

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：34104
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2020
課題番号：18K06764
研究課題名(和文)連鎖球菌産生毒素の機能解析と感染症制御への応用

研究課題名(英文)Functional analysis of streptococcal toxins

研究代表者

大倉 一人(OHKURA, Kazuto)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：00242850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：・ヒト咽頭口腔内常在細菌Streptococcus anginosus subsp. anginosus(SAA)は溶血株はペプチド溶血因子streptolysin S(SLS)を産生し 溶血性を示す。SAAが産生するSLSも細胞障害因子として機能することを明らかにした。

・Mitis群レンサ球菌属Streptococcus pseudopneumoniae(SPpn)からリパーゼドメイン、2つのレクチンドメイン、CDC部分ドメインを有すMitilectin(MLC)を見だし解析した。MLC組換え体はリパーゼ活性やヒト由来細胞結合性を示すが、溶血性は示さずヒト細胞への接着分子として機能した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これら連鎖球菌関連の病原因子について、動的構造と生物活性の相関を考慮して作用機構の解析を進めている例は、国内外において申請者のグループ以外にはなく、溶血、血栓形成、血管炎といった細菌感染に起因する様々な症例の発症および重篤化のメカニズムの解明と、その予防・治療法の確立に繋がると思われる。さらに本研究は、連鎖球菌のみならず、様々な病原微生物と宿主の相互作用の進化論的研究や創薬、新医療技術の開発にも繋がると考えられ、その学問的、社会的意義は大きいといえる。加えて、食事内容(糖類)により細胞障害毒素の産生分泌や活性発現が制御できれば、潰瘍性大腸炎などの発症予防、治療方法の開発に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：・Streptococcus anginosus subsp. anginosus (SAA) was a hemolytic strain that produced the peptide hemolytic factor streptolysin S (SLS) and exhibited α -hemolysis. It was revealed that SLS functions as a cytotoxic factor.

・Mitis group Streptococcus pseudopneumoniae (SPpn) produced mitilectin (MLC). MLC had a lipase domain, two lectin domains, and a CDC partial domain. The MLC recombinant showed lipase activity and human-derived cell binding, but did not show hemolytic property and functioned as an adhesion molecule to human cells.

研究分野：薬剤学

キーワード：細菌感染症 細胞溶解毒素 生体膜

1. 研究開始当初の背景

ヒト口腔内常在細菌であるアンギノサス群連鎖球菌 (AGS) やミチス群連鎖球菌 (MGS) には、血液寒天培地上で溶血性を示す株が存在する。我々は、ヒト特異的に深部臓器に膿瘍を形成する連鎖球菌 *Streptococcus intermedius* から、コレステロールと直接結合せずにヒト型 CD59 (hCD59) を受容体として細胞膜と結合して活性 (クラスター形成を伴う膜孔形成) を示すヒト特異的細胞溶解毒素インターメディリシン (ILY) を見だし、ILY が *S. intermedius* の溶血因子の本体であり、ヒト細胞への感染に必須であることを明らかにした。また、ILY や他の CDC の細胞膜結合部位は、分子運動を行いながら常に標的を認識し相互作用しうる状態にあることを報告してきた。さらに、ILY 以外の AGS 由来溶血性因子は長らく不明であったが、我々は溶血性を示す *Streptococcus anginosus* から溶血因子としてストレプトリジン S (SLS) のホモログを見だしてそのコード遺伝子構造を決定し、タンデム型の *sagA* 遺伝子構造 (*sagA1* および *sagA2*) を有すことを確認した。

S. anginosus の *sag* オペロンは、*sagAs* (*sagA1* および *sagA2*) を先頭に *sagB* ~ *sagI* が連続して存在し、先行研究より *sagAs* は細胞溶解を担う SLS ホモログの本体をコードし、*sagB* ~ *sagD* の翻訳産物は *sagAs* 翻訳産物の分子内ヘテロ環状構造の形成などを伴う成熟化のための構造変換を担い、*sagE* はリーダーペプチドの切断、*sagF* は自己防衛のための免疫蛋白の産生、*sagG* ~ *sagI* は薬剤耐性と関連する物質輸送を担う因子をコードすると考えられた。すなわち *sagAs* ~ *sagI* から産生される因子は互いに協調し合う包括的多機能分子グループだと考えられ、個々因子の構造機能解析と並んで協調的相互作用の理解も重要だといえる。

