

機関番号：14401

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） 病原性レンサ球菌の組織侵入と増殖に関する分子群の解析

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

研究者番号：50273694

研究成果の概要(和文): A群レンサ球菌は、ヒトに対して致死的な侵襲性の感染症を引き起す。研究計画の開始当初、国内外の研究グループによる解析により、同菌がヒトの組織内へ侵入するメカニズムが断片的に明らかになってきていた。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かった。そこで本研究では、補体や好中球等の免疫系を回避するA群レンサ球菌の病原因子群を同定し、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した。さらに、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、同様の手法で研究を行った。

研究成果の概要(英文): *Streptococcus pyogenes* causes pharyngitis, sepsis, and rheumatic fever. Cell-associated streptococcal C5a peptidase (ScpA) protects *S. pyogenes* from phagocytosis and has been suggested to interrupt host defenses by enzymatically cleaving complement C5a, a major factor in the accumulation of neutrophils at sites of infection. How *S. pyogenes* recognizes and binds to C5a, however, is unclear. We detected a C5a-binding protein in 8 M urea extracts of *S. pyogenes* by ligand blotting using biotinylated C5a. Searching of genome databases showed that the C5a-binding protein is identical to the streptococcal plasmin receptor (Plr), also known as streptococcal surface dehydrogenase (SDH) and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). In the present study, we identified a novel function of this multifunctional protein. We examined whether the streptococcal Plr/SDH/GAPDH inhibits the biological effects of C5a on human neutrophils. Together, these results indicate that the multifunctional protein Plr/SDH/GAPDH has additional functions that help *S. pyogenes* escape detection by the host immune system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	18,600,000	0	18,600,000
2007年度	18,600,000	0	18,600,000
2008年度	18,600,000	0	18,600,000
2009年度	18,600,000	0	18,600,000
2010年度	18,600,000	0	18,600,000
総計	93,000,000	0	93,000,000

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、感染症、細菌、微生物

## 1. 研究開始当初の背景

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、未だ詳細が明らかとされていなかった。

## 2. 研究の目的

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。

## 3. 研究の方法

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する。さらに、C5a および C3b 分解が A 群レンサ球菌感染症の発症に及ぼす影響をマウスモデルにより解析する。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。

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、リガンドブ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。

## 4. 研究成果

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。今後は、形態学的な観察手技を組み合わせて、A 群レンサ球菌感染症の重症化機構の多面的な分析が期待されている。また、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を遂行することも期待されている。

A 群レンサ球菌の自然免疫回避機構の解析は、当初計画よりも早く進行した。また、近年のバイオイメージング機器の急速な進歩により、生物試料の超微細構造の観察が可能となってきた。そこで、超微細構造の形態学的な解析機器を導入し、リアルタイムおよびナノスケールでの感染現象の解析を追加的に推進した。

