

令和元年6月3日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19751

研究課題名（和文）菌体表層に存在する線維状タンパク質重合体の会合と抗原性がもたらす病原性の探索

研究課題名（英文）Exploration of pathogenicity caused by association and antigenicity of fibrous protein polymers present on the bacterial cell surface

研究代表者

中田 匡宣（Nakata, Masanobu）

大阪大学・歯学研究科・准教授

研究者番号：90444497

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：化膿レンサ球菌は血清型依存性に多様な線毛を産生する。構造解析の結果から、メジャーサブユニット分子間の静電的相互作用が認められた。変異株と組換えタンパク質を用いた解析から、この静電的相互作用はメジャーサブユニットの重合度を変化させ、ヒト角化上皮細胞への菌体付着とバイオフィーム形成能に影響することが明らかになった。したがって、これまでに明らかになっていない線毛分子間の相互作用が病原性に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グラム陽性細菌の線毛タンパク質の間に生じる静電作用はこれまで報告されてこなかった。近年、化膿レンサ球菌の感染症は社会的に問題になっており、ワクチンの開発が求められている。線毛タンパク質はワクチン抗原の候補とされているため、線毛間相互作用の生物学的意義が明らかになれば、構造と機能を基礎にした抗原設計が可能になる。また、様々な病原性グラム陽性細菌が同様の線毛を産生するため、他菌種においても新規の線毛間相互作用の発見に繋がる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：Streptococcus pyogenes produce diverse varieties of pili in a serotype-dependent manner. Structural analysis of the major subunit indicated electrostatic interactions between major subunit molecules. Analysis using mutant strains and recombinant proteins revealed that the electrostatic interaction altered the degree of polymerization of major subunits and affected the ability of Streptococcus pyogenes to adhere to human keratinocytes and to form biofilms. Therefore, it was suggested that the interaction between pilus molecules is involved in virulence.

研究分野：細菌学

キーワード：レンサ球菌 線毛

## 1. 研究開始当初の背景

化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) は主にヒトの上気道や皮膚に局所性の化膿疾患を惹起する。唯一の宿主はヒトである。局所性の化膿疾患が治癒した後、続発症として、急性糸球体腎炎やリウマチ熱を惹き起こす。壊死性筋膜炎や敗血症を伴う劇症型感染症を惹起する場合もあり、致死率は約 30%にもおよび。近年、感染者数が増加しており、感染予防法と治療法の開発が待ち望まれている。化膿レンサ球菌は様々な菌体表層分子を介してヒトの細胞に付着し、組織に定着する。代表的な付着因子として、線毛が知られている。化膿レンサ球菌は血清型依存性に多様な線毛を産生する。線毛タンパク質はトリプシン耐性抗原 (T 抗原) として知られ、その抗原性は臨床現場において血清型分類 (T 型別) に用いられてきた。化膿レンサ球菌の線毛は、1 種のメジャーサブユニットと 1~2 種のマイナーサブユニットがイソペプチド結合で連結され、最終的に細胞壁の遊離アミノ基に架橋される。メジャーサブユニット分子内にはイソペプチド結合が存在し、線毛タンパク質のタンパク質分解酵素に対する耐性と構造安定性に寄与することが知られていた。また、他のグラム陽性菌の線毛についても同様にイソペプチド結合による連結と分子内のイソペプチド結合が線毛構造の安定性に寄与することが報告されてきた。化膿レンサ球菌の線毛の発現機構と機能の解析を行う過程において、これまでに報告されていないメジャーサブユニット間の分子間相互作用に着目した。

## 2. 研究の目的

化膿レンサ球菌の対合する線毛メジャーサブユニット 2 分子の間で静電的な親和性が認められたため、この線毛サブユニット間の推定相互作用が *in vivo* で起こるかについて検証し、線毛の機能や病原性に関わる表現型に影響するかについて明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 化膿レンサ球菌の培養と線毛タンパク質の検出