さらに、MGS 由来の多機能分子としてヒト血小板凝集因子 Sm-hPAF がある。Sm-hPAF は小児川崎病の発症との関連が注目されている *S. mitis* の一部の株が産生し、細胞溶解活性と血小板凝集活性を有し動脈血栓形成に関与すると考えられる。Sm-hPAF は細胞溶解を担う CDC 様構造に加えて N 末端側に推定レクチン様領域を有し、蛋白質レベルで 2 つの異なる分子が集合した構造をとる。このことは細胞溶解能を共通の特徴に持つと考えられてきた CDC の中に血小板凝集という別の機能を有する毒素の存在を示しており、SLS と共に連鎖球菌の病原因子が多機能性分子集団を形成していても不思議ではない。さらに最近、Sm-hPAF と同様に N 末端追加ドメインを有する EX-CDC を見だし、この追加ドメインを含めた構造機能解析も進めている。加えて、細菌感染時の炎症抑制に用いられる非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) の中で ILY の細胞障害性を亢進させる薬剤を見だし、治療法としての NSAID の選別も重要だと考えている。また糖による ILY 機能の抑制についても試験データを得ており、AGS 感染症の予防や治療への糖アナログの利用について検討を進めている。

2. 研究の目的

我々は、*S. anginosus* が産生するタンデム型 *sagAs* にコードされた SLS ホモログを見だし、その溶血能と感染リスクの観点から解析を進めている。この SLS ホモログをコードする *sag* オペロンは SLS の構造変換および菌体外輸送を統御する複数の因子をコードしており、各翻訳産物が分担して AGS の感染行動に関わっている。これまでに大腸菌や緑膿菌などのグラム陰性菌では詳細な輸送担体の分子論的解析がなされており、細胞壁 - 細胞膜間のアダプター分子を含む輸送系の役割分担について考察されている。一方、連鎖球菌などのグラム陽性菌では詳細な知見は殆どない。我々はホモロジー解析の結果から、SagG はホモダイマー型の輸送担体であり、SLS を菌体外へ分泌すると考えている。SLS が細胞障害性を発揮する際の最終イベントとして SagG ~ SagI 輸送系による SLS の菌体外輸送が考えられるため、この詳細を明らかにすることは SLS による連鎖球菌の病原性を考える上で重要である。さらに、連鎖球菌由来 CDC の細胞障害機構も未だ完全には解明されていない。*S. intermedius* 由来 ILY は膜コレステロールではなくヒト細胞膜の hCD59 を標的とするなど、多くの点で典型的な CDC とは異質な膜孔形成毒素である。*S. mitis* 由来 Sm-hPAF については細胞溶解と血小板凝集という異なる活性を有し、構造的にも CDC の基本構造の N 末端に 162 アミノ酸からなる OD を有する。この OD を構成するアミノ酸は肺炎球菌のフコレクチン関連タンパク質と高い相同性を有し、Sm-hPAF が潜在的に複数の機能を有すキメラ分子であり、多機能性感染症因子と推測される点も興味深い。これら連鎖球菌関連の病原因子について、動的構造と生物活性の相関を考慮して作用機構の解析を進めている例は、国内外において申請者のグループ以外にはなく、溶血、血栓形成、血管炎といった細菌感染に起因する様々な症例の発症および重篤化のメカニズムの解明と、その予防・治療法の確立に繋がると考えられる。さらに本研究は、連鎖球菌のみならず、様々な病原微生物と宿主の相互作用の進化論的研究や創薬、新医療技術の開発にも繋がると考えられ、その学問的、社会的意義は大きいといえる。加えて、食事内容 (糖類) により細胞障害毒素の産生分泌や活性発現が制御できれば、潰瘍性大腸炎などの発症予防、治療方法の開発に繋がると期待される。

3. 研究の方法

1) SLS 産生株において *sagA* ~ *sagI* 遺伝子を各々欠失させ、生育状況、SLS ホモログ産生能、溶血活性、動物細胞への感染力価、薬剤耐性などを指標とし、宿主への感染時に *sag* オペロンにコードされる個々因子が果たす役割を検証した。

