

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861546

研究課題名(和文)肺炎球菌のβ-ヘリックスタンパクPfbAが自然免疫回避に果たす役割の解析

研究課題名(英文)The role of pneumococcal beta-helix protein, PfbA, in the evasion from host innate immunity

研究代表者

山口 雅也 (Yamaguchi, Masaya)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00714536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肺炎球菌の菌体表層に局在するタンパクであるPfbAに着目し、自然免疫回避に果たす役割を解析した。ゲノムデータベース検索から、PfbAは肺炎球菌間において高く保存されている一方で、他のレンサ球菌には存在しない、肺炎球菌に特徴的なタンパクであることが示された。また、*in vitro*、*in vivo*の実験から、PfbAは好中球による肺炎球菌の貪食を抑制することで菌の自然免疫回避に寄与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the role of pneumococcal cell surface protein, PfbA, in the evasion from host innate immunity. Bioinformatic analysis showed that PfbA is a highly and specifically conserved protein in *Streptococcus pneumoniae* strains. In addition, our experimental results indicated that PfbA contributes to bacterial resistance to neutrophil killing via inhibiting its phagocytosis.

研究分野：細菌学

キーワード：Streptococcus pneumoniae 肺炎球菌 抗貪食 PfbA 好中球 自然免疫回避

## 1. 研究開始当初の背景

肺炎球菌は、肺炎や中耳炎の主たる起因菌であり、口腔・咽頭・上気道等より分離される。さらに、グラム陽性菌において黄色ブドウ球菌と並び、菌血症・敗血症よりもっとも頻繁に分離される菌の一つである。

肺炎球菌感染症においては、感染部位に多量的好中球が浸潤し、激しい炎症反応が引き起こされる。しかしながら、肺炎球菌は宿主の免疫応答を回避し、しばしば敗血症や髄膜炎といった侵襲性の疾患を引き起こす。このことから、肺炎球菌は宿主の自然免疫機構を回避するメカニズムを備えていることが推測される。申請者は、これまでに肺炎球菌の新規菌体表層タンパク PfbA が上皮細胞への付着・侵入とヒト血中での菌の生存に寄与していること、抗 PfbA-IgG が血中での菌の増殖を抑制することを報告した。しかし、PfbA がどのように血中での菌の生存に寄与するか、詳しいメカニズムは明らかになっていない。

## 2. 研究の目的

「研究開始当初の背景」で述べたように、これまでに申請者は、肺炎球菌の新規菌体表層タンパク PfbA を同定し、PfbA がヒト血中での菌の生存に寄与することを明らかにした。しかしながら、肺炎球菌の宿主自然免疫回避機構については不明な部分が多い。本研究では、肺炎球菌の PfbA が、宿主の自然免疫機構に及ぼす影響を検索した。

## 3. 研究の方法

まず、レンサ球菌における *pfba* 遺伝子の相同性検索を、ゲノムデータベースを利用して行った。

次に、*pfba* 遺伝子欠失株の作製をコンピテンシ刺激ペプチドを用いて行った。肺炎球菌の野生株、*pfba* 遺伝子欠失株と、ヒト末梢血より分離した好中球を混和し、1, 2, 3 時間培養した後の生存菌数を算定することで、好中球に対する各菌株の抗貪食能を比較した。また、PfbA がどのような機序にて好中球に作用するかを検索するため、各種阻害剤を用いた好中球殺菌試験を行った。さらに、各菌株と好中球を混和し、Time-lapse 顕微鏡を用いて、リアルタイムでの相互作用を観察した。

PfbA が単体で好中球に及ぼす影響を解析するため、大腸菌を用いて組換え PfbA を作製した。得られた組換え PfbA を蛍光マイクロビーズに固相化し、組換え PfbA を固相化した蛍光マイクロビーズまたは非固相化ビーズを好中球と混和した。混和後の細胞の蛍光強度の変化をフローサイトメーターで測定することで各ビーズに対する貪食能を比較した。

in vivo における PfbA の役割を解析するた

め、肺炎球菌の野生株、*pfba* 遺伝子欠失株をそれぞれマウスに経気道的に感染させ、感染 24 時間後の肺胞洗浄液における菌数を算定した。また、サイトカイン ELISA キットにて肺胞洗浄液中の炎症性サイトカイン量を測定した。

