

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890135

研究課題名（和文）肺炎球菌と好中球の相互作用の解明

研究課題名（英文）/The analysis of the interaction between *Streptococcus pneumoniae* and human neutrophil.

研究代表者

森 有可 (MORI YUKA)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：90527227

研究成果の概要（和文）：肺炎球菌は、肺炎や中耳炎、敗血症を引き起こす临床上重要な細菌であると考えられている。肺炎球菌による肺炎では、肺胞に好中球が顕著に浸潤するにも関わらず、肺炎球菌の周囲組織への移行が認められる。本研究では、肺炎球菌が自然免疫に及ぼす影響を解明するため、好中球と親和性の高い肺炎球菌由来の分子を検索し、機能解析を行った。その結果、肺炎球菌の菌体表層タンパク Enolase が同定された。さらに、肺炎球菌の Enolase が新規の Neutrophil Extracellular Traps 誘導分子であることが示された。

研究成果の概要（英文）：*Streptococcus pneumoniae* is the common causative agent of community acquired pneumonia, otitis media, and sepsis. A major feature of pneumococcal pneumonia is an abundant neutrophil infiltration. Here, we identified *S. pneumoniae* Enolase as a neutrophil binding protein using ligand blot assay and mass spectrometry. Scanning electron microscopic and fluorescence microscopic analysis revealed *S. pneumoniae* Enolase induced the formation of neutrophil extracellular traps which was reported to bind and kill microbes extracellularly.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：*Streptococcus pneumoniae*, 肺炎球菌, 自然免疫, 好中球, 菌体表層タンパク質, Enolase, 遊走活性, Neutrophil extracellular traps

1. 研究開始当初の背景  
肺炎球菌は小児の口腔の 10~30% から分離され、口腔常在菌としての報告がある一方で、

小児科領域感染症の起炎菌としても重要な細菌である。肺炎球菌は肺炎だけでなく、髄膜炎、菌血症などの侵襲性感染症の原因とな

ることが知られている。また、急性化膿性中耳炎、および同疾患から発展する重篤な感染症の起炎菌ともなっている。WHO による報告によると、世界では毎年 160 万人以上が肺炎球菌感染症により死亡しており、その 6 割を発展途上国の 5 歳以下の小児が占める。わが国においても肺炎は疾患別死亡原因の第 4 位を占めている。初期の肺炎の治療法として抗生物質が有効であるが、様々な薬剤に対して耐性を示す菌株が世界中で増加傾向にある。そのため、肺炎球菌による感染症の発症機構を解析し、化学療法剤に頼らない予防法・治療法を確立することが望まれている。

肺炎球菌性肺炎において、肺組織に著しい好中球の浸潤が認められるにも関わらず、重症化例において感染は深部組織へと拡大することが知られている。このことから、肺炎球菌には自然免疫を回避する分子機構を有することが推察される。肺炎球菌の免疫回避に関与する病原因子として、これまでに、貪食細胞からの回避に関与する莢膜、自己融解酵素 LytA、自己融解により細胞外に放出されるコレステロール依存性溶血毒素 Ply などが報告されている。これらが複雑に協調しながら宿主の免疫機構を回避していることが予測されるが、肺炎球菌が好中球に及ぼす分子機構については未だ不明な点が多い。

申請研究では、肺炎球菌感染が引き起こす好中球浸潤に着目した。肺炎球菌性肺炎では、顕著な好中球浸潤にもかかわらず感染が拡大することから、肺炎球菌は、自然免疫系のうち特に好中球から逃れる分子機構を有すると考えられる。肺炎球菌が好中球に及ぼす影響を解明するため、好中球と親和性の高い肺炎球菌由来の分子の検索を行うとともに、好中球における当該分子の受容体を検索し、新規の自然免疫関連分子の同定を試みたいと考えている。

## 2. 研究の目的

- (1) 好中球と親和性の高い肺炎球菌由来の分子を分離し、同定する。
- (2) 当該分子の肺炎球菌における発現を調べる。
- (3) 肺炎球菌を用いて、当該分子の欠失変異株を作製し、その動態を野生株と比較する。
- (4) 組換えタンパクを用いて当該分子の好中球に及ぼす影響を解析する。
- (5) 好中球における当該分子に対する受容体を分離し、同定する。
- (6) 手順 5 で同定した分子の機能解析を行う。

