

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 黒澤 美絵  
学位 博士 (歯学)  
学位記番号 新大院博 (歯) 第337号  
学位授与の日付 平成28年3月23日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
博士論文名 *Streptococcus pyogenes* CAMP factor attenuates phagocytic activity of RAW 264.7 cells.  
(*Streptococcus pyogenes* の産生する CAMP factor は RAW264.7 細胞の貪食能を低下させる)

論文審査委員 主査 教授 早崎 治明  
副査 教授 寺尾 豊  
副査 教授 朔 敬

博士論文の要旨

学位申請者 黒澤美絵氏より提出のあった主論文 (英語) の要旨 (和訳) は、以下の通りである。

【目的】

A群レンサ球菌のひとつである*Streptococcus pyogenes*は、小児に多発する咽頭炎の起因菌であり、今年度は、国内で40万人以上の小児に咽頭炎・扁桃炎を引き起こしたことが推計されている。同菌は、宿主免疫細胞の機能を低下させる多様な分子群を産生し、組織への侵入および組織内増殖を惹起することで感染を拡大させると考えられている。*S. pyogenes*が産生するCAMP factorは、赤血球膜上で多量体を形成し $\gamma$ 溶血を示すことが報告されているが、免疫細胞に対する作用については明らかではない。本研究では、マクロファージ系細胞に対するCAMP factorの影響を解析した。

【方法と結果】

国内で分離された*S. pyogenes* M1型 (142株、144株、466株、SSI-9株) およびM3型 (SSI-1株、TW3384株、SSI-7株、SSI-8株) をトッドヒューイット・イーストエキストラクト培地にて20時間培養し、菌体と培養上清におけるCAMP factor発現量について、特異抗体を用いて解析した。その結果、すべての菌株において菌体と培養上清中にCAMP factorの発現が認められた。また、1 mM  $Ca^{2+}$ 、5 mM  $Mg^{2+}$ 、あるいは5%  $CO_2$ 存在下で*S. pyogenes* SSI-9株を培養すると、CAMP factorの発現が上昇した。次に、*S. pyogenes* SSI-9株の培養上清とCAMP factor遺伝子欠失株の培養上清をマウスマクロファージ様RAW264.7細胞株に37°C、24時間作用させたところ、野生株の培養上清を添加した細胞では細胞質に空胞が認められた。一方、CAMP factor遺伝子欠失株の培養上清を作用させた細胞において、空胞は観察されなかった。また、組換え (r) CAMP factorにて処理したRAW264.7細胞においても細胞質に空胞が認められ、その空胞は抗CAMP factor抗体でrCAMP factorを中和することにより抑制された。さらに、rCAMP factorのRAW264.7細胞に対する細胞傷害性について解析するため、プロピジウムイオダイド試薬による染色を行うとともに、細胞内外の乳酸デヒドロゲナーゼ量を測定した。その結果、rCAMP factorの添加はプロピジウムイオダイド陽性細胞率および細胞内外の乳酸デヒドロゲナーゼ量に影響を及ぼさなかった。しかしながら、MTT試験にて細胞内の酵素活性を比色定量したところ、rCAMP factor処理濃度に依存して吸光度の値が低くなってお

り、かつ細胞数の有意な減少が認められた。rCAMP factorが細胞増殖を抑制することが示唆されたことから、細胞周期に与える影響について解析した。その結果、rCAMP factor添加群ではG2期停止状態の細胞が多く観察された。次に、rCAMP factorにより空胞を形成したRAW264.7細胞の貪食能力を解析するため、貪食能力解析用蛍光試薬にて調べたところ、空胞を形成したRAW264.7細胞は形成していない細胞と比較して、蛍光試薬の取り込み量が約70%低下した。また、rCAMP factor処理した細胞に*S. pyogenes* SSI-9株を1時間感染させた後、顕微鏡観察にて*S. pyogenes*が付着・侵入している細胞の割合を計測した。その結果、空胞を形成した細胞において、菌の付着・侵入割合が有意に低下していることが明らかとなった。

#### 【考察】

Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、およびCO<sub>2</sub>存在下において、*S. pyogenes* SSI-9株のCAMP factor発現が上昇したことから、菌の組織侵入時にCAMP factorの発現が増加すると示唆された。また、空胞形成毒素の多くは細胞死を惹起することが報告されているが、CAMP factorはRAW264.7細胞の細胞死を誘導することなく、空胞形成および貪食能の低下を引き起こすことが判明した。以上の結果より、CAMP factorは、RAW264.7細胞に疑似食胞と考えられる空胞を形成させることで、*S. pyogenes*に対する貪食能を低下させると推察した。

#### 【結論】

*S. pyogenes* の産生する CAMP factor は、マクロファージ機能を低下させることにより、*S. pyogenes* の自然免疫からの回避および感染拡大に関与すると考えられる。

### 審査結果の要旨

学位申請者 黒澤美絵氏より提出のあった主論文をもとに、下記の事項について試問を実施し、申請研究に対し十分な知識、先行研究との客観的な比較能力、および新規発展研究への明確な展望、さらには未到達課題に対する真摯かつ謙虚な態度から、博士の能力と研究者としての資質を有すると判断し、合格と判定した。