## 4. 研究成果

ゲノムデータベースを利用した BLAST 検索から、PfbA は肺炎球菌間において高く保存されている一方で、他のレンサ球菌には存在しないことが示された。PfbA が好中球による殺菌回避に寄与するかを調べるため、肺炎球菌野生株もしくは *pfba* 遺伝子欠失株とヒト好中球を混和し、培養後の菌体生存率を比較した。その結果、*pfba* の欠失により菌の生存率が有意に低下することが示された。一方、アクチン重合阻害剤で好中球を処理した場合、野生株と *pfba* 遺伝子欠失変異株の生存率に差が認められなかった。タイムラプス顕微鏡による観察では、*pfba* 欠失株が好中球と混和後 1 分以内に貪食されたのに対し、野生株は 5 分以上が経過した後にも貪食されなかった。次に、組換え PfbA を固相化した蛍光マイクロビーズまたは非固相化ビーズを用いた実験から、非固相化ビーズと比較して、PfbA 固相化ビーズが好中球に取り込まれる割合は低いことが示された。また、好中球に TLR2/4 阻害ペプチドを作用させた場合、コントロール群と比較して、*pfba* 欠失株の生存率はおよそ 2 倍に上昇した。一方、野生株の生存率に有意な変化は認められなかったことから、PfbA が TLR による異物の認識を阻害する可能性が示された。さらに、マウスに肺炎球菌を経気道感染し、感染 24 時間後の肺胞洗浄液中の菌数を比較した。*pfba* 欠失株を感染させたマウスでは、野生株感染マウスと比較して、肺胞洗浄液中の菌数がおよそ 5 分の 1 まで低下した。肺胞洗浄液中の炎症性サイトカインを測定したところ、両群に有意な差は認められなかった。

これらの結果から、PfbA は好中球の貪食を抑制し、肺炎球菌の自然免疫回避に寄与することが示唆された。

## 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 5 件)

1. Hirose Y., Yamaguchi M., Kawabata S., Murakami M., Nakashima M., Gotoh M., Yamamoto T. Effects of Extracellular pH on Dental Pulp Cells in vitro. J. Endodont. Vol. 42. pp. 735-741. 2016. doi:10.1016/j.joen.2016.01.019

2. Sumitomo T., Nakata M., Higashino M., Yamaguchi M., Kawabata S. Group A Streptococcus exploits human plasminogen for bacterial translocation across epithelial barrier via tricellular tight junctions. Sci. Rep., Vol. 7. 20069. 2016. doi:10.1038/srep20069
  3. Hirose Y., Yamamoto T., Nakashima M., Funahashi Y., Matsukawa Y., Yamaguchi M., Kawabata S., Gotoh M. Injection of dental pulp stem cells promotes healing of damaged bladder tissue in a rat model of chemically induced cystitis. Cell Transplant. Vol. 25. pp425-436. 2016. doi:10.3727/096368915X689523
  4. Kang S., Watanabe M., Jacobs J.C., Yamaguchi M., Dahesh S., Nizet V., Leyh T.S., Silverman R.B. Synthesis of mevalonate- and fluorinated mevalonate prodrugs and their in vitro human plasma stability. Eur. J. Med. Chem. Vol. 90C. pp448-461. 2015. doi:10.1016/j.ejmech.2014.11.040
  5. Henningham A.\*, Yamaguchi M.\*, Aziz R.K., Kuipers K., Buffalo C.Z., Dahesh S., Choudhury B., Van Vleet J., Yamaguchi Y., Seymour L.M., Ben Zakour N.L., He L., Smith H.V., Grimwood K., Beatson S.A., Ghosh P., Walker M.J., Nizet V., Cole J.N. Mutual exclusivity of hyaluronan and hyaluronidase in invasive group A Streptococcus. J. Biol. Chem. Vol. 289. pp32303-32315. 2014. \*equally contributed. doi:10.1074/jbc.M114.602847.
- 〔学会発表〕(計 22 件)
1. 中田匡宣,住友倫子,山口雅也,川端重忠.培養温度の変化が肺炎球菌の血中での生存に及ぼす影響.第 89 回日本細菌学会総会,2016 年 3 月 23~25 日,大阪市天王寺区・大阪国際交流センター.
  2. 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,大阪市天王寺区・大阪国際交流センター.
  3. 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,大阪市天王寺区・大阪国際交流センター.
  4. 毛利泰士,住友倫子,本多真理子,山口雅也,寺尾豊,中田匡宣,川端重忠.*Streptococcus pyogenes* の分泌型システインプロテアーゼ SpeB によるデスマグレイン分解が皮膚感染症の発症に及ぼす影響.第 89 回日本細菌学会総会,2016 年 3 月 23~25 日,大阪市天王寺区・大阪国際交流センター.
  5. 山口雅也,広瀬雄二郎,後藤花奈,住友倫子,川端重忠.B 群レンサ球菌におけるシアル酸分解酵素 NonA の進化的な不活性化.第 90 回日本感染症学会総会,2016 年 4 月 15,16 日,仙台市青葉区・仙台国際センター.
  6. 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* の形質転換誘導性タンパク Ccs4 は病原因子として働く.第 89 回日本細菌学会総会,2016 年 3 月 23~25 日,大阪市天王寺区・大阪国際交流センター.
  7. 山口雅也,広瀬雄二郎,住友倫子,中田匡宣,川端重忠.肺炎球菌の菌体表層タンパク PfbA による自然免疫回避機構の解析.第 89 回日本細菌学会総会,2016 年 3 月 23 日~25 日,大阪市天王寺区・大阪国際交流センター.
  8. 住岡龍一,中田匡宣,和田聖史,岡橋暢夫,住友倫子,山口雅也,林美加子,川端重忠.*Streptococcus sanguinis* 由来の過酸化水素は好中球に NETs を誘導する.第 89 回日本細菌学会総会,2016 年 3 月 23 日~25 日,大阪市天王寺区・大阪国際交流センター.
  9. 毛利泰士,住友倫子,本多真理子,山口雅也,寺尾豊,中田匡宣,川端重忠.A 群レンサ球菌が産生する分泌型プロテアーゼによるデスマグレイン分解と皮膚病態発症の関連.第 68 回日本細菌学会関西支部総会,2015 年 11 月 28 日,京都市山科・京都薬科大学.
  10. 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.*Streptococcus agalactiae* のシアル酸分解酵素に着目した分子進化解析 (Molecular evolutionary analysis on inactive sialidase of *Streptococcus agalactiae*) 第 57 回歯科基礎医学会学術大会,2015 年 9 月 11 日~13 日,新潟市中央区・朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター.
  11. 土門久哲,坂上雄樹,小田真隆,山口雅也,川端重忠,寺尾豊.肺炎球菌による宿主細胞の細胞死誘導能の解析 (Analysis of pneumococcus-induced cell death). 第 57 回歯科基礎医学会学術大

