

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 4月 16日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22790077

研究課題名（和文）創薬に指向した黄色ブドウ球菌免疫かく乱タンパク質ファミリーSSLの機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of staphylococcal superantigen-like protein

## 研究代表者

伊藤 佐生智（ITO SAOTOMO）

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号：70308013

研究成果の概要（和文）：Staphylococcal superantigen-like (SSL)はスーパー抗原と共通の立体構造を持ちながら、スーパー抗原活性を示さない黄色ブドウ球菌の分泌タンパク質毒素で、14種のSSLが存在し、その一部はSSLは宿主の免疫関連因子に結合しその機能をかく乱することが知られている。本研究において私たちはSSL3がToll-like receptor 2に、SSL8がテネイシンCに、SSL10がホスファチジルセリンおよび血液凝固因子に結合し、これらの生理機能を抑制することを見出した。本研究の成果はSSLの機能のかく乱を目指した黄色ブドウ球菌感染症の治療薬の開発およびSSLの宿主タンパク質かく乱作用を利用した新規医薬品の開発につながると思われる。

研究成果の概要（英文）：Staphylococcal superantigen-like (SSL) proteins, composed 14 member of exoprotein, share structural similarity with superantigens but no superantigenic activity. Several SSLs are known to be involved in immune evasion of *S. aureus*, however remaining SSLs are not identified their target proteins. In this study, we showed that SSL3 binds to TLR2, SSL8 binds to tenascin C, SSL10 binds to phosphatidyl serine and coagulation factors. We also showed the interactions between SSLs and the target proteins interferes the physiological functions of them.

## 交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費        | 間接経費      | 合計          |
|--------|-------------|-----------|-------------|
| 2010年度 | 1,200,000 円 | 360,000 円 | 1,560,000 円 |
| 2011年度 | 900,000 円   | 270,000 円 | 1,170,000 円 |
| 2012年度 | 900,000 円   | 270,000 円 | 1,170,000 円 |
| 年度     |             |           |             |
| 年度     |             |           |             |
| 総計     | 3,000,000 円 | 900,000 円 | 3,900,000 円 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・生物系薬学

キーワード：免疫回避・細菌毒素

## 1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌は化膿性疾患の主要な原因菌である。特に難治性の多剤抵抗性黄色ブドウ球菌の院内感染が問題であり有効な抗

生物質も限られることから、その治療法の確立は急務である。黄色ブドウ球菌は免疫系をかく乱することで感染を成立させている。この免疫回避システムを理解することは、免疫

回避の破綻を目指した黄色ブドウ球菌感染症の新しい治療法の開発を可能とする。本研究の対象である staphylococcal super antigen-like protein (SSL) はスーパー抗原と類似の立体構造を持ちながらスーパー抗原活性を示さない、14種類からなる黄色ブドウ球菌の分泌タンパク質ファミリーである。本研究計画を開始する時点で、私たちおよび開学の研究グループにより、一部の SSL のみが免疫系分子に作用して免疫回避に関与していること、すなわち、SSL5 が白血球の体内交通に関与する接着分子 PSGL-1 やケモカイン受容体に結合し、白血球の炎症部位へのリクルートを抑制すること、SSL7 は IgA および補体 C5 と結合し、これらによる殺菌を妨害すること、SSL10 が IgG に結合し、免疫複合体によって惹起される補体の古典経路による活性化を抑制することが報告されていた。また、私たちのグループは SSL5 がマトリックスメタロプロテアーゼ-9 (MMP-9) に結合し、プロテアーゼ活性を抑制することにより好中球の感染・炎症部位へのリクルートを妨害することを見出していた。

## 2. 研究の目的

14種ある SSL ファミリーのうち、宿主側の標的分子が明らかにされているものは SSL5,7,10 のみであり、黄色ブドウ球菌の免疫回避における SSL ファミリーの役割の全貌を明らかにするためには、残りの SSL の標的分子を明らかにする必要がある。これにより、免疫回避システムの破綻を目指した新たな多剤耐性黄色ブドウ球菌治療法の開発が可能となる。一方で SSL ファミリーの標的となっている宿主側のタンパク質は、種々の疾患において重要な役割を果たす因子でもある。SSL ファミリーのヒト免疫制御分子に対

