

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390463
 研究課題名（和文） A 群レンサ球菌に対する補体および好中球免疫機構と
 その回避に寄与する細菌因子の同定
 研究課題名（英文） Group A streptococcal proteases degrade human complements
 and contribute to evasion of innate immunity.
 研究代表者
 寺尾 豊 (TERAO YUTAKA)
 大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
 研究者番号：50397717

研究成果の概要：

A 群レンサ球菌は、劇症型等の侵襲性疾患を引き起こすことが知られている。劇症型患者の感染組織では、好中球の浸潤ならびに食食能が極度に低下し、A 群レンサ球菌の活発な増殖が認められる。そこで、好中球の食食と遊走に主要な役割を演じる補体 C3b および C5a が、A 群レンサ球菌に分解を受けるのではないかと仮説を立てて研究を推進した。その結果、A 群レンサ球菌の SpeB は C3b を分解し、ScpA は GAPDH と協調して C5a を分解することで免疫回避を行い、その後組織内増殖を可能にしていることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	10,900,000	3,270,000	14,170,000
2008 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔細菌学・レンサ球菌

1. 研究開始当初の背景

A 群レンサ球菌はヒトの咽頭炎や扁桃炎の起原菌として知られるが、近年、劇症型 A 群レンサ球菌感染症 (STSS) を引き起こすことで注目を集めている。同感染症は、30%を超える死亡率が報告されており、その発症機構の解明と病因論に基づいた有効な治療法の確立が望まれている。申請者らは、感染成立の第一段階に必須と考えられる A 群レンサ球菌の宿主細胞への付着・侵入機構について研究を

進めてきた。これまでに、侵襲性の強い患者から多く分離される血清型 M1 型菌および M3 型菌から、それぞれ新規タンパク FbaA, FbaB を同定し機能を明らかにした (Terao *et al.*, *Mol Microbiol*, **42**:75-86, 2001, *J Biol Chem*, **277**:47428-47435, 2002, *J Infect Dis*, **192**:2081-2091, 2005)。両タンパクは、共に菌体表層に局在するフィブロネクチン結合タンパクであり、当時いち早くゲノムデータベースを利用し、モチーフ検

素による *in silico* 法で選出した。同タンパクをコードする遺伝子配列から作製した組換えタンパクがフィブロネクチンと強固に結合することを示し、併せて、この遺伝子欠失株の咽頭上皮細胞株への付着侵入能およびマウス致死性が有意に低下することを報告した。

しかしながら、組織内に侵入した A 群レンサ球菌が全て重篤な感染症を引き起こす訳ではなく、STSS 等の発症には更なる病原因子の関連が考えられていた。STSS 患者から分離された菌株は、抗オプソニン化作用等が高いことが示唆され、劇症型の菌株は宿主免疫機構から逃れる機構を備えている可能性が考えられていた。

2. 研究の目的

申請者は図 1 に示す様な段階別の病態発症機序を推定した。申請研究では、この推定機序の第二段階目の A 群レンサ球菌が初期免疫システムから逃れる機構—特に補体免疫および好中球による貪食からの回避—に関与する新規病原因子の検索を行うことを目的とした。

