

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462780

研究課題名(和文)細胞間隙経路を介した病原性レンサ球菌の組織侵入機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of streptococcal translocation across epithelial barrier via paracellular route

研究代表者

住友 倫子 (Sumitomo, Tomoko)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：50423421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：化膿レンサ球菌が劇症型レンサ球菌感染症のような侵襲性疾患を惹起するためには、初発感染部位である咽頭や皮膚の上皮細胞層を突破する必要がある。我々は本菌がヒトプラスミノゲン(PLG)存在下において、主にトリセルラータイトジャンクション(tTJ)から上皮バリアを突破する現象を見出した。また、PLGは菌体表層タンパク質であるSENとトリセルリンを繋ぐ分子ブリッジとして機能し、化膿レンサ球菌のtTJへの局在に関与することを明らかにした。これらの研究結果から、化膿レンサ球菌はPLGのトリセルリン結合能を利用することでtTJに局在し、tTJから上皮バリアを突破することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus pyogenes is a human-specific pathogen responsible for local suppurative and life-threatening invasive systemic diseases. In the present study, a serotype M28 strain was found predominantly localized in tricellular tight junctions (tTJs) of epithelial cells cultured in the presence of plasminogen (PLG). Several lines of evidence indicated that interaction of PLG with tricellulin, a major component of tTJs, is crucial for bacterial localization. Additionally, we demonstrated that PLG functions as a molecular bridge between tricellulin and streptococcal surface enolase (SEN). The wild type strain efficiently translocated across the epithelial monolayer, accompanied by cleavage of transmembrane junctional proteins. In contrast, amino acid substitutions in the PLG-binding motif of SEN markedly compromised those activities. Our findings provide insight into the mechanism by which *S. pyogenes* exploits host PLG for acceleration of bacterial invasion into deeper tissues via tTJs.

研究分野：細菌学

キーワード：レンサ球菌 上皮バリア

1. 研究開始当初の背景

化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) はヒトの咽頭炎や膿痂疹の起因为として知られるが、時として、軟部組織壊死や多臓器不全を伴う致死性の高い劇症型レンサ球菌感染症を惹き起こす。皮膚や粘膜の上皮細胞層は極性を形成することにより、生体内への病原体の侵入を阻止する物理バリアとして機能する。それゆえ、化膿レンサ球菌が劇症型レンサ球菌感染症のような侵襲性疾患を惹起するためには、初発感染部位である咽頭や皮膚の上皮細胞層を突破する必要がある。我々はこれまでに、溶血毒素による宿主細胞内プロテアーゼの活性化と本菌が産生するプロテアーゼの協調作用が、菌体の上皮バリア突破に重要であることを明らかにした (Sumitomo *et al.* 2011. *J Biol Chem*, 286: 2750-2761; Sumitomo *et al.* 2013. *J Biol Chem*, 288: 13317-13324)。

2. 研究の目的

細胞間接着により多角形に縁取りされた上皮細胞の集合体である細胞シートには、2細胞間の接着部位であるバイセルラータイトジャンクション (bTJ) 以外に、3つの細胞の角が接するトリセルラータイトジャンクション (tTJ) と呼ばれ、主な構成分子としてトリセルリンが同定されている。我々は複数の臨床分離株について、感染細胞ではトリセルリンの分解が認められること、また、本菌は主に tTJ から上皮バリアを突破することを見出した。それゆえ、化膿レンサ球菌は tTJ 構成タンパク質に結合し、tTJ のバリア機能を破綻させる分子群を発現することが示唆された。本研究では、tTJ を介した化膿レンサ球菌の上皮バリア通過に寄与する細菌および宿主因子を同定し、本菌による tTJ 傷害機構の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 感染細胞における菌体局在部位の観察

