

Title	Streptococcus sanguinisにより産生される過酸化水素が好中球に対して及ぼす影響
Author(s)	住岡, 龍一
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56120
rights	© 2017 Sumioka et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

学位論文

Streptococcus sanguinis により産生される
過酸化水素が好中球に対して及ぼす影響

大阪大学大学院歯学研究科 口腔科学専攻
口腔分子感染制御学講座（歯科保存学教室）

住岡 龍一

要約

口腔清掃や歯科治療を契機として起こる一過性の菌血症は、心疾患ハイリスク患者等において感染性心内膜炎の原因になる。これまで、感染性心内膜炎の病巣から *Streptococcus sanguinis* を含む mitis 群口腔レンサ球菌が高頻度に分離されてきた。*S. sanguinis* は、ピルビン酸オキシダーゼである SpxB により高濃度の H_2O_2 を産生する。本研究では、*S. sanguinis* 由来の H_2O_2 が血中での菌体生存や好中球への細胞毒性に関与するかについて検討した。また、好中球での活性酸素種の産生が好中球の NETs (Neutrophil Extracellular Traps) 形成を誘導するという報告があるため、*S. sanguinis* が産生する H_2O_2 が NETs 形成を誘導するかについても併せて検討した。

S. sanguinis SK36 株 (WT 株) を親株として、*spxB* 欠失株 (Δ *spxB* 株) と復帰変異株 (Wr 株) を作製し、各菌株の H_2O_2 産生能を検討した。ペルオキシダーゼ反応と発色基質を用いて培養上清中の H_2O_2 産生量を定量した結果、WT 株もしくは Wr 株の H_2O_2 産生量は 2.9~3.5 mM であった。一方、 Δ *spxB* 株の H_2O_2 産生量は 0.9 mM に減少した。したがって、SpxB は SK36 株の H_2O_2 産生を担う主要な因子であることが示唆された。次に、健常ヒト末梢血もしくは好中球に各菌株を感染させ、経時的に菌体生存率を算出した。感染後 0.5~3 時間における Δ *spxB* 株の生存率は、WT 株および Wr 株のそれと比較して、減少したため、 H_2O_2 は末梢血中および好中球感染時の菌体生存に有利に働くことが示唆された。さらに、各菌株の好中球に対する細胞毒性を検討した結果、WT 株および Wr 株と比較して、 Δ *spxB* 株の細胞毒性は減少したため、 H_2O_2 は好中球に対して細胞毒性を有することが示唆された。

続いて、感染もしくは非感染好中球の DNA を DAPI もしくは SYTOX Green で蛍光染色したところ、WT 株もしくは Wr 株を感染させた好中球では、細胞外における糸状 DNA が認められた。一方、 Δ spxB 株を感染させた好中球の蛍光染色像では、非感染好中球の染色像と同様に分葉核の形態が保たれ、細胞外に顕著な DNA 染色像を認めなかった。また、NETosis の指標の一つである好中球ヒストンのシトルリン化をウェスタンブロット解析により検出した。WT 株もしくは Wr 株を感染させた好中球では、 Δ spxB 株感染時と比較して、ヒストン H3 および H4 のシトルリン化が亢進した。これらの結果から、*S. sanguinis* が産生する H_2O_2 は NETosis を誘導することが示唆された。さらに、SYTOX Green で染色した際、蛍光強度を指標に好中球由来の細胞外 DNA 量を評価した。WT 株もしくは Wr 株を感染させた好中球と比較して、 Δ spxB 株を感染させた好中球の細胞外 DNA 量は減少した。また、WT 株もしくは Wr 株を感染させた好中球の細胞外 DNA 量はカタラーゼの添加により減少したことから、*S. sanguinis* 由来の H_2O_2 は好中球の細胞外 DNA 量を増加させることが示唆された。最後に H_2O_2 が好中球の貪食能に与える影響について観察した。 Δ spxB 株を感染させた好中球の菌体貪食数は、WT 株もしくは Wr 株を感染させた好中球と比較して、増加した。 H_2O_2 は好中球の貪食能を抑制し、*S. sanguinis* の生存を有利にすることが示唆された。

以上の結果から、*S. sanguinis* の SpxB により産生される H_2O_2 は、血中での菌体生存率を上昇させ、好中球に対して細胞毒性を有することが明らかになった。また、好中球ヒストンのシトルリン化を誘導し、NETs 形成を促進する可能性が示唆された。

背景

日常の口腔清掃、歯科治療後の損傷上皮、もしくは未治療の歯科病変から口腔細菌が血管内に侵入すると一過性の菌血症を惹き起こし、糖尿病、循環器疾患、脳血管障害、肺疾患などの発症に影響を与える (1, 2). 口腔常在菌である *Streptococcus sanguinis* は、16S rRNA の塩基配列を用いた系統解析から mitis 群レンサ球菌に分類される (3, 4). 歯面表層にペリクルを介して結合する初期定着菌の一種であり、デンタルバイオフィーム形成に関与する (5, 6, 7). *S. sanguinis* は、感染性心内膜炎患者の血液から分離・同定されたことから名付けられた口腔レンサ球菌であり、心病巣局所から最も高頻度に分離される (8). したがって本菌は、血中における生存と宿主免疫機構からの回避に寄与する多様な病原因子の産生により、感染性心内膜炎を発症させることが推測される.

好中球は血中で最も多い貪食細胞であり、感染部位に遊走・集積し、活性化する. 活性化好中球は細菌を貪食し、殺菌・消化することから自然免疫において重要な役割を担う (9, 10). 近年、好中球は、核内のクロマチンやディフェンシン、ミエロペルオキシダーゼ、エラスターゼなどの抗菌物質を細胞外に放出することが報告された (11, 12). この網目状構造を呈する細胞外構造物は neutrophil extracellular traps (NETs) と名付けられ、アポトーシスやネクローシスとは異なる細胞死形態である NETosis に伴い、形成される (11). *In vitro* において、細菌感染だけでなく、インターロイキン 8 (IL-8)、リポ多糖 (LPS)、phorbol 12-Myristate 13-Acetate (PMA)、活性酸素種 (ROS, reactive oxygen species) などの刺激により NETosis は誘導されることが報告されている (12). NETs に捕獲された細菌は NETs の抗菌物質により殺菌されることから、NETs 形成は感染拡大防御に寄与

する (11, 12). 一方で, NADPH オキシダーゼを欠損する慢性肉芽腫症患者の好中球は PMA の刺激により NETs を形成しないことから, NETs 誘導に ROS が必要であることが示唆されてきた (13). また, NETs はヒト感染性心内膜炎病変の疣贅中に認められることが報告されており, 感染性心内膜炎の病態形成への関与が示唆されている (14).

口腔レンサ球菌は, 糖代謝によるピルビン酸の生成過程で ATP を産生する (15). 口腔レンサ球菌に幅広く保存される SpxB はピルビン酸オキシダーゼであり, 好気条件下で, 酸化還元反応によりピルビン酸と無機リン酸からアセチルリン酸, 二酸化炭素, および過酸化水素 (H_2O_2) を生成する (16, 17, 18). Mitis 群レンサ球菌は, 複数の菌種から構成されるバイオフィームにおいて, 0.7~1.6 mM の H_2O_2 を産生し, H_2O_2 産生の大部分は SpxB の酵素活性に起因する (19). H_2O_2 は, 遊離鉄などの遷移金属が存在する場合, Fenton 反応により酸化力が強いヒドロキシラジカルに変化し, DNA やタンパクを傷害する (17). Mitis 群レンサ球菌に属する肺炎球菌では, SpxB による H_2O_2 産生が菌体生存や病原性に重要な役割を果たす (20, 21). 肺炎球菌は, 鼻咽頭感染時に産生する H_2O_2 の作用により, インフルエンザ菌の生育を阻害し, 鼻咽頭における生存に有利に働く (20). また, 肺炎球菌由来の H_2O_2 は宿主由来の窒素酸化物と反応し, 細胞傷害性の強い亜硝酸過酸化物が産生される. そのため, マウス髄膜炎モデルにおいて, *spxB* 欠失により肺炎球菌の病原性は低下する (21). したがって, *S. sanguinis* を含む他のレンサ球菌においても, 菌体由来の H_2O_2 は宿主に対する病原性に関与する可能性がある. 実際, *S. sanguinis* や *Streptococcus oralis* を含む mitis 群口腔レンサ球菌は, H_2O_2 活性により単球由来細胞株や上皮細胞株の細胞死を誘導することが報

告されてきた (22, 23, 24). しかし, *S. sanguinis* が産生する H_2O_2 の正常免疫担当細胞に対する細胞毒性や細胞死誘導機構は不明である.

S. sanguinis は, 血中で生存するために NETs を含む好中球の殺菌機構を回避すると考えられる (25). しかし, *S. sanguinis* が免疫系を回避する機構の詳細は不明である. 本研究では, *S. sanguinis* 由来の H_2O_2 が血中における菌体生存, 好中球による殺菌からの回避, および NETs 誘導に関与するかについて検討した.

