に測定したところ、FBS 中では *ily* 発現量が MOPS-BHI で培養したもの比べて著しく増加していることがわかった。

(4) PC574 *msgA* 株と PC574 *nanA* 株の FBS 中での ILY 産生量

FBS 中で培養した際に認められる ILY 産生量の増加 (Fig. 2) が、FBS に含まれる糖鎖の MsgA や NanA による分解産物 “ガラクトース” によるものかどうかについて解析するために PC574 *msgA* 株と PC574 *nanA* 株 () を FBS 中で培養し、その溶血活性を PC574 () と比較した (Fig. 3)。その結果、どちらの破壊株においても FBS 中での溶血活性の増加が全く認められなくなることがわかった。

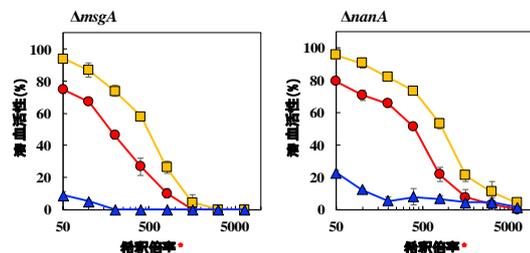


Fig. 3 AmsgA 株と AnanA 株の溶血活性

nanA 株は MsgA を分泌するにも関わらず溶血活性の増加が認められなかった。この理由として、MsgA がエンド型のグリコシダーゼ活性を示すので、先端にシアル酸が結合した状態での糖鎖を分解できないことが考えられる。また、破壊した遺伝子をプラスミドによって相補した株 () は、野生株と同様の溶血活性を示すことも確認した (Fig. 3)。以上の結果から、SI を FBS 中で培養した際に認められる ILY 産生量の増加は、MsgA と NanA による糖鎖分解産物ガラクトースによるものである可能性が高くなった。

(5) MsgA と NanA 処理により遊離するガラクトース量の測定

Fig. 2 で認められた FBS 中での溶血活性の増加が、MsgA と NanA による糖鎖分解産物であるガラクトースによるものであるか否かを確認する為に、FBS を MsgA と NanA 処理するとどれだけガラクトースが遊離するかを調べた。その結果、MsgA と NanA 処理により 2.8 mM のガラクトースが遊離することを確認した。また、この条件下において 4.2 mM のシアル酸も遊離した。さらに、MsgA のみを添加してもガラクトースはほとんど遊離しないことも確認した。なお、我々が使用している FBS は、5.6 mM のグルコースを含有していた。

(6) グリコシダーゼ処理時に遊離する糖含有条件下での PC574 の溶血活性

MsgA と NanA によって FBS 中の糖鎖が分解されることにより遊離すると考えられる糖 (2.8 mM ガラクトース, 2.8 mM *N*-アセチルグルコサミン, 4.2 mM シアル酸, 5.6 mM グルコース) を全て含有する MS-MOPS-BHI 培地 () を作製した (Fig. 4)。

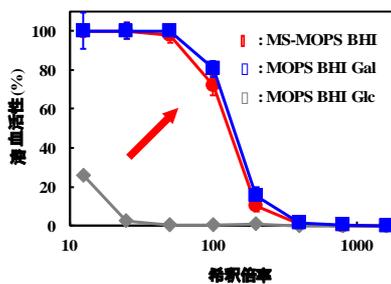


Fig. 4 MS-MOPS BHI培地で培養したPC574の溶血活性

この培地で PC574 を培養し、その培養上清中の溶血活性をグルコース () ないしはガラクトース () のみを炭素源として含む MS-MOPS 培地で培養したものと比較した。その結果、MS-MOPS-BHI 培地で培養を行った培養上清はガラクトースのみを含む培地の培養上清と同程度の強い溶血活性を示すことがわかった。なお、MS-MOPS-BHI 培地に含まれる糖の中でガラクトースのみが ILY 産生量を増加させることを確認している。以上の結果から、MsgA と NanA によ