する作用を直接利用またはその作用機序を模倣した新たな抗炎症薬、免疫調節薬、がん転移抑制および血管新生阻害薬の創薬が可能である。

本研究の目的は以下のとおりである。

- 1) 機能未知の SSL ファミリーの標的分子を明らかにし、免疫回避における SSL の役割を明らかにする。
- 2) SSL-標的分子相互作用に重要な SSL 側、標的分子側各々の最小アミノ酸配列を決定し、相互作用を阻害するペプチドを作成し、この SSL 由来阻害ペプチドの抗炎症、がん転移抑制、血管新生阻害、免疫調節薬としての有用性を示す。
- 3) 2)で見出した標的分子由来ペプチドの黄色ブドウ球菌感染症治療薬としての有用性を示す。

## 3. 研究の方法

以下の手順で研究を遂行した。

### (1) SSL の標的分子の探索

組換え SSL を結合したセファロースを用いたアフィニティー精製により、ヒト・動物試料より SSL 結合タンパク質を精製し、同定した。

### (2) SSL-標的分子相互作用の解析

標的分子と SSL の相互作用は SSL 結合セファロースを用いたプルダウンアッセイ、96 ウェルプレートを用いた ELISA により検討した。SSL、標的分子の欠失変異体、ドメインスワップ体、アミノ酸置換変異体を用いて、相互作用に必要な領域の特定を行った。

### (3) SSL-標的分子相互作用の生理的意義

標的分子の機能に対する SSL の作用について解析を行った。SSL3-TLR2 相互作用は各種 TLR2 リガンドによるマクロファージからのサイトカイン産生に対する SSL3 の作用、SSL8-テネイシン C 相互作用はケラチノサイトの細胞運動に対する SSL8 の作用、SSL10-血液凝固

因子は、血漿の凝固に対する SSL10 の作用、SSL10-フォスファチジルセリン相互作用は SSL10 のアポトーシス細胞への結合について検討した。

#### 4. 研究成果

私たちはこれまで SSL5 が MMP-9 に結合しそのプロテアーゼ活性を抑制すること、SSL10 が IgG に結合し古典経路による補体活性化を抑制することを見出している。研究期間内に新たに5つの SSL-標的分子相互作用を見出した。

(1) SSL6 はブタフィコリン  $\beta$  に結合する。

ブタ好中球ライセートを材料に SSL 結合タンパク質の探索を行ったところ、SSL6 結合タンパク質として、補体活性化レクチン経路の開始タンパク質、フィコリン  $\beta$  が単離された。SSL6 はフィコリン  $\beta$  と黄色ブドウ球菌の結合を妨げる可能性が示されたが、SSL6 とフィコリン  $\beta$  の結合はシアリルラクタサミン含有糖鎖依存的であったため、その後の解析は中断した。

(2) SSL3 は TLR2 に結合し、マクロファージからの TLR2 リガンドによるサイトカイン産生を抑制する。

ブタ脾臓を材料に SSL 結合タンパク質の探索を行った結果、ブタ TLR2 が単離された。SSL3 結合ビーズを用いたプルダウンアッセイにおいて、SSL3 はヒト、マウスの TLR2 にも結合すること、SSL3 は TLR2 の細胞外領域に結合すること、SSL3 はマクロファージからのサイトカイン産生を誘導することはないが、SSL3 は各種 TLR2 リガンドによるサイトカイン産生を抑制することを見出した。この成果は *Infection and Immunity* 誌に投稿、受理された。

(3) SSL8 はテネイシン C に結合しテネイシン

C-フィブロネクチン相互作用を妨害し、ケラチノサイトの細胞運動を遅延させる。

ヒト母乳を材料に SSL 結合タンパク質の探索を行った結果、SSL8 に細胞外マトリクスたんぱく質であるテネイシン C が結合することが明らかになった。SSL8 は TNC に結合することで TNC と別の細胞外マトリクスタンパク質であるフィブロネクチンとの結合を阻害し、TNC 存在下でのケラチノサイトの細胞運動を抑制することが明らかとなった。この成果を *Biochemical and Biophysical Research Communications* 誌に投稿し、受理された。

(4) SSL10 はホスファチジルセリンに結合する

SSL 結合ビーズを用いて各種細胞ライセートから結合タンパク質を探索する過程において、SSL10 ビーズに比較的非特異的な結合が多いことから、SSL10 は細胞膜成分に結合するのではないかと考えた。リン脂質を含むリポソームを作成し、SSL10 との結合を解析した結果、SSL10 はホスファチジルセリンに結合することが明らかとなった。さらに SSL10 は、アポトーシス細胞に Ca 非依存的に結合することを見いだした。この成果について *Microbiology and Immunology* 誌に投稿、受理された。