材料・方法

1. 使用菌株および培養条件

本研究で使用した菌株を表 1 に示す. *S. sanguinis* SK36 株 (以下, WT と表記する) はデンマーク Aarhus 大学の Mogens Kilian 博士より分与された (26). WT 株およびその変異株は Todd-Hewitt 培地 (TH, Becton Dickinson, NJ, USA) を用いて, 37°C で培養した. 一晚培養液を TH 培地で 100 倍希釈した試料を, 波長 600 nm における吸光度 (A_{600}) が 0.9 (対数増殖期後期) に達する時点まで大気中で培養した. 末梢血感染実験では, リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 8.10 mM Na_2HPO_4 , 1.47 mM KH_2PO_4) で 2 回洗浄を行った後, PBS で菌体を懸濁し, A_{600} が 0.2 になるように濃度を調整した. 好中球感染実験では, 菌体の濁度を同様に調整し, RPMI 培地 (和光純薬, 東京) で菌体を懸濁した. *Escherichia coli* TOP10 株 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を温度感受性シャトルベクターである pSET6 の宿主として用いた (27). pSET6 は動物衛生研究所 高松 大輔博士, 東京大学 関崎 勉博士より分与された. *E. coli* は Luria-Bertani (LB) 培地 (Sigma Aldrich, MO, USA) を用いて, 37°C で振盪培養した.

表 1. 本研究で使用した菌株

菌株	特徴	参考文献または入手先
<i>S. sanguinis</i>		
SK36	ヒトのデンタルプラーク由来株	21
ΔspxB	SK36 株から <i>spxB</i> を in-frame で欠失させた株	本研究
Wr	ΔspxB 作製時に生じた復帰変異株	本研究
<i>E. coli</i>		
TOP10	コンピテント大腸菌	Thermo Fisher Scientific

2. *spxB* 欠失株および復帰変異株の作製

SK36 株の *spxB* 欠失株 (Δ *spxB*) および復帰変異株 (Wr) は pSET6 を用いて作製した (図 1). 同ベクターは $<30^{\circ}\text{C}$ で複製するが, 37°C において複製しない. まず, *spxB* 遺伝子上流・下流領域を 2 対のプライマーセット (表 2, F1/R1, F2/R2) で PCR により増幅し, NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany) を用いて精製した. 得られた 2 種の PCR 産物を混合して鋳型 DNA とし, 上流領域の 5'側プライマーと下流領域の 3'側プライマー (F1/R2) を使用し, オーバーラッピング PCR を行った. PCR 産物と pSET6 を制限酵素 *Bam*H I と *Eco*R I で消化し, DNA ligase (タカラバイオ, 滋賀) と 16°C で一晩反応させた. TOP 10 株に形質転換した後, $10\ \mu\text{g/ml}$ のクロラムフェニコールを含有する LB 寒天培地に播種した. 37°C で一晩培養し, 生育したコロニーからプライマーセット SetF/SetR を用いたコロニーダイレクト PCR によりクローンを選択した. 得られた TOP10 株をクロラムフェニコール含有 LB 培地にて一晩培養後, NucleoSpin Plasmid Easy Pure (タカラバイオ) を用いてプラスミドを精製した.

構築したプラスミドの SK36 株への形質転換は以下のように行った (図 1B). SK36 株の一晩培養液を 10% の非働化ウマ血清 (SAFC Biosciences, MO, USA) を含む TH 培地で 100 倍希釈し, A_{600} が 0.1 に達するまで 37°C で培養した. コンピテンス刺激ペプチド (DLRGVPNPWGWIFGR, 純度 98.8%, Sigma Aldrich) を $1\ \mu\text{g/ml}$ の濃度で添加し, 10 分間の培養を行った. そして, 構築プラスミドを $1\ \mu\text{g/ml}$ の濃度で添加し, 25°C で 8 時間の培養を行った. 菌液を $5\ \mu\text{g/ml}$ のクロラムフェニコール (Sigma Aldrich) を含有する TH 寒天培地に播種し, 25°C で培養した. 生育したコロニーをクロラムフェニコール含有 TH 寒天培地において

37°C で2度継代することにより，細胞質内のプラスミドを排除した．続けて，TH 寒天培地における 25°C での継代により染色体内での相同組換えを誘導した．その結果，図 1B に示す 2 通りの組換えが起こり，欠失株もしくは復帰変異株が生じた．*spxB* 遺伝子の欠失もしくは復帰変異は，プライマーセット checkF/checkR を用いたコロニー PCR により確認した．野生遺伝子型へ復帰したクローンを Wr 株とし， Δ *spxB* 株と共に以後の解析に供試した．

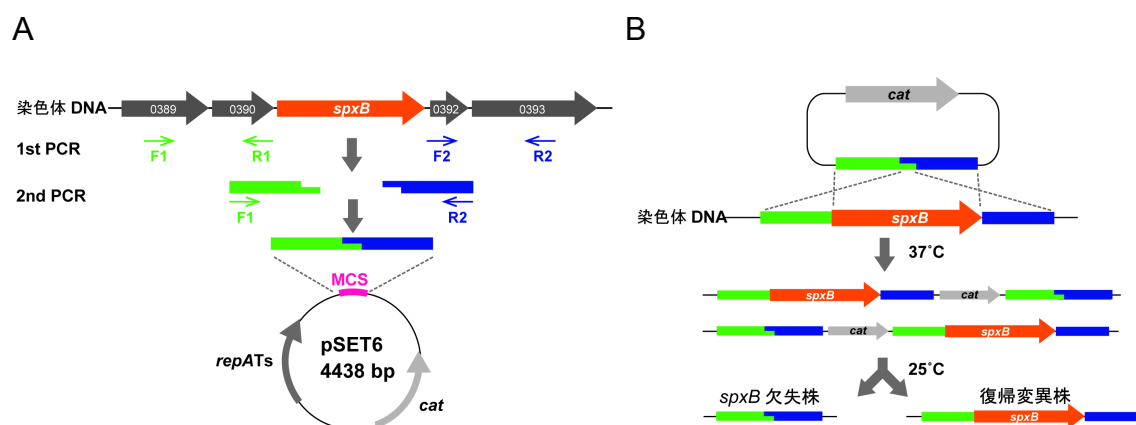


図 1. *spxB* 遺伝子欠失株および復帰変異株の作製

A. 2 対のプライマーセット (F1/R1, F2/R2) を用いて *spxB* 遺伝子上流領域と下流領域を PCR で増幅した．両断片を鋳型とし，オーバーラッピング PCR により両断片を連結させ増幅した．PCR 産物を温度感受性シャトルベクター pSET6 に挿入し，欠失株作製用プラスミドを構築した．*S. sanguinis* *spxB* の遺伝子番号は *ssa0391* であり，*ssa0389*～*ssa0393* を図に示す．MCS，マルチクロニングサイト．*cat*，クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子．*repATs*，温度感受性 replication initiation protein A 遺伝子．

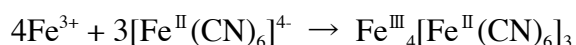
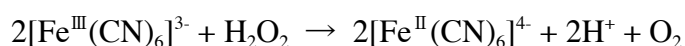
B. 欠失株作製用プラスミドを SK36 株に形質転換し，37°C で染色体 DNA への組換えを誘導した．その後，25°C で再度の相同組換えを誘導した．コロニー PCR と電気泳動により，*spxB* 遺伝子の欠失と野生遺伝子型への復帰を確認した．

表 2. 本研究で使用したプライマー

プライマー名	プライマー塩基配列 (5'-3')
F1	GCGAATTCATGGCAGTACAATTACTAGAAGA
R1	GATTTTCGGCGAGAGGAATTACATAATAACTCTCCTTCAATA
F2	TATTGAAGGAGAGTTATTATGTAATTCCTCTCGCCGAAAATC
R2	GCGGATCCCTCATTATTCCTATCTTCTATCT
SetF	GCAAGGCGATTAAGTTGGGTAA
SetR	GGAATTGTGAGCGGATAACAAT
checkF	GATAGCGGACTACCTAGCGCCAG
checkR	GAGTGGCTAGCACTCCTCTCCAT

3. プルシアンブルー反応を用いた H₂O₂ 産生能の検討

1.0 mg/ml のヘキサシアノ鉄 (III) 酸カリウムおよび 1.0 mg/ml の塩化第 2 鉄を添加した brain heart infusion 寒天培地 (BHI, Becton Dickinson) (プルシアンブルー寒天培地) を用いて, H₂O₂ 産生能の検討を行った (28). H₂O₂ 存在下で以下に示す反応により, 青色のヘキサシアノ鉄 (II) 酸鉄 (III) が産生される.



各菌株の一晩培養液を TH 培地で 100 倍希釈した試料を, A₆₀₀ が 0.5 (対数増殖期中期) に達するまで大気中もしくは嫌気条件で培養した. 菌体を PBS で 2 回洗浄した後, 8 μl の菌液をプルシアンブルー寒天培地に滴下した. コントロールとして同量の TH 液体培地を滴下し, 大気中もしくは嫌気条件で 24 時間の培養を 37°C で行った. アネロパック・ケンキ (三菱ガス化学, 東京) 存在下の嫌気ジャー内を嫌気条件とした (炭酸ガス濃度 15%以上, 酸素濃度 0.1%以下). 各コロニ

一周囲の青色ハローの面積を Image J ソフトウェア (<http://imagej.net/Welcome>) を用いた画像解析により算出した. 各コロニーの面積を減算したハロー面積から, 各菌株の H_2O_2 産生能を比較した.

