

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15787

研究課題名(和文)肺炎球菌のアルギニン代謝産物による免疫回避機構の解明

研究課題名(英文)Role of streptococcal arginine deiminase in the evasion of host immunity

研究代表者

山口 雅也 (Yamaguchi, Masaya)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：00714536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：レンサ球菌は、皮膚や粘膜面のマイクロバイオーームを構成する主要な属である。一方で、病原レンサ球菌感染症において、感染局所では激しい炎症応答や化膿性病変の形成が認められる。本研究では、一部のレンサ球菌がアルギニンを代謝する点に着目し、病原性に及ぼす影響の解析を試みた。肺炎球菌、化膿レンサ球菌、B群レンサ球菌についてアルギニン添加時のアンモニア産生量を比較したところ、化膿レンサ球菌で高い産生能が認められた。そこで、化膿レンサ球菌の野生株とアルギニン代謝遺伝子欠失株について、マウス感染モデルにて病原性を比較した。その結果、アルギニン代謝機構が皮膚病変形成に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Members of the genus *Streptococcus* are major constituents of human skin and the mucosal microbiome, of which some, such as *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus agalactiae*, and *Streptococcus pneumoniae*, are extracellular pathogens that occasionally cause life-threatening infectious diseases. In this study, we focused on the role of streptococcal arginine deiminase in the evasion of host immunity. In pilot study, *S. pyogenes* produced higher amount of ammonium ion as compared to *S. pneumoniae* and *S. agalactiae*. Next, we performed mouse infection assay using *S. pyogenes* wild-type and arginine deiminase knock out strains. The infection assay indicated that *S. pyogenes*-arginine deiminase pathway contributes to the pathogenesis in the skin infection.

研究分野：細菌学

キーワード：感染症 細菌 レンサ球菌 アルギニン

### 1. 研究開始当初の背景

病原レンサ球菌感染症において、感染局所では激しい炎症応答や化膿性病変の形成が認められる。しかし、病原レンサ球菌は宿主の免疫応答を回避し、しばしば敗血症や髄膜炎といった侵襲性の疾患を引き起こす。肺炎球菌を含む一部のレンサ球菌は、アルギニンを代謝してアンモニウムイオンを産生する。その性質は古くから菌株の鑑別に利用されてきた。一方、アンモニウムイオンはオートファジーの阻害剤として用いられている。また、我々はアンモニウムイオンが NETs 産生を抑制することを発見した。本研究ではレンサ球菌のアルギニン代謝機構に着目し、病原性に及ぼす影響を解析する。

### 2. 研究の目的

本研究では、一部のレンサ球菌がアルギニンを代謝してアンモニウムイオンを産生する点に着目した。肺炎球菌、化膿レンサ球菌、B群レンサ球菌についてアルギニン添加時のアンモニア産生量を比較したところ、化膿レンサ球菌で高い産生能が認められた。化膿レンサ球菌はヒトに膿痂疹や丹毒などの皮膚感染症を引き起こす原因菌である。化膿レンサ球菌が有するアルギニン代謝経路は、代謝過程において ATP とアンモニアを産生する。皮膚感染時には、環境中の糖質が少ないために、アルギニン代謝系が主として働いていると考えられる。本研究では、化膿レンサ球菌のアルギニン代謝機構が皮膚感染に及ぼす影響を検討した。

### 3. 研究の方法

化膿レンサ球菌 5448 株を親株として、アルギニンデヒミナーゼをコードする *arcA* 遺伝子の欠失株ならびに *arcA* 復帰変異株を作製した。次に、THY 液体培地中で培養した各菌株の増殖曲線、生菌数の推移、および *arcA* 発現量を評価した。また、培養上清中のアンモニア濃度を測定した。さらに、*S. pyogenes* のアルギニン代謝能が皮膚感染に及ぼす影響を検討するため、C57BL/6J 雌マウスの背部を除毛した後に、各菌株の懸濁液をガーゼパッチにより留置することで感染させた。感染 3 日後、皮膚病変中の生菌数と組織像を評価した。

