

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06380

研究課題名(和文) 補体C1qを介した化膿レンサ球菌の補体免疫回避機構の解明

研究課題名(英文) Streptococcus pyogenes endopeptidase 0 contributes to evasion from complement-mediated bacteriolysis via human complement factor C1q

研究代表者

小川 真理子(Ogawa, Mariko)

大阪大学・歯学研究科・特任研究員

研究者番号：20754732

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、化膿レンサ球菌のエンドペプチダーゼPep0と補体C1qとの相互作用と、Pep0が補体免疫回避や菌の病原性に及ぼす影響を検討した。ELISAの結果より、Pep0はC1qと濃度依存的に結合した。さらに、低pH条件下においてPep0はIgGとC1qとの結合を阻害した。また、低pH条件下においてはPep0はヒト血清中における化膿レンサ球菌の殺菌回避に寄与した。マウス皮膚感染モデルにおいて、野生株感染病巣はpep0欠失株感染病巣より大きく、かつ病巣における補体活性は低下した。以上の結果より、化膿レンサ球菌のPep0は補体免疫回避に寄与することで、病原性を発揮することが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified an endopeptidase of *Streptococcus pyogenes*, Pep0, as an interacting molecule with complement C1q, and investigated its effects on complement immunity and pathogenesis. ELISA results revealed that Pep0 bound to C1q in a concentration-dependent manner under physiological conditions. Then, the effects of Pep0 on bacterial evasion from complement immunity was analyzed in various pH condition. Under low pH conditions, Pep0 inhibited the binding of IgG to C1q. In addition, pep0 deletion rendered *S. pyogenes* more susceptible to the bacteriocidal activity of human serum. The wild-type strain (WT)-infected tissues exhibited greater severity and lower complement activity as compared to those infected by pep0 in a mouse skin infection model. Our results suggest that interaction of *S. pyogenes* Pep0 with C1q interferes with the complement pathway, which enables *S. pyogenes* to evade complement-mediated bacteriolysis under acidic conditions.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：化膿レンサ球菌 補体 エンドペプチダーゼ 古典経路 C1q

1. 研究開始当初の背景

S. pyogenes は血液寒天培地上でβ溶血性を示すグラム陽性球菌であり、ヒトを唯一の宿主とする病原微生物である。膿痂疹や咽頭炎などの比較的軽微な疾患から、軟部組織壊死を伴い敗血症性ショックを来す劇症型化膿レンサ球菌感染症まで多彩な病態を示す。さらに、*S. pyogenes* は多様な病原因子を発現し、宿主免疫を回避することが知られている。申請者は宿主自然免疫のうち補体免疫系に着目し、これまでに *S. pyogenes* のシステインプロテアーゼが各種補体関連因子を分解することで膜侵襲複合体の形成を阻害し、宿主補体免疫を回避することを解明した。

2. 研究の目的

(1) *S. pyogenes* の病原因子のうち、補体古典経路の開始因子である補体 C1q と相互作用を示す分子を同定する。

(2) 同定した分子と C1q との相互作用の詳細を明らかにし、血清中での菌体生存および病原性に及ぼす影響を検討する。

3. 研究の方法

S. pyogenes の類縁菌種である *S. pneumoniae* の endopeptidase O (PepO) は C1q と相互作用し、オプソニン化の回避に寄与することが明らかにされている。*S. pneumoniae* の PepO は *S. pyogenes* の PepO と 68% の相互性を示すことから、PepO を C1q と相互作用を示す分子の候補とした。また、予備実験で複数の臨床分離株において、莢膜産生量の高い株は高い C1q 結合能を有したことから、莢膜も C1q と相互作用を示す候補とした。

(1) PepO の抗血清を作製し、*S. pyogenes* の臨床分離株計 20 株における PepO の発現と局在を Western blot 法にて検討した。

(2) 莢膜をコードする *has* オペロンのうち *hasA* の欠失株、相補株を作製し、菌体と C1q との結合を ELISA 法にて解析した。

(3) 組換え PepO (rPepO) を作製した。続いて、生理条件下における rPepO とヒト C1q との結合を ELISA 法にて検討し、ポジティブコントロールであるヒト IgG と C1q との結合、ネガティブコントロールである BSA と C1q との結合と比較した。また、rPepO および IgG と C1q との分子間相互作用について、表面プラズモン共鳴装置を用いて解析した。