ヒト大腸由来上皮細胞 (Caco-2) の細胞数に対して、化膿レンサ球菌 NIH35 株 (劇症型レンサ球菌感染症由来, M28 型) が 1:10 になるように培養液に加え、感染させた。感染 2 時間後に、PBS で 3 回洗浄した後、20% FBS 含有 MEM を添加し、さらに培養した。所定時間培養後、4% パラホルムアルデヒドで固定し、0.2% Triton X-100 含有 PBS で浸透化処理を行った。GAS 感染細胞を 5% 牛血清アルブミンでブロッキングし、免疫蛍光染色法で標的タンパク質を染色した。蛍光退色防止

液 (Vectashield; Vector Laboratories) を添加してスライドガラス上に封入し、共焦点レーザー顕微鏡 (LSM510; Carl Zeiss) で観察した。

(2) 上皮バリア通過能の測定

Caco-2 をミリセルセルカルチャーインサート (3 μm pore-size; Millipore) で培養した。経上皮電気抵抗値 (TER) が 400-500 Ωcm^2 に達したモノレイヤーを上皮細胞バリアの *in vitro* モデルとして用いた。この上皮バリアモデルの細胞数に対して、菌体が 1:10 になるように、アピカル部位に感染させた。感染 2 時間後に、セルカルチャーインサートを MEM で 3 回洗浄後、アピカル側とバソラテラル側に 20% FBS 含有 MEM を添加し、さらに培養した。所定時間培養後、下部チャンバーの培養液を寒天平板培地へ播種し、37°C で一晩培養を行った後、生育したコロニー数から上皮バリアを通過した菌数を算定した。

(3) 細胞間接着分子分解能の測定

Caco-2、ヒト皮膚角化細胞 (HaCaT)、咽頭上皮細胞 (Detroit 562) の細胞数に対して、菌体が 1:10 になるように培養液に加え、2 時間感染させた。未付着菌体を PBS で 3 回洗浄した後、10% FBS 含有 MEM を添加し、さらに培養した。所定時間感染後の細胞を PBS で 3 回洗浄した後、6% 2-メルカプトエタノール含有 Laemmli ゲルローディングバッファーで溶解した。細胞ライセートを SDS-PAGE で展開し、PVDF 膜へ転写した。ブロッキング操作後、マウス抗ヒト E-カドヘリン抗体、ウサギ抗ヒトオクルディン抗体 (Life Technologies)、ウサギ抗ヒトトリセルリン抗体 (Sigma-Aldrich) を反応させた。二次抗体として、HRP 標識抗マウス IgG (Life Technologies)、もしくは HRP 標識抗ウサギ IgG を用い、ECL 試薬 (GE Amersham) と医療用レントゲンフィルムにより検出を行った。

(4) トリセルリンと菌体表層タンパク質の相互作用解析

マイクロプレート (96 穴) に 250 ng のトリセルリンを固化した後、ブロッキング操作を行った。Binding buffer (50 mM HEPES, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl_2 , 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ BSA) で所定濃度に希釈した Streptococcal surface enolase (SEN) の組換え体をヒトプラスミノーゲン (PLG; Sigma-Aldrich) 存在下もしくは非存在下に加え、37°C で 90 min 培養した。マウス抗 His₆ 抗体 (Sigma-Aldrich) および HRP 標識抗マウス IgG を反応させた後、HRP 基質 (Moss) を加えた。0.5 N HCl で反応を停止させ、450 nm における吸光度を測定した。また、トリセルリンと PLG の相互作用は表面プラズモン共鳴法で解析した。

4. 研究成果

(1) 化膿レンサ球菌は PLG 依存的に tTJ に局在する

Caco-2 細胞に化膿レンサ球菌をヒト PLG 存在下もしくは非存在下で感染させ、共焦点蛍光レーザー顕微鏡で菌体の局在を観察した。その結果、化膿レンサ球菌はヒト PLG 依存的に、tTJ に局在することを確認した (Fig. 1a)。また、菌体付着部位では細胞間接着を担う ZO-1 の分解が認められ、菌体がトリセルラー TJ から深部に侵入している様子も観察された。一方、トリセルリンノックダウン細胞では、菌体の tTJ への局在性が低下した (Fig. 1b)。これらの結果から、化膿レンサ球菌はヒト PLG 依存的に tTJ に局在することが示唆された。

