

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：32676

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670067

研究課題名(和文)細菌の産生する「細胞接着かく乱タンパク質」による宿主防御系の妨害

研究課題名(英文)Suppression of host defense system by bacterial "cell adhesion-perturbing proteins"

研究代表者

辻 勉(Tsuji, Tsutomu)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：00143503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：1) 黄色ブドウ球菌の産生するSSL5タンパク質が、白血球の感染局所への集積に重要な役割を果たすマトリックス分解酵素 MMP-9に結合し、その酵素活性を阻害することを観察した。MMP-9をシアリダーゼあるいはペプチド:N-グリカナーゼで処理すると両者の結合が減弱することがわかり、これらの結合がシアル酸を含む糖鎖に依存することが示唆された。

2) 各種細菌の培養上清より、P-セレクトリン/Fc融合タンパク質に結合する物質をスクリーニングしたところ、それぞれの上清に異なる結合タンパク質が検出された。これらのタンパク質のセレクトリン依存性の白血球接着反応に対する影響を解析している。

研究成果の概要(英文)：1) We observed that staphylococcal superantigen-like protein 5 (SSL5) bound to matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and inhibited its enzymatic activity. The enzyme plays a crucial role in the accumulation of leukocytes to infection sites. When MMP-9 was treated with sialidase or peptide:N-glycanase, the interaction between MMP-9 and SSL5 was weakened, suggesting that carbohydrate chains containing sialic acid residues were involved in the binding of the two molecules.

2) We screened the culture supernatants of various bacterial species (*A. hydrophila*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *M. bovis*, *S. aureus*) for the proteins bound to the P-selectin/Fc fusion protein, and detected several different proteins in these bacterial culture supernatants. We are examining the effects of these proteins on the selectin-dependent leukocyte adhesion.

研究分野：微生物学・免疫学

キーワード：細胞接着 白血球浸潤 細菌分泌タンパク質 マトリックス分解酵素 黄色ブドウ球菌 シアル酸

1. 研究開始当初の背景

細菌が産生する毒素はきわめて多種類に及び、宿主に対する作用も多様である。動物に対する致死作用や細胞に対する傷害作用をもつものを中心に研究が進められてきた。例えば、溶血毒素、神経毒素、腸管毒素、タンパク合成阻害毒素、cAMP 産生促進毒素のように直接的な細胞傷害作用の強いものが研究対象とされてきた。黄色ブドウ球菌から発見されたスーパー抗原は、直接の細胞傷害性はないが、きわめて多数のTリンパ球を活性化し、免疫応答を混乱させる作用をもつ毒素である。さらに最近、構造的に類似のタンパク質が10種類以上見出され (Fitzgerald *et al.* Infect. Immun. 71, 2827-2838, 2003; Langley *et al.* J. Immunol. 174, 2926-2933, 2005), スーパー抗原類似タンパク質 (SSL) と命名された。これらのタンパク質にはリンパ球活性化作用が認められず、作用についてはほとんど不明であった。

私たちは、このタンパク質ファミリーの中に、細胞外マトリックスの接着タンパク質あるいはマトリックス分解酵素 (MMP) に結合するものを見出した。これらは、宿主細胞のインテグリン媒介性細胞接着を阻害したり、MMP 活性を阻害したりすることが判明した。これらのタンパク質は、宿主免疫細胞の体内交通、足場依存的増殖・分化、細胞間共同作用、運動性に影響を与えることが推測され、生体防御システムに混乱をもたらし、感染を容易にさせる作用をもつ可能性が考えられた。このような作用をもつタンパク質を「細胞接着かく乱タンパク質」と仮に命名し研究に着手した。

2. 研究の目的

本研究では、以下の2つの目標を掲げ研究を進めた。

- (1) SSL ファミリータンパク質の一員である SSL5 と MMP-9 の結合の特性の解析および免疫妨害作用を明らかにする。
 - (2) P-セレクトリン依存性の細胞接着に影響を与える細菌由来成分を単離・同定する。
- 上記 (1) については、MMP-9 への結合活性を有する組換え型の SSL5 を調製し、MMP-9 酵素活性に対する阻害作用を解析するとともに、両分子の結合における糖鎖の役割について詳細に調べる。また、(2) については、糖結合性の細胞接着分子である P-セレクトリンが関与する細胞接着反応に影響を及ぼすような細菌由来のタンパク質を探索・同定することを端緒とし、免疫細胞の体内移行や機能修飾等について精査する。(1) では主に黄色ブドウ球菌に注目して検討しているが、他の細菌から分泌される類似の物質についても探索を進め、細胞接着を混乱させるタンパク質の重要性を明らかにする。