また、計画最終年度には、先行して実施した A 群レンサ球菌研究の手技と購入材料を転用し、肺炎レンサ球菌の細胞侵入機構と自

然免疫回避メカニズムの解明に取り組み、それぞれの関与分子群を同定することができた。

#### 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 20 件)

1. Ogawa, T., Terao, Y., Okuni, H., Ninomiya, K., Sakata, H., Ikebe, K., Maeda, Y., and Kawabata, S.: Biofilm formation or internalization into epithelial cells enable *Streptococcus pyogenes* to evade antibiotic eradication in patients with pharyngitis. ***Microb. Pathog.*, in press** (出版予定 2011 年 ; 査読有り) .
2. Ogawa, T., Terao, Y., Sakata, H., Okuni, H., Ninomiya, K., Ikebe, K., Maeda, Y., and Kawabata, S. : Epidemiological characterization of *Streptococcus pyogenes* isolated from patients with multiple onsets of pharyngitis. ***FEMS Microbiol. Lett.* 318:** 143–151, 2011 (査読有り) .
3. Okahashi, N., Nakata M., Sakurai A., Terao Y., Hoshino T., Yamaguchi Y., Isoda R., Sumitomo T., Nakano K., Kawabata S., and Ooshima T.: Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to salivary amylase and promote the biofilm formation. ***Microb. Pathog.*, 50:** 148-154, 2011 (査読有り) .
4. Sumitomo, T., Nakata M., Higashino M., Jin Y., Terao Y., Fujinaga Y., and Kawabata S.: Streptolysin S contributes to group A streptococcal translocation across an epithelial barrier. ***J. Biol. Chem.*, 286(4):** 2750-2761, 2011 (査読有り) .
5. Nakagaki, H., Sekine S., Terao Y., Toe M., Tanaka M., Shizukuishi S., Ito H., Kawabata S., McGhee JR., Fujihashi K., and Kataoka K.: *Fusobacterium nucleatum* envelope protein, FomA, is immunogenic and binds to salivary statherin-derived peptide. ***Infect. Immun.*, 78(3):** 1185-1192, 2010 (査読有り) .
6. Okahashi, N., Nakata M., Sakurai A., Terao Y., Hoshino T., Yamaguchi Y., Isoda R., Sumitomo T., Nakano K., Kawabata S., and Ooshima T.: Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to fibronectin and contribute to cell adhesion. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 391:**1192-1196, 2010 (査読有り) .
7. Yamaguchi, M., Minamide M., Terao Y., Isoda R., Ogawa T., Yokota S., Hamada S. and Kawabata S.: Nrc of *Streptococcus pneumoniae* suppresses capsule expression and enhances anti-phagocytosis. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 390(1):** 155-160, 2009 (査読有り) .
8. Terao, Y., Isoda R., Murakami, J. Hamada, S. and Kawabata, S.: Molecular and biological characterization of novel *gtf* regulation-associated genes in *Streptococcus mutans*. ***Oral Microbiol. Immunol.*, 24:** 211-217, 2009 (査読有り) .
9. Nakata, M., Köller, T. , Moritz, K., Ribardo, D., Jonas, L., McIver, K. S., Sumitomo, T., Terao, Y., Kawabata, S., Podbielski, A. and Kreikemeyer, B.: Mode of expression and functional characterization of FCT-3 pilus region encoded proteins in the *Streptococcus pyogenes* serotype M49. ***Infect. Immun.*, 77:** 32-44, 2009 (査読有り) .
10. Yamaguchi, M., Terao, Y., Hamada, S. and Kawabata, S. : PfbA, a Novel Plasmin- and Fibronectin-binding Protein of *Streptococcus pneumoniae* Contributes to Fibronectin-dependent Adhesion and Antiphagocytosis. ***J. Biol. Chem.*, 283:** 36272-36279, 2008 (査読有り) .
11. Okamoto, S., Terao, Y., Hasuike, K., Hamada, S. and Kawabata, S.: A novel streptococcal leucine zipper protein (Lzp) that binds to binds to human immunoglobulins. ***Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 377:** 1128-1134, 2008 (査読有り) .
12. Terao, Y., Mori, Y., Yamaguchi, M., Shimizu, Y., Ooe, K., Hamada, S. and Kawabata S.: Group A streptococcal cysteine protease degrades C3 (C3b) and contributes to evasion

- of innate immunity. *J. Biol. Chem.*, **283**, 6253-6260, 2008 (査読有り) .
13. Kunitomo, E., Terao, Y., Okamoto, S., Rikimaru, T., Hamada, S. and Kawabata, S.: Molecular and biological characterization of histidine triad protein in group A streptococci. *Microbes Infect.*, **10**, 414-423, 2008 (査読有り) .
  14. Okamoto, S., Terao, Y., Tamura, Y., Hamada, S. and Kawabata, S.: Streptococcal immunoglobulin-binding protein Sib35 exerts stimulatory and mitogenic effects toward mouse B lymphocytes. *FEMS Microbiol. Lett.*, **281**, 73-80, 2008 (査読有り) .
  15. Itsuki, Y., Saeki, M., Nakahara, H., Egusa, H., Irie, Y., Terao, Y., Kawabata, S., Yatani, H. and Kamisaki, H.: Molecular cloning of novel Monad binding protein containing tetratricopeptide repeat domains. *FEBS Lett.*, **582**, 2365-2370, 2008 (査読有り) .
  16. Saeki, M., Irie, Y., Ni, L., Itsuki, Y., Terao, Y., Kawabata, S. and Kamisaki Y.: Calcineurin potentiates the activation of procaspase-3 by accelerating its proteolytic maturation. *J. Biol. Chem.*, **282**, 11786-11794, 2007 (査読有り) .
  17. Okamaoto, S., Terao, Y., Kaminishi, H., Hamada, S. and Kawabata S.: Induction of immune responses by streptococcal water-insoluble alpha-glucans. *J. Dent. Res.*, **86**, 242-248, 2007 (査読有り) .
  18. Yamaguchi, M., Terao, Y., Ogawa, T., Takahashi, T., Hamada, S. and Kawabata S.: Role of *Streptococcus sanguinis* sortase A in bacterial colonization. *Microbes Infect.*, **8**: 2791-2796, 2006 (査読有り) .
  19. Terao, Y., Yamaguchi, M., Hamada, S. and Kawabata, S.: Multifunctional glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pyogenes* is essential for evasion from neutrophils. *J. Biol. Chem.*, **281**, 14215-14223, 2006 (査読有り) .
- [学会発表] (計 71 件)
1. 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.
  2. Kataoka K, Fujihashi K, Kobayashi R, Gilbert RS, Sekine S, Fukui M, Fukuyama Y, Kawabata S., Ito H, and Fujihashi K. Nasal cholera toxin activated mucosal dendritic cells, but not CD4+ T cells elicit TI-IgG class switching recombination by B-1 B cells. 14th International Congress on Immunology. August 22-27, 2010. Kobe Hyogo, Japan.
  3. 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. 88<sup>th</sup> General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research. July 14-17, 2010. Barcelona, Spain.
  4. Matsumoto-Nakano M, Nagayama K, Fujita K, Inagaki S, Takashima Y, Kawabata S., and Ooshima T. Anticariogenic effects of *Oenothera biennis* seed extracts on *Streptococcus mutans* activity. The 57th congress of the European Organization for Caries Research. July 7-10, 2010. Montpellier, France
  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. Isoda R, Terao Y., Nakata M., Sumitomo T, and Kawabata S. Neonatal exposure induced commensal-like immune-response against *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in mice. 87th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research. April 1-4, 2009. Miami, USA.
  7. Kataoka K, Nakagaki H, Terao Y., Toe M, Sekine S, Fujihashi K, Kawabata S., and Shizukuishi S. FomA specific-salivary