#### 1. 口腔内細菌感染性心内膜炎について

感染性心内膜炎患者の血中から検出された細菌の 87.1%が口腔内細菌の *Streptococcus mitis* 群と *Staphylococcus epidermidis* であったという報告 (Dokkyo Journal of Medical Sciences 41 (1): 103~113, 2014) をはじめ、多数の文献がある。

#### 2. *Streptococcus pyogenes* と CAMP factor について

*S. pyogenes* は、ヒト咽頭や消化管、表皮の常在細菌の一種で、CAMP factor はこの菌種のほか、*S. agalactiae*、*S. uberis*、*Propionibacterium acnes* など皮膚疾患の起因菌において発現する。CAMP は発見者 Christie、Atkins、Munch-Peterson 3 人の姓名のイニシャルに由来する。

#### 3. *S. pyogenes* CAMP factor 遺伝子と相同性の高い遺伝子を有する 2 菌種 (*S. agalactiae* と *P. acnes*) について、*S. pyogenes* との間で共通する病態はあるか

*S. pyogenes*、*S. agalactiae*、および *P. acnes* の CAMP factor で共通する特徴としてはγ溶血を示すことが挙げられる。なお、本研究で明らかにした CAMP factor によるマクロファージ様細胞に対する機能障害については、*S. agalactiae*、および *P. acnes* では報告されておらず、本研究が最初の報告である。

#### 4. 組換え体作製として、pGEX6P-1 ベクターと *E. coli* Able-K 宿主の組合せを選んだ理由は何か

pGEX6P-1 ベクターは、Glutathione S-transferase (GST) 融合タンパク質発現用ベクターである。GST タグの分子量は 26 kDa と大きいと、GST タグが付与されることにより目的タンパク質の性

質が変化する可能性がある。このため、GST 融合タンパク質は毒性を一時的に低下することができ、大腸菌の生存率を高めることが可能であると考えられる。

※参考：ヒスチジン (His) タグの分子量は約 0.8 kDa (6 アミノ酸) と小さいため、目的タンパク質に及ぼす影響は小さいとされる。

AbleK は毒性の高い遺伝子をクローニングする際に用いる大腸菌株である。本大腸菌株は、プラスミドのコピー数を抑えることにより、クローニングされたプラスミド由来のタンパク質の発現を低減させ、細胞の生存率を高めることを特徴とする。

#### <本研究でこの宿主ベクター系を用いた理由>

実験当初はクローニング用大腸菌株として頻用されている *E. coli* XL10-Gold や JM109 を用いていたが、目的遺伝子 (*cfa*) が組み込まれた大腸菌株が寒天培地上で生育しなかった。CAMP factor の毒性が高いことにより、大腸菌株の生存率低下を引き起こしている可能性が考えられたため、*E. coli* AbleK を使用したところ、寒天培地上で生育が認められた。また、発現用大腸菌株として通常用いられる *E. coli* BL21 (DE3) では、CAMP factor の発現が十分に得られなかったが、*E. coli* AbleK を使用した結果、CAMP factor の大量精製に成功した。本研究では当初、pQE30 ベクターを用いたヒスチジントグ (His タグ) 融合 CAMP factor を作製し実験に供していた。しかしながら、CAMP factor の多量体形成に His タグが影響を及ぼしている可能性が考えられた。そこで、今回はタグの影響を排除するため GST 融合 CAMP factor を精製後、プレジジョンプロテアーゼにより GST タグを切断した CAMP factor を実験に供した。

#### 5. 上皮細胞での解析と $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{CO}_2$ 存在下実験の設定について

*S. pyogenes* は上皮層から侵入し、自然免疫から回避することで組織内で増殖して感染を拡大する。炎症組織内では  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{CO}_2$  各濃度が高いので、これを想定した条件下で解析したものである。本実験では、まず免疫細胞に対する CAMP factor の影響に焦点を絞った。上皮細胞への影響については現在解析中である。

#### 6. $\Delta cfa$ 株と野生株について、GAPDH 以外の病原因子の発現に違いは生じていなかったか。また、両菌株間の成長増殖速度に有意差は認められなかったか

今回、他の病原因子発現に違いが生じたか否かについては調査していない。また、今回の実験条件においては、野生株と比して  $\Delta cfa$  株の成長増殖速度に有意差は認められなかった。

#### 7. ゲノムデータベースに登録されている *S. pyogenes* CAMP factor はアミノ酸レベルで相同性は何パーセントか。また、特徴あるモチーフとして NCBI の CDD に登録されているものはあるか

ゲノムデータベースに登録されている *S. pyogenes* 5 菌株 (M1 型 SF370 株、M1 型 MGAS8232 株、M3 型 MGAS315 株、M5 型 Manfredo 株、M23 型 M23ND 株) の CAMP factor について、アミノ酸配列の相同性を調べた。*S. pyogenes* SF370 株を基準とした場合、各菌株のアミノ酸配列の相同性は MGAS8232 株で 100%、MGAS315 株で 99.2%、Manfredo 株で 98.8%、および M23ND 株で 98.1% であり、CAMP factor はアミノ酸レベルにおいて高い相同性を有している。さらに、CAMP factor を N ドメイン側、中間、C ドメイン側の 3 つにわけ、NCBI の BLAST で検索した。その結果、CAMP factor と類似している構造は既知のタンパク質の中では認められなかった。