(5) SSL10 は血液凝固因子に結合し、血液凝固を妨害する。

ブタ血漿を材料に SSL 結合タンパク質を探索した結果、SSL10 結合ビーズによってブタのプロトロンビンが回収された。SSL10 はプロトロンビンの  $\gamma$  カルボキシグルタミン酸 (Gla) ドメインに結合すること、ワルファリン処理により Gla 修飾を阻害すると SSL10 とプロトロンビンの結合が損なわれること、プロトロンビン以外のビタミン K 依存性凝固因子も SSL10 と結合すること、SSL10 は血液凝固を阻害することが

明らかになった。この成果について特許出願を行うとともに現在論文投稿を行っている。

(6) 各種 SSL-標的分子の相互作用に関与する領域の同定

これまでに私たちが見出した SSL-標的分子相互作用について、欠失変異体、ドメインスワップ体、アミノ酸置換変異体を作成し、両者の結合に寄与する領域の特定を行った。その結果、SSL3、SSL5 および SSL10 は OB-fold 領域を介して標的分子と結合していることが明らかとなった。現在、さらにこの領域の絞り込みを行っている。

#### 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 4 件)

① Itoh S, Yamaoka N, Kamoshida G, Takii T, Tsuji T, Hayashi H, Onozaki K. Staphylococcal superantigen-like protein 8 (SSL8) binds to tenascin C and inhibits tenascin C-fibronectin interaction and cell motility of keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 433, 127-132, 2013. 査読有

② Itoh S, Yokoyama R, Murase C, Takii T, Tsuji T and Onozaki K. Staphylococcal superantigen-like protein 10 (SSL10) binds to phosphatidylserine and apoptotic cells. *Microbiology and Immunology*, 56, 363-371, 2012. 査読有

③ Yokoyama R, Itoh S, Kamoshida G, Takii T, Fujii S, Tsuji T, Onozaki K. Staphylococcal superantigen-like protein 3 binds to the Toll-like receptor 2 extracellular domain

and inhibits cytokine production induced by *Staphylococcus aureus*, cell wall component, or lipopeptides in murine macrophages.

80, 2816-2825, 2012. 査読有

④ Itoh S, Hamada E, Kamoshida G, Takeshita K, Oku T, Tsuji T. Staphylococcal superantigen-like protein 5 inhibits matrix metalloproteinase 9 from human neutrophils.

*Infection and Immunity*, 78, 3298-3305, 2010. 査読有

[学会発表] (計 15 件)

① 横山 領介, ○伊藤 佐生智, 鴨志田 剛, 奥村 拓也, 瀧井 猛将, 藤井 聡, 辻 勉, 小野寄 菊夫

黄色ブドウ球菌スーパー抗原様タンパク質 SSL3 は Toll like receptor 2 の細胞外領域に結合し, TLR2 を介したマクロファージからの炎症性サイトカイン産生を抑制する

日本薬学会 第 133 年会 2013 年 3 月 30 日 (横浜) 口演

② Saotomo Itoh, Takemasa Takii, Tsutomu Tsuji, Kikuo Onozaki

Staphylococcal superantigen-like protein 3 binds to TLR2 and inhibits cytokine production from murine macrophages in response to *S. aureus*, cell wall component or TLR2 ligand lipopeptides.

第 41 回日本免疫学会学術集会 2012 年 12 月 5 日 (神戸)

③ 横山 領介, 伊藤 佐生智, 鴨志田 剛, 奥村 拓也, 瀧井 猛将, 藤井 聡, 辻 勉, 小野寄 菊夫

黄色ブドウ球菌分泌毒素 Staphylococcal superantigen like 3 は toll like receptor

2 (TLR2) に結合し, TLR2 リガンドによるマクロファージからの炎症性サイトカイン産生を抑制する

フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジーシンポジウム 2012 年 10 月 26, 27 日 (名古屋)

④花井朱璃, 伊藤佐生智, 瀧井猛将, 辻勉, 小野寄菊夫

黄色ブドウ球菌スーパー抗原様タンパク質 SSL5 とマトリックスメタロプロテアーゼ 9 の結合様式の解析

フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジーシンポジウム 2012 年 10 月 26, 27 日 (名古屋)

