

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390410

研究課題名(和文) 補体制御因子を不活化し侵襲性感染症を誘発させる細菌分子の探索

研究課題名(英文) Exploration of bacterial factors that inactivate complement regulatory factors and induce invasive infectious diseases

研究代表者

川端 重忠 (Kawabata, Shigetada)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50273694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：侵襲性のレンサ球菌感染症では、ヒト体内に侵入した細菌が免疫機構による殺菌から回避することにより病態が増悪すると考えられている。本研究では、A群レンサ球菌が産生する分泌型タンパク分解酵素 SpeB が、補体系の制御因子であるC1エステラーゼインヒビターを分解し、本菌の免疫回避と補体系の攪乱に寄与することを示した。また、亜急性心内膜炎から高頻度に分離されるレンサ球菌について、好中球による殺菌からの回避機構の一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Evasion of the human immune system is a hallmark of pathogenic streptococci that cause invasive infections, and leads to exacerbation of pathological condition during the course of infection. In this study, we revealed that a group A streptococcal protease, SpeB, cleaves C1 esterase inhibitor, and the cleavage is attributable to bacterial survival and aberration of complement system. Moreover, we demonstrate a mechanism by which streptococcus species frequently isolated from subacute bacterial endocarditis evades neutrophil killing.

研究分野：細菌学

キーワード：レンサ球菌 補体 免疫回避

## 1. 研究開始当初の背景

ヒトに病原性を示す多くの細菌は免疫システムを回避することが知られている。侵襲性のレンサ球菌感染症では、免疫回避能を有するレンサ球菌がヒト組織内で急速に増殖し、組織破壊を惹起する。しかし、レンサ球菌由来の病原因子だけでは説明困難な激しい組織破壊を伴う場合が認められる。

ヒトには組織に侵入した微生物から普遍的に身体を防御する自然免疫系が備わっている。自然免疫システムとして、補体カスケードや NETs (neutrophil extracellular traps) が挙げられる。補体カスケードや NETs はあらゆる病原微生物を排除する必要があるため、宿主の組織に対しても作動し傷害を与える危険性を孕んでいる。そのため、生体内には宿主細胞を保護する制御因子が複数存在する。病原性レンサ球菌はこのような免疫機構や制御因子の機能を抑制し、免疫を回避するとともに、病態を増悪させる可能性が考えられた。しかし、病原性レンサ球菌が補体制御因子や NETs に作用して免疫を回避し、攪乱させる機構についての詳細は明らかではなかった。

## 2. 研究の目的

(1) 侵襲性感染症を引き起こす細菌は、補体制御因子を不活化する分子を有し、補体カスケードの矛先を宿主へ転換させ、自己侵襲的に病態を増悪させるのではないかという仮説を立てた。*Streptococcus pyogenes* は壊死性筋膜炎や多臓器不全などを伴う劇症型レンサ球菌感染症の起原菌である。本菌が補体制御因子に影響を与えるかについて明らかにし、併せて、補体制御因子に作用する新規の因子を同定することを目的とした。

(2) 亜急性心内膜炎から最も高頻度に分離される *Streptococcus sanguinis* は病巣に疣贅を形成する。疣贅の臨床検体には NETs が観察されるという報告があることから、*S. sanguinis*

は NETs による殺菌から回避するという可能性が考えられた。*S. sanguinis* の NETs 分解能を検討し、NETs による殺菌を回避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) 補体制御因子として、C1 esterase inhibitor (C1-INH) に着目し、*S. pyogenes* 臨床分離株が血清中の C1-INH を分解するかについて、*S. pyogenes* 培養上清とヒト血清を反応させた後、抗 C1-INH 抗体を用いたウェスタンブロット法で検討した。続いて、C1-INH 分解能を呈した臨床分離株において、分解を担うプロテアーゼを検索した。同定した分子について、*S. pyogenes* 臨床分離株における発現量と C1-INH 分解能の相関を確認した。同定分子の組換えタンパクならびに変異株を作製し、C1-INH 分解能の検討とエドマン分解法による C1-INH 切断部位の決定を行った。野生株と変異株を用いて、ヒト血清中での生存率を解析するとともに、菌体の形態を走査型電子顕微鏡で観察した。さらに、血清中における菌体への補体沈着量をフローサイトメトリー解析により検討した。同定分子の組換えタンパクが補体因子を分解するかについても検討を行った。

(2) *S. sanguinis* について、NETs の主要構成成分である DNA を分解する表層分子を *in silico* 解析により検索した。得られた候補分子について、組換えタンパクを作製し、DNA 分解能と RNA 分解能を検討した。また、遺伝子欠失株および復帰変異株を作製し、ヒトの好中球から誘導した NETs 中での生存率を経時的に検討した。さらに、*Lactococcus lactis* 異種発現系を用いて同様の解析を行った。