って FBS から遊離するガラクトース量は ILY を過剰産生させるのに十分な量であることがわかった。

(7) ヒト血漿中での ILY 発現量の検討

FBS 中で確認されるような MsgA と NanA による糖鎖分解産物“ガラクトース”による ILY 産生量の増加が人体中で起こった場合、SI 弱毒株が ILY を高産生する強毒株のようにふるまう可能性がある。そこで、その有無を調べる目的で、ヒト血漿 (HP) 中で PC574 *ily-rluci* を培養し、その溶血活性と *ily* 発現量を FBS 中で培養したものと比較した (Fig. 5A, B)。

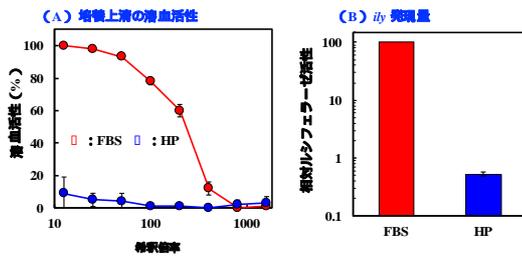


Fig. 5 ヒト血漿培養後のILY溶血活性と*ily*発現量

その結果、ヒト血漿中では FBS 中で認められたような溶血活性や *ily* 発現量の増加が全く認められなかった。このことから、ヒト血漿は、ILY 活性や *ily* 発現を抑制する因子を含んでいると考えられる。

(8) ヒト血漿に含まれる抗 ILY, 抗 MsgA, 抗 NanA 抗体の抗体価の測定

SI はヒトの口腔内常在菌であり、その存在や感染歴の有無などにより、SI に対する抵抗力に個人差ある可能性がある。そこで、健康なボランティア 10 人の血漿 (A~J) を終濃度 2% になるように添加した FBS 中で SI を培養した。その培養上清中の溶血活性を、FBS 中で培養したものと比較した。その結果、5 人の血漿 (eHP) に強い溶血活性抑制効果があること、残りの血漿 (iHP) は抑制効果をあまり示さないことがわかった。これらの結果から、ヒト血漿は SI の溶血活性を抑制する因子を含むこと、またその効果には個人差があることを確認した。ヒト血漿の溶血活性抑制因子として、抗 ILY 抗体、抗 MsgA 抗体、抗 NanA 抗体などが考えられる。そこでヒト血漿 (A~J) が、ILY, MsgA, NanA に対する抗体をどの程度保有しているのかを ELISA を用いて解析した (Fig. 6)。

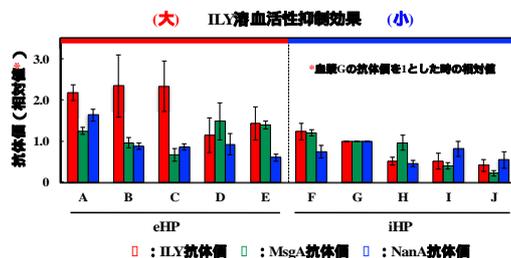


Fig. 6 ヒト血漿中の抗ILY, MsgA, NanA抗体価

その結果、溶血活性の抑制効果が強かった eHP は高い抗 ILY 抗体価を保有していることがわかった。

そこで、eHP と iHP の ILY 中和活性を比較した (Fig. 7)。その結果、eHP は iHP よりも有意に強い ILY 中和活性を示すことを確認した。このことから、FBS 中での溶血活性抑制効果の主な原因は、抗 ILY 抗体によるものであることがわかった。

