

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462779

研究課題名(和文) レンサ球菌が産生する線毛の付着機能と発現機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of expression mechanisms and adhesive functions of streptococcal pili

研究代表者

中田 匡宣 (Nakata, Masanobu)

大阪大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：90444497

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト病原体である化膿レンサ球菌は咽頭や皮膚へ局所性の化膿疾患を起こすだけでなく、侵襲性疾患を惹起する。病態発症過程において、本菌は様々な環境因子と宿主因子を感知し、分泌タンパク質の産生を調節する。臨床分離頻度が高い血清型の菌株を用いて、菌体外環境温度が線毛の発現に及ぼす影響について検討した結果、特定の染色体領域を有する菌株において、温度感受性の線毛発現が認められた。この発現機構を解析したところ、環境温度に依存する転写因子の翻訳効率に起因することが明らかになった。したがって、化膿レンサ球菌は菌体外の環境温度に対応し、付着因子の産生を制御することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The human pathogen group A *Streptococcus pyogenes* causes a wide variety of diseases, ranging from superficial purulent infections of the pharynx and skin to invasive infections. During the pathological process, *Streptococcus pyogenes* senses diverse environmental and host factors, and exhibits modulation of secretory proteins. We examined whether environmental temperature has effects on pilus expression of *S. pyogenes*. Experiments using clinically relevant serotypes revealed that strains possessing distinct genotypes of a chromosomal region showed temperature-dependent pilus expression, which was attributed to translation efficiency of a transcriptional regulator. Thus, the findings indicate that *Streptococcus pyogenes* responds to environmental temperature and modulates expression of adhesins.

研究分野：分子生物学

キーワード：化膿レンサ球菌 線毛

1. 研究開始当初の背景

化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) はヒトを宿主とし、皮膚や咽頭に膿ヶ疹や咽頭炎などの化膿疾患を惹起する。また、壊死性筋膜炎や多臓器不全などを伴う劇症型レンサ球菌感染症を起こす場合があり、化学療法の実施にかかわらず、致死率は約 30% を超える。上市されているワクチンは無く、病態発症機序の解明やワクチン開発が待ち望まれている。化膿レンサ球菌は血清型特異的に様々な表層タンパク質や分泌タンパク質を産生し、ヒト組織へ特異的に定着した後、多岐に渡る疾患を起こすと考えられている。菌体表層タンパク質として、化膿レンサ球菌は線毛様構造物を産生する。線毛の生物学的・臨床的に重要な点として、ヒト組織への付着因子として機能し、線毛主要構成タンパクが T 血清型を担うトリプシン耐性タンパク (T タンパク) であることが挙げられる。血清型別の第一選択である M タイピングと共に、T タイピングはわが国での臨床現場において用いられてきた。一方、線毛の詳細な発現機構は明らかになっていない。血清型 M49 型の菌株は、通常の培養温度である 37°C での培養時と比較して、低温培養時に線毛の産生を亢進することを報告したが (Nakata M. *et al.*, *Infect. Immun.* 77: 32-44, 2009)、他の血清型については不明であったとともに、制御機構についても解明されていない。

2. 研究の目的

化膿レンサ球菌は M タンパクの抗原性あるいは遺伝子多型により、150 種以上に分類される。温度依存性の線毛発現を呈する血清型株を明らかにし、T タイピングの基礎を築くことを目的とした。また、環境温度により線毛の発現量を変化させる菌株を用いて、温度感受性線毛発現機構の詳細と生物学的意義の解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株

M1, M3, M5, M6, M12, M18, M28, M49 型の臨床分離株を供試した。温度感受性線毛発現機構の解析には、劇症型レンサ球菌感染症に

由来する M3 型株および皮膚疾患由来の M49 型株を用いた。培養は大気条件下で 0.2% の酵母エキスを含む Todd Hewitt 培地にて行った。*Lactococcus lactis* の培養には 0.5% グルコースを含む M17 培地を用いた。