4. 培養上清中の H_2O_2 産生量の定量

大気中もしくは 5% CO_2 を含む大気中で各菌株を一晩培養し, Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて培養上清中の H_2O_2 量を定量した. 96 ウェルポリスチレンプレート (イワキ, 東京) に分注した供試検体にキット付属の amplex red reagent を添加し, MULTISCKAN FC (Thermo Fisher Scientific) で吸光度 (A_{550}) を測定した. 培養上清中に H_2O_2 が存在する場合, ホースラディッシュペルオキシダーゼ活性によりアンプレックス (10-acetyl-3, 7-dihydroxyphenoxazine) が赤色酸化物であるレゾルフィン (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-one) に変化する. 既知濃度 (1.6~12.8 mM) の H_2O_2 溶液を用いて作図した標準曲線から, 供試検体に含まれる H_2O_2 の濃度を算出した.

5. 末梢血殺菌試験

末梢血での菌体生存率の検討は, Lancefield らの実験法を改変して行った (29). ヒト末梢血は, 健常成人から採取した. 10 unit/ml のヘパリン (持田製薬, 東京) を混和した末梢血 540 μl と 1×10^5 コロニー形成単位(colony forming unit, CFU) を含む各菌液 60 μl を混和した. 37°C で 0.5, 1.5, および 3 時間の回転培養を行った後, 混和液を TH 寒天培地に播種した. 37°C で一晩培養した後, 生育コ

ロニー数から経時的な菌体生存率を算出した。

6. 好中球の単離

ヘパリンを添加した健常成人末梢血と 3%のデキストラン T-500 (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) を含有する PBS を混和した。室温で 90 分間静置し、赤血球を沈殿させた。上層を Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) に積層し、 $400 \times g$ で 25 分間の比重遠心分離を 20°C で行った (低加速回転, ノーブレーキ)。回収したペレットを ACK 溶解緩衝液 (0.15 M NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0.1 mM EDTA) で懸濁し、赤血球を溶血させた。PBS で 2 回洗浄し、ペレットを RPMI 1640 培地 (RPMI 培地) で懸濁した。懸濁液の一部を等量の 0.4% トリパンブルー含有 PBS と混和し、ヘモサイトメーターを用いて好中球の生細胞数を算出した。細胞数を調整後、10%ウシ胎仔血清 (FCS, SAFC Biosciences, KS, USA) を含む RPMI 培地で懸濁した。

7. 好中球への感染

単離した好中球に、好中球の細胞数と菌の CFU の比率 (multiplicity of infection, MOI) が 10 となるように調整し、各菌株を感染させた。 37°C , 5% CO_2 存在下で培養を行った。

8. 好中球殺菌試験

好中球感染時の菌体生存率の検討は、Eggleton らの実験法を改変して行った (30, 31)。感染させた好中球を 0.5, 1.5, および 3 時間培養し、培養液を TH 寒天培

地に播種した。一晚培養した後、生育コロニー数から菌体生存率を算出した。

カタラーゼ添加時の好中球殺菌試験は、96 ウェルポリスチレンプレートの中の各ウェルに 5×10^5 細胞ずつ好中球を播種し、30 分間の前培養により、ウェル基底面へ好中球を接着させた。カタラーゼ (最終濃度 5 unit/ml, Sigma-Aldrich) を添加した RPMI 培地と交換し、各菌株を感染させた。感染後 1 もしくは 3 時間で、培養液を懸濁し、TH 寒天培地に播種した。一晚培養後、生育コロニー数から菌体生存率を算出した。

9. 好中球に対する細胞毒性の検討

24 ウェルポリスチレンプレート (Corning, NY, USA) の各ウェルに 1.5×10^6 細胞のヒト好中球を播種した。30 分の培養後、RPMI 培地を交換し、各菌株を感染させた。陽性コントロールとして、200 nM の PMA (和光純薬) を添加した。1 もしくは 3 時間培養した後、培養上清を回収し、CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit (Promega, WI, USA) を用いた比色定量法により細胞毒性を検討した。培養上清中に乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) が存在する場合、LDH の酵素活性により、テトラゾリウム塩は赤色産物であるホルマザンに変化する。96 ウェルポリスチレンプレートに分注した供試検体にキット付属の assay buffer を添加し、MULTISCKAN FC で吸光度 (A_{490}) を測定した (31)。0.25% Triton X-100 含有 PBS で溶解させた検体における細胞毒性を 100% とした。非感染好中球における細胞毒性の値を減算し、各菌株の細胞毒性を算出した。

10. 感染好中球の細胞死形態の観察

Poly-L-lysine (Sigma Aldrich) をコートした 8 ウェルチャンバースライド (Nagle Nunc, NY, USA) の各ウェルに 5×10^5 細胞のヒト好中球を播種した. 30 分の培養後, 培地交換し, 各菌株を感染させた. コントロールとして, 200 nM の PMA もしくは 1 mM の H_2O_2 溶液を添加した.

3 時間の培養を行った後, 4% パラホルムアルデヒドを含有する PBS を添加し, 室温で 20 分間の固定を行った. PBS で 2 回洗浄後, 1% ウシ血清アルブミン (Sigma Aldrich) を含有する PBS を用いて $4^\circ C$ で一晩のブロッキングを行った. 好中球エラスターゼを蛍光標識するため, 一次抗体のヤギ抗ヒトエラスターゼポリクローナル抗体 (1:2,000, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) と室温で 1 時間反応させ, PBS で 3 回洗浄した. そして, 二次抗体の Alexa Fluor 594 標識抗ヤギ IgG 抗体 (1:1,000, Thermo Fisher Scientific) と室温で 1 時間反応させた後, PBS で 5 回洗浄した. ProLong Gold Antifade Reagent with DAPI (Thermo Fisher Scientific) を用いて DNA の蛍光染色と封入を行い, 蛍光顕微鏡 (Axioplan 2, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) により観察した (11, 14).

細胞外 DNA の蛍光ライブ染色は, SYTOX Green を用いて行った. 感染好中球を 3 時間培養した後, PBS で 2 回洗浄し, 50 nM の SYTOX Green (Thermo Fisher Scientific) を添加した. さらに, $37^\circ C$, 5% CO_2 存在下で 10 分間培養し, 蛍光顕微鏡により観察した. SYTOX Green は無損傷の膜を通過せず, 死細胞内もしくは細胞外の DNA のみを染色する.

11. 好中球ヒストンのシトルリン化の検出

24 ウェルポリスチレンプレートの1ウェルあたり、 1.5×10^6 細胞のヒト好中球を播種した。30分の培養後、培地交換し、各菌株を感染させた。コントロールとして200 nMのPMAを添加した。1時間の培養後、 $400 \times g$ で5分間の遠心分離を行い、培養液から細胞を回収した。プレート基底面に接着した細胞はドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 1×サンプル緩衝液 [6.25 mM トリス塩酸緩衝液 (pH6.8), 4%ドデシル硫酸ナトリウム溶液, 10% グリセロール, 0.005%プロモフェノールブルー] で懸濁し、上清中の細胞と混和した。混和液に50 mMジチオトレイトールを添加し、 100°C で5分間加熱後、16%アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEによりタンパクを展開した。そして、セミドライ式プロッター (BIO RAD, CA, USA) を用いてポリフッ化ビニリデン膜 (PVDF膜, Millipore) へ15V一定で1時間の転写を行った。PVDF膜をブロックエース (メグミルク, 東京) 溶液に浸漬し、 4°C で一晩のブロッキングを行った。次に、0.05% Tween 20 (和光純薬) を含むTBS [20 mM Tris, 0.15 M NaCl (pH 7.6)] (TBST) で2,000倍希釈した抗ヒストン H3 シトルリン抗体 (Abcam, Cambridge, UK) と室温で1時間反応させた。TBSTで3回洗浄後、2,000倍希釈したHRP標識抗ウサギIgG抗体 (Cell Signaling Technology, MA, USA) と室温で1時間反応させた。PVDF膜を洗浄後、Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) と反応させ、生じた化学発光をレントゲンフィルム (富士フィルム, 東京) に投影し、現像した。

続いて、PVDF膜をTBSTで2回洗浄し、ストリッピング溶液 (和光純薬) と10分間反応させた。さらに、TBSTで3回洗浄後、ブロッキングを行った。TBST

で 2,000 倍希釈したマウス抗 β -アクチン抗体 (Cell Signaling Technology) と 1 時間反応させた. TBST で 3 回洗浄後, 2,000 倍希釈した HRP 標識抗マウス IgG 抗体と 1 時間反応させた. PVDF 膜を TBST で 3 回洗浄後, 先述と同様に, ローディングコントロールである β -アクチンを検出した.

12. 感染好中球の細胞外 DNA 量の測定

96 ウェルポリスチレンプレートの各ウェルに 5×10^5 細胞のヒト好中球を播種し, 30 分間の培養を行った. カタラーゼ含有もしくは不含の培地と交換し, 各菌株を感染させた. 感染 1 もしくは 3 時間後に, PBS で洗浄し, SYTOX Green を添加した. 励起波長/蛍光波長を 485/535 nm に設定し, 1 秒間の相対蛍光単位 (relative fluorescent unit, RFU) を Wallac ARVO SXFL 1420 Multilabel Counter (Perkin Elmer Life Sciences, MA, US) で測定し, 細胞外 DNA 量の比較を行った (32). 各検体の蛍光強度は, 非感染好中球での値を減算し, 算出した.