化膿レンサ球菌の培養は大気下で 0.2% の酵母エキスを含む Todd Hewitt 培地 (THY 培地) で行った。通常の培養温度である 37°C と体表温度を反映する 25°C において菌株を一晩培養もしくは対数増殖期まで培養した。低張緩衝液を用いて、 $\mu$  タノリジン抽出により細胞表層画分を調製した。3~10% アクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE によりタンパク質を展開し、ニトロセルロース膜に転写した。室温で 1 時間のブロッキングを行い、0.1% Tween20 を含む Tris 緩衝液 (TBST) で 3 回洗浄した後、TBST で 1,000 倍希釈した抗メジャーサブユニットマウス抗血清と 37°C で 1 時間反応させた。ニトロセルロース膜を TBST で 3 度の洗浄後、2,000 倍希釈したホースラディッシュペルオキシダーゼ標識マウス IgG 抗体と 37°C で 1 時間反応させた。TBST で 3 回洗浄後、ECL 発光液と反応させ、レントゲンフィルムに密着させてオートグラフィーを行った。

### (2) 線毛メジャーサブユニット遺伝子変異株とその相補株の作製

線毛メジャーサブユニットをコードする遺伝子について、温度感受性プラスミドを用いて、抗菌薬耐性遺伝子を有さないインフレーム遺伝子欠失株の作製を行った。そして、シャトルベクターを用いて、野生型もしくは変異型メジャーサブユニット遺伝子を発現させ、再導入株を作製した。変異型メジャーサブユニット遺伝子には、静電的相互作用を担うと推定されるアミノ酸残基をアラニン残基に変異させるよう設計した。一方、プラスミド保持に必要な抗菌薬の成長度や表現型に対する影響と線毛サブユニット量の不適切なストイキオメトリが予想されたことから、メジャーサブユニット遺伝子欠失株の染色体 DNA へ野生型もしくは変異型メジャーサブユニット遺伝子を組込んだ株を作製した。

### (3) 組換えタンパク質の作製

メジャーサブユニットのシグナル配列とカルボキシル基末端側を除く断片をコードする DNA をヒスチジンタグ融合タンパク質発現プラスミドに挿入し、大腸菌に形質転換を行った。対数増殖期まで培養を行い、1 mM の Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside を添加し、アミノ基末端側にヒスチジンタグを融合させたメジャーサブユニット組換えタンパク質の産生誘導を 30°C で 3 時間行った。菌体を回収した後、破碎し、菌体破碎液を調製した。そして、Ni-NTA レジンを用いたアフィニティークロマトグラフィー、およびゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。得られたタンパク質の濃度は BCA 法により決定した。

### (4) タンパク質分解酵素に対する耐性の検討

上記で作製した野生型ならびに静電的相互作用を担う残基群に変異を導入した組換えメジャーサブユニットタンパク質とトリプシン溶液を混和し、37°C で反応させた。経時的に反応を停止させ、SDS-PAGE とウェスタンブロット解析により、組換えタンパク質の分解を検討した。

### (4) ヒト角化細胞への菌体付着能の検討

ヒト皮膚由来の角化細胞 HaCaT を用いて菌体付着試験を行った。抗菌薬が非存在下の条件下で角化細胞数と細菌数 (colony forming unit) の比率を 10 として 2 時間の感染を行った。リン酸緩衝液で 3 度の洗浄を行った後、超純水で角化細胞を溶解した。段階希釈した溶解液を寒天培地に播種し、37°C で 24 時間の培養を行った。生育した集落数から付着率を算出した。

#### (5) バイオフィーム形成能の検討

一晚培養菌液を C 培地 (0.5% Proteose peptone 3, 1.5% Yeast extract, 10 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.4 mM MgSO<sub>4</sub>, 17 mM NaCl) で 10 倍希釈し, 96 穴プレートに播種し, 24~48 時間の培養を行った。リン酸緩衝液で 3 回洗浄し, 0.2% クリスタルバイオレット溶液で染色した。リン酸緩衝液で 3 回洗浄後, 100 µl の 1% SDS 溶液で懸濁し, その吸光度 (A<sub>550</sub>) を測定した。