細胞傷害毒素については、これまで多くの知見が得られているが、細胞間あるいは細胞とマトリックス相互作用に依存する高次の

生物機能に影響を与える毒素様タンパク質については情報が限られており、新たな視点からの細菌感染の理解に繋がり、また、感染成立における役割を明らかにすることにより感染症の予防と治療に貢献することが期待される。

3. 研究の方法

(1) MMP-9の精製

ヒト単球系白血病細胞株 THP-1 を 10% ウシ胎児血清 (FCS) 及び 12-*O*-テトラデカノイルホルボル-13-アセテート (PMA) (5 nM) を含む RPMI-1640 培地で 48 時間培養し単球様に分化させた。その後、細胞を洗浄し培養液を ASF-104 無血清培地に替え、さらに 48 時間培養した。培養上清からゼラチン-セファロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより MMP-9 を精製した。カラムに結合した MMP-9 は、5% DMSO を含む 50 mM Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 10 mM CaCl₂ (pH 7.5) により溶出した。

(2) 組換え型 SSL-5 の調製

ヒスチジン (His) タグ及びグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) タグを付加した 2 種類の組換え型 SSL5 を調製した。GST-SSL5 調製のためには pGEX-5X-1 ベクターに黄色ブドウ球菌より単離した SSL5 の DNA を組み込み、また、His-SSL5 の調製には、ベクターとして pQE を使用した。大腸菌に組換え DNA を導入し、0.2 mM IPTG 存在下 25 °C で組換え型 SSL5 を発現誘導した。超音波処理により得られた大腸菌破砕液から、GST-SSL5 の場合にはグルタチオン-セファロース、また His-SSL5 の場合には Ni-セファロースをそれぞれ用いて精製した。クロマトグラフィーには下記の緩衝液を使用した。

[グルタチオン-アガロース]

結合用緩衝液: 50 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)

溶出緩衝液: 50 mM Tris-HCl, 40 mM 還元型グルタチオン (pH 8.0)

[Ni-セファロース]

結合用緩衝液: 50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 20 mM イミダゾール (pH 7.5)

溶出緩衝液: 50 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 0.5 M イミダゾール (pH 7.5)

(3) SSL5 と MMP-9 の結合

両タンパク質の結合をプルダウンアッセイ法により解析した。組換え型の GST-SSL5 を結合させたグルタチオン-セファロースあるいは His-SSL5 を結合させた Ni-セファロースを THP-1 細胞の培養上清と混合し、4 °C で 2 時間反応させた。その後、セファロースビーズを洗浄後、結合した MMP をゼラチンゼイモグラフィーで分析した。

また逆に、MMP-9 を結合させたゼラチン-セファロースと GST-SSL5 を発現させた大腸菌の破砕液とを混合し、4 °C で 2 時間反応させた。セファロースビーズを洗浄後、結合し

た大腸菌由来タンパク質を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) / ウェスタンブロットにより分析した。

(4) MMP-9 酵素活性の測定

精製した MMP-9 を 4-aminophenylmercuric acetate (APMA) (1 mM) で 3 時間活性化した後, 基質蛍光ペプチド MOCac-Pro-Leu-Gly-Leu-A₂pr(Dnp)-Ala-Arg-NH₂ (1 mM) を加え室温で 2 時間反応させ, 蛍光強度 (393 nm) を測定した。

4. 研究成果

(1) SSL5 と MMP-9 の結合

THP-1 細胞の培養上清より, 固相化させた組換え型 GST-SSL5 あるいは His-SSL5 に結合する MMP をゼラチンゼイモグラフィーで分析したところ, GST-SSL5 結合セファロースの試料からは MMP-9 であると考えられる約 90 kDa のゼラチナーゼ活性を示すバンドが検出されたが, 担体のみや GST 結合セファロースの場合にはバンドが検出されなかった (図 1)。また, His-SSL5 結合セファロースの試料からも同様のゼラチナーゼ活性を示すバンドが検出されたが, SSL5 の結合していない担体のみからも量的には少ないながらバンドが検出された。