会,2015年9月11日~13日,新潟市中央区・朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター。

12. 毛利泰士,住友倫子,山口雅也,中田匡宣,寺尾豊,川端重忠. *Streptococcus pyogenes* に起因する皮膚感染症の発症における SpeB の関与. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会,2015年9月11日~13日,新潟市中央区・朱鷺メッセ新潟コンベンションセンター。
13. 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. B 群レンサ球菌のシアル酸分解酵素の分子系統解析と病原性に果たす役割の解析. 日本進化学会第 17 回大会,2015年8月20日~23日,東京都文京区・中央大学後楽園キャンパス。
14. 住友倫子,中田匡宣,山口雅也,川端重忠. トリセルラ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,宮崎市瀬頭・宮崎県市町村職員共済組合 ひまわり荘。
15. 山口雅也,住友倫子,中田匡宣,川端重忠. 肺炎球菌の菌体表層タンパクが血中における菌の生存に果たす役割の解明. 近畿腸管微生物研究会総会,2015年6月13日,大阪。
16. 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,岐阜市・長良川国際会議場。
17. 山口雅也,中田匡宣,住友倫子,川端重忠. M4 型 *Streptococcus pyogenes* のヒアルロン酸分解酵素が宿主細胞内生存に果たす役割 (Role of hyaluronidase in intracellular survival of M4 *Streptococcus pyogenes*). 第 88 回日本細菌学会総会,2015年3月26~28日,岐阜市・長良川国際会議場。
18. 住岡龍一,山口雅也,中田匡宣,明田幸宏,野杣由一郎,和田聖史,住友倫子,川端重忠. *Streptococcus pneumoniae* ZmpC は血液脳関門の突破を抑制する. 第 67 回日本細菌学会関西支部総会,2014年11月22日,西宮市・兵庫医科大学。
19. 山口雅也,中田匡宣,住友倫子,川端重忠. A 群レンサ球菌のヒアルロン酸分解酵素が病原性に果たす役割 (Role of

hyaluronidase in group A *Streptococcus pneumoniae*). 第 56 回歯科基礎医学会学術大会,2014年9月25~27日,福岡市・福岡国際会議場。

20. 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 (The enzymatic activity of the wall-anchored nuclease from *Streptococcus sanguinis*). 第 56 回歯科基礎医学会学術大会,2014年9月25~27日,福岡市・福岡国際会議場。
21. 住岡龍一,中田匡宣,森田知里,和田聖史,岡橋暢夫,住友倫子,山口雅也,林美加子,川端重忠. *Streptococcus sanguinis* が産生する過酸化水素は NETs 形成を誘導する (Hydrogen peroxide produced by *Streptococcus sanguinis* induces NET formation). 第 56 回歯科基礎医学会学術大会,2014年9月25~27日,福岡市・福岡国際会議場。
22. 山口雅也,住友倫子,中田匡宣,川端重忠. 肺炎球菌による赤血球侵入機構の解明. 第 46 回レンサ球菌研究会,2014年6月27~28日,東京都文京区・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。

〔図書〕(計 1 件)

1. 山口雅也. 肺炎球菌と赤血球の相互作用の解明,一般財団法人 岩垂育英会 創立 50 周年記念誌,一般財団法人 岩垂育英会. pp18-19. 2015.

〔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

申請者のホームページ：

<http://www.hs.ura.osaka-u.ac.jp/yamaguchimasaya/>

申請者所属教室のホームページ：

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

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

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

### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

### (3)連携研究者

( )

研究者番号：