#### 4. 研究成果

メジャーサブユニット遺伝子の欠失株にシャトルベクターを用いて野生型もしくは変異型メジャーサブユニット遺伝子を発現させた菌株を用いた解析から, 変異によりメジャーサブユニットの重合度は上昇することが明らかになった。さらに, 染色体 DNA に同様の変異を導入した変異株を作製し, 細胞壁画分の線毛発現を検討した結果, 同様の傾向が認められた。変異型メジャーサブユニットには静電的相互作用を担うと推定されるアミノ酸残基をアラニン残基に置換させたことから, メジャーサブユニットの分子間相互作用が線毛重合過程に影響を与えることが示唆された。野生型ならびに変異型の組換えメジャーサブユニットタンパク質を作製し, タンパク質分解酵素に対する感受性を検討した結果, 感受性に有意な差は認められなかった。上記菌株の培養皮膚角化細胞への菌体付着能とバイオフィーム形成能に及ぼす影響について検討した結果, 菌株依存的に変化が認められたため, メジャーサブユニットの分子間静電的相互作用は宿主との相互作用とバイオフィーム形成能に影響を及ぼす可能性が考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 16 件)

1. [Yamaguchi M](#), Goto K, Hirose Y, Yamaguchi Y, [Sumitomo T](#), [Nakata M](#), Nakano K, [Kawabata S](#). 2019. Identification of evolutionarily conserved virulence factor by selective pressure analysis of *Streptococcus pneumoniae*. *Communications Biology*. 2:96. doi: 10.1038/s42003-019-0340-7. 査読有.
2. Hirose Y, [Yamaguchi M](#), Goto K, [Sumitomo T](#), [Nakata M](#), [Kawabata S](#). 2018. Competence-induced protein Ccs4 facilitates pneumococcal invasion into brain tissue and virulence in meningitis. *Virulence*. 9:1576-1587. doi:10.1080/21505594.2018.1526530. 査読有.
3. Ota C, Morisaki H, [Nakata M](#), Arimoto T, Fukamachi H, Kataoka H, Masuda Y, Suzuki N, Miyazaki T, Okahashi N, Kuwata H. 2018. *Streptococcus sanguinis* noncoding cia-Dependent Small RNAs negatively regulate expression of type IV pilus retraction ATPase PilT and biofilm formation. *Infection and Immunity*. 86:pil: e00894-17. doi: 10.1128/IAI.00894-17. 査読有.
4. [Sumitomo T](#), Mori Y, Nakamura Y, Honda-Ogawa M, Nakagawa S, Yamaguchi M, Matsue H, Terao Y, [Nakata M](#), [Kawabata S](#). 2018. Streptococcal cysteine protease-mediated cleavage of desmogleins is involved in the pathogenesis of cutaneous infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 8:10. doi:10.3389/fcimb.2018.00010. 査読有.
5. Kriebel K, Hieke C, Müller-Hilke B, [Nakata M](#), Bernd Kreikemeyer. 2018. Oral biofilms from symbiotic to pathogenic interactions and associated disease – Connection of Periodontitis and Rheumatic arthritis by peptidylarginine deiminase. *Frontiers in Microbiology*. 9:53. doi: 10.3389/fmicb.2018.00053. 査読有.
6. Isenring J, Köhler J, [Nakata M](#), Frank M, Jans C, Renault P, Danne C, Dramsi S, Kreikemeyer B, Oehmcke-Hecht S. 2018. *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus* endocarditis isolate interferes with coagulation and activates the contact system. *Virulence*. 9:248-261. doi: 10.1080/21505594.2017.1393600. 査読有.
7. Honda-Ogawa M, [Sumitomo T](#), Mori Y, Hamd DT, Ogawa T, [Yamaguchi M](#), [Nakata M](#), [Kawabata S](#). 2017. *Streptococcus pyogenes* endopeptidase O contributes to evasion from complement-mediated bacteriolysis via binding to human complement factor C1q. *The Journal of Biological Chemistry*. 292: 4244-4254. doi:10.1074/jbc.M116.749275. 査読有.
8. [Yamaguchi M](#), [Nakata M](#), Sumioka R, Hirose Y, Wada S, Akeda Y, [Sumitomo T](#), [Kawabata S](#). 2017. Zinc metalloproteinase ZmpC suppresses experimental pneumococcal meningitis by inhibiting bacterial invasion of central nervous systems. *Virulence*. 8:1516-1524. doi:10.1080/21505594.2017.1328333. 査読有.