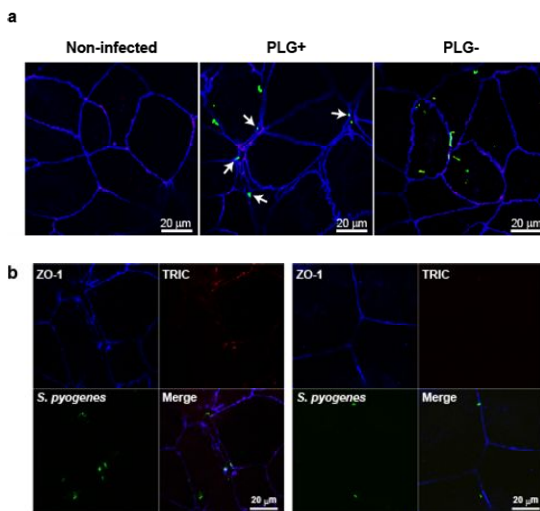


Figure 1. PLG is associated with bacterial localization in tTJs. (a) Caco-2 cells were infected with an EGFP-expressing *S. pyogenes* NIH35 strain as green images at an MOI of 10 for 2 h in the presence or absence of 2 μ M human PLG. White arrows indicate bacterial association with tricellulin. (b) Tricellulin knockdown were infected with EGFP-expressing GAS strain at an MOI of 10 for 2 h in the presence of 2 μ M human PLG. ZO-1 and tricellulin were immunostained and are shown as blue and red images, respectively. GAS-infected cells were analyzed using a confocal laser-microscope.

(2) PLG はトリセルリンと化膿レンサ球菌の菌体表面タンパク質を繋ぐ分子ブリッジとして機能する

tTJ の主要構成タンパク質であるトリセルリンは 2 つの細胞外ループを有する 4 回膜貫通型タンパク質である。そこで、トリセルリン細胞外ループの N 末端側に His₆ タグを付与した組換えタンパク質を作製し、ヒト PLG との相互作用を表面プラズモン共鳴法により解析した。その結果、ヒト PLG はトリセルリンに結合し、トリセルリン細胞外ループの²¹⁷Lys と²⁵²Lys が PLG との相互作用に重要で

あることが明らかになった。また、PLG は菌体表面の PLG 結合タンパク質である SEN とトリセルリンを繋ぐ分子ブリッジとして機能することを ELISA で証明した (Fig. 2)。

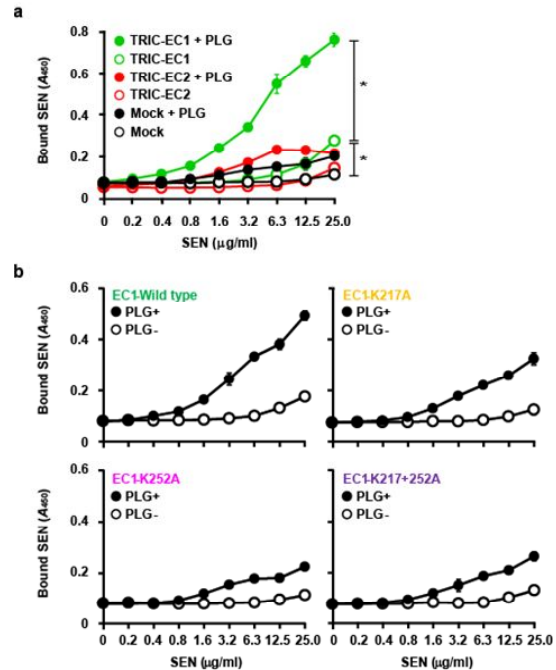


Figure 2. PLG functions as molecular bridge between SEN and tricellulin. TRIC proteins (a) or TRIC-EC1 variants (b) were immobilized on microtiter plates, then increasing amounts of SEN were added in the absence or presence of 1 μ M human PLG. Bound SEN was detected using an anti-SEN antibody. All experiments were performed in sextuplet with three technical repeats. Data are shown as the mean \pm S.D. of six wells from a representative experiment. *, $P < 0.01$.