感染好中球の細胞外 DNA 量にアポトーシスの影響がないかについて検討するため, 好中球を含む溶液に 20 μ M の Z-Val-Ala-Asp(OMe)-CH₂F (Z-VAD-FMK, ペプチド研究所, 大阪) を添加し, 96 ウェルポリスチレンプレートに播種した. Z-VAD-FMK は不可逆性の全カスパーゼ阻害剤でアポトーシスの誘導を阻害する. 30 分間の培養後, Z-VAD-FMK 含有 RPMI と交換し, 各菌株を 1 もしくは 3 時間感染させた. PBS で洗浄後, SYTOX Green を添加し, 蛍光強度を測定した.

13. 好中球の貪食能の観察と貪食菌数の測定

8 ウェルチャンバースライドの各ウェルに 5×10^5 細胞の好中球を播種し, 30 分

間の前培養を行った。培地を交換した後、各菌株を感染させた。感染 0.5 もしくは 1 時間後、メタノールにより固定し、ギムザ染色を行った。水洗・乾燥後、位相差顕微鏡 (CX41, オリンパス, 東京) を用いて好中球内に貪食された *S. sanguinis* を観察した。1,000 倍の拡大像を、各検体につき 10 視野ずつデジタルカメラで撮影した。画像において、好中球内に完全に含まれた菌を連鎖の長さによらず 1 連鎖とした。好中球数と好中球に貪食された連鎖数から、1 好中球あたりの貪食菌数 (連鎖) を算出した。

14. 統計処理

全ての実験は 3 回以上行い、その平均値および標準偏差をグラフに示した。Mann-Whitney *U* 検定により各群間の有意差を検討した。 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

15. 実験承認

本研究は、大阪大学遺伝子組換え実験委員会、病原体等取扱安全管理委員会、および大阪大学歯学部倫理審査委員会の承認を得て行った (遺伝子組換え実験承認番号; 3365, 病原体所持承認番号; 23(歯学研究科)-8, 倫理研究承認番号; H26-E43)。

結果

1. 作製変異株の生育度とコロニー形態の観察

S. sanguinis SK36 株 (WT) を親株として, *spxB* 欠失株 ($\Delta spxB$) および復帰変異株 (Wr) を作製し, 各菌株の生育度とコロニー形態について検討した. *spxB* 欠失により, 生育度は亢進する傾向を認めたが, 有意差は認められなかった (図 2A). また, TH 寒天培地上で生存した各菌株のコロニー形態を観察した. WT 株および Wr 株のコロニーの表層は滑沢であったのに対し, $\Delta spxB$ 株では粗造であった (図 2B).

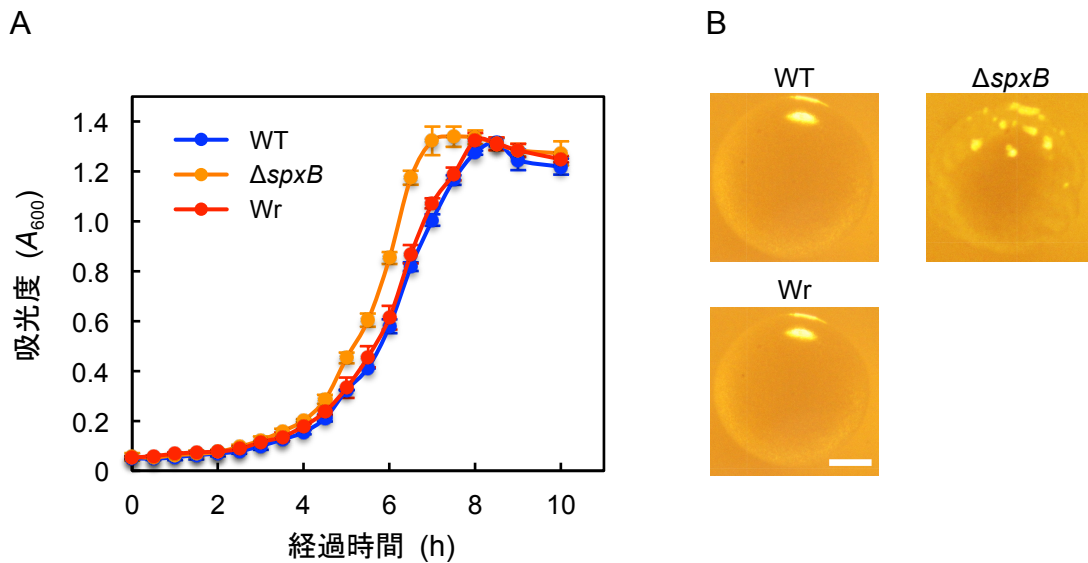


図 2. *S. sanguinis* SK36 株, *spxB* 欠失株, および復帰変異株の成長度とコロニー形態

A. *S. sanguinis* の各菌株を TH 液体培地にて 37°C で培養し, 波長 600 nm の吸光度を測定した. *S. sanguinis* SK36 株 (WT), *spxB* 欠失株 ($\Delta spxB$), 復帰変異株 (Wr) のデータをそれぞれ青色, 黄色, 赤色で示す.

B. 各菌液を TH 寒天培地に播種し, 37°C で培養した. 一晚培養後, デジタルカメラで撮影した単一コロニーの写真を示す. Bar, 0.25 mm.

2. プルシアンブルー反応を用いた *S. sanguinis* の H_2O_2 産生能の検討

各菌株の H_2O_2 産生能をプルシアンブルー反応により検討した。プルシアンブルー寒天培地に各菌液を滴下し、大気中で培養を行った。WT 株および Wr 株のコロニー周囲には、境界明瞭な濃紺色のハローが形成された (図 3A)。一方、 $\Delta spxB$ 株のコロニー周囲には、境界不明瞭な淡青色のハローが認められた。コントロールとして滴下した TH 培地では、ハローの形成を認めなかった。青色ハローの面積を Image J ソフトウェアを用いて解析した結果、WT および Wr 株と比較して、 $\Delta spxB$ 株のハロー面積は有意に減少した (図 3B, $p < 0.01$)。また、嫌気培養下では供試菌株のコロニー周囲にハローは全く確認されなかった (図 3C)。

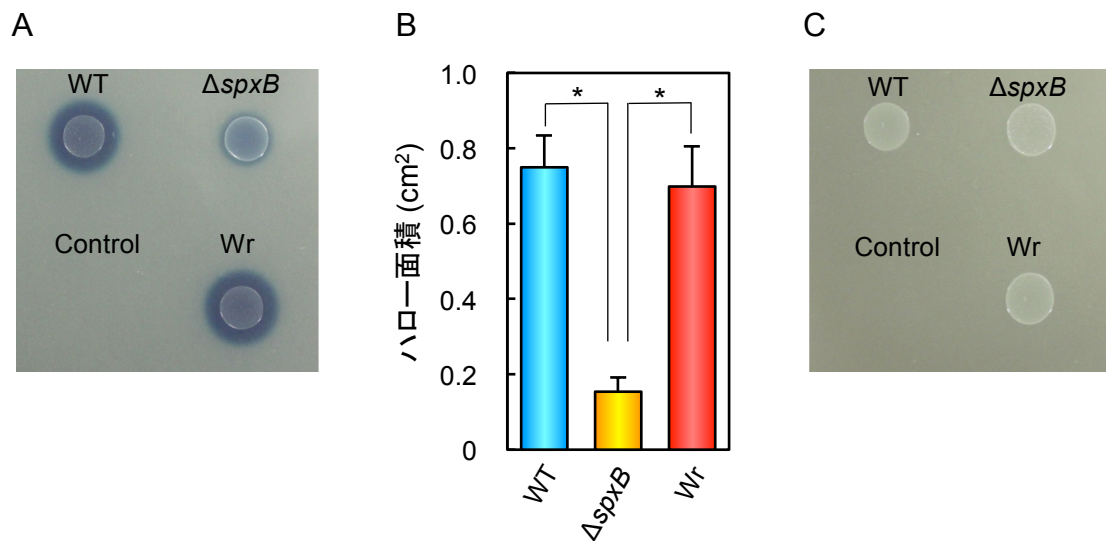


図 3. プルシアンブルー反応を用いた H_2O_2 産生能の検討

A. 対数増殖期中期まで大気中で培養した *S. sanguinis* の各菌液をプルシアンブルー寒天培地に滴下した。コントロールとして TH 培地のみを滴下し、24 時間大気中で培養した。 *S. sanguinis* SK36 株, *spxB* 欠失株, 復帰変異株をそれぞれ WT, $\Delta spxB$, Wr と示す。

B. プルシアンブルー寒天プレート上の青色ハロー面積を Image J ソフトウェアにて算定した。図中の縦棒は 3 回の実験における平均値を、誤差バーは標準偏差をそれぞれ示す。* $p < 0.01$ 。

C. 嫌気培養した各菌液をプルシアンブルー寒天培地に滴下し、24 時間の嫌気培養を行った。

3. 菌体培養上清中の H₂O₂ の定量

アンプレックスレッドを用いて, *S. sanguinis* の培養上清中における H₂O₂ の定量を行った. WT 株および W_r 株の H₂O₂ 産生量は, 大気中での培養において, 2.9 ~ 3.5 mM であった. また, 5% CO₂ 存在下での培養時と比較して, H₂O₂ 産生量に差を認めなかった (図 4). 一方, 両条件における Δ *spxB* 株の H₂O₂ 産生量は, WT 株および W_r 株のそれと比較して有意に減少した ($p < 0.01$). *S. sanguinis* ATCC10556 株の H₂O₂ 産生量について, アンプレックスレッドを用いて検討したが, SK36 株と同程度であった (data not shown). プルシアンブルー反応を用いた検討および H₂O₂ 産生量の定量から, SpxB は *S. sanguinis* SK36 株の H₂O₂ 産生に関する主要な因子であることが示唆された.