### 4. 研究成果

各菌株における対数増殖期から死滅期にかけての増殖曲線に差は認められなかった。しかし、定常期から死滅期における生菌数は、*arcA* 欠失により有意に低下した。また、野生株および復帰変異株における *arcA* 発現量および培養液中のアンモニア濃度は対数増殖期と比較して、定常期以降で顕著に上昇した。感染実験では、*arcA* の欠失により皮膚病変中の生菌数が有意に減少した。さらに、野生株および復帰変異株感染マウスでは感染部位における潰瘍形成が認められたが、*arcA* 欠失

により抑制された。

以上の結果より、化膿レンサ球菌の皮膚病変形成に *ArcA* によるアルギニン代謝能が寄与する可能性が示された。

### 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 16 件)

1. Domon H., Nagai K., Maekawa T., Oda M., Yonezawa D., Takeda W., Hiyoshi T., Tamura H., Yamaguchi M., Kawabata S., Terao Y. Neutrophil elastase subverts the immune response by cleaving Toll-like receptors and cytokines in pneumococcal pneumonia. **Front. Immunol.**, *in press* 査読有
2. Yamaguchi M., Synergistic findings from microbiological and evolutionary analyses of virulence factors among pathogenic streptococcal species. **J. Oral Biosci.** *in press*, 査読有 *invited review*.
3. Hirose Y., Funahashi Y., Matsukawa Y., Majima T., Yamaguchi M., Kawabata S., Gotoh M., Yamamoto T., Comparison of trophic factors secreted from human adipose-derived stromal vascular fraction with those from adipose-derived stromal/stem cells in the same individuals. **Cytotherapy**, *in press* 査読有
4. Nagai K., Domon H., Maekawa T., Oda M., Hiyoshi T., Tamura H., Yonezawa D., Arai Y., Yokoji M., Tabeta K., Habuka R., Saitoh A., Yamaguchi M., Kawabata S., Terao Y. Pneumococcal DNA-binding proteins released through autolysis induce the production of proinflammatory cytokines via toll-like receptor 4. **Cell. Immunol.**, Vol. 325. pp14-22. 2018. 査読有
5. Sumitomo T., Mori Y., Nakamura Y., Honda-Ogawa M., Nakagawa S., Yamaguchi M., Matsue H., Terao Y., Nakata M., Kawabata S. Streptococcal cysteine protease-mediated cleavage of desmogleins is involved in the pathogenesis of cutaneous infection. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, Vol. 8. 10. 2018. 査読有
6. Kurosawa M., Oda M., Domon H., Isono T., Nakamura Y., Saitoh I., Hayasaki H., Yamaguchi M., Kawabata S., Terao Y. *Streptococcus pyogenes* CAMP factor promotes bacterial adhesion and invasion in pharyngeal epithelial cells without serum via PI3K/Akt signaling pathway. **Microb. Infect.**, Vol. 20 pp9-18. 2018. 査読有
7. Yamaguchi M., Nakata M., Sumioka R., Hirose Y., Wada S., Akeda Y., Sumitomo T.