⑤横山 領介, 伊藤 佐生智, 鴨志田 剛, 瀧井 猛将, 藤井 聡, 辻 勉, 小野寄 菊夫

黄色ブドウ球菌スーパー抗原様タンパク質 SSL3 は toll like receptor 2 に結合しマクロファージのサイトカイン産生を抑制する  
第 24 回微生物シンポジウム 2012 年 9 月 3, 4 日 (大坂)

⑥伊藤 佐生智, 横山 領介, 鴨志田 剛, 村瀬千鶴子, 岡田 浩美, 藤井 聡, 瀧井 猛将, 辻 勉, 小野寄 菊夫

黄色ブドウ球菌分泌タンパク質 SSL10 は Gladメインを介して血液凝固因子に結合し, 血液凝固を抑制する

第 13 回 Pharmaco-Hematology シンポジウム 2012 年 6 月 15, 16 日 (東京)

⑦伊藤佐生智, 横山領介, 鴨志田剛, 岡田浩美, 藤井聡, 瀧井猛将, 辻勉, 小野寄菊夫黄色ブドウ球菌スーパー抗原様タンパク質 SSL10 の血液凝固抑制作用

日本薬学会 第 132 年会, 2012 年 3 月 29 日,

札幌

⑧伊藤 佐生智, 横山 領介, 鴨志田 剛, 岡田浩美, 藤井 聡, 瀧井 猛将, 辻 勉, 小野寄 菊夫

黄色ブドウ球菌スーパー抗原様タンパク質 SSL10 による血液凝固抑制作用

フォーラム 2011 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2011 年 10 月 28 日 金沢

⑨伊藤 佐生智, 横山 領介, 鴨志田 剛, 岡田浩美, 藤井 聡, 瀧井 猛将, 辻 勉, 小野寄 菊夫 黄色ブドウ球菌スーパー抗原様タンパク質 SSL10 は血液凝固因子を標的とし、血液凝固を抑制する

第 23 回微生物シンポジウム 2011 年 9 月 3, 4 日, 千葉

⑩伊藤 佐生智, 横山 領介, 鴨志田 剛, 岡田 浩美, 藤井 聡, 瀧井 猛将, 小野寄 菊夫, 辻 勉

黄色ブドウ球菌分泌タンパク質 SSL ファミリーの血漿中標的分子の探索

第 12 回 Pharmaco Hematology シンポジウム, 2011 年 6 月 18 日, 富山

⑪横山 領介, 伊藤 佐生智, 鴨志田 剛, 瀧井 猛将, 辻 勉, 小野寄 菊夫

黄色ブドウ球菌分泌タンパク質 SSL6 は ficolin- $\beta$  に結合する

日本薬学会 第 131 年会, 2011 年 3 月 30 日, 静岡

⑫伊藤 佐生智, 濱田 恵里, 鴨志田 剛, 横山 領介, 瀧井 猛将, 小野寄 菊夫, 辻 勉 黄色ブドウ球菌スーパー抗原様分泌タンパク質 SSL ファミリーによる補体活性化抑制作用

フォーラム 2010 衛生薬学・環境トキシコロジー, 2010年9月9,10日,東京

⑬伊藤 佐生智, 濱田 恵里, 鴨志田 剛, 横山領介, 瀧井 猛将, 小野寄 菊夫, 辻 勉  
黄色ブドウ球菌スーパー抗原様タンパク質 SSL10 はヒト IgG の Fc 部に結合し古典経路による補体活性化を抑制する  
第22回微生物シンポジウム, 2010年9月3,4日,大阪

⑭Itoh Saotomo, Hamada Eri, Kamoshida Go, Takii Takemasa, Onozaki Kikuo, Tsuji Tsutomu Staphylococcal superantigen-like protein 10 binds to human immunoglobulin G and inhibits the classical complement activation pathway  
4th International Congress of Immunology, August 22 - 27, 2010, Kobe

⑮横山 領介, 伊藤 佐生智, 鴨志田 剛, 瀧井 猛将, 辻 勉, 小野寄 菊夫  
Staphylococcal superantigen-like protein 6 (SSL6) はブタフィコリン $\beta$ に結合する  
第56回日本薬学会東海支部総会・大会, 2010年7月3日,岐阜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 抗凝固薬及びその用途

発明者: 伊藤佐生智, 瀧井猛将, 小野寄菊夫, 横山領介, 鴨志田剛, 辻勉

権利者: 名古屋市立大学

種類: 特願

番号: 2011-90473

出願年月日: 2011. 4. 14

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

伊藤 佐生智 (ITO SAOTOMO)

名古屋市立大学・大学院薬学研究科・講師

研究者番号: 70308013