(4) rPepO と C1q との相互作用に NaCl 濃度及び pH が及ぼす影響を、ELISA にて解析し、IgG と C1q との結合に対する作用と比較した。

(5) rPepO および IgG と C1q との結合に対する IgG と PepO の阻害作用を、競合 ELISA にて

検討した。

(6) 莢膜型 M3 の *S. pyogenes* SSI-1 野生株もしくはそれを親株とした *pepO* 欠失株 ($\Delta pepO$) を、様々な pH 条件下にて血清もしくは非働化血清と反応させ、PepO が菌体の血清中における生存に及ぼす影響を検討した。さらに、pH5.0 条件下にて血清と反応させた後の菌体表層構造を、走査型電子顕微鏡で観察した。

(7) 野生株と $\Delta pepO$ 株をそれぞれマウスに皮内感染させ、病原性に及ぼす影響を検討した。さらに、各菌株感染病巣における補体活性および集積した C1q 量を定量し、比較した。

4. 研究成果

(1) Western blot 解析の結果、PepO の発現は供試した *S. pyogenes* 20 株全ての菌株の細胞質および培養上清画分に検出された。なお、細胞壁画分にはほとんど PepO は検出されなかった。

(2) 予備実験の結果に反し、*hasA* 欠失株は野生株および相補株と比較して高い C1q 結合能を示した。この結果より、莢膜と C1q との相互作用の検討は中止した。

(3) pH7.4 の生理条件下において rPepO はヒト IgG と比較して少ないものの、C1q と濃度依存的に結合した (図 1)。さらに、rPepO は IgG と同等以上に、C1q に対して高い親和性を示した。

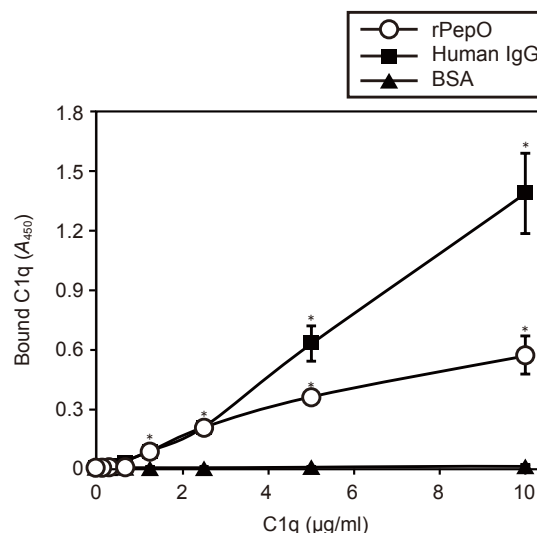


図 1. PepO と C1q との結合. * $p < 0.05$ (vs. BSA)

(4) rPepO と C1q との結合は IgG と C1q との結合と同様に、高濃度の NaCl 存在下にて阻害された (図 2)。

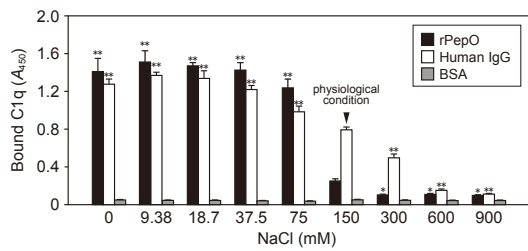


図 2. PepO および IgG と C1q との結合に NaCl 濃度が及ぼす影響. $**p < 0.01$, $*p < 0.05$ (vs. physiological condition).

また、rPepO と C1q は、低い pH 条件下において高い結合性を示した。一方、IgG と C1q とは高い pH 条件において結合量が増加する傾向が認められた (図 3)。

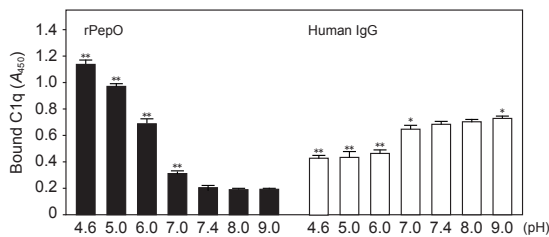


図 3. PepO および IgG と C1q との結合に pH が及ぼす影響. $**p < 0.01$, $*p < 0.05$ (vs. pH7.4)

(5) pH 5.0 条件下では、IgG は rPepO と C1q との結合に影響を及ぼさなかった (図 4A)。一方、IgG と C1q の結合を PepO は濃度依存的に阻害した (図 4B)。