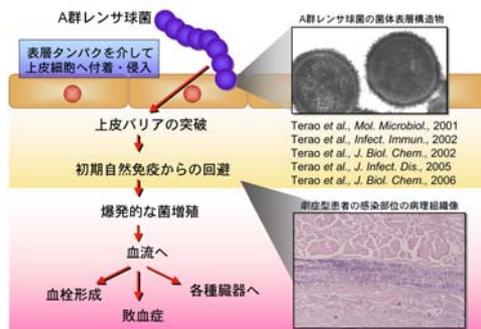


図1 A群レンサ球菌の深部組織感染に至る推定感染機序

感染初期においては、好中球が感染菌に遊走し速やかに感染細菌の排除を行い、感染の拡大を未然に防いでいる。この際、好中球の遊走因子として働く分子が補体成分 C5a であるが、A 群レンサ球菌の菌体表層には、C5a を分解する C5a ペプチダーゼが存在する。申請者らは C5a ペプチダーゼ自身が C5a 結合能を有さないという知見と C5a 結合能を有する新規タンパクが A 群レンサ球菌の表層に発現している所見を得ていた。また、遊走して来た好中球による効率的な感染細菌の排除のためには、補体成分 C3b によるオプソニン化が必須であるが、STSS 患者の感染部位血清からは、C3b が分解され検出されないことを明らかにしていた。申請研究においては、この C5a 結合タンパクが、C5a ペプチダーゼによる C5a 分解に及ぼす影響と C5a によって活性化される食細胞の遊走活性に及ぼす影響を検索するこ

ととした。併せて、感染微生物のオプソニンで主要な役割を果たす C3b を分解する A 群レンサ球菌の分子を同定し、組織内に侵入した菌体の補体免疫回避と感染拡大に及ぼす影響についてマウス感染実験を用いて *in vitro* のレベルで明らかにすることを目的とした。また、C3b 分解分子を阻害する化学物質を検索し、同化学物質や特異抗体の投与による STSS 抑制効果についても検討を加えることにした。

3. 研究の方法

(1) A 群レンサ球菌の臨床分離菌株の収集 (担当：川端)

現在、当研究室において保有している A 群レンサ球菌菌株に加えて、日米欧等の各地域から咽頭炎や侵襲性 A 群レンサ球菌感染症などの様々な病態由来の菌株を収集した。次に、現有設備である DNA シークエンサーを用いて、各菌株の *emm* 遺伝子の可変領域の塩基配列を決定し、その遺伝子型別を行い病状との関連を検索した。

(2) A 群レンサ球菌菌体表層タンパク画分における補体 C5a 結合タンパクの検索 (担当：寺尾・中田)

種々の *emm* 遺伝子型の臨床株から、8 M 尿素溶液を用いて菌体表層タンパク画分を抽出した。これらを現有機器である二次元電気泳動装置を用いて展開後、ビオチン標識した補体 C5a と結合するタンパクスポットをリガンドプロット法で検出した。検出スポットに該当するゲル上の A 群レンサ球菌菌体表層タンパクを、現有設備である多目的スキャナーで選択後、質量分析装置にて解析し、該当する遺伝子をゲノムデータベースから選出した。

(3) A 群レンサ球菌の C5a 結合タンパクの組換え体、抗血清、および欠失変異株の作製 (担当：寺尾)

上記(2)で同定された、C5a 結合タンパクの遺伝子配列を基に、組換え体ならびに当該遺伝子欠失変異株を作製した。グラム陽性菌である A 群レンサ球菌の組換えタンパクは、グラム陰性菌である大腸菌で発現、精製することは困難であることが知られている。そこで本研究では、種々の宿主や発現ベクターを組み合わせ、A 群レンサ球菌組換えタンパク調整方法の最適化を試みる。そのために、無細胞組換え体発現システム、およびグラム陽性菌発現宿主 *Bacillus subtilis* 発現系、酵母発現系を用いた。さらに、得られた組換え体をウサ

ぎに免疫して、特異的抗血清を調整した。

(4) C5a結合タンパクの分子生物学的解析
(担当：寺尾・中田)

種々の領域に対応する組換え C5a 結合タンパク断片を構築し、C5a 結合領域を検索した。ついで、抗 C5aBP 抗体と共焦点蛍光レーザー顕微鏡およびウェスタンブロット法を用いて、C5a 結合タンパクの菌体における局在を検討した。さらに、C5a 結合タンパク添加による、C5a 依存性の好中球遊走能および H₂O₂ 産生能に及ぼす影響を、走化性チェンバーを用いて解析した。また、A 群レンサ球菌菌体表層における C5a 分解に関与する分子を C5a 結合タンパクおよび C5a ペプチダーゼに特異的な抗血清を用いた阻害実験で解析した。

(5) 補体 C3b 分解酵素の検索 (担当：寺尾・川端・中田)