(3) トリセルリンと PLG の相互作用を介して化膿レンサ球菌は上皮バリアを突破する

Caco-2 をトランスウェルフィルターシステムで培養し、*in vitro* 上皮バリアモデルとした。この上皮バリアモデルに、野生株と SEN 変異株をアピカル部位から感染させ、細菌の下部チャンバーへの到達を上皮バリア通過能として評価した。その結果、PLG 結合能が消失した SEN 変異株の上皮バリア通過能は、野生株と比較して有意に低下した。また、化膿レンサ球菌感染細胞における ZO-1、トリセルリン、オクルディンや E-カドヘリンなどの細胞間接着分子の分解は、SEN 変異により著しく抑制した。

以上の結果から、化膿レンサ球菌は PLG のトリセルリン結合能を利用することで、bTJ と比較して構造的に脆弱な tTJ に優先的に局在し、細胞間接着分子の傷害により tTJ から上皮バリアを突破することが示唆された。

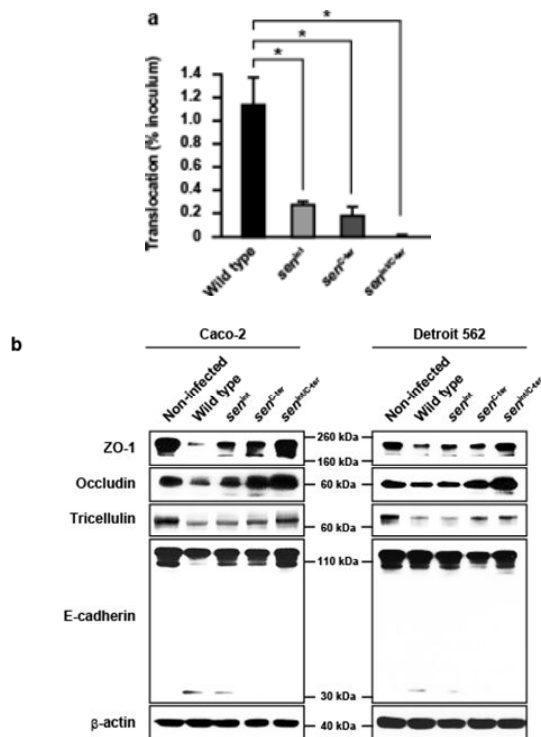


Figure 3. Bacterial translocation is mediated by interaction of SEN with human PLG. (a) Caco-2 cells were grown using a Millicell filter system, and then infected with the NIH35 strain or *sen* mutants at an MOI of 10 for 2 h. After removing non-adherent bacteria, the ability of the *S. pyogenes* strains to translocate across epithelial cells at 8 h after infection in the presence of human PLG was assessed by examining medium samples obtained from the lower chambers. (b) Caco-2 cells (left panel) or Detroit 562 cells (right panel) were infected with NIH35 or *sen* mutants at an MOI of 10 for 7 h in the presence of 1 μ M PLG. Cleavage of ZO-1, occludin, tricellulin, and E-cadherin was detected in whole cell lysates by Western blot analysis. β -actin served as a loading control.

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 13 件)

1. 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. *J Biol Chem*. 292 :4244-4254. 査読有 . doi: 10.1074/jbc.M116.749275.
2. 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*, in press. 査読有 . doi: 10.1080/21505594.2017.1328333.