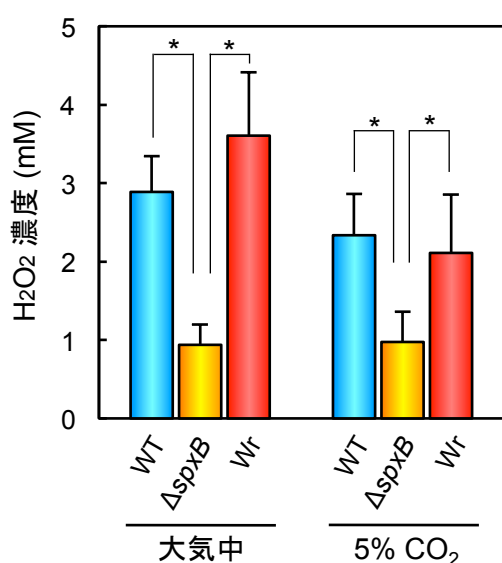


図 4. 培養上清中の H₂O₂ 産生量
大気中および 5% CO₂ 存在下で一晩培養した *S. sanguinis* SK36 株 (WT), *spxB* 欠失株 (Δ *spxB*), および復帰変異株 (W_r) の培養上清中の H₂O₂ 産生量を Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase Assay Kit を用いて定量した. 図中の縦棒は 4 回の実験における平均値を, 誤差バーは標準偏差をそれぞれ示す. * $p < 0.01$.

4. 末梢血中および好中球感染時の菌体生存に対する H₂O₂ の影響

血中における *S. sanguinis* の生存に H₂O₂ が影響を及ぼすかについて検討するため, 健常ヒト末梢血に *S. sanguinis* の各菌株を 0.5, 1.5, および 3 時間感染させた. その結果, WT 株および W_r 株と比較して, Δ *spxB* 株の菌体生存率は全ての時点に

において有意に低下した (図 5A). 次に, 1 細胞の好中球あたり 10 CFU の各菌株を感染させ (MOI = 10), 経時的に菌体生存率を算出した. 末梢血感染時と同様に, 全時点において $\Delta spxB$ 株の菌体生存率は, WT 株もしくは Wr 株のそれと比較して, 有意に低下した (図 5B). これらの結果から, 末梢血中および好中球存在下で, 菌体由来の H_2O_2 は *S. sanguinis* の生存に有利に働くことが示唆された.

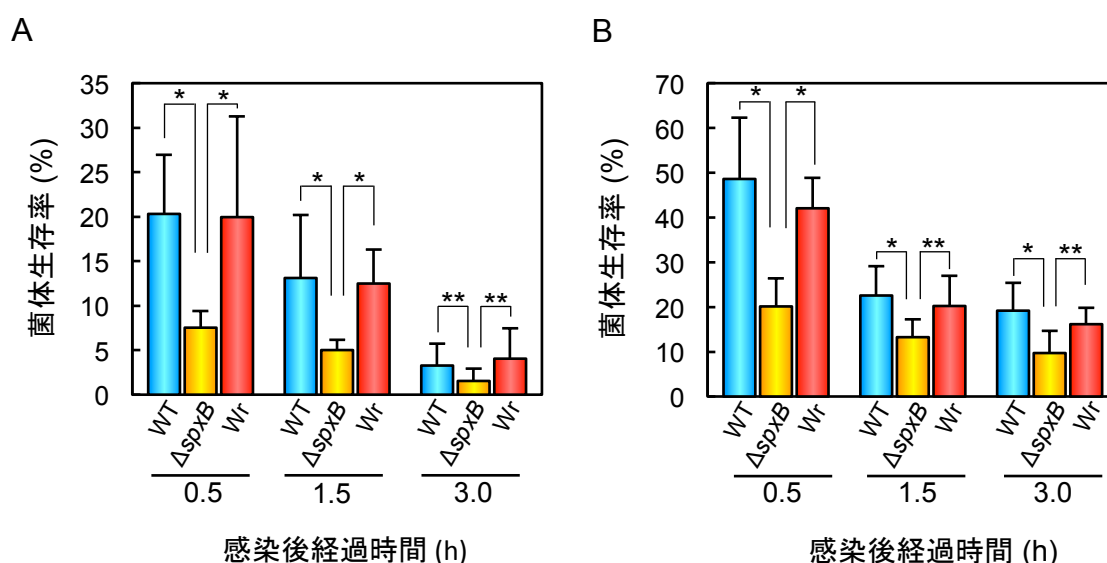


図 5. 末梢血および好中球感染時の菌体生存率

A. 対数増殖期後期まで培養した *S. sanguinis* SK36 株 (WT), *spxB* 欠失株 ($\Delta spxB$), もしくは復帰変異株 (Wr) を末梢血に感染させた. 感染後, 0.5, 1.5, および 3 時間の培養を行った後, TH 寒天培地に播種し, 一晚培養した. 生育コロニー数から菌体生存率を算出した. 図中の縦棒は 3 回の実験における平均値を, 誤差バーは標準偏差をそれぞれ示す. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$.

B. ヒト末梢血から単離した好中球に, MOI が 10 になるように *S. sanguinis* を感染させた. 末梢血感染時と同様に, 経時的に菌体生存率を算出した. 図中の縦棒は 3 回の実験における平均値を, 誤差バーは標準偏差をそれぞれ示す. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$.

5. 好中球に対する細胞毒性への H_2O_2 の影響

S. sanguinis が産生する H_2O_2 の好中球に対する傷害性を LDH の遊離量を指標に検討した. LDH は正常細胞の細胞質内に存在し, 細胞膜の傷害により培養上

清に遊離する酵素である。各菌株を感染させた好中球の培養上清中に遊離する LDH 量を感染 1 および 3 時間後に検討した結果、WT 株および Wr 株と比較して、 $\Delta spxB$ 株の細胞毒性は低下した (図 6)。また、PMA の添加により LDH の遊離が認められた。この結果より、*S. sanguinis* が産生する H_2O_2 は好中球に対して細胞毒性を有することが示唆された。

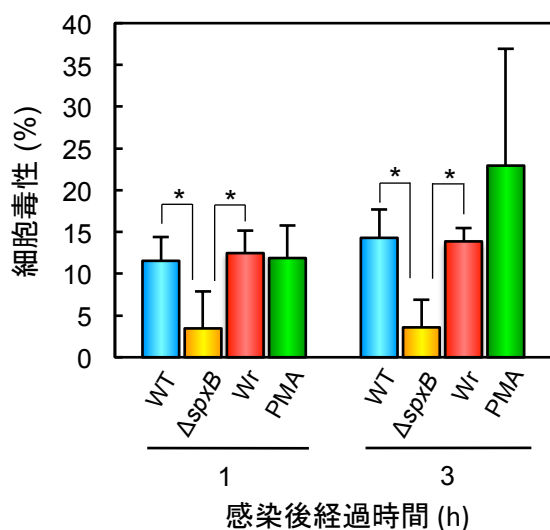


図 6. 好中球に対する細胞毒性

S. sanguinis SK36 株 (WT), *spxB* 欠失株 ($\Delta spxB$), もしくは復帰変異株 (Wr) を好中球に MOI を 10 で感染させた。陽性コントロールとして、200 nM の PMA を添加した。1 もしくは 3 時間培養後、培養上清を回収し、LDH 遊離試験に供試した。細胞毒性は以下の式から算出した。細胞毒性 (%) = (各検体の吸光度 - 非感染好中球の吸光度) / 0.25% Triton X-100 含有 PBS を添加した好中球の吸光度。図中の縦棒は 3 回の実験における平均値を、誤差バーは標準偏差をそれぞれ示す。* $p < 0.01$ 。

6. 感染好中球の観察

S. sanguinis の各菌株を好中球に 3 時間感染させ、固定後もしくは非固定で蛍光染色した DNA を観察した。

固定した好中球の DNA およびエラスターゼの蛍光染色を行った結果、WT 株もしくは Wr 株を感染させた好中球では、膨潤した核形態や糸状・網目状を呈する細胞外 DNA の染色像が認められた (図 7)。PMA もしくは 1 mM H_2O_2 を添加した場合においても、同様の DNA 染色像が観察された。一方、 $\Delta spxB$ 株感染好中球および非感染好中球の DNA 染色像において、細胞外の糸状、網目状の DNA は認