上記(1)で収集した各菌株の培養上清と C3b 標品を 37° C で 1 時間反応させた後、SDS-PAGE 電気泳動で展開し、C3b タンパク質バンドの変化から分解活性を測定した。C3b 分解活性の高い血清型の A 群レンサ球菌ゲノムデータベースから、グラム陽性菌の推定シグナル配列を有するタンパクを抽出した。併せて相同性検索を行い、各種プロテアーゼの機能ドメインを保有するタンパクを選出した。

4. 研究成果

A 群レンサ球菌の菌体表層には、C5a を分解するセリンプロテアーゼ ScpA が存在する。しかしながら、ScpA には C5a を結合する機能が認められなかった。そこで、A 群レンサ球菌表層で C5a を認識し、結合する分子を検索した。その結果、C5a と結合するグリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) が同定された。GAPDH は、解糖系を構成する細胞質内の酵素であるが、A 群レンサ球菌の場合は菌体表層にも露出していることが示されている。本申請研究で、ScpA と GAPDH の両分子は相互に作用することで、効率的に C5a 分解し好中球の遊走を阻害することが明らかとなった。また、A 群レンサ球菌を液体培地中で培養すると、その培養上清からも GAPDH が検出される。液相条件下で C5a と GAPDH を混合すると、両者の複合体形成が観察された。さらに、GAPDH を好中球の浮遊液に添加すると、C5a 存在下であっても遊走活性が低下した。これらの知見から、A 群レンサ球菌の GAPDH は菌体周囲の

C5a に結合して不活化することが示唆された。

C5a の他にも、補体成分で感染微生物の排除に必要な役割を果たす分子が存在する。通常、組織に侵入した感染微生物は、補体成分 C3b によってオプソニン化され、C5a の作用で走化した好中球あるいはマクロファージに貪食される。しかしながら、劇症型 A 群レンサ球菌感染症患者の感染部位より採取した血液からは、正常な分子量の C3b が検出されず、分解を受け分子量の低下したような C3b 断片のみがウェスタンブロットで認められた。そこで、A 群レンサ球菌の産生する各種プロテアーゼと C3b を順に反応させたところ、分泌型プロテアーゼ SpeB のみが C3b を分解し、好中球の A 群レンサ球菌貪食作用を低下させることを見出した。以上の知見から A 群レンサ球菌は、好中球遊走因子を分解し、あるいはオプソニン過程を阻害する複数の経路で感染局所における自然免疫系を阻止することが示唆された。

本研究の結果、A 群レンサ球菌の補体免疫ならびに好中球免疫からの回避機構の一端が明らかになった。これらの知見は、多くの微生物の免疫回避に関する研究の推進に寄与すると思われる。薬剤耐性菌の問題が脚光を浴びる現状において、病原細菌の感染機構を明らかにする基礎研究は、長期的な感染症治療の基盤にもなると考えられる。

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 20 件)

英文学術雑誌 (1-11 は全て査読有り)

1. Terao, Y., R. Isoda, J. Murakami, S. Hamada and S. Kawabata.: *Oral Microbiol. Immunol., in press.*
2. Nakata, M., T. Köller, K. Moritz, D. Ribardo, L. Jonas, K. S. McIver, T. Sumitomo, Y. Terao, S. Kawabata, A. Podbielski and B. Kreikemeyer. (2009): *Infect. Immun., 77*: 32-44.
3. Yamaguchi, M., Y. Terao, Y. Mori, S. Hamada and S. Kawabata. (2008): *J. Biol. Chem., 283*: 36272-36279.
4. Terao, Y., Y. Mori, M. Yamaguchi, Y. Shimizu, K. Ooe, S. Hamada and S. Kawabata. (2008): *J. Biol. Chem., 283*: 6253-6260.
5. Kunitomo, E., Y. Terao, S. Okamoto, T. Rikimaru, S. Hamada and S. Kawabata.