(2) 抗線毛タンパク抗血清の作製

線毛タンパク質の組換え体を大腸菌で発現させ、アフィニティークロマトグラフィーにより精製した。そして、精製タンパク質をマウスへ免疫することにより、特異的抗血清を調製した。

(3) 培養温度の違いによる線毛発現量への影響

通常の培養温度である 37°C と体表や上気道の温度を反映する 25 もしくは 28°C において各菌株を一晩培養もしくは対数増殖期まで培養した。ムタノリジン抽出により細胞表層画分を調製し、菌体表層での線毛発現をウェスタンブロット解析により検討した。さらに、全菌体と抗線毛タンパク抗血清を用いたフローサイトメトリー解析により線毛産生細胞の比率を解析した。

(4) 転写開始部位の決定

5' prime RACE 法を用いて線毛遺伝子と転写因子の転写開始部位を決定した。

(5) 化膿レンサ球菌変異株の作製と異種発現系の構築

温度感受性ベクターを用いて抗菌薬耐性を付与しない遺伝子欠失株を作製した。また、*Lactococcus lactis* に化膿レンサ球菌の線毛遺伝子群と転写因子を発現させ、異種線毛発現系を構築した。

(6) 培養上皮細胞への菌体付着能の解析

ヒト皮膚角化上皮細胞株である HaCaT 細胞を用いて、各菌株について付着試験を行い、線毛発現量と菌体付着の相関を検討した。

(7) 線毛遺伝子と転写因子群の転写量の解析

対数増殖期まで培養した菌体から全 RNA を精製し、cDNA を合成した。Northern blot 解析とリアルタイム PCR 解析により、線毛遺伝子と転写因子群の mRNA 量を比較した。

(8) 培養温度の違いによる転写因子の翻訳効率の検討

in vitro 転写・翻訳システムを用いて、37°C と 25°C における転写因子群の DNA もしくは

mRNA からの翻訳効率を検討した。

4. 研究成果

ゲノム配列が明らかになっている M1, M3, M5, M6, M12, M18, M28, および M49 型の臨床分離株について、培養温度による線毛発現の変化を検討した結果、M3, M5, M49 型の菌株において、通常の培養温度である 37°C では検出されなかった線毛の発現が低温培養時において認められた。この現象は低温における線毛遺伝子の転写量の増加に起因した。ヒト角化上皮細胞への菌体付着量は、菌体を低温で培養することにより増加した。温度感受性の線毛発現は線毛関連遺伝子群をコードする染色体領域の遺伝子型に依存したことから、制御因子を探索し、転写因子である *Nra* を挙げた。M49 型株を親株として作製した *nra* 欠失株は低温においても線毛を産生しなかったため、*Nra* は線毛遺伝子に対する正の転写因子であることが明らかになった。また、線毛遺伝子と *nra* の転写開始点は培養温度の違いにより変化しなかった。培養温度の変化により *nra* の mRNA 量に変化は認められなかったが、*Nra* タンパク質の検出量は培養温度の低下によって増加したため、*nra* 転写後の翻訳過程に環境温度が影響すると考えられた。線毛遺伝子群と *nra* を *Lactococcus lactis* に発現させた結果、同様の培養温度による線毛発現制御が認められた。さらに、*in vitro* 転写・翻訳システムによる解析において、*nra* mRNA からの翻訳は培養温度の低下により亢進した。したがって、菌体周囲の環境温度は *nra* 転写後の翻訳効率を変化させ、付着因子である線毛の発現量と上皮細胞への菌体付着に影響を与えることが示唆された。これらの研究成果は、化膿レンサ球菌感染による病態多様性を担う機構を解明する一助となる可能性があるとともに、T 型別を決定する際の適切な培養条件の決定と化膿レンサ球菌感染症に対する確実な診断に繋がることを期待できる。

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 15 件)