- Kawabata S. Zinc metalloproteinase ZmpC suppresses experimental pneumococcal meningitis by inhibiting bacterial invasion of central nervous systems. **Virulence**, Vol. 8. pp1516-1524. 2017. 査読有
8. Beulin D.S., Radhakrishnan D., Suresh S.C., Sadasivan C., Yamaguchi M., Kawabata S., Ponnuraj K. *Streptococcus pneumoniae* surface protein PfbA is a versatile multi-domain and multi-ligand-binding adhesin employing different binding mechanisms. **FEBS J.**, Vol. 284. pp3404-3421. 2017. 査読有
  9. Oda M., Domon H., Kurosawa M., Isono T., Maekawa T., Yamaguchi M., Kawabata S., Terao Y. *Streptococcus pyogenes* phospholipase A2 induces the expression of adhesion molecules on human umbilical vein endothelial cells and aorta of mice. **Front. Cell. Infect. Microbiol.** Vol. 7. 300. 2017. 査読有
  10. Sumioka R., Nakata M., Okahashi N., Li Y., Wada S., Yamaguchi M., Sumitomo T., Hayashi M., Kawabata S. *Streptococcus sanguinis* induces neutrophil cell death by production of hydrogen peroxide. **PLoS One**, Vol. 12. e0172223. 2017. 査読有
  11. Honda-Ogawa M., Sumitomo T., Mori Y., Hamd D.T., Ogawa T., Yamaguchi M., Nakata M., Kawabata S. *Streptococcus pyogenes* endopeptidase O contributes to evasion from complement-mediated bacteriolysis via binding to human complement factor C1q. **J. Biol. Chem.** Vol. 292. pp4244-4254. 2017. 査読有
  12. Oogai Y., Yamaguchi M., Kawada-Matsuo M., Sumitomo T., Kawabata S., Komatsuzawa H. Lysine and threonine biosynthesis from aspartate contributes to *Staphylococcus aureus* growth in calf serum. **Appl. Environ. Microbiol.** Vol. 82. pp6150-6157. 2016. 査読有
  13. Yamaguchi M.<sup>§</sup>, Hirose Y., Nakata M., Uchiyama S., Yamaguchi Y., Goto K., Sumitomo T., Lewis A.L., Kawabata S., Nizet V. Evolutionary inactivation of a sialidase in group B *Streptococcus*. **Sci. Rep.** Vol. 6. 28852. 2016. 査読有  
<sup>§</sup>corresponding author.
  14. Hirose Y., Yamaguchi M., Kawabata S., Murakami M., Nakashima M., Gotoh M., Yamamoto T. Effects of Extracellular pH on Dental Pulp Cells *in vitro*. **J. Endodont.** Vol. 42. pp.735-741. 2016. 査読有
  15. 山口雅也, 川端重忠. 病原レンサ球菌の感染過程における莢膜糖鎖と糖鎖分解酵素の役割. **生化学**. 日本生化学会. Vol. 90. pp80-83. 2018. 査読有
  16. 山口雅也. 病原レンサ球菌における莢膜と糖鎖分解酵素. **大阪大学歯学雑誌**, 大阪大学歯学会. Vol. 61. pp1-4. 2017. 査読無
- [学会発表](計 33 件)
1. 山口雅也. 分子系統解析を利用した *Streptococcus agalactiae* のシアル酸分解酵素の機能解析. 第 59 回歯科基礎医学会 学会奨励賞 受賞講演. 2017 年 9 月 16-18 日. 塩尻市, 長野県.
  2. 山口雅也, 川端重忠. 分子進化解析に基づく *Streptococcus agalactiae* の糖鎖分解酵素様分子 NonA の機能解析. 大阪大学歯学会第 123 回例会 大阪大学弓倉奨励賞 受賞講演. 2017 年 1 月 12 日. 吹田市, 大阪府.
  3. Yamaguchi M., Hirose Y., Goto K., Sumitomo T., Nakata M., Kawabata S. *Streptococcus pneumoniae* evades host innate immunity through parallel beta-helix protein PfbA. LISSSD2017. 2017 年 10 月 16-20 日. Denarau island, Fiji.( 口頭発表)
  4. 広瀬雄二郎, 山口雅也, 後藤花奈, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. *Streptococcus pyogenes* が産生する ArcA は皮膚病変形成に寄与する / ArcA contributes to development of the *Streptococcus pyogenes* skin lesion. 第 91 回日本細菌学会総会. 2018 年 3 月 27-29 日. 博多市.(ワークショップ/ポスター)
  5. 山口雅也, 中田匡宣, 住岡龍一, 和田聖史, 広瀬雄二郎, 明田幸宏, 住友倫子, 川端重忠. 肺炎球菌のジンクメタロプロテアーゼの系統解析と髄膜炎発症に果たす役割の解明 / Phylogenetic analysis of pneumococcal zinc metalloproteases and the role in bacterial meningitis. 第 90 回日本細菌学会総会 2017 年 3 月 19-21 日. 仙台市.(ワークショップ/ポスター)
  6. 住友倫子, 中田匡宣, 山口雅也, 川端重忠. インフルエンザウイルス感染は化膿レンサ球菌の上皮バリア突破を亢進させる / Virus-induced dysfunction of epithelial barrier promotes bacterial invasion into host cells. 第 90 回日本細菌学会総会. 2017 年 3 月 19-21 日. 仙台市.(ワークショップ/ポスター)
  7. Hirose Y., Yamaguchi M., Goto K., Sumitomo T., Nakata M., Kawabata S. *Streptococcus pneumoniae* Ccs4 that is involved in invasion into brain across blood-brain barrier impacts its virulence in meningitis. LISSSD2017. 2017 年 10 月 16-20 日. Denarau island, Fiji.(ポスター)
  8. Sumitomo T., Mori Y., Nakamura Y., Ogawa-Honda M., Yamaguchi M., Terao Y., Nakata M., Kawabata S. Streptococcal cysteine protease-mediated cleavage of desmogleins contributes to development of cutaneous infection. IUMS 2017, 2017 年 7 月 17-21 日. Singapore. (ポスター)