## 4. 研究成果

(1) *S. pyogenes* 臨床分離株の培養上清には C1-INH 分解活性が認められた。分解を担う

プロテアーゼを検索した結果，細胞外に分泌されるシステインプロテアーゼ SpeB であることが明らかになった．各臨床分離株の SpeB 産生量と C1-INH 分解能は相関した．組換え SpeB による C1-INH の切断は I49 と S50 間ならびに V127 と T128 間で起こることが示唆された．これらの切断部位は C1-INH 立体構造の維持に必要であるジスルフィド結合に近接していた．また，後者の切断部位は C1-INH 欠損症である遺伝性血管浮腫 II 型におけるアミノ酸配列欠損部位と重複していたことから，SpeB による C1-INH の部分的な分解によっても，C1-INH の構造変化と機能低下が惹起されることが示唆された．ヒト血清中における野生株および *speB* 変異株の生菌数を比較したところ，*speB* 変異株の生菌数は野生株と比較して有意に少なかった．SpeB 組換え体は C2，C3b，C4，C5a，C6，C7，C8，C9，および膜侵襲複合体を分解した．ヒト血清と反応させた野生株と *speB* 変異株を走査型電子顕微鏡で観察した結果，野生株と比較して，*speB* 変異株では，膜侵襲複合体の形成によると考えられた菌体表層構造の破壊が認められた．また，フローサイトメトリー解析により菌体表層への C9 沈着を検討したところ，C9 の沈着は *speB* 変異株でのみ認められた．これらの結果から，SpeB は C1-INH や補体成分を分解することにより，*S. pyogenes* の生存に寄与することが明らかになった．また，SpeB は C1-INH の分解により補体系の過剰な活性化を惹起し，補体分子群の量的均衡の破綻により組織傷害が起こされる可能性が示唆された．

(2) *S. sanguinis* の菌体表層分子群のアミノ酸配列を用いてドメイン検索を行い，ヌクレアーゼドメインを有する細胞壁架橋型タンパク SWAN を同定した．*swan* 遺伝子の欠失により *S. sanguinis* の細胞外 DNA 分解活性は低下したことから，SWAN は主な細胞外 DNase

であることが示唆された．組換え SWAN は NETs DNA を含む各種 DNA ならびにヒト由来の RNA を分解したことから，SWAN はヌクレアーゼであることが明らかになった．ヒト好中球から誘導した NETs 中での菌体生存率を検討した結果，野生株と比較して，*swan* 欠失株の生存率は有意に低下した．*L. lactis* 異種発現系を用いた解析においても同様の傾向が認められた．これらの結果から，細胞外に表出される SWAN のヌクレアーゼ活性により，*S. sanguinis* は NETs の DNA を分解し，NETs による殺菌から回避する可能性が示唆された

## 5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Morita C, Sumioka R, Nakata M, Okahashi N, Wada S, Yamashiro T, Hayashi M, Hamada S, Sumitomo T, and Kawabata S. 2014. Cell wall-anchored nuclease of *Streptococcus sanguinis* contributes to escape from neutrophil extracellular trap-mediated bacteriocidal activity. *PLoS One* 9: e103125. 査読有. doi: 10.1371/journal.pone.0103125.

Okahashi N, Sumitomo T, Nakata M, Sakurai A, Kuwata H, and Kawabata S. 2014. Hydrogen peroxide contributes to the epithelial cell death induced by the oral mitis group of streptococci. *PLoS One* 9(1): e88136. 査読有. doi: 10.1371/journal.pone.0088136.

Beulin DS, Yamaguchi M, Kawabata S, and Ponnuraj K. 2014. Crystal structure of PfbA, a surface adhesion of *Streptococcus pneumoniae*, provides hints into its interaction with fibronectin. *Int J Biol Macromol* 64: 168-173. 査読有. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.11.035.

Yamaguchi M, Terao Y, Mori-Yamaguchi Y, Domon H, Sakaue Y, Yagi T, Nishino K, Yamaguchi A, Nizet V, and Kawabata S. 2013. *Streptococcus pneumoniae* invades erythrocytes and utilizes them to evade human innate immunity. *PLoS One* 8: e77282. 査読有. doi: 10.1371/journal.pone.0077282.

Honda-Ogawa M, Ogawa T, Terao Y, Sumitomo T, Nakata M, Ikebe K, Maeda Y, and Kawabata S. 2013. Cysteine proteinase from *Streptococcus pyogenes* enables evasion of innate immunity via degradation of complement factors. *J Biol Chem* 288:

15854-15864. 査読有. doi: 10. 1074/jbc. M113. 469106.

Sumitomo T, Nakata M, Higashino M, Terao Y, and Kawabata S. 2013. Group A streptococcal cysteine protease cleaves epithelial junctions and contributes to bacterial translocation. *J Biol Chem* 288: 13317-13324. 査読有. doi: 10. 1074/jbc. M113. 459875.

