

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18073011

研究課題名（和文） 病原レンサ球菌の組織侵入と増殖に関与する分子群の解析

研究課題名（英文） Molecular analysis of bacterial invasion strategies and intracellular growth of 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

研究分野：医歯薬学（感染現象のマトリックス）

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，組織侵入，増殖，タンパク質，病原因子

1. 研究計画の概要

グラム陽性菌である A 群レンサ球菌による侵襲性の感染症としては、敗血症、壊死性筋膜炎等の侵襲性病態が知られている。これまでの国内外の研究グループによる侵襲性 A 群レンサ球菌感染症の発症機序の解析により、A 群レンサ球菌菌体がヒトの組織内へ侵入するメカニズムは解明されつつある。しかしながら、体内に侵入した A 群レンサ球菌が多段階的に働く免疫機構をそれぞれ回避する機序については、未だ詳細が明らかにされていない。本研究では、宿主免疫からの回避に働く A 群レンサ球菌分子群を同定し、その解析結果に基づいた侵襲性 A 群レンサ球菌感染症の予防および治療法を検索する。特に、侵襲性 A 群レンサ球菌感染症では、その感染巣に好中球の浸潤が極度に低いことが報告されているため、ヒトの初期自然免疫系に抗う A 群レンサ球菌病原因子を中心に検索を進める。また、A 群レンサ球菌と類縁の菌種である肺炎レンサ球菌についても、同様の手技で研究を行う予定である。

2. 研究の進捗状況

当初計画に従い、侵襲性 A 群レンサ球菌感染症患者由来の血液ならびに菌株の解析から、A 群レンサ球菌には好中球遊走に寄与する補体成分 C5a を分解する分子群と、オプソニン化に関与する補体成分 C3b を分解するプロテアーゼが存在することを明らかにした。すなわち、感染初期に好中球を遊走させるために重要な役割を果たす補体成分 C5a を、A 群レンサ球菌がセリンプロテアーゼ ScpA と C5a 結合能を有する GAPDH の協調作用で分解することを明らかにした。ついで、C5a の働き

で遊走して来た好中球が、効率的な感染細菌を排除する過程において、中心的に作動する補体成分 C3b を分解する A 群レンサ球菌の分子がシステインプロテアーゼ SpeB であることを示した。併せて、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した。また、C3b 分解分子を阻害する特異抗体を調整し、A 群レンサ球菌感染による重症化を抑制する知見も得た。

これらの成果により、申請計画の目標を達成することが出来たため、さらに肺炎レンサ球菌の宿主感染機構ならびに組織内増殖機構を解析することにした。

肺炎レンサ球菌は、感染の過程で肺胞上皮細胞へ付着・侵入することが推察されていたものの、関与する分子群やメカニズムは不明であった。そこで、ゲノムデータベースをモチーフ検索し、新規の組織侵入因子の候補遺伝子を 13 種類選出した。その後、*in vitro* 解析を進め、新規侵入因子である PfbA を同定した。次いで、PfbA の詳細な機能解析を分子レベルで行った。その結果、肺炎レンサ球菌の初期感染機構の一端を明らかにすることができた。

3. 現在までの達成度

<区分>

① 当初の計画以上に進展している。

<理由>

自然免疫の中心的な役割を果たす補体免疫系とそれを回避する A 群レンサ球菌分子群の同定に成功し、生化学的・細胞生物学的手法を用いて、免疫回避メカニズムの解析を推進

した。その結果、A 群レンサ球菌感染症の重症化機構の分析に関しては、当初の計画通り進捗している（研究成果；雑誌論文 1, 3-5）。さらに、A 群レンサ球菌研究で蓄積された知見と手技を応用して、肺炎レンサ球菌研究にも着手し、同菌の組織侵入因子 PfbA の同定に成功した。この計画は、当初予定よりも進捗しており、学術論文の発表も達成できた（研究成果；雑誌論文 2）。

4. 今後の研究の推進方策

好中球から A 群レンサ球菌が逃れる機構をナノスケールおよびリアルタイムで形態学的に解析する。そのために、前年度までに得られた A 群レンサ球菌病原因子の抗体を金粒子もしくは蛍光色素で標識し、原子間力顕微鏡ならびにタイムラプス蛍光顕微鏡下で、好中球と共培養する A 群レンサ球菌上の各病原因子の発現過程と動きを観察する。

さらに、近年、新たに報告された好中球の細胞外捕獲構造物 (NETs) による免疫システムを A 群レンサ球菌が回避出来るのか否かを検索する。A 群レンサ球菌に NETs 回避能が備わっていることが示された場合、NETs 回避分子を、既に構築した各種組換えタンパクおよび、各種遺伝子欠失株を用いて調べる。

また、A 群レンサ球菌で得られた知見を基に、肺炎レンサ球菌研究を推進する。ゲノムデータベースから、推定病原因子ライブラリーを構築し、二次元電気泳動スポットの質量分析の結果から、実際に発現しているタンパクのスクリーニングを行う。それら発現タンパクの配列情報を基に組換えタンパクを作製し、補体成分やケモカインの分解能を有するものを選出する。一方で、各種補体成分をビオチン等で標識し、リガンドプロット法で肺炎レンサ球菌の菌体表層および培養上清中の補体結合タンパクを検索する。標識補体成分と反応した、菌体成分のタンパクバンドは、質量分析の結果と上記の推定病原因子ライブラリーから同定する。つづいて、同定された病原因子の遺伝子欠失変異株を作製し、補体成分の分解能や捕獲能を野性株と比較する。さらに、これら組換え体を添加した場合の好中球走化性や貪食能に及ぼす影響も検討する。

5. 代表的な研究成果

(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 9 件)

1. Terao, Y., Y. Mori, M. Yamaguchi, Y. Shimizu, K. Ooe, S. Hamada and S. Kawabata. (2008): Group A streptococcal cysteine protease degrades C3 (C3b) and contributes to evasion

of innate immunity. *J. Biol. Chem.*, **283**: 6253-6260.

2. Yamaguchi, M., Y. Terao. Y. Mori, S. Hamada and S. Kawabata. (2008): PfbA, a novel plasmin- and fibronectin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae* contributes to fibronectin-dependent adhesion and antiphagocytosis. *J. Biol. Chem.*, **283**: 36272-36279.
3. Kunitomo, E., Y. Terao. S. Okamoto, T. Rikimaru, S. Hamada and S. Kawabata. (2008): Molecular and biological characterization of histidine triad protein in group A streptococci. *Microbes Infect.*, **10**: 414-423.
4. Okamoto, S., Y. Terao. Y. Tamura, S. Hamada and S. Kawabata. (2008): Streptococcal immunoglobulin-binding protein Sib35 exerts stimulatory and mitogenic effects toward mouse B lymphocytes. *FEMS Microbiol. Lett.*, **281**: 73-80.
5. Okamoto, S., Y. Terao. K. Hasuike, S. Hamada and S. Kawabata. (2008): A novel streptococcal leucine zipper protein (Lzp) binds to human immunoglobulins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **377**: 1128-1134.

[その他]

ホームページ

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