9. Honda M., Sumitomo T., Mori Y., Yamaguchi M., Nakata M., Kawabata S. Involvement of Group A streptococcal endopeptidase O in evasion from complement-mediated bacteriolysis via binding to complement C1q. The 13th Korea-Japan International Symposium on Microbiology, 2016年5月12-13日. Gyeongju city, Korea. (ポスター)
10. 後藤花奈, 山口雅也, 広瀬雄二郎, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. 肺炎球菌の CbpJ が肺炎発症に果たす役割の解析. 第70回日本細菌学会関西支部総会. 2017年11月25日. 大阪市. (口頭/ポスター)
11. 後藤花奈, 山口雅也, 広瀬雄二郎, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. *Streptococcus pneumoniae* のコリン結合タンパク質 CbpJ は肺炎発症に寄与する. 第5回五大学・微生物研究会 2017年9月19日. 松本市, 長野県. (口頭発表)
12. 住友倫子, 中田匡宣, 山口雅也, 川端重忠. インフルエンザウイルス感染による Snail1 の発現誘導は化膿レンサ球菌の上皮バリア突破を亢進させる / Influenza A virus infection-induced Snail1 expression contributes to secondary bacterial translocation across epithelial barrier. 第59回歯科基礎医学会. 2017年9月16-18日. 塩尻市, 長野県. (口頭発表)
13. 山口雅也, 中田匡宣, 広瀬雄二郎, 後藤花奈, 住友倫子, 川端重忠. 化膿レンサ球菌のヒアルロン酸分解酵素 HylA の分子系統解析と病原性に果たす役割の解析. 第49回レンサ球菌研究会. 2017年6月17-18日. 新潟市. (口頭発表)
14. 山口雅也, 広瀬雄二郎, 明田幸宏, 住友倫子, 川端重忠. 肺炎球菌のメタロプロテアーゼ ZmpC は中枢系への菌の侵入を抑制する. 第91回日本感染症学会総会・学術講演会 第65回日本化学療法学会学術集会 合同学会. 2017年4月6-8日. 東京都新宿区. (口頭発表)
15. 毛利泰士, 住友倫子, 松岡悠美, 本多真理子, 山口雅也, 寺尾 豊, 中田匡宣, 川端重忠. *Streptococcus pyogenes* による皮膚病変の形成機構に関する解析. 第69回日本細菌学会関西支部総会. 2016年11月19日. 大阪市. (口頭/ポスター)
16. 広瀬雄二郎, 山口雅也, 後藤花奈, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. 肺炎球菌が発現する形質転換誘導性タンパク質 Ccs4 の病原性への関与. 第4回4大学・口腔微生物研究会. 2016年8月26-27日. 千歳市. (口頭発表)
17. 山口雅也, 広瀬雄二郎, 後藤花奈, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. 肺炎球菌の菌体表層タンパク PfbA は宿主の自然免疫機構からの回避に寄与する / PfbA of *Streptococcus pneumoniae* contributes to the evasion from host innate immunity. 第58回歯科基礎医学会学術大会. 2016年8月24-26日. 札幌市. (口頭発表)
18. 小川真理子, 住友倫子, 毛利泰士, 山口雅也, 中田匡宣, 川端重忠. C1q との相互作用を介する化膿レンサ球菌の補体免疫回避機構 / *Streptococcus pyogenes*-produced endopeptidase O contributes to evasion from complement-mediated bacteriolysis via binding to human complement factor C1q. 第58回歯科基礎医学会学術大会. 2016年8月24-26日. 札幌市. (口頭/ポスター)
19. 住友倫子, 中田匡宣, 毛利泰士, 小川真理子, 山口雅也, 川端重忠. インフルエンザウイルス感染に伴い上皮表層に誘導される GP96 は化膿レンサ球菌の上皮細胞への付着を亢進させる / Influenza A virus-induced surface display of GP96 promotes adherence of *Streptococcus pyogenes* to epithelial cells. 第58回歯科基礎医学会学術大会. 2016年8月24-26日. 札幌市. (口頭発表)
20. 本多真理子, 住友倫子, 毛利泰士, Dalia Hamd, 山口雅也, 中田匡宣, 川端重忠. *Streptococcus pyogenes* が産生する endopeptidase O と C1q の結合による補体免疫回避機構. 第48回レンサ球菌研究会. 2016年7月8-9日. 長崎市. (口頭発表)
21. 山口雅也, 広瀬雄二郎, 中田匡宣, 後藤花奈, 住友倫子, 川端重忠. 分子進化解析を利用した B 群レンサ球菌のシアル酸分解酵素が病原性に果たす役割の解明. 日本生化学会 近畿支部会. 2016年5月21日. 神戸市. (口頭/ポスター)
22. 山口雅也, 広瀬雄二郎, 後藤花奈, 住友倫子, 川端重忠. B 群レンサ球菌におけるシアル酸分解酵素 NonA の進化的な不活性化. 第90回日本感染症学会総会. 2016年4月15-16日. 仙台市. (口頭発表)
23. 山口雅也, 広瀬雄二郎, 後藤花奈, 竹村萌, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. 肺炎球菌の beta-ヘリックス構造タンパク質 PfbA を介した貪食回避機構の解析 / Role of pneumococcal beta-helix protein PfbA in the evasion of phagocytosis. 第91回日本細菌学会総会. 2018年3月27-29日. 博多市. (ポスター)
24. 後藤花奈, 山口雅也, 広瀬雄二郎, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. 肺炎球菌のコリン結合タンパク質 CbpJ および CbpL の肺炎発症における役割の解析 / Role of choline binding proteins CbpJ and CbpL in development of pneumococcal pneumonia. 第91回日本細菌学会総会.