Okahashi N, Nakata M, Sumitomo T, Terao Y, and Kawabata S. 2013. Hydrogen peroxide produced by oral streptococci induces macrophage cell death. *PLoS One* 8: e62563. 査読有. doi: 10.1371/journal.pone.0062563.

Ogawa T, Terao Y, Honda-Ogawa M, Hashimoto S, Ikebe K, Maeda Y, and Kawabata S. 2013. MicroRNA fragments derived from *Streptococcus pyogenes* enable activation of neutrophil phagocytosis: *in vitro* study. *Microbes Infect* 15: 212-218. 査読有. doi: 10. 1016/j. micinf. 2012. 11. 009.

Yamaguchi M, Terao Y, and Kawabata S. 2013. Pleiotropic virulence factor - *Streptococcus pyogenes* fibronectin-binding proteins. *Cell Microbiol*. 15: 503-511. 査読有. doi: 10.1111/cmi.12083.

Hoshino T, Fujiwara T, and Kawabata S. 2012. Evolution of cariogenic character in *Streptococcus mutans*: horizontal transmission of glycosyl hydrolase family 70 genes. *Sci Rep* 2: 518. 査読有. doi: 10.1038/srep00518.

Nomura R, Nakano K, Naka S, Nemoto H, Masuda K, Lapirottanakul J, Alaluusua S, Matsumoto M, Kawabata S, and Ooshima T. 2012. Identification and characterization of a collagen-binding protein, Cbm, in *Streptococcus mutans*. *Mol Oral Microbiol*, 27: 308-323. 査読有. doi: 10.1111/j.2041-1014.2012.00649.x.

Murakami J, Terao Y, Morisaki I, Hamada S, and Kawabata S. 2012. Group A *Streptococcus* adheres to pharyngeal epithelial cells with salivary proline-rich proteins via GrpE chaperone protein. *J Biol Chem* 287: 22266-22275. 査読有. doi: 10. 1074/jbc. M112. 350082.

[学会発表](計40件)

住友倫子, 中田匡宣, 山口雅也, 川端重忠. Plasminogen promotes group A streptococcal epithelial translocation via tricellular tight junctions. 第88回日本細菌学会総会, 2015年3月26~28日, 長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市).

Yamaguchi M, Yamaguchi Y, Nakata M, Henningham A, Olson J, Dahesh S, Cole J, Kawabata S, Varki A, and Nizet V. Enzymatically active extracellular hyaluronidase (Hyla) of group A *Streptococcus* promotes intracellular survival and virulence.

SFG and JSCR2014 Joint Annual Meeting. November 16-19, 2014. Honolulu (USA).

Morita C, Nakata M, Sumioka R, Okahashi N, Hamada S, Sumitomo T, and Kawabata S. Role of *Streptococcus sanguinis* cell wall-anchored nuclease. XIX Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Disease. November 9-12, 2014. Buenos Aires (Argentina).

小川真理子, 住友倫子, 川端重忠. 溶血性レンサ球菌のDNA分解酵素 Sda1 阻害による形質転換効率の向上. 第56回歯科基礎医学会学術大会, 2014年9月25~27日, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市).

森田知里, 住岡龍一, 中田匡宣 和 田聖史, 岡橋暢夫, 住友倫子, 山口雅也, 浜田茂幸, 山城隆, 川端重忠. *Streptococcus sanguinis* の細胞壁架橋型ヌクレアーゼの酵素活性. 第56回歯科基礎医学会学術大会, 2014年9月25~27日, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市).

川端重忠. 化膿レンサ球菌の進化と戦略 - 細胞付着・侵入, 抗食食, 遺伝子の変化 -. 第46回レンサ球菌研究会, 2014年6月27~28日, 東京大学農学部弥生キャンパス内フードサイエンス棟中島董一郎記念ホール(東京都・文京区).

Yamaguchi M, and Kawabata S. Role of *Streptococcus pneumoniae* surface protein pfbA in blood. 2014 Kyungpook-Osaka University International Symposium ~New Horizon of Basic and Clinical Research in Dentistry~. May 16, 2014. Daegu (Korea).

住友倫子, 東野美晴, 中田匡宣, 川端重忠. Group A *Streptococcus* translocates across epithelial barrier via tricellular tight junctions. 第87回日本細菌学会総会, 2014年3月26~28日, タワーホール船堀(東京都・江戸川区).

岡橋暢夫, 中田匡宣, 住友倫子, 寺尾豊, 川端重忠. 口腔レンサ球菌が産生する過酸化水素がマクロファージの細胞死を誘導する. 第87回日本細菌学会総会, 2014年3月26~28日, タワーホール船堀(東京都・江戸川区).

