

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20390465

研究課題名（和文）ヒト病原性レンサ球菌が産生する付着・定着因子群の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of adhesins and colonization factors produced by human pathogenic streptococci

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

*Streptococcus pyogenes* は感染部位において上皮細胞へ特異的に付着し、定着する。この過程において線毛は重要な役割を果たすと考えられる。本研究では、線毛形成に不可欠である因子を同定し、線毛の発現様式と組立て機構を明らかにした。線毛の付着・定着因子としての機能を検討した結果、線毛の型別により多様性が認められた。このことから、線毛は *S. pyogenes* の組織指向性と病態の多様性に寄与すると推察された。

研究成果の概要（英文）：

The human pathogen *Streptococcus pyogenes* produces diverse pili depending on the serotype. In a serotype M49 *S. pyogenes* strain, we demonstrate that FctA is the pilus backbone protein, and FctB and Cpa, a collagen-binding adhesin, are ancillary proteins. We also found that both Cpa and FctA are trypsin-resistant T antigens. Mutagenesis assays and eukaryotic cell adherence tests revealed that FctB and housekeeping sortase SrtA contribute to the cell wall anchoring of pili, whereas Cpa functions as a pilus adhesin to human keratinocytes. Sortase C2 and putative signal peptidase LepA enzymes were crucial for polymerization of FctA. The pilus expression increased with lower temperature. The ability to form biofilms was not affected by the mutation of the pilus genes. In contrast to the M49 pili, pili of a serotype M6 *S. pyogenes* strain were found to be assembled from two proteins, i.e. the backbone protein T6 and ancillary protein FctX, in a manner that requires both SrtA and pilus-associated sortase SrtB. We found that T6 pili contribute to biofilm formation, but not to adherence to human keratinocytes under the condition used in this study. These data suggest the serotype-dependent pilus assembly mechanism and contribution of *S. pyogenes* pili to the tissue tropism.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2009 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2010 年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

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：レンサ球菌，線毛，付着因子，定着因子，組織指向性

## 1. 研究開始当初の背景

*S. pyogenes* はヒトを唯一の宿主とし、主に皮膚や咽頭において化膿性炎症を惹起する。*S. pyogenes* は血清型特異的に様々な表層タンパクや分泌タンパクを産生し、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。菌体表層タンパクとして、*S. pyogenes* が線毛様構造物を産生することが発見されていたが、線毛の詳細な生物学的機能や発現・組立て様式は不明であった。

*S. pyogenes* 線毛の生物学的・臨床的に重要な点として、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。*S. pyogenes* の血清型タイピングの第一選択である 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。しかし、多くの菌株において T 抗原性を担うタンパクは完全には解明されておらず、線毛副構成タンパクが T 抗原性に関与する可能性が推察されていた。

## 2. 研究の目的

*S. pyogenes* 感染による病態発症の機構は完全には解明されておらず、特に発展途上国において有効な予防法と治療法の確立が待たれている。病態が認められる解剖学的部位の多様性は、*S. pyogenes* が産生する病原因子群、*S. pyogenes* のヒト組織への指向性や宿主因子等に起因すると考えられる。*S. pyogenes* の線毛は多様性に富み、ヒト組織への指向性に関与することが推察されたため、線毛の発現・組立て機構や機能の解明を本研究の目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 使用菌株

M49 型皮膚臨床株と扁桃炎由来 M6 型株を用いて後述の解析を行った。

### (2) 線毛の構造と組立て機構の解析

線毛タンパクの複合体形成を免疫沈降法とウェスタンブロット解析により検討した。線毛の構造を検討するため、全菌体を用いて、線毛構成タンパクを異なる粒子径の金コロイドでそれぞれ標識し、透過型電子顕微鏡により観察した。

線毛タンパクの組換え体を作製し、マウスとウサギへ免疫することにより、特異的抗血清を調製した。線毛形成に関与すると考えられる因子の遺伝子欠失株と変異体発現株を作製し、各変異株における線毛発現をウェスタンブロット解析、フローサイトメトリー解析により検討した。ウェスタンブロット解析に関しては、菌体表層画分および培養上清画分のそれぞれについて行った。