- 2018年3月27-29日・博多市。(ポスター)
25. 広瀬雄二郎, 山口雅也, 後藤花奈, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. *Streptococcus pneumoniae* Ccs4 は脳血管内皮細胞への付着・侵入を促進する病原因子である. 2017年度生命科学系学会合同年次大会. 2017年12月6-9日. 神戸市。(ポスター)
26. 住友倫子, 中田匡宣, 山口雅也, 川端重忠. A型インフルエンザウイルス感染に伴い表在化するGP96は化膿レンサ球菌の上皮細胞への付着を亢進させる / Influenza A virus-induced cell surface display of GP96 promotes secondary bacterial adherence to epithelial cells. 第65回日本ウイルス学会学術集会. 2017年10月24-26日. 大阪市。(ポスター)
27. 後藤花奈, 山口雅也, 広瀬雄二郎, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. *Streptococcus pneumoniae* のコリン結合タンパク質 CbpJ は肺炎発症における病原因子として働く / The choline binding protein CbpJ of *Streptococcus pneumoniae* contributes to pathogenicity of pneumonia. 第59回歯科基礎医学会. 2017年9月16-18日. 塩尻市, 長野県。(ポスター)
28. 永井康介, 土門久哲, 前川知樹, 山口雅也, 川端重忠, 寺尾 豊. 自己溶菌に伴い放出される肺炎球菌の菌体内病原因子の同定と分子解析 / Investigation of intracellular pathogenic factor released by of *Streptococcus pneumoniae*. 第59回歯科基礎医学会. 2017年9月16-18日. 塩尻市, 長野県。(ポスター)
29. 土門久哲, 前川知樹, 永井康介, 山口雅也, 川端重忠, 寺尾 豊. 肺炎の重症化に伴い誘導される宿主由来エラスターゼの病原性解析 / Molecular analysis of virulence mechanisms associated with neutrophil elastase in pneumococcal pneumonia. 第59回歯科基礎医学会. 2017年9月16-18日. 塩尻市, 長野県。(ポスター)
30. 広瀬雄二郎, 山口雅也, 後藤花奈, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. 肺炎球菌の Ccs4 は脳血管内皮細胞への侵入に寄与する病原因子である / Pneumococcal Ccs4 is a virulence factor involved in the invasion into brain microvascular endothelial cells. 第90回日本細菌学会総会. 2017年3月19-21日. 仙台市。(ポスター)
31. 本多真理子, 住友倫子, 山口雅也, 中田匡宣, 川端重忠. 化膿レンサ球菌の endopeptidase O と補体 C1q の相互作用が病原性に及ぼす影響 / *Streptococcus pyogenes* endopeptidase O contributes to its pathogenesis via interaction with C1q. 第90回日本細菌学会総会. 2017年3月