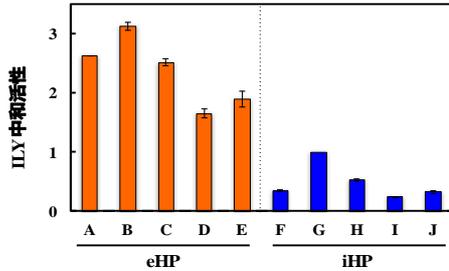


Fig. 7 ヒト血漿のILY中和活性

(9) ヒト血漿の *ily* 遺伝子発現抑制効果

SI をヒト血漿中で培養すると、溶血活性だけではなく、*ily* 遺伝子の発現量も低下した (Fig. 5B)。その理由として、ヒト血漿中の抗体によって MsgA と NanA の活性が中和され、糖鎖からのガラクトースの遊離量が低下してしまったためである可能性が考えられる。そこで、ヒト血漿が本当に MsgA や NanA 活性を抑制するかどうかを調べた。なお、この研究には ILY, MsgA, NanA に対する抗体価の合計値がもっとも高い値を示す血漿 A と一番低い値を示す J を使用した (Fig. 6)。これら血漿を終濃度 2% になるように添加した FBS で PC574 *ily-rluci* を培養した後に、菌体中のルシフェラーゼ活性を測定した (Fig. 8)。その結果、抗体価が高い血漿 A を添加した方が J を添加したものよりもルシフェラーゼ活性が大きく減少することがわかり、血漿 A は J よりも *ily* 発現を強く抑制することがわかった。

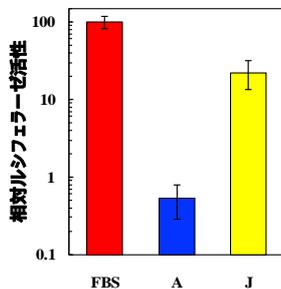


Fig. 8 血漿A, Jの ily 発現抑制効果

さらに、血漿 A ないしは J を添加した培養上清中の MsgA (β -Gal, GlcNAcase) 活性と NanA 活性を FBS で培養したものと比較した (Fig. 9)。その結果、血漿 A, J とともにそれらの活性を有意に低下させるが、血

漿 A を加えた方が強く抑制することが明らかになった。

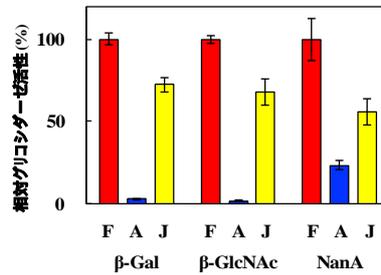


Fig. 9 ヒト血漿によるグリコシダーゼ活性の抑制効果

以上の結果から、ヒト血漿を含む条件下で培養した際に認められる、*ily* 発現量の低下 (Fig. 5B, 8) は、ヒト血漿中の抗体によって MsgA と NanA の活性が中和されたためである可能性が高いことがわかった。

(10) ヒト血漿の SI 細胞毒性抑制効果

ヒト血漿は、PC574 の ILY 活性と *ily* 発現を抑制する抗体を含むことがわかった。したがって、ヒト血漿は SI のヒト細胞に対する細胞毒性を抑制できる可能性がある。そこで、ヒト血漿存在下・非存在下でヒト由来培養細胞 (HepG2) に PC574 などを感染させ細胞毒性を比較した。その結果、ヒト血漿は PC574 などが示す細胞障害性を強く抑制することを確認した。

(11) まとめ

我々はさらに、MsgA の産生量がガラクトースによって、NanA の産生量がシアル酸によって促進されることも明らかにしている。よって、この株が体液や細胞表面に存在する糖鎖を分解すると ILY 発現だけではなく MsgA や NanA の発現量も増加し糖鎖の分解量がさらに増加すると考えられる。その結果、ILY 発現量が著しく増加し、低病原性株が高病原性株のように振る舞う可能性がある。しかしながら、ヒトはそれに対する防御機構を保有しており抗 ILY, 抗 MsgA, 抗 NanA 抗体などにより ILY 活性と *ily* 発現を抑制していることがわかった。このような寄生体-宿主間相互作用による相反的な毒素分泌の制御機構については、これまで世界でも殆ど解析がなされておらず、我々の発見は非常に新規性・重要性が高いと考えられる。