## 3. 研究の方法

- (1) 好中球と親和性の高い肺炎球菌由来の分子の分離および同定。

ヒト単球性白血病由来 THP-1 細胞をジブチル cAMP により好中球様細胞に分化させた。好中球様細胞の表層タンパクをビオチンにて標識した。肺炎球菌の菌体表層タンパクを Native-PAGE にて展開し、ビオチン化した好中球表層タンパクと反応させ、リガンドブロット法を用いて好中球の表層タンパクと結合する分子を検索した。結合を示すバンドを切り出し、質量解析を行うことでタンパクの同定を行った。

- (2) 当該分子の肺炎球菌における発現の検索。

同定されたタンパクについて、大腸菌を用いて組換えタンパクを作製した。さらに組換えタンパクをウサギに免疫することで特異的抗血清を得た。得られた特異的抗血清を用いて、肺炎球菌菌体表層画分と肺炎球菌培養上清に対してウェスタンブロット法を行い、肺炎球菌におけるタンパクの局在を検索した。また、共焦点蛍光レーザー顕微鏡を用い

て菌体における局在を直接的に観察した。加えて、組換えタンパクを蛍光色素にて標識した後に、好中球に添加し、フローサイトメーターにて蛍光強度の変化を測定した。これにより、実際に生細胞において当該タンパクが好中球に結合することを計測した。

### (3) 当該分子の好中球に及ぼす影響の解析.

当該遺伝子の組換えタンパクを好中球に添加し、好中球の遊走能に対する影響をマルチスクリーンプレートを用いて解析した。また、肺炎球菌による好中球の形態の変化について、走査型電子顕微鏡を用いて観察した。当該遺伝子が必須遺伝子であった場合は、好中球と結合する分子の組換えタンパクを好中球に添加することで好中球におよぼす影響を検討した。

### (4) 好中球における当該分子に対する受容体の分離および同定.

好中球側の肺炎球菌結合分子を同定した。具体的には、手順2にて同定された肺炎球菌側の結合因子をビオチン標識し、Ni-NTA アガロースビーズに固相化した。次に、好中球表面層画分より pull-down assay を用いて肺炎球菌由来の分子と結合する分子を分離した。続いて、Native-PAGE にて Ni-NTA アガロースビーズごと展開し、肺炎球菌側の結合因子に対する特異的抗血清を用いたリガンドブロット法にて好中球側の結合タンパクを検索した。結合を示すバンドを切り出し、質量解析を行うことでタンパクの同定を行った。

### (5) 手順4で同定した分子の機能解析.

好中球の肺炎球菌レセプターについて組換えタンパクを作製した。さらに、組換えタンパクをウサギに免疫し特異的抗血清を作製した。同定された肺炎球菌側と好中球側の

タンパクについて、分子間相互作用解析装置を用いて反応速度と結合解離定数を算出した。特異的抗血清を用いて、共焦点蛍光レーザー顕微鏡を用いて好中球における肺炎球菌レセプターの局在を検索した。また、特異的抗血清を添加することにより、肺炎球菌の好中球結合タンパクが阻害されるかどうかを検討した。

## 4. 研究成果

### (1) 好中球様 THP-1 細胞表面層画分と結合する肺炎球菌菌体表面層タンパクの同定

肺炎球菌 R6 株の菌体表面層タンパクの 8 M 尿素抽出画分および培養上清の硫酸アンモニウム沈殿画分と、好中球様に分化させた後にビオチン標識した THP-1 細胞の表面層画分をリガンドブロット分析により反応させたところ、約 47 kDa の肺炎球菌菌体表面層タンパクとの結合が認められた。当該タンパクは、MS/MS および MASCOT 解析の結果、Enolase (SpR1036) と同定された。

### (2) 肺炎球菌の菌体における Enolase 発現の解析

得られた Enolase の配列をもとに、組換えタンパクおよび抗血清を調製した。肺炎球菌における Enolase の発現を解析するため、菌体表面層タンパクの 8 M 尿素抽出画分および培養上清画分を SDS-PAGE にて展開した後、抗 Enolase 抗血清を用いたウェスタンブロット分析を行った。その結果、菌体表面層画分および培養上清画分の両方から、ウサギ抗 Enolase 抗血清と反応する 47.1 kDa のバンドが検出された。

