

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 8 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590221

研究課題名(和文)連鎖球菌由来病原因子の分子機構解析と創薬への応用

研究課題名(英文)Molecular analysis of streptococcus derived protein factors for application to drug discovery

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) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：レンサ球菌が産生する細胞溶解毒素のなかから、膜コレステロール依存性、ヒト特異性、小児川崎病との関連性などに目を向けて機能解析を行った。特に、細菌感染臓器における深部膿瘍形成因子であるコレステロール依存性細胞溶解毒素(CDC)、ヒト細胞にのみ親和性を示し重篤な症状を引き起こすインターメディリシン(ILY)、小児川崎病発症因子の可能性が高いヒト血小板凝集因子(Sm-hPAF)、流産との関連が疑われるバジノリシン(VLY)、を主な題材として、標的細胞認識機構を解析し、感染および症状発現の制御、ならびに、治療薬開発について模索し主に以下の成果を報告した。

研究成果の概要(英文)：Molecular features of Streptococci derived cytolysins were examined. Especially, the structural function of cholesterol dependent cytolysin (CDC), human specific intermedilysin (ILY), Kawasaki disease related factor (Sm-hPAF), and miscarriage related vaginolysin (VLY), were analyzed.

研究分野：医歯薬学

キーワード：細菌感染症 タンパク質毒素

1. 研究開始当初の背景

グラム陽性菌に広く分布するコレステロール依存性細胞溶解毒素(CDC)ファミリーは様々な感染症の病原因子の一つである。なかでもヒト深部臓器(脳や肝臓)に膿瘍を引き起こすことが知られている連鎖球菌 *Streptococcus intermedius* から、我々はこれまでにコレステロール(CHL)とは直接結合せず、ヒト細胞膜と結合して活性(クラスター形成をともなう膜孔形成)を発現する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、その構造機能解析を通して、CDCファミリーの細胞認識機構は多様性を持つこと(Ohkura K. et al. *Microbiology and Immunology*, 48 (9), 677-692, 2004)、ヒト細胞への感染時にはILYは必須の因子として機能することをILY ノックアウト株を作成して、その感染実験から検証した(Ohkura K. et al. *Microbiology and Immunology*, 49 (7), 681-694, 2005)、さらにILYをはじめとするCDCの細胞膜結合部位は柔軟に分子運動を行いつつも常にターゲットとなる膜受容体を認識し相互作用しうる状態にあること(Ohkura K. et al. *Anticancer Research*, 26 (6A), 4055-4062, 2006)などを報告してきた。また感染症の一種であることが強く疑われる小児川崎病の起原菌として口腔内ビリダス群連鎖球菌がある。これらの細菌に由来する重症症状としては動脈(冠状動脈)血栓形成があり、これまでに血小板凝集活性を指標として川崎病患者児由来のビリダス群連鎖球菌株をスクリーニングし、*S. mitis* から血栓形成に関わる血小板凝集因子としてヒト血小板凝集因子 Sm-hPAF を単離した。その遺伝子クローニングの結果、驚いたことに Sm-hPAF は CDC の遺伝子ファミリーに属し、ILY とアミノ酸レベルで 55% と高い相同性を有することが明らかとなった (*Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, in press, 2011. 図1.系統樹)。

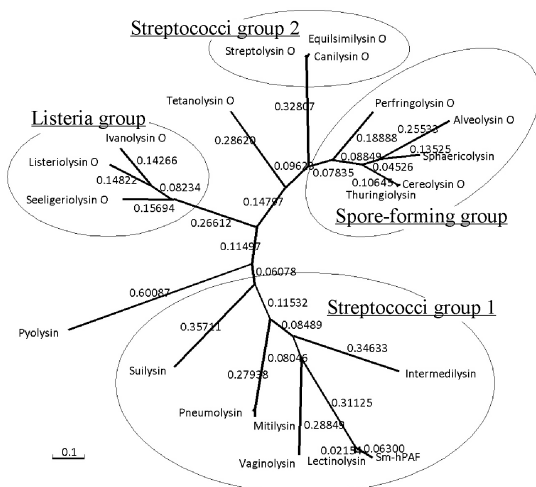


図1.細菌由来細胞溶解毒素の系統樹

さらに Sm-hPAF は、CDC に共通して存在する 11mer モチーフ領域を有し、その配列中に ILY で見られたように CDC と比較して3つのアミノ酸置換がみとめられた(図2. 11mer 領域配列)。