- secretary-IgA inhibits *Fusobacterium nucleatum* binding to statherin. 87th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research. April 1-4, 2009. Miami, USA.
8. 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.
  9. Terao Y, Yamaguchi M, Ogawa T, Kawabata S. Cysteine protease SpeB enables *Streptococcus pyogenes* to evade neutrophil immunity. FEMS 2009 3rd Congress of European Microbiologists. June 28-July 2, 2009. Gothenburg, Sweden
  10. 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.
  11. Terao Y, Mori Y, Yamaguchi M, Hamada S, Kawabata S. *Streptococcus pyogenes* degrades complements C3 and C3b to evade of innate immune system. The 8<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity. September 7-11, 2008. Higashiura, Hyogo, Japan.
  12. Yamaguchi M, Terao Y, Mori Y, Hamada S, and Kawabata S. Impact of novel multi-functional protein PfbA on adherence, invasion, and antiphagocytosis by *Streptococcus pneumoniae*. The International Union of Microbiological Societies 2008. August 5-9, 2008. Istanbul, Turkey.
  13. 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. 17<sup>th</sup> Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. June 22-26, 2008. Porto Heli, Greece.
  14. Terao Y, Mori Y, Yamaguchi M, Hamada S, and Kawabata S. Group A streptococcal cysteine protease degrades complement C3 and contributes to evasion of innate immunity in severe streptococcal infections. 108<sup>th</sup> General Meeting of American Society for Microbiology. June 1-5, 2008. Boston, USA.
  15. Lapidattanakul J, Nakano K, Kawabata S, and Ooshima T. *Streptococcus mutans* clonal variation revealed by multilocus sequence typing. The 2<sup>nd</sup> Thailand-Japan Joint Forum on Infectious Diseases. October 8, 2007. Bangkok, Thailand.
  16. Nakata M, Ribardo DA, McIver KS, Podbielski A, Kreikemeyer B, and Kawabata S. Role of the *Streptococcus pyogenes* FCT-region components in pilus assembly and virulence. The 7<sup>th</sup> Awaji International Forum on Infection and Immunity. September 1-5, 2007. Higashiura, Hyogo, Japan.
  17. Yamaguchi M, Terao Y, Mori Y, Hamada S, and Kawabata S. Plasmin(ogen)- and fibronectin-binding protein of *Streptococcus pneumoniae* provides bacterial plasmin activity. 107<sup>th</sup> General Meeting of American Society for Microbiology. May 21-25, 2007. Toronto, Canada.
  18. Nakata M, Ribardo DA, McIver KS, Kawabata S, Podbielski A, and Kreikemeyer B. Role of *Streptococcus pyogenes* FCT-region sortase and other components in pilus assembly and virulence. 107<sup>th</sup> General Meeting of American Society for Microbiology. May 21-25, 2007. Toronto, Canada.
  19. Okamoto S, Terao Y, Kaminishi H, Hamada S, and Kawabata S. Inflammatory immune responses by water-insoluble alpha-glucans from *Streptococcus sobrinus*. The 2<sup>nd</sup> International Symposium for Interface Oral Health Science. February 18-19, 2007. Sendai, Miyagi, Japan.
  20. Kawabata S, Terao Y, and Hamada S. Multifunctional glyceralaldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pyogenes* is essential for evasion from neutrophils. The 2<sup>nd</sup>

FEMS Congress of European Microbiologist.  
July 4-8, 2006. Madrid, Spain.

21. Yamaguchi M, Terao Y, Mori Y, Hamada S, and Kawabata S. Identification of a novel plasmin (ogen)- and fibronectin-binding protein in *Streptococcus pneumoniae*. The 46<sup>th</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy. September 27-30, 2006. San Francisco, CA, USA.

[図書] (計3件)

1. 浜田茂幸, 川端重忠, 西原達次, 菅井基行, 中川一路編, 口腔微生物学・免疫学第三版, 医歯薬出版社, 総279ページ. 2010.
2. 寺尾 豊, 川端重忠. A群レンサ球菌のサイババル・ストラテジー, 蛋白質核酸酵素増刊号, 共立出版, 54: 982-987, 2009.
3. 寺尾 豊, 住友倫子, 中田匡宣, 磯田竜太郎, 川端重忠. 病原性レンサ球菌の病原因子の機能解析. 生命歯科医学のカッティング・エッジ (米田俊之編). 大阪大学出版会. p68-78, 2008.

[その他]

ホームページ等

<http://web.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  
(H19～H20 分担者として参画)

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  
(H19～H20 分担者として参画)