[学会発表](計 31 件)

1. 李怡萱, 中田匡宣, 山口雅也, 住友倫子, 川端重忠. PilX is a pilus subunit of *Streptococcus sanguinis* that contributes to biofilm formation. 2018. 第 6 回口腔微生物研究会。
2. 山口雅也, 後藤花奈, 広瀬雄二郎, 竹村萌, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. *Streptococcus pneumoniae* のコリン結合タンパク質群の系統関係と種内における選択圧の解析. 2018. 第 6 回口腔微生物研究会。
3. Hirose Y, [Yamaguchi M](#), Goto K, [Sumitomo T](#), [Nakata M](#), [Kawabata S](#). Pneumococcal Ccs4 facilitates its invasion into brain tissue and develops meningitis. 2018. ASM Microbe 2018.

4. Yamaguchi M, Goto K, Hirose Y, Yamaguchi Y, Sumitomo T, Nakata M, Kawabata S. Identification of novel pneumococcal virulence factor CbpJ by molecular evolutionary analysis. 2018. Gordon Research Conference.
5. 李怡萱, 中田匡宣, 岡橋暢夫, 山口雅也, 住友倫子, 川端重忠. Component analysis of cell-wall anchored pili of *Streptococcus sanguinis*. 2018. 第 60 回歯科基礎医学会学術大会.
6. 岡橋暢夫, 中田匡宣, 広瀬雄二郎, 桑田啓貴, 川端重忠. ミテイス群レンサ球菌が産生する過酸化水素はマスト細胞の細胞死を誘導し, 脱顆粒を抑制する. 2018. 第 60 回歯科基礎医学会学術大会.
7. 東孝太郎, 武部克己, 山口雅也, 住友倫子, 中田匡宣, 鈴木守, 川端重忠. 化膿レンサ球菌におけるヒアルロン酸分解酵素の分子系統解析およびタンパク質構造解析. 2018. 第 60 回歯科基礎医学会学術大会.
8. 山口雅也, 後藤花奈, 広瀬雄二郎, 竹村萌, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. 分子進化解析に基づく肺炎球菌のコリン結合タンパク質群の選択圧の評価. 2018. 第 60 回歯科基礎医学会学術大会.
9. 広瀬雄二郎, 山口雅也, 毛利泰士, 後藤花奈, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. 化膿レンサ球菌のアルギニンデヒミナーゼ ArcA は低グルコース環境下で病原因子の発現に寄与する. 2018. 第 60 回歯科基礎医学会学術大会.
10. 後藤花奈, 山口雅也, 広瀬雄二郎, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. *Streptococcus pneumoniae* の CbpJ は肺炎において好中球からの殺菌回避に寄与する. 2018. 第 50 回レンサ球菌研究会.
11. 長瀬賢史, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠, 岡本成史. インフルエンザウイルスと *Streptococcus sanguinis* の共感染による肺炎発症メカニズムの解析. 2018. 第 50 回レンサ球菌研究会.
12. 山口雅也, 中田匡宣, 住友倫子, 川端重忠. 肺炎球菌のジンクメタロプロテアーゼ ZmpC が髄膜炎発症に果たす役割の解明. 2018. 第 38 回近畿腸管微生物研究会.
13. 山口雅也, 広瀬雄二郎, 後藤花奈, 竹村萌, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. 肺炎球菌の  $\beta$ -ヘリックス構造タンパク質 PfbA を介した貪食回避機構の解析. 2018. 第 91 回日本細菌学会総会.
14. 後藤花奈, 山口雅也, 広瀬雄二郎, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. 肺炎球菌のコリン結合タンパク質 CbpJ および CbpL の肺炎発症における役割の解析. 2018. 第 91 回日本細菌学会総会.