- 19-21日. 仙台市。(ポスター)
32. 広瀬雄二郎, 山口雅也, 後藤花奈, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. 形質転換誘導性タンパク質 Ccs4 が *Streptococcus pneumoniae* の病原性に与える影響 / Competence-induced protein Ccs4 impacts virulence of *Streptococcus pneumoniae*. 第58回歯科基礎医学会学術大会. 2016年8月24-26日. 札幌市。(ポスター)
33. 中田匡宣, 住友倫子, 山口雅也, 川端重忠. 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 / Pneumococcal adaptation to environmental temperature shift impacts survival in blood. 第58回歯科基礎医学会学術大会. 2016年8月24-26日. 札幌市。(ポスター)

〔図書〕(計1件)

1. Yamaguchi M., Kawabata S. Streptococcal Enolase and Immune Evasion, In *Moonlighting proteins: Novel virulence factors in bacterial infections*. Ed: Henderson B. **Wiley Science**, pp269-289. 2017. *invited book chapter*. 査読有

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 出願年月日:  
 国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
 発明者:  
 権利者:  
 種類:  
 番号:  
 取得年月日:  
 国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等  
 研究代表者のホームページ  
<https://www.hs.ura.osaka-u.ac.jp/yamaguchimasa/ya/>  
 研究代表者所属教室のホームページ  
<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~mcrbio/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 雅也 (YAMAGUCHI, Masaya)  
 大阪大学・大学院歯学研究科・助教  
 研究者番号: 00714536

(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

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

住友 倫子 (SUMITOMO, Tomoko)  
大阪大学・大学院歯学研究科・講師  
研究者番号：50423421

(3)連携研究者

( )

研究者番号：

(4)研究協力者

( )