3. Sumioka R, Nakata M, Okahashi N, Li Y, Wada S, Yamaguchi M, Sumitomo T, Hayashi M, Kawabata S. 2017. *Streptococcus sanguinis* induces neutrophil cell death by production of hydrogen peroxide. *PLoS One*. 12(2): e0172223. 査読有 . doi: 10.1371/journal.pone.0172223.
4. Sumitomo T, Nakata M, Higashino M, Yamaguchi M, Kawabata S. 2016. Group A *Streptococcus* exploits human plasminogen for bacterial translocation across epithelial barrier via tricellular tight junctions. *Sci Rep* 7: 20069. 査読有. doi: 10.1038/srep20069.
5. Yamaguchi M, Hirose Y, Nakata M, Uchiyama S, Yamaguchi Y, Goto K, Sumitomo T, Lewis A, Kawabata S, Nizet V. 2016. Evolutionary inactivation of a sialidase group B *Streptococcus*. *Sci Rep* 6: 28852. 査読有. doi: 10.1038/srep28852.
6. Oogai Y, Yamaguchi M, Kawada-Matsuo M, Sumitomo T, Kawabata S, Komatsuzawa H. 2016. Lysine and threonine biosynthesis from aspartate contributes to *Staphylococcus aureus* growth in calf serum. *Appl Environ Microbiol* 82: 6150-6157. 査読有 . doi:10.1128/AEM.01399-16.
7. Okahashi N, Nakata M, Kuwata H, Kawabata S. 2016. *Streptococcus oralis* induces lysosomal impairment of macrophages via bacterial hydrogen peroxide. *Infect Immun* 84: 2042-2050. 査読有 . doi: 10.1128/IAI.00134-16.
8. Hirose Y, Yamaguchi M, Kawabata S, Murakami M, Nakashima M, Goto, M, Yamamoto T. 2016. Effects of extracellular pH on Dental Pulp Cells in Vitro. *J Endod* 42: 735-741. 査読有 . doi: 10.1016/j.joen.2016.01.019.
9. Hirose Y, Yamamoto T, Misako N, Funahashi Y, Matsukawa Y, Yamaguchi M, Kawabata S, Gotoh M. 2016. Injection of dental pulp stem cells promotes healing of damaged bladder tissue in a rat model of chemically induced cystitis. *Cell Transplant* 25: 425-436. 査読有. doi: 10.3727/096368915X689523.
10. Sumitomo T. 2015. Group A *Streptococcus* translocates across an epithelial barrier via degradation of intercellular junctions. *J Oral Biosci* 57: 135-138. 査読有 . doi: org/10.1016/j.job.2015.03.002.

11. Hamada S, Kawabata S, Nakagawa I. 2015. Molecular and genomic characterization of pathogenic traits of group A *Streptococcus pyogenes*. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 91: 539-559. 査読有. doi: 10.2183/pjab.91.539.
12. Morita C, Sumioka R, Nakata M, Okahashi N, Wada S, Yamashiro T, Hayashi M, Hamada S, Sumitomo T, 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.
13. Okahashi N, Sumitomo T, Nakata M, Sakurai A, Kuwata H, Kawabata S. 2014. Hydrogen peroxide contributes to the epithelial cell death induced by the oral mitis group of streptococci. *PLoS One* 9: e88136. 査読有. doi: 10.1371/journal.pone.0088136.

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 住友倫子 他. インフルエンザウイルス感染は化膿レンサ球菌の上皮バリア突破を亢進させる. 第 90 回日本細菌学会総会, 2017 年 3 月 19~21 日, 仙台国際センター(宮城県・仙台市).
2. 住友倫子 他. インフルエンザウイルス感染に伴い上皮表層に誘導される GP96 は化膿レンサ球菌の上皮細胞への付着を亢進させる. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 2016 年 8 月 24 日~26 日, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市).
3. 住友倫子 他. インフルエンザウイルス感染に伴う Gp96 の局在と化膿レンサ球菌感染症の関連性. 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(大阪府・大阪市).
4. 住友倫子 他. トリセルラータイトジャンクションを介した化膿レンサ球菌の上皮バリア突破機構の解析. 第 47 回レンサ球菌研究会, 2015 年 7 月 3~4 日, 宮崎県市町村職員共済組合 ひまわり荘(宮崎県・宮崎市).
5. Sumitomo T, Nakata M, Yamaguchi M, and Kawabata S. Group A *Streptococcus* penetrates across an epithelial barrier via tricellular tight junctions. 115th General Meeting of American Society for Microbiology. May 30-June 2, 2015. New Orleans (USA).
6. 住友倫子 他. 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).

〔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

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

(2) 研究分担者

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

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

山口 雅也 (YAMAGUCHI, Masaya)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号 : 00714536