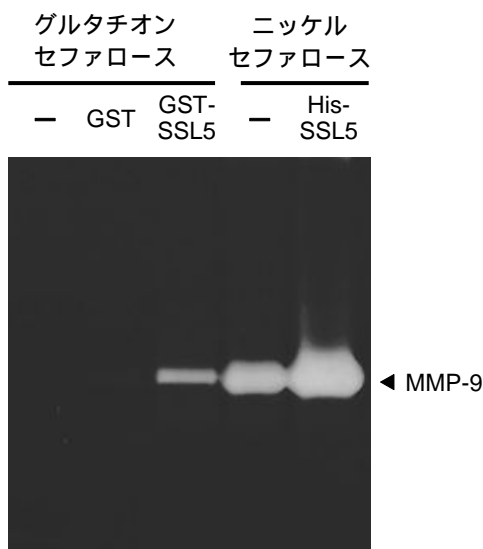


図 1 ゼラチンゼイモグラフィーによる SSL5 に結合する MMP の分析

一方, THP-1 細胞由来の MMP-9 を結合させたゼラチン-セファロースと GST または GST-SSL5 を含む菌体破砕液を混合し, 結合タンパク質を SDS-PAGE により分離後, 銀染色および抗 GST 抗体を用いたウェスタンブロットを行った。その結果, MMP-9 結合セファロースを GST-SSL5 を発現させた大腸菌破砕液と混合した場合には, 約 48 kDa

に GST-SSL5 のバンドが検出されたが, GST を発現させた大腸菌破砕液と混合した場合には GST の分子量である 約 26 kDa 付近にバンドは検出されなかった (図 2)。



図 2 抗 GST 抗体を用いたウェスタンブロットによる MMP-9 結合タンパク質の分析

これらの結果から, SSL5 は単球様細胞株 THP-1 由来の MMP-9 に特異的に結合することが示された。

(2) MMP-9 酵素活性に及ぼす SSL5 の影響

精製 MMP-9 の酵素活性を種々の濃度の GST-SSL5 存在下で測定したところ, MMP-9 の基質分解による蛍光強度は, GST-SSL5 の濃度依存的に減少した。一方, GST の添加では影響されなかった (図 3)。

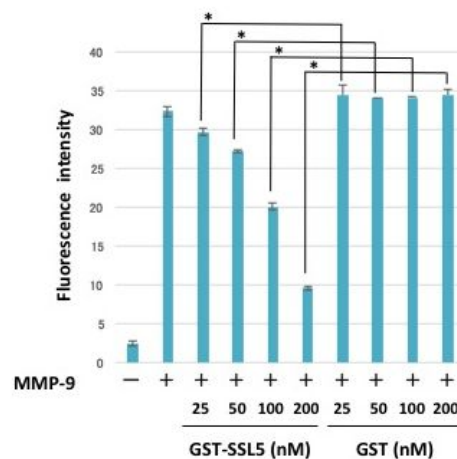


図 3 MMP-9 酵素活性に及ぼす SSL5 の影響

(3) SSL5 と MMP-9 の相互作用における糖鎖の役割

SSL5 が MMP-9 に加え, 複数の異なるタンパク質と結合することを見出したので, 結合反応に糖鎖が関与する可能性を考え, 白血球

由来の MMP-9 をシアリダーゼあるいはペプチド:N-グリコナーゼ (PNGase) で処理した後に結合を調べた。その結果、MMP-9 と SSL5 の結合は、両酵素で処理することにより減弱することがわかり、両者の結合がシアル酸を含む糖鎖に依存するものであることが示唆された(図4)。MMP-9 に存在する N-結合型あるいは O-結合型糖鎖のいずれに SSL5 が結合するのか、さらに研究を進めている。