CDC: ECTGLAWEWWR
 ILY: GATGLAWEPWR
 PLO: EATGLAWDPWW
 VLY: EKTGLVWEPWR
 Sm-hPAF: EKTGLVWEPWR

図2. 11mer 領域のアミノ酸配列

このことは膜孔形成能を共通の特徴を持つと考えられてきた CDC の中に血小板凝集という全く別の機能を有する毒素があることを示し、毒素遺伝子の進化論や感染病因論の上で非常に画期的な知見と考えられる。また Sm-hPAF も ILY と類似して、ヒト血小板に高い特異性を示し、またヒト赤血球に対しても高い親和性を示した。従って Sm-hPAF についての知見は、先に述べた *S. intermedius* 感染症の成立機構やヒト特異的病原因子の作用機構解明に加えて、ストレプトコッカスをはじめとする連鎖球菌に起因する病態や病原因子の機能解明および治療薬の開発にも寄与することができる。また最近、ILY が GPI アンカー型タンパク質であるヒト型 CD59 (hCD59) を発現させたラット肝細胞 BRL3A を認識し、活性を発揮することが明らかとなり、その感染機構の解明を急いでいる。

2. 研究の目的

レンサ球菌が産生する細胞溶解毒素のなかから、膜コレステロール依存性、ヒト特異性、小児川崎病との関連性などに目を向けて機能解析を行う。細菌感染臓器における深部膿瘍形成因子であるコレステロール依存性細胞溶解毒素(CDC)、ヒト細胞にのみ親和性を示し重篤な症状を引き起こすインターメディリシン(ILY)、小児川崎病発症因子の可能性が高いヒト血小板凝集因子(Sm-hPAF)、流産との関連が疑われるバジノリシン(VLY)、を主な題材として、標的細胞認識機構を解析し、感染および症状発現の制御、ならびに、治療薬開発へつなげる。

3. 研究の方法

1) クラスター形成機構の解明: これまでの解析から ILY はドメイン 2 とドメイン 4 を結ぶ部位を軸として回転運動できること、および、ドメイン 3 は極めてダイナミックな構造変化(腕の伸長)をしうる部位(腕)を有することを明らかにしている(Ohkura K. et al. *Anticancer Research*, 26 (6A), 4055-4062, 2006)。

これらのことは CDC、ILY などが細胞膜上でクラスターを形成する際に起こりうる構造変化を示唆していると考えられる。このことを踏まえて、ILY、Sm-hPAF、VLY や CDC の 1 ~ 4 ドメイン中の構造変化時に基点となりうる部位のアミノ酸に変異を導入しつつ、赤血球との相互作用を電子顕微鏡で観察しクラスター形成の解析を試みた。

2) ヒト GPI アンカー型タンパク質 hCD59 発現ラット肝細胞 BRL3A と ILY、Sm-hPAF、VLY、CDC との相互作用解析：ヒト肝がん細胞 HepG2 の全 RNA 分画から cDNA を作成し鋳型として PCR により hCD59 の ORF 全長を増幅して pcDNA3.1(+) にクローニングする。この組み換えプラスミドでラット肝細胞 BRL3A を形質転換して hCD59 を発現する BRL3A-hCD59 株を得る。BRL3A-hCD59 細胞の懸濁液に ILY、Sm-hPAF、VLY や CDC 毒素を加えて 37 °C で 1 時間加熱した後、遠心分離して上清を回収し残存溶血活性を測定し結合率を算定した。溶血活性は PBS 中で各毒素を 37 °C で 1 時間ヒトあるいは動物赤血球に作用させた後、遠心分離して上清の 540nm における吸光度を測定して溶血活性を評価した。上記の事を検証する際に、ILY や SLO の膜結合領域 (ドメイン 4) の各部を欠損させた変異体を作成 (Ohkura K. et al. *Microbiology and Immunology*, 48, 677-692, 2004) し、BRL3A-hCD59 細胞との結合性を検討して hCD59 が認識する毒素の部位を探索した。

3) hCD59 と毒素の結合シミュレーションと感染制御薬の設計：CD59 の X 線結晶構造 (1ERG) と各毒素との結合シミュレーションを insightII-Discover などを用いて行い、毒素側、受容体側のどの部分構造が受容体との結合に関わるか探索した。関与がみとめられた部分構造の変異・欠損体や化学修飾体を作成し、両者の相互作用に変化が起こるかを 2) で述べた残存溶血活性の解析などから検証した。さらに、結合に必須であると認められた部位を Discover3 モジュールで分子力学的に解析 (298K, 500psec) し、経時的に高次構造 (動的な高次構造) を追うことで相互作用領域のバックボーンや側鎖の動的構造を検証して、感染予防・感染症治療に有益な薬剤の設計を試みた。