2) 輸送担体関連遺伝子のデータベース探索から SagG~SagI が物質輸送に関わりがあり、なかでも SagG が p-糖蛋白質と類似の高次構造を取りながらホモダイマーとして輸送担体の形状を保つことを分子モデリングから確認しており、基質の通路に位置するアミノ酸を置換した変異体を作製し薬剤耐性能を検証した。加えて SagG のアダプター蛋白質と推定される SagH、SagI の機能を解析した。

3) SagG~SagI 各々を組み込んだリポソームを作製し輸送対象とする基質を検証。輸送担体を組み込んだ薬物輸送の解析系を用いることで、感染症治療薬のみならず、通常は感染症治療に用いない薬剤の菌体からの排出強度(耐性の獲得され易さ)を予測でき、治療薬剤選択の指標となる。

4) *S. anginosus* において、SLS による細胞障害活性が自己に対して発揮されないように SagF が機能することが予測される。SagF を大腸菌などで発現させ SLS の細胞溶解活性に対する防御効果を検証した。その際、*S. pyogenes* 由来 SLS の細胞障害性が *S. anginosus* 由来 SagF でも抑制されるかを検討し、*S. anginosus* 由来 SagF の他菌種由来 SLS に対する有効性を検証した。

5) EX-CDC のドメイン 1~4 は CDC 様の構造機能を有するが、追加ドメイン (EX) の機能は不明である。そこで、EX ドメイン単体を発現させ細胞膜障害性を検証した。また CDC は膜孔を形成し細胞溶解を引き起こす際に、ドメイン 2~3 間の大きな構造変換が必須であることから、EX-CDC のドメイン 2~3 間に S-S 結合を導入し、構造変換を抑制した EX-CDC 変異体を作製し EX の作用特性を検証した。

6) *S. pyogenes* 由来 SLS、*S. anginosus* 由来 SagA1、SagA2 は動物種を問わず 溶血を誘導することから、SLS の受容体は動物種を問わず細胞膜に分布する分子だと考えられる。SLS および EX-CDC について、リン脂質組成を変えたりポソーム、または CDC 受容体のコレステロールや ILY 受容体のヒト型 CD59 を埋め込んだリポソームへの作用を解析した。*S. anginosus* 由来 SagA1、SagA2 の C 末端へ FLAG タグを付加すると溶血活性が減弱する事から受容体認識に C 末端近傍の関与も考えられ、そのような情報も考慮し検討した。

7) ILY の活性が単糖存在下で抑制されることから、SLS や EX-CDC についても糖存在下での細胞障害性を検証し、毒素産生連鎖球菌の生育、細胞溶解毒素の分泌・活性発現に及ぼす食事内容の影響を検討した。

8) 細菌感染時の炎症抑制に用いる NSAID には、ILY の溶血活性を増強するものが存在する。連鎖球菌由来毒素の膜作用を肝ミトコンドリアに対する透過性遷移誘導能を用いて解析したところ、*N*-phenylanthranilic acid 骨格をもつ NSAID に膜作用を確認したことから、SLS や EX-CDC の細胞障害作用に及ぼす NSAID や他薬物の効果を検証した。

4. 研究成果

連鎖球菌関連因子の機能解析

(1) β -Hemolytic *Streptococcus anginosus* subsp. *anginosus* causes streptolysin S-dependent cytotoxicity to human cell culture lines in vitro. : ヒト咽頭口腔内の常在細菌である *Streptococcus anginosus* subsp. *anginosus* (SAA) には溶血株を示すサブグループが存在し、これらの株はペプチド溶血因子である streptolysin S (SLS) を産生することによって 溶血性を示す。この SLS については、これまでに「溶血因子ではあるが細胞障害性には寄与しない」ことが他の研究グループから報告されていたが、我々は評価系の再検討を行い、遺伝子組換えの手法を用いて作製した SLS 非産生株を用いた検討によって、SAA が産生する SLS も細胞障害因子としての機能を示すことを明らかにした。

(2) Molecular characteristics of an adhesion molecule containing cholesterol-dependent cytolysin-motif produced by mitis group streptococci. : Mitis 群レンサ球菌属の *Streptococcus pseudopneumoniae* (SPpn) の病原性は不明な点が多い。本研究ではリパーゼドメイン、2つのレクチンドメイン、そしてコレステロール依存性細胞溶解毒素の部分ドメインを保有して多機能が示唆される Mitilectin (MLC) と名付けた SPpn 由来分子について、組換えタンパク質を調製して機能を検証した。その結果、MLC 組換え体はリパーゼ活性及びレクチンドメインを介したヒト由来細胞への結合性を示したが、溶血性は示さなかった。また、MLC 産生株はヒト由来細胞への結合性を示したが、この結合性は MLC に体する抗血清存在下では減少し、さらに MLC コード遺伝子欠失株でも同様の結果が得られた。従って、MLC はヒト由来細胞への接着分子として機能し、MLC 産生株の潜在的な病原性に重要な役割を果たしていることが示唆された。