### (3) T 抗原の検索

線毛副構成タンパクがトリプシン耐性タンパクであるかを検討するため、トリプシン処理を行った全菌体と抗線毛タンパク抗血清を用いてフローサイトメトリー解析を行った。また、線毛タンパク組換え体と T 血清型別用の抗血清を用いたリガンドブロット法により T 抗原の検索を行った。

### (4) 温度感受性線毛発現機構の解析

ルシフェラーゼ遺伝子を線毛遺伝子群の下流に組み込み、ルシフェラーゼ活性を指標に、培養温度の変化と線毛遺伝子転写量の相関が認められるかを検討した。また、全 RNA を用いた Northern blot 解析とリアルタイム PCR 解析により線毛遺伝子の転写を検討した。さらに、細胞壁画分における線毛の発現をウェスタンブロット解析により検討した。

### (5) 上皮細胞への付着試験

ヒト皮膚角化上皮細胞株である HaCaT 細胞を用いて、各線毛遺伝子欠失株について付着試験を行い、線毛が付着因子として機能するかを検討した。また、細胞外マトリックスタンパクを介した付着であるかを確認するために、ウシ胎児血清非存在下で同様の解析を行った。さらに、蛍光マイクロビーズへ線毛構成タンパク組換え体をコーティングし、その上皮細胞への付着能を検討した。

#### (6) バイオフィーム形成能の解析

一晚培養菌液を 10 倍希釈し、96 穴ポリスチレンプレートに播種した。24 時間の培養によりバイオフィームを形成させ、PBS で 3 回洗浄した後、クリスタルバイオレットで染色した。PBS で 3 回洗浄後、SDS 溶液で懸濁し、その吸光度を測定した。

### 4. 研究成果

#### (1) M49 型株の線毛

免疫沈降法を用いた解析から線毛は Cpa, FctA, および FctB から構成されることが示唆された。線毛形成に関与する因子を検索した結果、トランスペプチダーゼである SrtC2 およびシグナルペプチダーゼ I のホモログである LepA が線毛形成に不可欠であり、線毛の細胞壁への架橋には FctB と SrtA が関与することが明らかになった。免疫電顕法による観察から、FctA が線毛主要構成タンパクであり、Cpa および FctB は副構成タンパクであることが示唆された。また、FctA および Cpa がトリプシン耐性タンパクであり T 抗原性を担うことが明らかとなった。線毛の産生を促す環境因子を検索した結果、低温培養時に線毛産生能は上昇した。転写因子である Nra の欠失株では、低温培養時においても線毛の発現が認められなかったことから、Nra が線毛遺伝子の発現に対する正の調節因子として機能することが示唆された。さらに、M49 型株が産生する線毛はバイオフィーム形成には関与せず、皮膚角化上皮細胞への付着因子として機能することが示唆された。この付着は細胞外マトリックスタンパクを介さず、Cpa が角化上皮細胞へ直接結合することによると推察された。

#### (2) M6 型株の線毛

M6 型株が産生する線毛は T6 と FctX から構成され、SrtA と SrtB が線毛の組立てと細胞壁への架橋に必要であった。T6 は線毛のシャフトを形成し、FctX は副構成タンパクであることを明らかにした。また、両線毛タンパクが T 抗原性を有することが明らかになった。

M49 型株の線毛とは異なり、温度感受性の線毛発現は認められず、培養皮膚角化上皮細胞への付着には関与しないことが示唆された。線毛の欠失によりバイオフィーム形成能は低下したことから、M6 型株が産生する線毛はバイオフィーム形成に関与することが明らかになった。