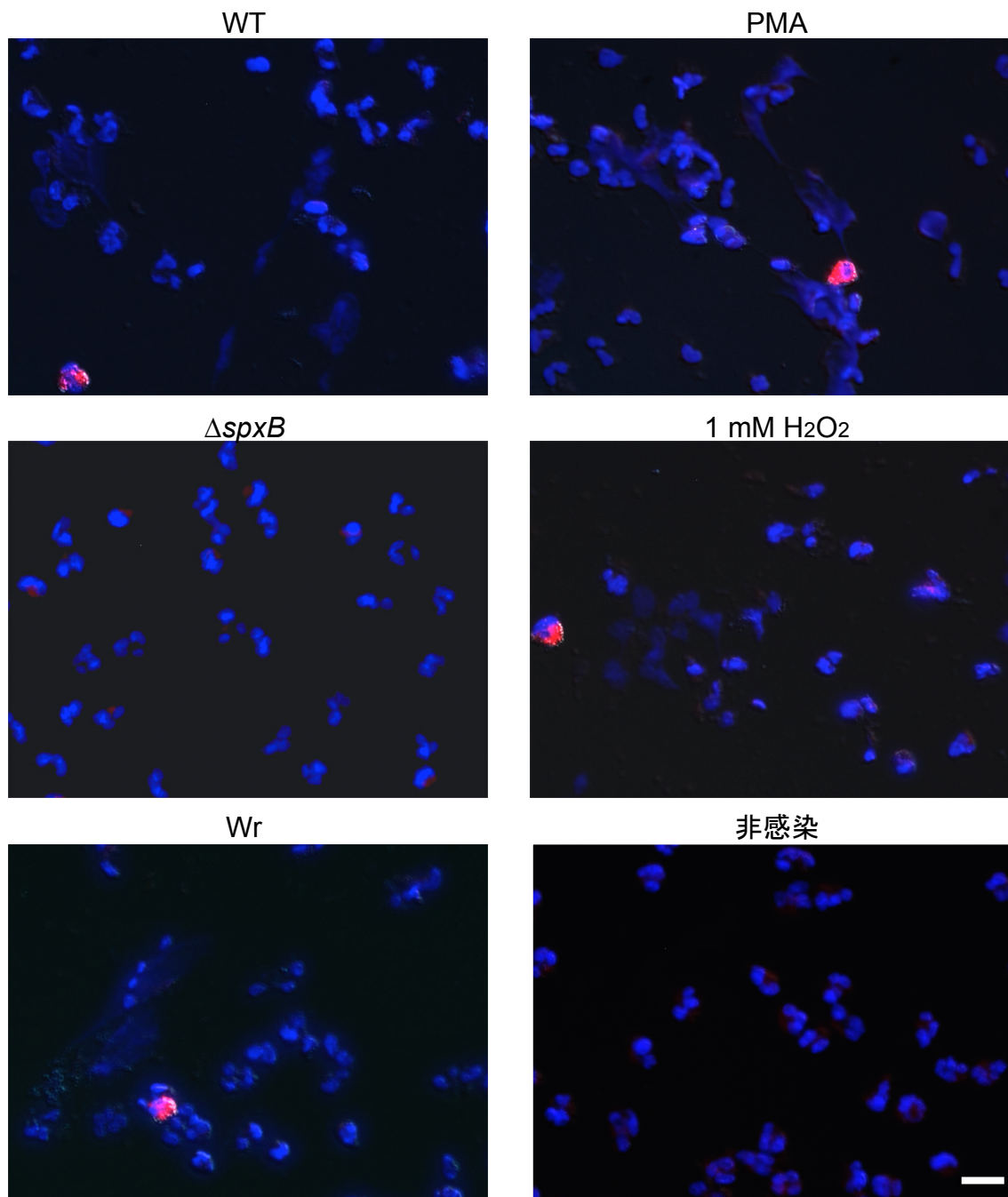


図 7. 感染好中球の DNA およびエラスターゼの蛍光染色像

好中球に *S. sanguinis* SK36 株 (WT), *spxB* 欠失株 ($\Delta spxB$), もしくは復帰変異株 (Wr) を感染させ, 3 時間培養した. 陽性コントロールとして, 200 nM の PMA もしくは 1 mM の H_2O_2 を好中球に添加した. 好中球エラスターゼはヤギ抗ヒトエラスターゼポリクローナル抗体と Alexa Fluor 594 標識抗ヤギ IgG 抗体で標識した. DNA の蛍光染色は DAPI を用いて行った. Bar, 20 μm .

められず、分葉核の形態は保存されていた。

次に、固定を行わず、DNA の蛍光ライブ染色を行った。蛍光 DNA 染色剤として、無損傷の膜を通過せず細胞外 DNA のみと反応する SYTOX Green を用いた (図 8)。WT 株もしくは Wr 株を感染させた好中球の DNA 染色像において、細胞形態が不均一な好中球や細胞外 DNA 染色像が観察された。PMA もしくは H_2O_2 の添加時においても、同様の DNA 染色像が認められた。一方、 $\Delta spxB$ 株感染好中球もしくは非感染好中球の染色像では、細胞外 DNA は認められず、部分的な細胞内 DNA の染色が認められた。これらの結果から、*S. sanguinis* 由来の H_2O_2 により傷害を受けた好中球は、NETs に特徴的な膨潤する核形態を呈し、一部の DNA を細胞外に放出することが示唆された。

7. *S. sanguinis* 感染による NETosis の誘導

細胞外の DNA 染色像が NETs 形成を反映するかについて確認するため、NETosis の誘導過程で起こるヒストン H3 および H4 のシトルリン化が感染好中球で認められるかについて、ウェスタンブロット解析により検討した。WT 株もしくは Wr 株を感染させた好中球および PMA 処理を行った好中球では、シトルリン化ヒストン H3 および H4 が、 $\Delta spxB$ 株感染好中球もしくは非感染好中球と比較し、明瞭に検出された (図 9)。 β -アクチンの検出量はサンプル間で同等であったことから、*S. sanguinis* の H_2O_2 は好中球ヒストン H3 および H4 のシトルリン化を促進し、NETs を誘導することが示唆された。

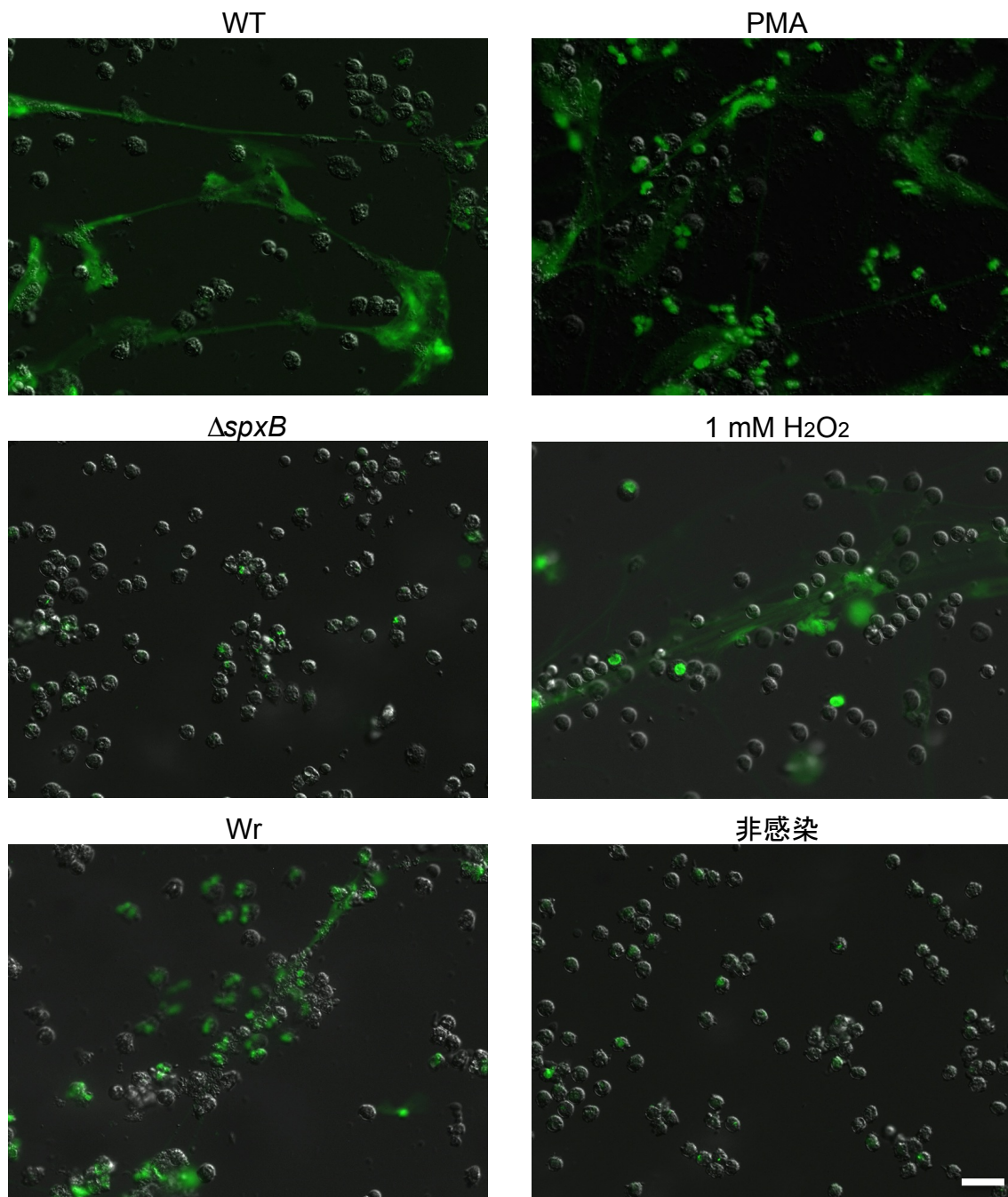


図 8. 感染好中球における細胞外 DNA

好中球に *S. sanguinis* SK36 株 (WT), *spxB* 欠失株 ($\Delta spxB$), もしくは復帰変異株 (Wr) を感染させ、3 時間培養した。陽性コントロールとして、200 nM の PMA もしくは 1 mM の H₂O₂ を好中球に添加した。50 nM の SYTOX Green を添加し、細胞外 DNA の蛍光ライブ染色を行った。微分干渉像および緑色で示す細胞外 DNA 染色像の重ね合わせ像を示す。Bar, 20 μ m.