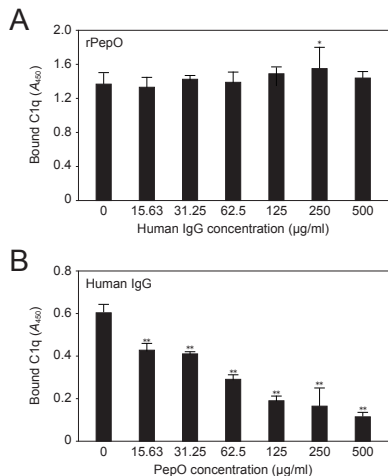


図 4. pH 5.0 条件下において PepO および IgG と C1q との結合に IgG および PepO が及ぼす影響。

(6) pH5.0 条件下では、ヒト血清存在下における $\Delta pepO$ の菌数増加率は野生株と比較して有意に低下した (図 5A)。一方、非働化血清と反応させた場合、野生株と $\Delta pepO$ の菌数増加率に有意差は認められなかった。なお、pH の上昇に伴い、PepO による補体関連殺菌回避作用は低下した (図 5B, C)。

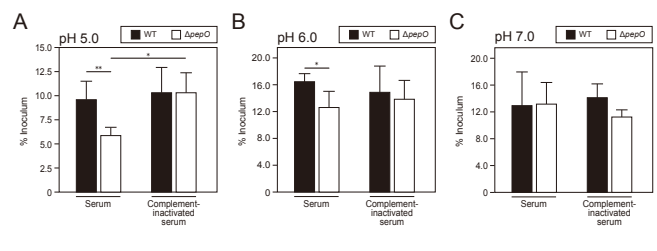


図 5. pH 5.0, 6.0, 7.0 条件下において PepO が血清もしくは非働化血清存在下での菌の生存に及ぼす影響. $**p < 0.01$, $*p < 0.05$

また、pH5.0 条件下におけるヒト血清と反応させた菌体の表層構造については、 $\Delta pepO$ では野生株と比較して著明な表層構造の破壊が認められた。一方、非働化血清と反応させた菌については野生株、 $\Delta pepO$ 共に表層構造の破壊は認められなかった (図 6)。

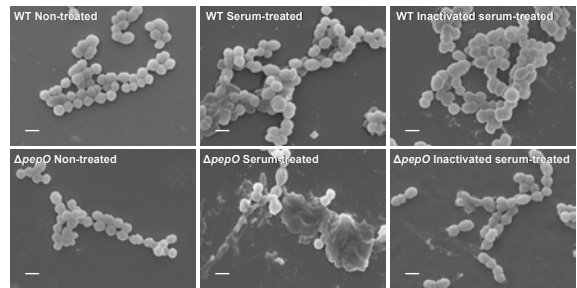


図 6. pH 5.0 条件下において PepO が血清存在下での菌の表層構造保持に及ぼす影響

(7) マウス皮膚感染モデルにおいて、 $\Delta pepO$ 感染による皮膚病巣の面積は野生株感染時と比較して有意に減少した (図 7A, B)。

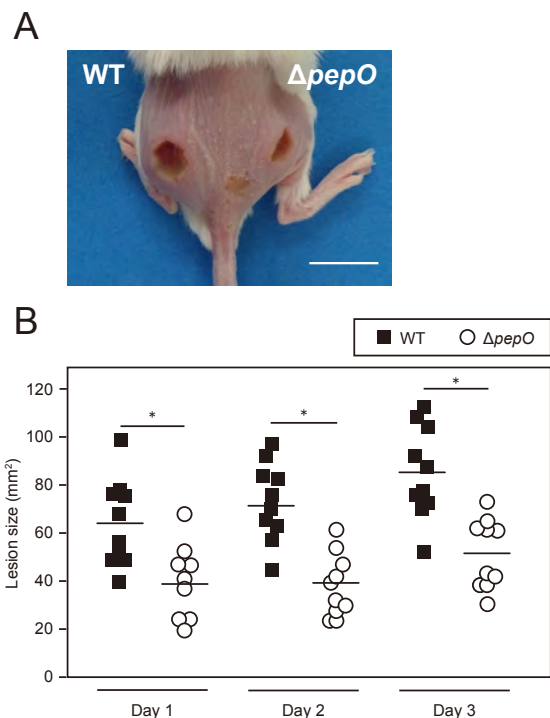


図 7. PepO が皮膚病変形成に及ぼす影響. (A) 感染 3 日後のマウス背部の典型像. (B) 感染 1~3 日後のマウスの背部の病巣サイズをデンシトメトリック解析にて定量した. * $p < 0.05$

さらに、野生株感染マウス皮膚病巣組織における補体活性は、 $\Delta pepO$ 感染マウスと比較して低かった (図 8 左). また、野生株感染皮膚病巣の C1q 量は $\Delta pepO$ 感染マウスと比較して有意に高かった (図 8 右).