1. Sumioka R, Nakata M, Okahashi N, Li Y, Wada S, Yamaguchi M, Sumitomo T, Hayashi M, Kawabata S. 2017. *Streptococcus sanguinis* induces neutrophil cell death by production of hydrogen peroxide. *PLoS One*. 12(2): e0172223. 査読有 . doi: 10.1371/journal.pone.0172223.
2. Honda-Ogawa M, Sumitomo T, Mori Y, Hamd DT, Ogawa T, Yamaguchi M, Nakata M, Kawabata S. 2017. *Streptococcus pyogenes* endopeptidase O contributes to evasion from complement-mediated bacteriolysis via binding to human complement factor C1q. *J Biol Chem*. 292 :4244-4254. 査読有 . doi: 10.1074/jbc.M116.749275.
3. Yamaguchi M, Nakata M, Sumioka R, Hirose Y, Wada S, Akeda Y, Sumitomo T, Kawabata S. 2017. Zinc metalloproteinase ZmpC suppresses experimental pneumococcal meningitis by inhibiting bacterial invasion of central nervous systems. *Virulence, in press*. 査読有 .doi: 10.1080/21505594.2017.1328333.
4. Miyamoto Y, Akaike T, Kawabata S, Akuta T, Taruki C, Yoshitake J, Hamada S, Ota F, Ikarashi H, Yoshimura K, Kamijo R, Maeda H. 2016. Degradation of bradykinin by a metalloendopeptidase from *Streptococcus pyogenes*. *J Oral Biosciences* 58(4):167-172. 査読有. doi:org/10.1016/j.job.2016.07.003.
5. Ogawa T, Ogawa HM, Ikebe K, Kawabata S, Maeda Y. 2016. Microbiological assessment of effects of clinical mouth rinses on common oral microbes. *Journal of Oral Science in press*.
6. Okahashi N, Nakata M, Kuwata H, Kawabata S. 2016. *Streptococcus oralis* induces lysosomal impairment of macrophages via bacterial hydrogen peroxide. *Infect Immun*. 84(7):2042-2050. 査読有 . doi:

- 10.1128/IAI.00134-16.
7. Sumitomo T, Nakata M, Higashino M, Yamaguchi M, Kawabata S. 2016. Group A *Streptococcus* exploits human plasminogen for bacterial translocation across epithelial barrier via tricellular tight junctions. *Sci Rep* 7: 20069. 査読有. doi: 10.1038/srep20069.
 8. Yamaguchi M, Hirose Y, Nakata M, Uchiyama S, Yamaguchi Y, Goto K, Sumitomo T, Lewis A, Kawabata S, Nizet V. 2016. Evolutionary inactivation of a sialidase group B *Streptococcus*. *Sci Rep* 6: 28852. 査読有. doi: 10.1038/srep28852.
 9. Oogai Y, Yamaguchi M, Kawada-Matsuo M, Sumitomo T, Kawabata S, Komatsuzawa H. 2016. Lysine and threonine biosynthesis from aspartate contributes to *Staphylococcus aureus* growth in calf serum. *Appl Environ Microbiol* 82: 6150-6157. 査読有. doi:10.1128/AEM.01399-16.
 10. Okahashi N, Nakata M, Kuwata H, Kawabata S. 2016. *Streptococcus oralis* induces lysosomal impairment of macrophages via bacterial hydrogen peroxide. *Infect Immun* 84: 2042-2050. 査読有. doi: 10.1128/IAI.00134-16.
 11. Hirose Y, Yamaguchi M, Kawabata S, Murakami M, Nakashima M, Goto, M, Yamamoto T. 2016. Effects of extracellular pH on Dental Pulp Cells in Vitro. *J Endod* 42: 735-741. 査読有. doi: 10.1016/j.joen.2016.01.019.
 12. Hirose Y, Yamamoto T, Misako N, Funahashi Y, Matsukawa Y, Yamaguchi M, Kawabata S, Gotoh M. 2016. Injection of dental pulp stem cells promotes healing of damaged bladder tissue in a rat model of chemically induced cystitis. *Cell Transplant* 25: 425-436. 査読有. doi: 10.3727/096368915X689523.
 13. Hamada S, Kawabata S, Nakagawa I. 2015. Molecular and genomic characterization of pathogenic traits of group A *Streptococcus pyogenes*. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 91: 539-559. 査読有. doi: 10.2183/pjab.91.539.
 14. Morita C, Sumioka R, Nakata M, Okahashi N, Wada S, Yamashiro T, Hayashi M, Hamada S, Sumitomo T, Kawabata S. 2014. Cell wall-anchored nuclease of *Streptococcus sanguinis* contributes to escape from neutrophil extracellular trap-mediated bacteriocidal activity. *PLoS One* 9: e103125. 査読有. doi: 10.1371/journal.pone.0103125.
 15. Okahashi N, Sumitomo T, Nakata M, Sakurai A, Kuwata H, Kawabata S. 2014. Hydrogen peroxide contributes to the epithelial cell death induced by the oral mitis group of streptococci. *PLoS One* 9: e88136. 査読有. doi: 10.1371/journal.pone.0088136.
- 〔学会発表〕(計4件)
1. 中田匡宣 他. 環境温度の変化に対する肺炎球菌の適応と血中における菌体生存の関連. 第58回歯科基礎医学会学術大会, 2016年8月24日~26日, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市).
 2. 中田匡宣 他. 培養温度の変化が肺炎球菌の血中での生存に及ぼす影響. 第89回日本細菌学会総会, 2016年3月23~25日, 大阪国際交流センター (大阪府・大阪市).
 3. 中田匡宣 他. M6型A群レンサ球菌が産生するFCT1型線毛遺伝子の転写調節 (Transcriptional regulation of FCT type 1 pili in serotype M6 *Streptococcus pyogenes*). 第88回日本細菌学会総会, 2015年3月26~28日, 長良川国際会議場 (岐阜県・岐阜市).
 4. Morita C, Nakata M, Sumioka R, Okahashi N, Hamada S, Sumitomo T, and Kawabata S. Role of *Streptococcus sanguinis* cell wall-anchored nuclease. XIX Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Disease. November 9-12, 2014. Buenos Aires, Argentina.
- 〔図書〕(計4件)
1. 中田匡宣, 川端重忠. 2016. 微生物の遺伝

- 学, 32-38 項 . 口腔微生物学・免疫学 第 4 版, 川端重忠, 小松澤均, 大原直也, 寺尾豊, 浜田茂幸編, 医歯薬出版株式会社 .
2. 中田匡宣, 川端重忠 . 2016 . 微生物遺伝子の変化, 39-45 項 . 口腔微生物学・免疫学 第 4 版, 川端重忠, 小松澤均, 大原直也, 寺尾豊, 浜田茂幸編, 医歯薬出版株式会社 .
 3. 中田匡宣, 川端重忠 . 2016 . 微生物遺伝子の応用, 46-48 項 . 口腔微生物学・免疫学 第 4 版, 川端重忠, 小松澤均, 大原直也, 寺尾豊, 浜田茂幸編, 医歯薬出版株式会社 .
 4. 中田匡宣, 川端重忠 . 2015 . 肺炎球菌と現行ワクチン . 日本歯科医師会雑誌 .68(4): 16-17 .

〔その他〕

ホームページ等

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~mcrbio/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

中田 匡宣 (NAKATA, Masanobu)

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号 : 90444497

(2) 研究分担者

川端 重忠 (KAWABATA, Shigetada)

大阪大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号 : 50273694

岡橋 暢夫 (OKAHASHI, Nobuo)

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号 : 40150180

住友 倫子 (SUMITOMO, Tomoko)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号 : 50423421