機能性化合物の開発

(1) Structure-associated Functional Control of TX-1877 Series by Glyco-conjugation. : 2-nitroimidazole 骨格を有する TX-1877 へ糖を付加し、放射線増感能を制御することを試みた。TX-1877 の水酸基へ、1) β -グルコース (TX-2141)、 β -ガラクトース (TX-2218)、 α -マンノース付加体 (TX-2217)、2) tetra-*O*-acetyl β -glucose (TX-2244)、tetra-*O*-acetyl β -galactose (TX-2245)、tetra-*O*-acetyl α -mannose 付加体 (TX-2246)、3) *N*-acetyl β -galactosamine (TX-2068)、tri-*O*-acetyl *N*-acetyl β -galactosamine 付加体 (TX-2243) を作成した。TX-2244 (ER=2.30) で高い効果を確認した。TX-2246 (ER=1.88) でも増感能の向上がみられた。単糖付加体の最安定構造の dGW 値 (-160kJ/mol ~ -180kJ/mol 近辺) と比較して、アセチル化体の dGW 値はより小さく、いずれも疎水性度の上昇がみられた。最安定構造の dGW 値が -250kJ/mol 近辺の TX-2244 および TX-2246 が良好な放射線増感能を示し、標的細胞との相互作用に適切な疎水性度の目処が付き、より効率的な分子設計を試行している。

(2) Correlation between radiosensitizing activity and the stereo-structure of the TX-2036 series of molecules. : 2-nitroimidazole 骨格に 1,3-cyclopentenedione もしくは trifluoromethyl 構造を付加し TX-2036 誘導体を作成した。これらは不斉炭素を有しエナンチオマーのペアを形成する。1,3-cyclopentenedione 付加体のうち S-体の TX-2044, TX-2031, TX-2037 で R-体の TX-2043, TX-2030, TX-2036 より高い放射線増感能を示した。Trifluoromethyl 付加体では R-体の TX-2045 が S-体の TX-2046 より高い増感能を示した。R-体の TX-2030 と S-体の TX-2031 を比較しても、配座 - エネルギー特性に差異はみとめられなかった。他の TX-2036 誘導体についても R-, S-体で配座のエネルギー順位に差異は確認できなかった。R-体の TX-2030、S-体の TX-2031 において配座依存的な疎水性度の変化はみとめられず、-220 ~ -195kJ/mol 程度で推移した。他の TX-2036 誘導体についても R-, S-体で立体疎水性度の特性に差異は確認できなかった。静電ポテンシャルフィールドをみると、TX-2030, -2031 ペア、TX-s2036, -2037 ペア、TX-2043, -2044 ペアのうち放射線増感能の弱い方には、1,3-cyclopentenedione 部位に極小マイナスフィールドが発生していた。1,3-cyclopentenedione 付加体について、放射線増感能が他の立体異性体ペアより低い化合物では極小フィールドが 2 個発生していた。