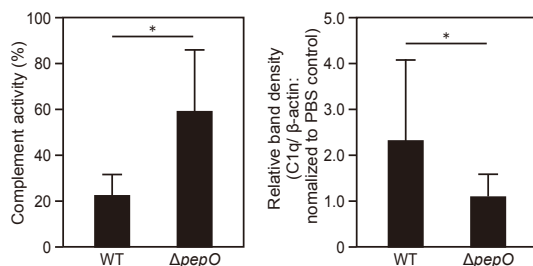


図 8. (左) PepO が *S. pyogenes* 感染病巣における補体活性に及ぼす影響 (右) PepO が *S. pyogenes* 感染病巣における C1q 量に及ぼす影響

以上の結果より、*S. pyogenes* の PepO は炎症病巣において、C1q との結合により補体古典経路を阻害することで殺菌を回避し、菌の病原性に寄与することが示唆された。

本研究結果は、*S. pyogenes* の PepO による補体免疫回避機能の影響について、国内外で初めての報告である。今後は既報の PepO の他の機能と本研究で明らかにされた機能との関連性、さらには *S. pyogenes* の病原性に及ぼす影響の詳細について明らかにする予定である。

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 1 件)

① Honda-Ogawa M, Sumitomo T, Mori Y, Hamd DT, Ogawa T, Yamaguchi M, Nakata M, Kawabata S. *Streptococcus pyogenes* endopeptidase O contributes to evasion from complement-mediated bacteriolysis via binding to human complement factor C1q. *J Biol Chem*. 査読有. 2017 Mar 10;292(10):4244-4254. DOI: 10.1074/jbc.M116.749275. <http://www.jbc.org/content/292/10/4244.full.pdf>

[学会発表] (計 6 件)

① 小川 真理子. 補体 C1q を介した化膿レンサ球菌の補体免疫回避機構の解明. 第 3 回口腔微生物研究会. 2015 年 9 月 11 日. ホテルメッツ新潟 (新潟).

② 本多 真理子, 住友 倫子, 毛利 泰士, 山口 雅也, 中田 匡宣, 川端 重忠. A 群レンサ球菌の endopeptidase O による補体 C1q を介し

た補体免疫回避機構. 第 89 回日本細菌学会総会. 2016 年 3 月 23~25 日. 大阪国際交流センター (大阪).

③ M. Honda, T. Sumitomo, Y. Mori, M. Yamaguchi, M. Nakata, S. Kawabata. Involvement of Group A streptococcal endopeptidase O in evasion from complement-mediated bacteriolysis via binding to complement C1q. The 13th Korea - Japan International Symposium on Microbiology (X-KJISM). 2016 年 5 月 12~13 日. 慶州 (韓国).

④ 本多 真理子, 住友 倫子, 毛利 泰士, Dalia Hamd, 山口 雅也, 中田 匡宣, 川端 重忠. *Streptococcus pyogenes* が産生する endopeptidase O と C1q の結合による補体免疫回避機構. 第 48 回レンサ球菌研究会. 2016 年 7 月 8~9 日. 長崎大学 (長崎市).

⑤ 小川 真理子, 住友 倫子, 毛利 泰士, 山口 雅也, 中田 匡宣, 川端 重忠. C1q との相互作用を介する化膿レンサ球菌の補体免疫回避機構. 第 58 回 歯科基礎医学会学術大会. 2016 年 8 月 24~26 日. 札幌コンベンションセンター (札幌).

⑥ 本多 真理子, 住友 倫子, 山口 雅也, 中田 匡宣, 川端 重忠. 化膿レンサ球菌の endopeptidase O と補体 C1q の相互作用が病原性に及ぼす影響. 第 90 回 日本細菌学会総会. 2016 年 3 月 19~21 日. 仙台国際センター (仙台).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[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

小川 真理子 (OGAWA, Mariko)
大阪大学・大学院歯学研究科・特任研究員
研究者番号：20754732

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()