線毛の発現・組み立て様式と機能には多様性が認められた。線毛が組織特異的な付着因子として機能し、菌体の定着を促す可能性が強く示唆された。これらの研究成果はレンサ球菌の組織指向性や病態多様性の解明への一助となる可能性が考えられる。併せて、国内外における将来のワクチン開発や臨床現場における診断薬開発の基盤となることが期待出来る。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Ogawa T, Terao Y, Okuni H, Ninomiya K, Sakata H, Ikebe K, Maeda Y, Kawabata S. 2011. Biofilm formation or internalization into epithelial cells enable *Streptococcus pyogenes* to evade antibiotic eradication in patients with pharyngitis. *Microb Pathog* 51(1-2):58-68. 査読有.
- ② Ogawa T, Terao Y, Sakata H, Ohkuni H, Ninomiya K, Ikebe K, Maeda Y, and Kawabata S. 2011. Epidemiological characterization of *Streptococcus pyogenes* isolated from patients with multiple onsets of pharyngitis. *FEMS Microb Lett* 318(2):143-151. 査読有.
- ③ Okahashi N, Nakata M, Terao Y, Isoda R, Sakurai A, Sumitomo T, Yamaguchi M, Kimura RK, Oiki E, Kawabata S, and Ooshima T. 2011. Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to salivary amylase and promote the biofilm formation. *Microb Pathog* 50(3-4): 148-154. 査読有.
- ④ Sumitomo T, Nakata M, Higashino M, Jin Y, Terao Y, Fujinaga Y, Kawabata S. 2011. Streptolysin S contributes to group A streptococcal translocation across an epithelial barrier. *J Biol Chem* 286(4): 2750-2761. 査読有.
- ⑤ Okahashi N, Nakata M, Sakurai A, Terao Y, Hoshino T, Yamaguchi M, Isoda R, Sumitomo T, Nakano K, Kawabata S, and Ooshima T. 2010. Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to fibronectin and contribute to cell adhesion. *Biochem Biophys Res Commun* 391(2):

1192-1196. 査読有.

⑥ Terao Y, Isoda R, Murakami J, Hamada S, and Kawabata S. 2009. Molecular and biological characterization of *gtf* regulation-associated genes in *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 24(3): 211-217. 査読有.

⑦ Nakata M, Köller T, Moritz K, Ribardo D, Jonas L, McIver KS, Sumitomo T, Terao Y, Kawabata S, Podbielski A, and Kreikemeyer B. 2009. Mode of expression and functional characterization of FCT-3 pilus region encoded proteins in the *Streptococcus pyogenes* serotype M49. *Infect Immun* 77(1): 32-44. 査読有.

⑧ Okamoto S, Terao Y, Hasuike K, Hamada S, and Kawabata S. 2008. A novel streptococcal leucine zipper protein (Lzp) binds to human immunoglobulins. *Biochem Biophys Res Commun* 377 (4): 1128-1134. 査読有.

⑨ Yamaguchi M, Terao Y, Mori Y, Hamada S, and Kawabata S. 2008. PfbA, a novel plasmin- and fibronectin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae*, contributes to fibronectin-dependent adhesion and antiphagocytosis. *J Biol Chem* 283(52): 36272-36279. 査読有.

⑩ Kunitomo E, Terao Y, Okamoto S, Rikimaru T, Hamada S, and Kawabata S. 2008. Molecular and biological characterization of histidine triad protein in group A streptococci. *Microbes Infect* 10(4): 414-423. 査読有.

⑪ Terao Y, Mori Y, Yamaguchi M, Shimizu Y, Ooe K, Hamada S, and Kawabata S. 2008. Group A streptococcal cysteine protease degrades C3 (C3b) and contributes to evasion of innate immunity. *J Biol Chem* 283(10): 6253-6260. 査読有.

[学会発表] (計 47 件)

① 木村敬次リチャード, 中田匡宣, 住友倫子, 寺尾豊, 磯田竜太郎, 川端重忠. M6 型 A 群レンサ球菌が産生する線毛の形成機構と機能の解析. 第 63 回日本細菌学会関西支部総会. 2010 年 11 月 20 日, 関西医科大学.