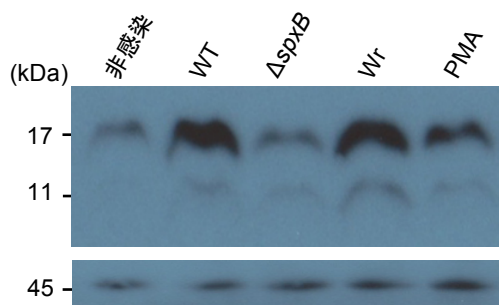


図9. 好中球のシトルリン化ヒストンの検出

好中球に *S. sanguinis* SK36 株 (WT), *spxB* 欠失株 ($\Delta spxB$), もしくは復帰変異株 (Wr) を 1 時間感染させた. 陽性コントロールとして, 好中球を PMA で処理し, 1 時間培養した. ウェスタンブロット解析により, 好中球ヒストン H3 (17 kDa) および H4 (11 kDa) を検出した (上パネル). ローディングコントロールとして β -アクチン (45 kDa) を検出した (下パネル).

8. 感染好中球の細胞外 DNA 量の測定

感染好中球の細胞外 DNA 量は菌体由来の H_2O_2 により影響を受けるかについて検討した. 好中球に 1 もしくは 3 時間の感染を行った後, SYTOX Green を添加し, 蛍光強度の測定により細胞外 DNA 量を比較した. また, カタラーゼを感染時に添加する群においても, 同様の解析を行った. カタラーゼの非存在下では, $\Delta spxB$ 株を感染させた好中球での蛍光強度は, WT 株もしくは Wr 株の感染時と比較し, 両時点で有意に減少した ($p < 0.01$, 図 10). また, WT 株もしくは Wr 株を感染させた好中球では, 各時点においてカタラーゼの添加により蛍光強度は減少し, $\Delta spxB$ 株感染時での蛍光強度と同等になった. 陽性コントロールとして, PMA を好中球に添加した場合の蛍光強度は, カタラーゼの有無による変化を認めなかった. これらの結果から, *S. sanguinis* が産生する H_2O_2 は好中球に作用し, NETs 誘導と共に細胞外 DNA 量を増加させることが示唆された.

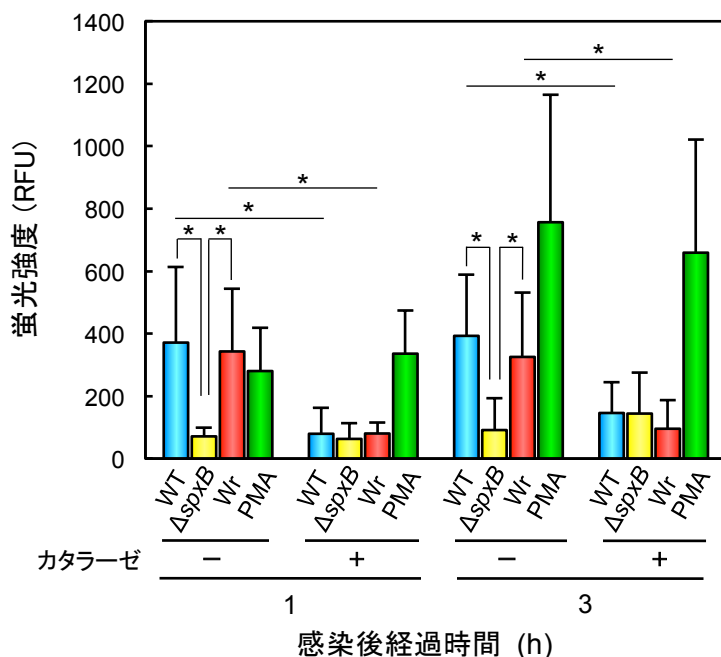


図 10. 感染好中球の細胞外 DNA 量に対する H₂O₂ の影響

30 分間の前培養を行った好中球に、カタラーゼを添加し、*S. sanguinis* SK36 株 (WT), *spxB* 欠失株 (Δ spxB), もしくは復帰変異株 (Wr) を感染させた. 感染 1 もしくは 3 時間後に SYTOX Green を添加し、蛍光強度を測定した. 非感染好中球での値を減算し、各検体の蛍光強度を算出した. 図中の縦棒は 3 回の実験における平均値を、誤差バーは標準偏差をそれぞれ示す. RFU, 相対蛍光単位. **p* < 0.01.

次に、細胞外 DNA 量にアポトーシスが影響しないことを検討するため、カスパーゼインヒビターである Z-VAD-FMK を好中球に前処理し、前述と同様に感染後の細胞外 DNA 量を測定した. その結果、感染後 1 および 3 時間において、Z-VAD-FMK 処理による蛍光強度の変化は認められなかった (図 11). この結果から、*S. sanguinis* 由来の H₂O₂ による細胞外 DNA 量の増加には、アポトーシスは関与しないことが示唆された.

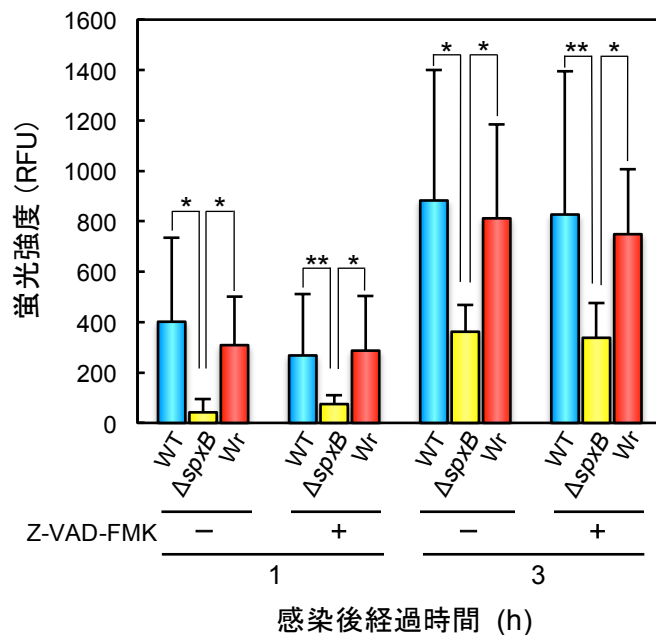


図 11. 感染好中球の細胞外 DNA 量へのアポトーシスの影響

好中球に 20 μ M の Z-VAD-FMK を添加し、30 分間の前培養を行った。続いて、*S. sanguinis* SK36 株 (WT), *spxB* 欠失株 ($\Delta spxB$), もしくは復帰変異株 (Wr) を感染させた。感染後 1 もしくは 3 時間に SYTOX Green を添加し、蛍光強度を測定した。非感染好中球での値を減算し、各検体の蛍光強度を算出した。図中の縦棒は 3 回の実験における平均値を、誤差バーは標準偏差をそれぞれ示す。RFU, 相対蛍光単位。* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ 。

9. カタラーゼ添加時の菌体生存率の測定

S. sanguinis が産生する H_2O_2 による NETs 誘導は、菌体生存率に影響するかに ついて検討した。96 ウェルポリスチレンプレート底面に接着した好中球に *S. sanguinis* を感染させ、1 もしくは 3 時間培養後の菌体生存率を検討した。両時点 において、カタラーゼ添加の有無に関わらず、 $\Delta spxB$ 株の菌体生存率は、WT およ び Wr 株のそれと比較して、有意に低下した (図 12)。カタラーゼの添加により、 感染後 3 時間における WT, $\Delta spxB$, Wr 株の菌体生存率は、カタラーゼ非添加時と 比較し増加した。以上の結果から、カタラーゼ添加による NETs 形成量の減少は、