- (2008): *Microbes Infect.*, **10**:414-423.
6. Okamoto, S., Y. Terao, Y. Tamura, S. Hamada and S. Kawabata. (2008): *FEMS Microbiol. Lett.*, **281**: 73-80.
 7. Okamoto, S., Y. Terao, K. Hasuike, S. Hamada and S. Kawabata. (2008): *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **377**: 1128-1134.
 8. Itsuki, Y., M. Saeki, H. Nakahara, H. Egusa, Y. Irie, Y. Terao, S. Kawabata, H. Yatani and H. Kamisaki. (2008): *FEBS Lett.*, **582**: 2365-2370.
 9. Okamoto, S., Y. Terao, H. Kaminishi, S. Hamada and S. Kawabata. (2007): *J. Dent. Res.*, **86**: 242-248.
 10. Saeki, M., Y. Irie, L. Ni, Y. Itsuki, Y. Terao, S. Kawabata and Y. Kamisaki. (2007): *J. Biol. Chem.*, **282**: 11786-11794.
 11. Kreikemeyer, B., M. Nakata, T. Köller, H. Hildisch, V. Kourakos, K. Standar, S. Kawabata, M. O. Glocker and A. Podbielski. (2007): *Infect Immun.*, **75**: 5698-5710.

日本語総説 (12~20 は全て査読無し)

12. 川端重忠, 寺尾 豊, 中田匡宣 (2008). 感染・炎症・免疫, 医学の門社, 38 (1): 2-13.
13. 寺尾 豊, 川端重忠 (2007). 実験医学増刊号, 羊土社, 25:55-60.
14. 寺尾 豊 (2007). 臨床医薬研究協会, 7:18-20.
15. 川端重忠 (2007). 大阪大学歯学雑誌 51: 33-35.
16. 浜田茂幸, 川端重忠, 藤原卓 (2007). 感染・炎症・免疫, 37: 39-51.
17. 川端重忠, 寺尾 豊 (2007). BIO Clinica, 北隆館, 22:39-44. 査読無.
18. 中田匡宣, 寺尾 豊, 川端重忠 (2007). 炎症と疾患, 先端医学社, 15:45-50.
19. 住友倫子, 川端重忠 (2007). 化学療法の領域, 医療ジャーナル社, 23:1741-1747.
20. 川端重忠, 山口雅也 (2007). 医学のあゆみ, 医歯薬出版, 223 (8): 601-605.

[学会発表] (計 36 件)

1. Terao, Y., Y. Mori, M. Yamaguchi, S. Hamada, and S. Kawabata. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity. 7-11 September, 2008, Higashiura, Hyogo, Japan.
2. Yamaguchi, M., Y. Terao, Y. Mori, S. Hamada, and S. Kawabata. The International Union of Microbiological

- Societies 2008. 5-9 August, 2008, Istanbul, Turkey.
3. Terao, Y., Y. Mori, M. Yamaguchi, S. Hamada, and S. Kawabata. 108th General Meeting of American Society for Microbiology. 1-5 June, 2008, Boston, USA.
 4. Yamaguchi, M., Y. Terao, Y. Mori, S. Hamada, and S. Kawabata. The 107th General Meeting of American Society for Microbiology. 21-25 May, 2007, Toronto, Canada.
 5. Nakata, M., D. A. Ribardo, K. S. McIver, S. Kawabata, A. Podbielski, and B. Kreikemeyer. The 107th General Meeting of American Society for Microbiology. 21-25 May, 2007, Toronto, Canada.
- その他 31 件.

[図書] (計 2 件)

1. 寺尾 豊, 川端重忠. 蛋白質核酸酵素増刊号, 共立出版, P982-987. (2009) .
2. 寺尾 豊, 住友倫子, 中田匡宣, 磯田竜太郎, 川端重忠. 生命歯科医学のカッティング・エッジ (米田俊之編). 大阪大学出版会. p. 68-78. (2008).

○ホームページ

<http://www.dent.osaka-u.ac.jp/~mcrbio/kenkyuuterao1.html>

○研究代表者の学会賞受賞 (計 7 件)

日本細菌学会 黒屋奨学賞,
歯科基礎医学会 歯科基礎医学会賞,
日本感染症学会 北里柴三郎学術奨励賞,
その他 4 件

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺尾 豊 (TERAO YUTAKA)

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号: 50397717

(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・助教

研究者番号: 90444497