② 寺尾豊, 川端重忠. 病態観察とゲノム情報から展開する A 群レンサ球菌の分子解析. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会. 2010 年 9 月 20~22 日, タワーホール船堀.

③ Sumitomo T, Nakata M, Terao Y, and Kawabata S. Streptolysin S contributes to group A streptococcal paracellular translocation across epithelial cells. The 10th Awaji International Forum on Infection and Immunity. September 7-10, 2010. Awaji, Hyogo, Japan.

④ Ogawa T, Terao Y, Ohkuni H, Ninomiya K, Sakata H, Ikebe K, Maeda Y, and Kawabata S. Characterization of *Streptococcus pyogenes* isolated from patients with recurrent pharyngitis. 88th General Session & Exhibition of the

International Association for Dental Research. July 14-17, 2010. Barcelona, Spain.

⑤ Yamaguchi M, Terao Y, Nishino K, Yamaguchi A, Hamada S, and Kawabata S. *Streptococcus pneumoniae* evades neutrophil phagocytosis through its surface protein PfbA. 110th General Meeting of American Society for Microbiology. May 23-27, 2010. San Diego, USA.

⑥ 住友倫子, 中田匡宣, 寺尾豊, 川端重忠. Streptolysin S contributes to group A streptococcal paracellular translocation across epithelial cells. 第 62 回日本細胞生物学会大会. 2010 年 5 月 19~21 日, 大阪国際会議場.

⑦ 岡橋暢夫, 中田匡宣, 桜井敦朗, 寺尾豊, 山口雅也, 星野倫範, 川端重忠, 大嶋隆. 口腔レンサ球菌 *S. sanguinis* 線毛 pili の機能. 第 83 回日本細菌学会総会. 2010 年 3 月 27~29 日, パシフィコ横浜.

⑧ 東野美晴, 住友倫子, 中田匡宣, 寺尾豊, 川端重忠. 宿主細胞間接着分子の破壊に関与する A 群レンサ球菌プロテアーゼの検索. 第 83 回日本細菌学会総会. 2010 年 3 月 27~29 日, パシフィコ横浜.

⑨ 住友倫子, 中田匡宣, 東野美晴, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌の上皮バリア突破機構に関与する宿主プロテアーゼの解析. 第 83 回日本細菌学会総会. 2010 年 3 月 27~29 日, パシフィコ横浜.

⑩ 中田匡宣, 住友倫子, 磯田竜太郎, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌が産生する線毛の細胞壁架橋機構の解析. 第 83 回日本細菌学会総会. 2010 年 3 月 27~29 日, パシフィコ横浜.

⑪ 寺尾豊, 浜田茂幸, 川端重忠. *Streptococcus pyogenes* の補体 C6 結合タンパクの同定と機能解析. 第 83 回日本細菌学会総会. 2010 年 3 月 27~29 日, パシフィコ横浜.

⑫ 住友倫子, 中田匡宣, 東野美晴, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌の上皮バリア突破機構に関与する宿主プロテアーゼの検索. 第 8 回感染症沖縄フォーラム. 2010 年 2 月 12 日. 沖縄国民年金健康センター.

⑬ 住友倫子, 川端重忠. カルボシステインによるヒト肺胞上皮細胞への肺炎レンサ球菌の付着抑制効果. 第 52 回日本感染症学会中日本地方会. 2009 年 11 月 26~28 日, 名古屋国際会議場.

⑭ 川端重忠. 肺炎球菌表層タンパク質 PfbA の機能解析. 第 82 回日本生化学会大会. 2009 年 10 月 23 日, 神戸ポートアイランド.

⑮ 中田匡宣, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌が産生する線毛の発現機構の解析. 第 51 回歯科基礎医学会学術大会. 2009 年 9 月 9~11 日, 朱鷺メッセ, 新潟市.

⑯ Yamaguchi M, Terao Y, Hamada S, and Kawabata S. Role of *Streptococcus pneumoniae*

PfbA in adhesion to human epithelial cells and resistance to neutrophil phagocytosis. The 9th Awaji International Forum on Infection and Immunity. September 8-11, 2009. Awaji, Hyogo, Japan.