4. 研究成果

レンサ球菌が産生する細胞溶解毒素のなかから、膜コレステロール依存性、ヒト特異性、小児川崎病との関連性などに目を向けて機能解析を行った。特に、細菌感染臓器における深部膿瘍形成因子であるコレステロール依存性細胞溶解毒素 (CDC)、ヒト細胞にのみ親和性を示し重篤な症状を引き起こすインターメディリシン (ILY)、小児川崎病発症因子の可能性が高いヒト血小板凝集因子 (Sm-hPAF)、流産との関連が疑われるバジノ

リシン (VLY)、を主な題材として、標的細胞認識機構を解析し、感染および症状発現の制御、ならびに、治療薬開発について模索し主に以下の成果を報告した。

1. Intermedilysin (ILY)、Vaginolysin (VLY)、Streptococcus mitis-derived human platelet aggregation factor (Sm-hPAF) とヒト細胞側受容体 (hCD59) との相互作用を解析した。ILY 中の Arg432 が hCD59 中の Glu76 と水素結合を形成し、これを基点として ILY と hCD59 は互いに整合性がとれる位置に落ち着くと考えられた。VLY と hCD59 では、VLY:Lys447 - hCD59:Tyr62, VLY:Arg419 - hCD59:Glu76 間に二つの水素結合が確認され、ILY と hCD59 間の様な柔軟な相互調節はないことが伺えた。Sm-hPAF と hCD59 間でも Sm-hPAF: Lys403 - hCD59: Tyr62, Sm-hPAF: Arg375 - hCD59: Glu76 の二つの水素結合が確認された。ILY と hCD59 間の総非結合エネルギーが 234165 kcal/mol であり、VLY と hCD59 間 (205 kcal/mol) や Sm-hPAF と hCD59 間 (113 kcal/mol) より強い相互作用が観察された。

2. ヒト口腔常在菌 *Streptococcus anginosus* に由来する β 溶血因子の探索を行い、化膿性連鎖球菌が産生する代表的な β 溶血因子である Streptolysin-S (SLS) ホモログの存在を明らかにした。*S. anginosus* では SLS ホモログをコードしている遺伝子が 2 つタンデムに存在し、各々の翻訳産物が β 溶血性に寄与することを示した。これら 2 つの分子 SagA1 および SagA2 について動的構造を解析したところ、リーダーペプチド領域とプロペプチド領域を有し、分子内に環構造を形成することでリーダーペプチド部分とプロペプチド部分の切断が制御されることが示唆された。

3. 黄色ブドウ球菌由来プロテイン A の IgG 結合ドメインである Z を標的化ドメインとし、コレステロール依存性細胞溶解毒素 (CDC) とのキメラタンパク質を構築した。精製したキメラタンパク質は、IgG 結合性、コレステロール含有リン脂質膜結合性、還元条件下選択的な膜孔形成性など期待された機能を維持しており、さらに抗 CEA 抗体を結合させたキメラタンパク質は CEA 発現細胞への選択的な送達を確認された。以上より、構築したキメラタンパク質を用いた DDS に関して、細胞標的化に関する汎用性の向上が期待された。

4. 脂肪酸代謝に重要なカルニチンパルミトイル転移酵素 (CPT1) には肝型、筋型に加え、近年新たに脳型アイソザイムが発見されたが、その詳細については不明であった。本研究では、それぞれのリコンビナントタンパク質を調製し定量的な活性測定を行うことで、脳型 CPT1 活性が極めて低いことを明らかにした。さらに、アイソザイム間の部位置換キ

メラ CPT1s を作製し、脳型 CPT1 の活性欠落の要因について議論した。

5. ミトコンドリア外膜における物質輸送には VDAC1 が重要な役割を担う。これまでの研究から VDAC1 の pseudogene が実際に転写されている可能性が示されたため、データベースに登録されている 16 種の VDAC1 の pseudogene について解析を行った。その結果、8 種の pseudogene が脳や精巣などで転写されているが、タンパク質の鋳型としては機能していないことを明らかにできた。

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 10 件)