また、SI は疾病や老化などにより抵抗力の落ちた人に重篤な膿瘍感染症を引き起こすことが報告されているが、これは抵抗力の低下により抗体によって ILY, MsgA, NanA の活性を十分に抑えることが出来なくなってしまったことも一因として考えられる。したがって、超高齢化社会を迎えつつある我が国において、本菌による重篤な感染症が増加する可能性は極めて高い。本研究課題により得られた知見から、高齢者の SI の保菌

の有無や抗 ILY, 抗 MsgA, 抗 NanA 抗体の抗体価を調べることにより本菌による重篤な感染症が発症するリスクを予見できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

Tomoyasu T and Nagamune H. (2016)
Functional comparison between the DnaK chaperone systems of *Streptococcus intermedius* and *Escherichia coli*. FRANS J. DE BRUIJN(ed), STRESS AND ENVIRONMENTAL REGULATION OF GENE EXPRESSION AND ADAPTATION IN BACTERIA, 2:791-795. Wiley-Blackwell, New Jersey. 査読無(総説)
DOI: 10.1002/9781119004813

Imaki H, Tomoyasu T, Yamamoto N, Taue C, Masuda S, Takao A, Maeda N, Tabata A, Whiley RA and Nagamune H. (2014)
Identification and Characterization of a Novel Secreted Glycosidase, with Multiple Glycosidase Activities, in *Streptococcus intermedius*. *J Bacteriol.* **196(15)**: 2817-2826. 査読有
DOI: 10.1128/JB.01727-14

〔学会発表〕(計 18件)

<国際会議>

Tomoyasu T, Expression control pathways of *ily* by blood components in *Streptococcus intermedius*. The 13th Korea - Japan International Symposium on Microbiology, May, 13, 2016. Gyeongju (Korea)

Nagamune H, CHARACTERIZATION OF A NOVEL SECRETED GLYCOSIDASE WITH MULTIPLE GLYCOSIDASE ACTIVITIES, MSGA: A CANDIDATE KEY ENZYME REGULATING GROWTH AND PATHOGENICITY OF STREPTOCOCCUS INTERMEDIUS. XIX Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, Nov. 11, 2014, Paseo La Plaza, (Buenos Aires, Argentina)

<国内での発表>

的場 正樹, *Streptococcus intermedius* の高病原性株スクリーニングシステムの開発, 第90回日本細菌学会総会, 2017年3月19日, 仙台国際センター 展示棟(宮城県仙台市)

日下信吾, *Streptococcus intermedius* が産生するシアリダーゼの発現制御機構の解析, 2016年10月15日, かがわ国際会議場(香川県高松市)

友安 俊文, *Streptococcus intermedius* の血液成分による病原性亢進とヒト血液成分によるその防御, 第48回レンサ球菌研究会, 2016年7月9日, 長崎大学医学部 良順会館(長崎県長崎市)

千葉 真也, 血液成分による *ily* 遺伝子発現の正および負の調節, 第89回日本細菌学会総会, 2016年3月23日, 大阪国際交流センター(大阪府大阪市)

山崎 貴大, *S. intermedius* が保有するグリコシダーゼがインターメディリシン発現制御に果たす役割についての解析, 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)

友安 俊文, *Streptococcus intermedius* が保有するグリコシダーゼの病原性に果たす役割について, 第61回トキシシンポジウム ~鳴門渦潮カンファレンス~, 2014年9月4日, ルネッサンスリゾート鳴門(徳島県鳴門市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

友安 俊文(TOMOYASU, Toshifumi)
徳島大学・大学院生物資源産業研究部
・准教授
研究者番号: 20323404

(2)研究分担者

田端 厚之(TABATA, Atushi)
徳島大学・大学院生物資源産業研究部
・講師
研究者番号: 10432767

長宗 秀明(NAGAMUNE, Hideaki)

徳島大学・大学院生物資源産業研究部
・教授
研究者番号: 40189163

(3)研究協力者

的場 正樹(MATOBA, Masaki)

日下 信吾(KUSAKA, Shingo)

山崎 貴大(YAMASAKI, Takahiro)

千葉 真也(CHIBA, Shinya)