(3) Effect of isomerization of TX-2036 derivatives on the interaction with tyrosine kinase domain of EGF receptor. : Chiral-2-nitroimidazole 化合物である TX-2036 誘導体は立体異性ペアを有し、立体異性体 (R-, S-体) に依存した EGF 受容体 kinase ドメイン (EGFR-tyk) 阻害を示した。EGFR-tyk はリガンドが結合しうるポケットをその分子中央部に有することを構造解析から確認した。TX-2036 誘導体は、このリガンド結合部位へはまり込むことが相互作用シミュレーションで確認できた。また、EGFR-tyk へ配位する際のマイクロ環境は、R-, S-各誘導体において個々特徴的な様式を示した。EGFR-tyk 活性への効果を見ると、R-体 (TX-2043, -2030, -2036) は S-体 (TX-2044, -2031, -2037) と比べて高い EGFR-tyk 阻害を示した。なかでも TX-2036 は IC₅₀ = 1.8 μ M と強い阻害を示した。標的となるアミノ酸残基についてみると、R-誘導体では EGFR-tyk 分子の Lys⁷²¹ および Thr⁷⁶⁶ 残基との相互作用がみとめられた。一方、S-誘導体では相互作用するアミノ酸残基が個々の誘導体で異なっていた。すなわち、TX-2044 は Ile⁷⁶⁵, Thr⁷⁶⁶ と相互作用を示し、TX-2031 では Ser⁶⁹⁶, Thr⁷⁶⁶, Thr⁸³⁰ と相互作用がみられ、TX-2037 においては Gly⁷⁷², Cys⁷⁷³, Thr⁸³⁰ との相互作用が確認された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Matsumoto Airi, Tabata Atsushi, Ohkura Kazuto, Oda Hiroki, Kodama Chihiro, Ohkuni Hisashi, Takao Ayuko, Kikuchi Ken, Tomoyasu Toshifumi, Nagamune Hideaki	4. 巻 65
2. 論文標題 Molecular characteristics of an adhesion molecule containing cholesterol dependent cytolysin motif produced by mitis group streptococci	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 61 ~ 75
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1348-0421.12868	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 OHKURA KAZUTO, TABATA ATSUSHI, UTO YOSHIHIRO, HORI HITOSHI	4. 巻 40
2. 論文標題 Effect of Isomerization of TX-2036 Derivatives on the Interaction With Tyrosine Kinase Domain of EGF Receptor	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4675 ~ 4680
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.14466	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 OHKURA KAZUTO, TABATA ATSUSHI, UTO YOSHIHIRO, HORI HITOSHI	4. 巻 39
2. 論文標題 Correlation Between Radiosensitizing Activity and the Stereo-structure of the TX-2036 Series of Molecules	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4479 ~ 4483
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.13622	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tabata Atsushi, Yamada Takuya, Ohtani Hiromi, Ohkura Kazuto, Tomoyasu Toshifumi, Nagamune Hideaki	4. 巻 11
2. 論文標題 -Hemolytic Streptococcus anginosus subsp. anginosus causes streptolysin S-dependent cytotoxicity to human cell culture lines in vitro	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Oral Microbiology	6. 最初と最後の頁 1609839 ~ 1609839
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/20002297.2019.1609839	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 OHKURA KAZUTO、KAWAGUCHI YUKI、TATEMATSU YOHEI、TABATA ATSUSHI、UTO YOSHIHIRO、HORI HITOSHI	4. 巻 38
2. 論文標題 Structure-associated Functional Control of TX-1877 Series by Glyco-conjugation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 4241 ~ 4245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancerres.12720	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 松本愛理、田端厚之、大倉一人、児玉千紘、大國寿士、高尾亞由子、菊池賢、友安俊文、長宗秀明
2. 発表標題 ミチス群レンサ球菌が産生するコレステロール依存性細胞溶解毒素モチーフを持つ細胞接着分子の特性
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田端厚之、立松洋平、大倉一人
2. 発表標題 リアルタイム薬剤検出システムの構築試行：ミトコンドリア酸素消費速度を利用した担体からの薬剤放出特性の解析
3. 学会等名 第24回バイオ治療法研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田端厚之、宇都義浩、堀 均、大倉一人
2. 発表標題 Chiral-2-nitroimidazole骨格を足場としたTX-2036誘導体の特性：EGF受容体キナーゼドメインとの相互作用
3. 学会等名 第23回バイオ治療法研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山本篤司、服部奈々美、江口昂佑、田口裕基、刀根淳貴、大倉一人
2. 発表標題 脂肪酸結合タンパク質 (FABP) のアイソフォーム間における薬物結合能の比較
3. 学会等名 日本薬学会第139年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田端厚之、宇都義浩、堀 均、大倉一人
2. 発表標題 Chiral-2-nitroimidazole骨格を有するTX-2036誘導体の開発：放射線増感能の修飾に関わる分子特性の検証
3. 学会等名 第22回バイオ治療法研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 西平有里菜、田端厚之、友安俊文、大倉一人、長宗秀明
2. 発表標題 薬剤キャリアのミセルが示す癌細胞障害性
3. 学会等名 第22回バイオ治療法研究会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	田端 厚之 (TABATA Atsushi) (10432767)	徳島大学・大学院社会産業理工学研究部(生物資源産業学 域)・講師 (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------