また、生菌体における Enolase の局在を確認するため、ウサギ抗 Enolase 抗血清を用いて菌体を蛍光免疫染色を行い、共焦点レーザー蛍光顕微鏡下で観察した。抗 Enolase 抗血

清を反応させた菌体では、その表層全面にわたって Enolase が検出された。一方、非免疫血清を反応させた菌体では反応増は認められなかった。さらに、ELISA 法により、R6 株の培養上清中に遊離する Enolase を定量したところ、7.4 nM であった。以上の結果より、Enolase は肺炎球菌の菌体表層および培養上清に存在することが明らかとなった。

### (3) Enolase の好中球遊走因子としての可能性

Enolase が好中球の遊走におよぼす影響を、健常なヒトの末梢血より分離した好中球と走化性チャンバーを用いた遊走能試験により検討した。その結果、Enolase を 6.7 nM 以上添加したとき、好中球の遊走量は有意に増加することが示された。また、好中球の遊走量は、添加した Enolase の量依存的に増加した。これらのことから、Enolase はヒト末梢血より分離した好中球に対して量依存的な遊走活性を有すること、ならびに Tryptic Soy 培地による培養条件で遊離する Enolase 量で好中球を遊走させることが示唆された。

### (4) Enolase 添加による好中球の形態変化および細胞傷害の解析

Enolase を添加した際の好中球の形態変化を観察するため、走査型電子顕微鏡による観察を行った。培養上清に 100 nM の Enolase を添加し、反応させた後の好中球を検鏡した結果、Enolase を添加しなかった場合と比較して、一部の好中球で細胞構造が破壊され、網状の構造物を漏出している像が認められた。Enolase 添加および非添加群のそれぞれの電子顕微鏡像から、各々 20 視野を無作為に選び、細胞構造の破壊が認められる好中球の割合を算定したところ、培養上清に 100 nM Enolase を添加した群では、約 50% の細胞で

構造の破壊が認められた。蛍光顕微鏡による観察から、これらの網状の構造物が、DNA を主体とする Neutrophil Extracellular Traps であることが示された。

次に、Enolase のヒト好中球への細胞傷害性を LDH 遊離試験にて測定した。その結果、Enolase を添加しない場合と比較して、Enolase を 10 nM 以上添加したとき、好中球の LDH 量は有意に増加した。また、好中球の培養上清中に添加する Enolase の量依存的に、好中球より遊離する LDH 量が増加することが示された。これらのことから、Enolase は好中球に対して細胞傷害性を有し、Neutrophil Extracellular Traps を伴う細胞死を誘導することが示唆された。

さらに、ヒト末梢血中に肺炎球菌を混和し Enolase を添加することで、Enolase が抗貪食能におよぼす影響を検索した。その結果、Enolase の添加によってヒト末梢血中における肺炎球菌の生存率が低下することが示された。

### (5) 好中球表層の Enolase 受容体の検出

Enolase と結合する好中球表層のタンパクを検索するため、Enolase 固相化カラムを用いたブルダウン実験と質量分析により、Enolase と結合能を持つ好中球様 THP-1 細胞表層分子を検索した。MS/MS および MASCOT 解析の結果、当該タンパクは機能未知である myoblast antigen 24.1D5 であることが明らかとなった。myoblast antigen 24.1D5 と Enolase の反応性をリガンドブロット法で調べた結果、myoblast antigen 24.1D5 は Enolase と結合することが示された。

次に、好中球における myoblast antigen 24.1D5 の局在を、共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて観察した。その結果、myoblast antigen 24.1D5 は好中球の表層に発現することが認

められた。

## 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0件)

[学会発表] (計2件)

- ① 森 有可, 寺尾 豊, 山口雅也, 浜田茂幸, 大嶋 隆, 川端重忠, 新規免疫システム NETs を誘導する肺炎レンサ球菌タンパクの同定, 第33回日本分子生物学会年会, 2010.12.7-10, 神戸市
- ② 森 有可, 寺尾 豊, 山口雅也, 浜田茂幸, 川端重忠, *Streptococcus pneumoniae* の自然免疫回避における Enolase の役割, 第83回日本細菌学会総会, 2010.3.27-29, 横浜市

[その他]

「口腔微生物学・免疫学 第3版」(医歯薬出版)の表紙に画像が採択された。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森 有可 (MORI YUKA)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：90527227