1. Atsushi Tabata, Yukimasa Ohkubo, Eriko Sakakura, Toshifumi Tomoyasu, Kazuto Ohkura, Hideaki Nagamune
Investigation of a bacterial pore-forming chimera toxin for application as a novel drug-delivery system tool.
Anticancer Research (2012) 32, 2323-2329.
2. Kazuto Ohkura, Yuki Kawaguchi, Atsushi Tabata, Atsushi Yamamoto, Yasuo Shinohara, Hideaki Nagamune, Hitoshi Hori
Molecular profiles of cholesterol-dependent cytolysin family-derived 11mer regions.
Anticancer Research (2012) 32, 2343-2346.
3. Atsushi Tabata, Kota Nakano, Kazuto Ohkura, Toshifumi Tomoyasu, Ken Kikuchi, Robert Whiley, Hideaki Nagamune
Novel twin streptolysin S-like peptides encoded in the sag operon homologue of β -hemolytic *Streptococcus anginosus*.
Journal of Bacteriology (2013) 195, 1090-1099.
4. Yuki Kawaguchi, Atsushi Tabata, Hideaki Nagamune, Kazuto Ohkura
Profiles of ILY, VLY and Sm-hPAF interaction with human CD59.
Anticancer Research (2013) 33, 2901-2904.
5. Atsushi Tabata, Yukimasa Ohkubo, Masato Tamura, Toshifumi Tomoyasu, Kazuto Ohkura, Hideaki Nagamune
Construction of an improved drug delivery system tool with enhanced versatility in cell-targeting.
Anticancer Research (2013) 33, 2905-2910.
6. Takuya Hada, Takenori Yamamoto, Atsushi Yamamoto, Kazuto Ohkura, Naoshi Yamazaki,

Yoshiharu Takiguchi, Yasuo Shinohara
Comparison of the catalytic activities of three isozymes of carnitine palmitoyltransferase 1 expressed in COS7 cells.
Applied Biochemistry and Biotechnology (2014) 172, 1486-1496.

7. Atsushi Tabata, Kazuto Ohkura, Yukimasa Ohkubo, Toshifumi Tomoyasu, Hisashi Ohkuni, Robert Whiley, Hideaki Nagamune
The diversity of receptor recognition in cholesterol-dependent cytolysins.
Microbiology and Immunology (2014) 58, 155-171.

8. Atsushi Tabata, Yuji Sato, Kentaro Maya, Kota Nakano, Ken Kikuchi, Robert Whiley, Kazuto Ohkura, Toshifumi Tomoyasu, Hideaki Nagamune.
A streptolysin S homologue is essential for β -haemolytic *Streptococcus constellatus* subsp. *constellatus* cytotoxicity.
Microbiology (2014) 160, 980-991.

9. Yusuke Ido, Tatsuki Yoshitomi, Kazuto Ohkura, Takenori Yamamoto, Yasuo Shinohara
Utility of syntenic relationships of VDAC1 pseudogenes for not only an understanding of the phylogenetic divergence history of rodents, but also ascertaining possible pseudogene candidates as genuine pseudogenes.
Genomics (2014) 104, 128-133.

10. Yuki Kawaguchi, Atsushi Tabata, Hideaki Nagamune, Kazuto Ohkura
Molecular analysis of *Streptococcus anginosus*-derived SagA peptides.
Anticancer Research (2014) 34, 4627-4631.

[学会発表](計 19 件)

1. 田端厚之、中野晃太、大倉一人、友安俊文、菊池 賢、長宗秀明
 β 溶血性 *Streptococcus anginosus* が保有するペプチド性溶血因子の分子特性
第 6 回細菌学若手コロッセウム、2012 年 8 月 8 日 ~ 8 月 10 日、八王子セミナーハウス
2. 山本篤司、立松洋平、林 大輝、岡戸みな美、大倉一人
非ステロイド性抗炎症薬のミトコンドリアに対する作用を指標とした副作用発現メカニズムの解析
第 31 回日本社会薬学会、2012 年 9 月 15 日 ~ 9 月 16 日、鈴鹿医療科学大学
3. 大倉一人、川口遊喜、田端厚之、篠原康雄、長宗秀明
細菌由来細胞溶解毒素のヒト側受容体との相互作用