森田知里, 住岡龍一, 中田匡宣, 岡橋暢夫, 住友倫子, 川端重忠. *Streptococcus sanguinis* が産生するヌクレアーゼの機能解析. 第66回日本細菌学会関西支部総会, 2013年11月16日, 大阪大学微生物病研究所 谷口記念講堂(大阪府・吹田市).

Nakata M, Kawabata S. Mode of expression and assembly mechanism of Group A Streptococcal pili. The 12th Awaji International Forum on Infection and Immunity. September 10-13, 2013. Awaji Yumebutai International Conference Center (Hyogo・Awaji)

森田知里, 住岡龍一, 中田匡宣, 岡橋暢夫, 住友倫子, 川端重忠. *Streptococcus sanguinis*

の菌体表層ヌクレアーゼは自然免疫からの回避に寄与する. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 2013 年 9 月 20~22 日, 岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市).

住友倫子, 中田匡宣, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌の上皮バリア突破機構に関する宿主プロテアーゼの解析. 第 22 回 Lancefield レンサ球菌研究会, 2013 年 6 月 28~29 日, ホテル島根イン青山 (東京都・港区).

Sumitomo T, Nakata M, Higashino M, Terao Y, and Kawabata S. Group A streptococcal pyrogenic exotoxin B cleaves epithelial junctions and contributes to bacterial translocation. 113th General Meeting of American Society for Microbiology. May 18-21, 2013. Denver (USA).

Nakata M, Sumitomo T, and Kawabata S. Assembly mechanism of T6 pili and its involvement in biofilm formation. GAS Infections 2013. March 21-23, 2013, Roma (Italy).

本多真理子, 寺尾豊, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. Molecular mechanisms of complement evasion by *Streptococcus pyogenes* cysteine protease SpeB. 第 86 回日本細菌学会総会, 2013 年 3 月 18~20 日, 幕張メッセ (千葉県・千葉市).

森田知里, 住岡龍一, 中田匡宣, 岡橋暢夫, 本多真理子, 住友倫子, 川端重忠. Functional analysis of cell wall-anchored nuclease from *Streptococcus sanguinis*. 第 86 回日本細菌学会総会, 2013 年 3 月 18~20 日, 幕張メッセ (千葉県・千葉市).

岡橋暢夫, 沖永敏則, 桜井敦朗, 寺尾豊, 中田匡宣, 川端重忠, 西原達治. *Streptococcus sanguinis* induces foam cell formation and cell death of macrophages. 第 86 回日本細菌学会総会 2013 年 3 月 18~20 日, 幕張メッセ (千葉県・千葉市).

本多真理子, 寺尾豊, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. *Streptococcus pyogenes* のシステインプロテアーゼ SpeB が補体免疫機構に及ぼす影響. 第 65 回日本細菌学会関西支部総会. 2012 年 11 月 17 日, 臨床研究情報センター (兵庫県・神戸市).

Sumitomo T, Nakata M, Higashino M, Terao Y, and Kawabata S. Group A streptococcal cysteine protease cleaves epithelial junctions and contributes to bacterial translocation. The 11th Korea-Japan International Symposium on Microbiology 2012. September 13-14. Buyeo, (Korea).

- ②① Ogawa T, Ikebe K, Kagawa R, Honda M, Terao Y, Kawabata S, and Maeda Y. Poor oral condition promotes harboring of salivary pneumococci in elderly. 90th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research. June 20-23, 2012. Iguazu

Falls (Brazil).

- ②② 本多真理子, 橋本栄, 寺尾豊, 川端重忠. *Streptococcus pyogenes* のシステインプロテアーゼ SpeB による補体免疫回避機構の解析. 第 21 回 Lancefield レンサ球菌研究会. 2012 年 6 月 8~9 日, 大阪大学大学院歯学研究科 弓倉記念ホール (大阪府・吹田市).

〔図書〕(計 5 件)

川端重忠. 2013. 序 - 注目される劇症型細菌感染症の現状と理解 - . 特集 1 「いわゆるヒト喰いバクテリアと劇症型感染症」. 医薬ジャーナル社 化学療法の領域. 29(7): 26-27.

住友倫子, 川端重忠. 2013. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症の発症に寄与する細菌因子. 特集 1 「いわゆるヒト喰いバクテリアと劇症型感染症」. 化学療法の領域. 29(7): 48-55.

中田匡宣, 川端重忠. 2013. 病原性レンサ球菌の二成分制御系シグナル伝達機構. 特集「細菌の病原遺伝子の発現調節機構」. 化学療法の領域. 29(1): 42-50.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~mcrbio/kenkyuuyuma1.html>

## 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)  
新潟大学・医歯学総合研究科・教授  
研究者番号: 50397717

住友 倫子 (SUMITOMO, Tomoko)  
大阪大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号: 50423421

中田 匡宣 (NAKATA, Masanobu)  
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授  
研究者番号: 90444497