15. 広瀬雄二郎, 山口雅也, 後藤花奈, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. *Streptococcus pneumoniae* Ccs4 は脳血管内皮細胞への付着・侵入を促進する病原因子である. 2017. 第 40 回日本分子生物学会.
16. 後藤花奈, 山口雅也, 広瀬雄二郎, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. 肺炎球菌の CbpJ が肺炎発症に果たす役割の解析. 2017. 第 70 回日本細菌学会関西支部総会.
17. 住友倫子, 中田匡宣, 山口雅也, 川端重忠. A 型インフルエンザウイルス感染に伴い表在化する GP96 は化膿レンサ球菌の上皮細胞への付着を亢進させる. 2018. 第 65 回日本ウイルス学会学術集会.
18. 後藤花奈, 山口雅也, 広瀬雄二郎, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. *Streptococcus pneumoniae* のコリン結合タンパク質 CbpJ は肺炎発症に寄与する. 2017. 第 5 回 五大学・口腔微生物研究会.
19. 中田匡宣, 住友倫子, 川端重忠. 化膿レンサ球菌における温度感受性の線毛発現機構. 2017. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会.
20. 岡橋暢夫, 中田匡宣, 住友倫子, 桜井敦朗, 桑田啓貴, 川端重忠. 口腔レンサ球菌が産生する過酸化水素は上皮細胞に対する細胞傷害性を有する. 2017. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会.
21. 住友倫子, 中田匡宣, 山口雅也, 川端重忠. インフルエンザウイルス感染による Snail の発現誘導は化膿レンサ球菌の上皮バリア突破を亢進させる. 2017. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会.
22. 後藤花奈, 山口雅也, 広瀬雄二郎, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. *Streptococcus pneumoniae* のコリン結合タンパク質 CbpJ は肺炎発症における病原因子として働く. 2017. 第 59 回歯科基礎医学会学術大会.
23. 山口雅也, 中田匡宣, 広瀬雄二郎, 後藤花奈, 住友倫子, 川端重忠. 化膿レンサ球菌のヒアルロン酸分解酵素 HylA の分子系統解析と病原性に果たす役割の解析. 2017. 第 49 回レンサ球菌研究会.
24. 中田匡宣, 住友倫子, 山口雅也, 川端重忠. 化膿レンサ球菌の線毛発現機構. 2017. 第 37 回近畿腸管微生物研究会.

[図書](計 1 件)

1. 中田匡宣, 川端重忠. レンサ球菌の病原因子. 特集「改めて考えるレンサ球菌感染症」, 化学療法の領域 (医薬ジャーナル社). 2017. 33:35-42.

〔その他〕  
ホームページ等  
<https://web.dent.osaka-u.ac.jp/mcrbio/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：川端 重忠  
ローマ字氏名：KAWABATA, shigetada  
所属研究機関名：大阪大学  
部局名：歯学研究科  
職名：教授  
研究者番号（8桁）：50273694

研究分担者氏名：住友 倫子  
ローマ字氏名：SUMITOMO, tomoko  
所属研究機関名：大阪大学  
部局名：歯学研究科  
職名：講師  
研究者番号（8桁）：50423421

研究分担者氏名：山口 雅也  
ローマ字氏名：YAMAGUCHI, masaya  
所属研究機関名：大阪大学  
部局名：歯学研究科  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：00714536

研究分担者氏名：鈴木 守  
ローマ字氏名：SUZUKI, mamoru  
所属研究機関名：大阪大学  
部局名：たんばく質研究所  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：40280507