⑰ Sumitomo T, Nakata M, Terao Y, and Kawabata S. Group A Streptococci translocates across epithelial barrier via intercellular junction cleavage. 109th General Meeting of American Society for Microbiology. May 17-21, 2009. Philadelphia, USA.

⑱ 山口雅也, 南出由希, 小川泰治, 森有可, 寺尾豊, 浜田茂幸, 川端重忠. *Streptococcus pneumoniae* に対する感染防御抗原の検索. 第 82 回日本細菌学会総会. 2009 年 3 月 12~14 日, 名古屋国際会議場.

⑲ 住友倫子, 中田匡宣, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌の上皮バリア突破機構に関する解析. 第 82 回日本細菌学会総会. 2009 年 3 月 12~14 日, 名古屋国際会議場.

⑳ 中田匡宣, 住友倫子, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌線毛の温度感受性発現機構の解析. 第 82 回日本細菌学会総会. 2009 年 3 月 12~14 日, 名古屋国際会議場.

㉑ 住友倫子, 中田匡宣, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌の上皮バリア突破機構に関する解析. 第 7 回感染症沖縄フォーラム. 2009 年 2 月 12 日. 沖縄県青年会館.

㉒ 中田匡宣, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌が産生する線毛の機能解析. 第 50 回歯科基礎医学会学術大会. 2008 年 9 月 23 日~25 日, TOC 有明コンベンションホール, 東京都.

㉓ Yamaguchi M, Terao Y, Mori Y, Hamada S, and Kawabata S. Impact of novel multi-functional protein PfbA on adherence, invasion, and anti-phagocytosis by *Streptococcus pneumoniae*. The International Union of Microbiological Societies 2008. August 5-9, 2008. Istanbul, Turkey.

㉔ 住友倫子, 中田匡宣, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌の上皮バリア突破機構に関する解析. 第 17 回 Lancefield レンサ球菌研究会. 2008 年 7 月 25~26 日, 徳島大学.

㉕ Nakata M, Fiedler T, Köller T, Stander K, Kawabata S, Podbielski A, and Kreikemeyer B. The *Nra-Ralp3* transcriptional regulatory network of *Streptococcus pyogenes* serotype M49: control of the novel ERES pathogenicity region. 17th Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. June 22-26, 2008. Porto Heli, Greece.

㉖ Nakata M, Köller T, McIver KS, Kawabata S, Podbielski A, and Kreikemeyer B. Role of the *Streptococcus pyogenes* serotype M49 FCT-3 region encoded pilus in virulence. 17th Lancefield International Symposium on

Streptococci and Streptococcal Diseases. June 22-26, 2008. Porto Heli, Greece.

〔図書〕 (計 5 件)

① 岡本成史, 川端重忠, 先端医学社, 炎症と免疫, 18 (6), A 群レンサ球菌-インフルエンザウイルスとの複合感染による重症化-, (2010), 93-96 項.

② 川端重忠, 医歯薬出版, 口腔微生物学・免疫学 第 3 版, グラム陽性球菌と感染症, (2010), 98-102 項.

③ 寺尾豊, 川端重忠, 共立出版, 蛋白質核酸酵素 2009 年 6 月増刊号, 54 (8), 感染現象 その理解の深化から疾患制御への展望, A 群連鎖球菌のサバイバル・ストラテジー, (2009), 982-987 項.

④ 寺尾豊, 住友倫子, 中田匡宣, 磯田竜太郎, 川端重忠, 大阪大学出版会, 生命歯科医学のカットニング・エッジ, 病原性レンサ球菌の病原因子の機能解析, (2008), 68-78 項.

⑤ 川端重忠, 寺尾豊, 中田匡宣, 医薬の門社, 感染・炎症・免疫, 38 (1), A 群レンサ球菌の病原性発現に関する分子機構, (2008), 2-13 項.

〔その他〕

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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

### (2) 研究分担者

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

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

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