第16回バイオ治療法研究会、2012年12月8、東京理科大学森戸記念館

4. Atsushi Tabata, Yuji Sato, Kota Nakano, Kazuto Ohkura, Ken Kikuchi, Toshifumi Tomoyasu, Hideaki Nagamune

S.constellatus subsp. *constellatus* が保有するβ溶血因子の探索

第86回日本細菌学会、2013年3月18日~3月20日、幕張メッセ国際会議場

5. 山本篤司、立松洋平、林大輝、岡戸みな美、大倉一人

ミトコンドリア酸素消費を指標とした薬剤放出のリアルタイム解析

日本薬学会第133年会、2013年3月28日~3月30日、パシフィコ横浜

6. 田端厚之、中野晃太、大倉一人、菊池賢、友安俊文、長宗秀明

β溶血性 *Streptococcus anginosus* が保有するストレプトリジンSホモログの特徴と細胞障害性への寄与

第22回Lancefieldレンサ球菌研究会、2013年6月28日~29日、東京

7. 立松洋平、山本篤司、林大輝、岡戸みな美、大倉一人

ミトコンドリア酸素消費を指標とした薬物放出リアルタイムモニタリングシステムの構築

第59回日本薬学会東海支部大会、2013年7月6日、名古屋

8. 林大輝、山本篤司、立松洋平、岡戸みな美、大倉一人

種々の非ステロイド性抗炎症薬により誘起されるミトコンドリア透過性遷移の比較解析

第59回日本薬学会東海支部大会、2013年7月6日、名古屋

9. 田端厚之、大倉一人、友安俊文、大國寿士、長宗秀明

コレステロール依存性細胞溶解毒素の受容体認識および作用特性における多様性

第60回毒素シンポジウム、2013年7月17日~19日、兵庫

10. 大倉一人、川口遊喜、田端厚之、長宗秀明

Streptococcus anginosus 由来ストレプトリジンSホモログの分子内環形成による活性制御

第17回バイオ治療法研究会、2013年12月7日、福岡

11. 山本篤司、林大輝、立松洋平、藤田明日、大倉一人

メフェナム酸類縁体によるミトコンドリア透過性遷移の誘導とその構造特性

Properties of mefenamic acid analogues in mitochondrial permeability transition

日本薬学会第134年会、2014年3月27日~30日、熊本

12. 井戸佑介、吉富立樹、大倉一人、山本武範、篠原康雄

3つのVDAC1の偽遺伝子はラットとマウスの分岐前に形成されていた

日本薬学会第134年会、2014年3月27日~30日、熊本

13. 田端厚之、眞屋健太郎、大谷浩美、佐藤裕士、中野晃太、大倉一人、菊池賢、友安俊文、長宗秀明

β溶血性アンギノース群レンサ球菌が保有するストレプトリジンSホモログの多様性

第46回レンサ球菌研究会、2014年6月27日~28日、東京

14. 玉岡雅章、竹田望、田端厚之、大倉一人、友安俊文、大國寿士、長宗秀明

コレステロール依存性細胞溶解毒素の膜孔形成活性に対する糖の抑制効果

Investigation for the inhibitory effect of sugars on the pore-formation of cholesterol-dependent cytolysins

第87回日本生化学会、2014年10月15日~18日、京都

15. Atsushi Tabata, Kota Nakano, Yuji Sato, Kentaro Maya, Hiromi Ohtani, Yukimasa Ohkubo, Kazuto Ohkura, Ken Kikuchi, Robert Whiley, Toshifumi Tomoyasu, Hideaki Nagamune

Streptolysin S homologues of peptide hemolysin: Novel beta-hemolytic factors distributed among beta-hemolytic anginosus group Streptococci

XIX Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases 2014年11月9日~12日、アルゼンチン

16. 山本篤司、立松洋平、林大輝、藤田明日、田口諒、大倉一人

非ステロイド性抗炎症薬によるミトコンドリア膜障害を介した副作用発現機構解析

第36回生体膜と薬物の総合作用シンポジウム、2014年11月20日~21日、徳島

17. 大久保行将、安養寺夏希、田端厚之、北條恵子、友安俊文、立松洋平、大倉一人、長宗秀明

ドラッグデリバリーシステム創成を目指したSortase Aによるペプチド修飾化リポソーム作製技術の開発

第18回バイオ治療法研究会、2014年12月13日、高松

18. 立松洋平、川口遊喜、田端厚之、長宗秀

明、大倉一人

アミノ酸挿入による CT 活性の消失：天然型抗凝固薬の X 因子結合特性を指標としたアナログ分子の探索

第 18 回バイオ治療法研究会、2014 年 12 月 13 日、高松

19. 眞屋健太郎、田端厚之、大倉一人、菊池賢、友安俊文、長宗秀明

S. anginosus subsp. *whileyi* および *S. constellatus* subsp. *viborgensis* が保有する β 溶血因子の特性解析

Characterization of β -hemolytic factor of *S. anginosus* subsp. *whileyi* and *S. constellatus* subsp. *viborgensis*

第 88 回日本細菌学会総会、2015 年 3 月 26 日 ~ 28 日、岐阜

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.suzuka-u.ac.jp/education/pp/index.html>

<http://www.tokushima-u.ac.jp/hbs/>

6 . 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

長宗秀明 (NAGAMUNE, Hideaki)

徳島大学大学院ソシオテクノサイエンス

研究部ライフシステム部門

研究者番号：40189163