#### 8. GTBS 緩衝液の特徴は何か。何故、今回の実験で使用しているのか

タンパク質を希釈する一般的な溶媒としては PBS や TBS があげられるが、これらを用いて希釈した場合、dilution effect (タンパク質を希釈することにより活性が著しく低下すること) を示すタンパク質も存在する。本研究で用いた rCAMP factor は実験当初、PBS を溶媒としていた。しかしながら、1 週間程度で rCAMP factor の活性 (溶血能および空胞形成能) が消失することが判明した。そこで、タンパク質の活性維持に重要な役割を果たすとされるゼラチンを含む GTBS 溶液を溶媒としたところ、タンパク質の活性が維持されたため、今回は GTBS 溶液で希釈した rCAMP

factor を実験に供した。ゼラチンは、タンパク質のアグリゲーションを抑制し、タンパク質の安定性、および溶解性の向上を目的として添加される。

#### 9. 本論文の各実験で使用している rCAMP factor 濃度 (0.2~5 µg/ml) は、*S. pyogenes* が産生する native CAMP factor 濃度と同程度か

native CAMP factor 濃度について述べられている文献は、我々が検索した中では認められなかった。本研究では Western blot により CAMP factor 発現は確認したが、ELISA 等を用いた濃度測定は行っていない。したがって、今回は native CAMP factor 濃度が不明であったため、*S. pyogenes* の産生するその他の病原タンパク質の毒性発現濃度にしたがって実験を進めることとした。以上のことより、本研究で使用した rCAMP factor の濃度と *S. pyogenes* の産生する native CAMP factor の濃度が同程度であるかについて、現時点で明言することはできない。先行研究では、*S. pyoegens* ScpA 濃度 100 nM で好中球に対する作用を解析している(J Biol Chem 281(20):14215-23, 2006)。本研究では、CAMP factor を 0.2、1、5 µg/ml の濃度で用いたが、これらはそれぞれ 0.64、31.2、156 nM である。

#### 10. rCAMP factor の多量体形成について解析を行ったのは何故か

空胞形成毒素として知られる *Helicobacter pylori* の産生する VacA や *Clostridium perfringens* の  $\epsilon$  毒素は細胞膜上で各々 12 量体、7 量体を形成するので、CAMP factor も RAW 細胞膜上で多量体を形成するとの仮説を設定した。還元等の処理実験行っていないため、多量体形成機構は確認できていない。

#### 11. RAW 細胞に形成された空胞とオートファジーまたは貪食機構について

CAMP factor が RAW 細胞に作用して、L 型 Ca チャンネルを介して Ca イオンの細胞内への流入が起こり、PI3K を活性化し、クラスリン依存性のエンドソームが形成されることが判明している。空胞の性格づけにはライソゾームマーカー等を用いた解析がさらに必要である。Western blot では LC3-II の発現は確認できず、オートファジーの誘導はないと結論した。マクロファージによる貪食はオプソニン化で効率が高くなるが、抗原接触のみでも貪食は起こるとされており、さらに今回の実験では血清を添加したため、血清中に含まれる抗体による非特異的なプソニン効果も否定できない。

#### 12. *S. pyogenes* を感染させた場合でも、RAW 細胞に細胞周期の停止像は観察されるのか

今回、*S. pyogenes* を感染させた RAW 細胞において細胞周期の変化は調べていない。本研究では、RAW 細胞に CAMP factor を 24 時間作用させているが、*S. pyogenes* を同時間作用させた場合、細胞死が惹起された。*S. pyogenes* を 2~3 時間感染させた場合、細胞死は起こらないが *S. pyogenes* は CAMP factor 以外に様々な病原タンパク質を発現しているため、CAMP factor のみを細胞に作用させた場合とは異なる現象が観察される可能性がある。

#### 13. CAMP factor の発現調節メカニズムは明らかにされているのか。あるいは、どのような分子メカニズムを仮説立てているか

現在、*S. pyogenes* CAMP factor の発現調節メカニズムは明らかになっていない。しかしながら、Jiangらは*S. agalactiae* CAMP factor の発現が二成分制御系 CsrRS により調節されていることを報告している (J Bacteriol 187: 1105-13, 2005)。*S. pyogenes* は *S. agalactiae* CsrRS と相同性の高いタンパク質である CovRS を有しており、さらに、CovRS の活性は  $Mg^{2+}$  濃度依存的であることが知られている (Mol Microbiol 65: 671-83, 2007)。本研究では、 $Mg^{2+}$  の存在下において *S. pyogenes* CAMP factor の発現が亢進することが明らかになった。したがって、*S. pyogenes* CAMP factor の発現は CovRS により制御されていると推察する。