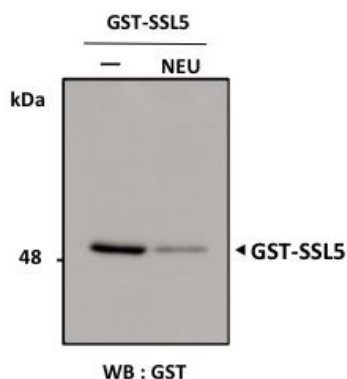


図4 SSL5 と MMP-9 の結合に及ぼすシアリダーゼ処理の影響

(4) MMP-9 酵素活性におけるシアル酸の役割
MMP-9 をノイラミニダーゼで処理しシアル酸を除去することにより、蛍光基質を分解する活性が 13%程度にまで減少した。この結果および SSL5 がシアル酸依存的に MMP-9 に結合し酵素活性を阻害することを考え合わせると、MMP-9 の酵素活性にはシアル酸の存在が重要であると考えられる。

(5) P-セレクトリン依存性細胞接着に影響を及ぼす細菌由来タンパク質の探索
セレクトリン依存性の白血球接着反応に対する細菌由来分泌タンパク質の影響を調べるために P-セレクトリン/Fc 融合キメラタンパク質を調製した。このキメラタンパク質と各種細菌 (*S. aureus*, *A. hydrophila*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *M. bovis*,) 培養上清より結合タンパク質をスクリーニングしたところ、それぞれの細菌の培養上清から複数の異なる結合タンパク質が検出された。現在、これらのタンパク質の性状について解析を続けている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

1. Oku T, Ando Y, Ogura M, Tsuji T. Development of splice variant-specific monoclonal antibodies against human $\alpha 3$ integrin. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother* 査読有 35: 12-17 (2016) doi: 10.1089/mab.2015.0053.
2. Ando Y, Oku T, Tsuji T. Platelets attenuate production of cytokines and nitric oxide by

macrophages in response to bacterial endotoxin. *Platelets* 査読有 27: 344-350 (2016) doi: 10.3109/09537104.2015.1103369

3. Itoh S, Kawano K, Takeshita K, Maitani Y, Tsuji T. Development of liposomal nanoconstructs targeting P-selectin (CD62P)-expressing cells by using a sulfated derivative of sialic acid. *Pharm Res* 査読有 31: 2868-2875 (2014) doi: 10.1007/s11095-014-1383-6
4. Kamoshida G, Ogawa T, Oyanagi J, Sato H, Komiya E, Higashi S, Miyazaki K, Tsuji T. Modulation of matrix metalloproteinase-9 secretion from tumor-associated macrophage-like cells by proteolytically processed laminin-332 (laminin-5). *Clin Exp Metastasis* 査読有 31: 285-291 (2014) doi: 10.1007/s10585-013-9627-0

〔学会発表〕(計6件)

1. 栗坂知里, 奥 輝明, 辻 勉 黄色ブドウ球菌由来 SSL5 と MMP-9 の結合における糖鎖の役割 日本薬学会 136 年会 2016 年 3 月 (横浜)
2. 安藤祐介, 奥 輝明, 辻 勉 微生物成分に対するマクロファージの応答に及ぼす血小板由来因子の影響 日本薬学会 136 年会 2016 年 3 月 (横浜)
3. 栗坂知里, 奥 輝明, 伊藤佐生智, 辻 勉 SSL5 と matrix metalloproteinase-9 の結合 第 16 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム 2015 年 6 月 (東京)
4. 安藤祐介, 奥 輝明, 辻 勉 血小板はマクロファージのエンドトキシン応答を抑制する 第 16 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム 2015 年 6 月 (東京)
5. 伊藤佐生智, 小代智紀, 工藤早苗, 川野久美, 米谷芳枝, 辻 勉 硫酸化シアル酸誘導体 NMSO3 による P-セレクトリン依存的な細胞接着の制御と DDS への応用 第 15 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム 2014 年 5 月 (名古屋)
6. Oku, T, Kaneko, Y, Ishii, R, Toyoshima, S, Tsuji, T. Thr-412 of Coronin-1 is phosphorylated by protein kinase C α *Experimental Biology* 2014 2014 年 4 月 (San Diego, CA, USA)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

辻 勉 (TSUJI, Tsutomu)

星薬科大学・薬学部・教授

研究者番号: 00143503

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

築地 信 (TSUIJI, Makoto)
星薬科大学・薬学部・准教授
研究者番号：90302611

奥 輝明 (OKU, Teruaki)
星薬科大学・薬学部・助教
研究者番号：20409361