菌体生存に有利に働くことが示唆された。

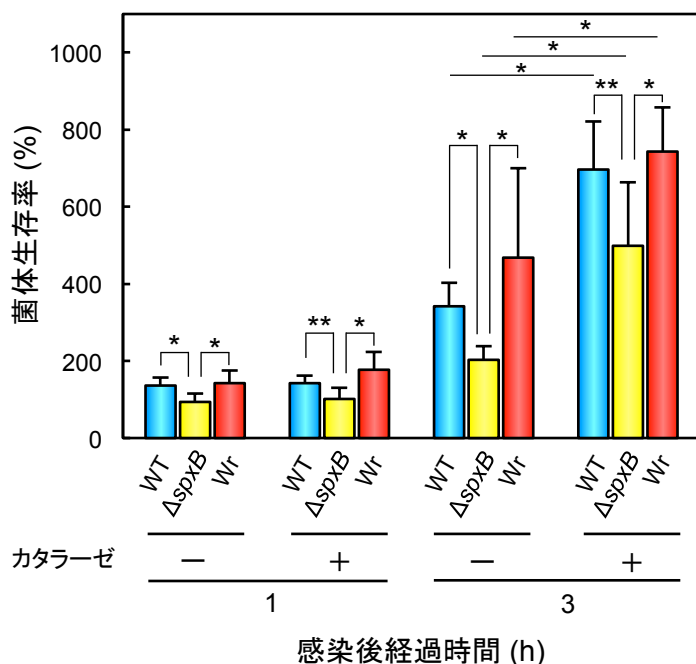


図 12. カタラーゼ添加時の菌体生存率の測定

好中球を前培養した後、カタラーゼ含有 RPMI 培地に交換し、*S. sanguinis* SK36 株 (WT), *spxB* 欠失株 (Δ spxB), もしくは復帰変異株 (Wr) を感染させた。1 もしくは 3 時間培養した後、TH 寒天培地に播種し一晚培養した。TH 寒天培地上の生育コロニー数から菌体生存率を算出した。図中の縦棒は 3 回の実験における平均値を、誤差バーは標準偏差をそれぞれ示す。* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$ 。

10. 好中球貪食能の検討

好中球の *S. sanguinis* 貪食能を検討するため、8 ウェルチャンバースライドに播種した好中球に各菌株を感染させ、0.5 もしくは 1 時間培養後にギムザ染色を行い、位相差顕微鏡で観察した (図 13A)。感染 0.5 時間後の好中球が貪食した菌数は、*spxB* の欠失により、有意に増加した (図 13B)。感染 1 時間後の好中球が *spxB* 欠失株を貪食した菌数は、Wr 株のそれと比較して、有意に増加した。この結果から、*S. sanguinis* は H_2O_2 により好中球による貪食能に抵抗する可能性が示唆された。

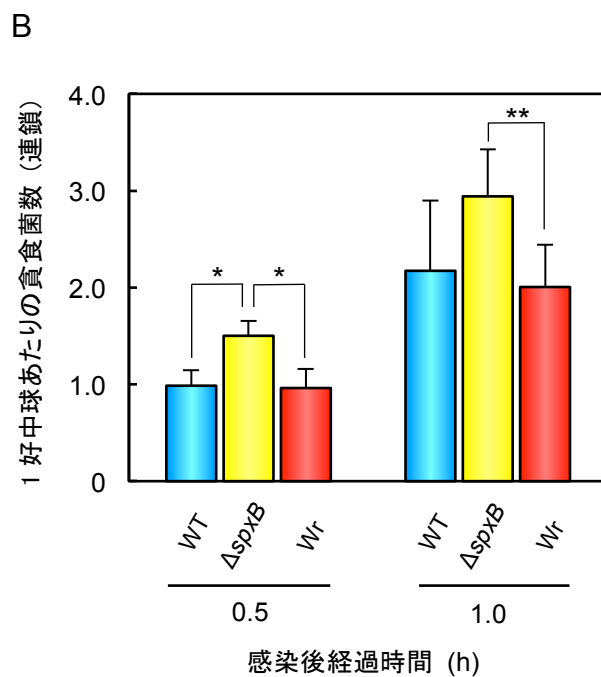
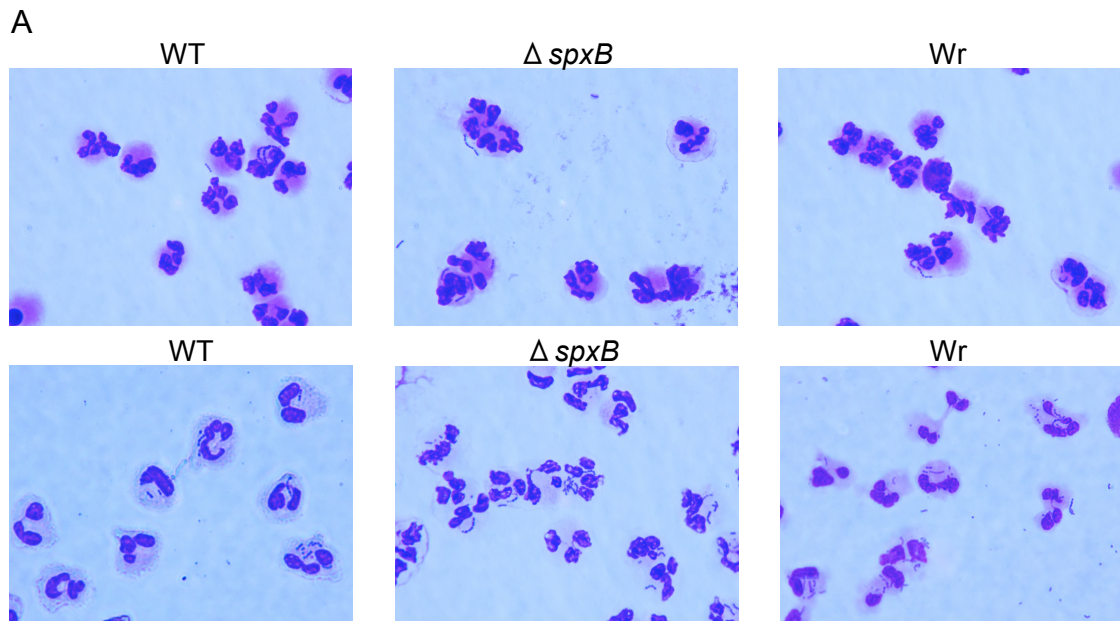


図 13. 好中球食食能の検討

A. 30 分間の前培養を行った好中球に, *S. sanguinis* SK36 株 (WT), *spxB* 欠失株 ($\Delta spxB$) および復帰変異株 (Wr) を感染させた. 0.5 (上段) もしくは 1 時間 (下段) 後にメタノールによる固定とギムザ染色を行った. 位相差顕微鏡を用いて, 1,000 倍の拡大像を観察した.

B. 好中球に食食された *S. sanguinis* の連鎖数から, 1 細胞の好中球あたりの食食連鎖数を算出した. 各条件につき 10 視野を検討した. 図中の縦棒は 6 回の実験における平均値を, 誤差バーは標準偏差をそれぞれ示す. * $p < 0.01$, ** $p < 0.05$.

考察

口腔常在菌は、未治療の歯科病変からだけでなく、日常のブラッシング時や歯科治療時に、血管内へ侵入し、一過性の菌血症を誘発する (1, 2, 33). ブラッシングを行った 5 分後の菌血症発症率は 10%程度であり、抜歯 5 分後では 50%に達する (34). 血管内へ侵入した病原細菌は宿主免疫機構を様々な病原因子の働きにより回避する. *S. sanguinis* や *S. oralis* を含む mitis 群レンサ球菌やグラム陰性桿菌である *Haemophilus influenzae* は、IgA プロテアーゼを産生することにより粘膜免疫を回避する (35, 36). 免疫系を回避した細菌は全身に伝播し、時に感染性心内膜炎等の致死的な感染症を誘発する (3, 37). 感染性心内膜炎は毎年 100 万人あたり 17~62 人が発症する稀な疾患であると報告されているが、その致死率は 10~26%に及ぶ (38). そのため、感染性心内膜炎のハイリスク患者において、歯科治療時の抗菌薬の予防投与が推奨されている (39, 40). 感染性心内膜炎関連細菌の血管内への侵入性、宿主免疫への抵抗性、心組織への定着機構、および心組織における疣贅拡大機序について解明することは、感染性心内膜炎の予防・治療法の開発につながる (37, 41, 42). 口腔領域に由来する菌血症の多くはレンサ球菌により発症する. 感染性心内膜炎の病巣局所から最も高頻度に分離される細菌は、本研究で対象とした *S. sanguinis* を含む mitis 群レンサ球菌である (3, 39). Mitis 群レンサ球菌が感染性心内膜炎を発症させるためには、宿主免疫からの回避や心組織への定着に機能する様々な病原因子の関与が推測される. 本研究では、*S. sanguinis* の H₂O₂ 産生能と SpxB に着目した.

SpxB はピルビン酸オキシダーゼであり、酸素存在下でピルビン酸からアセチルリン酸を生成する酸化還元反応を触媒する酵素である. 反応時に副産物とし

て、 H_2O_2 が産生される (16). この経路はアセチルリン酸から酢酸が合成される際に ATP が産生されるため、菌体のエネルギー産生において重要である. H_2O_2 は他の ROS と比較して安定であり、それ自体が細胞に障害を与えることはない. しかし、 H_2O_2 は細胞質内で遊離鉄などの遷移金属と反応することで、極めて酸化力が強いヒドロキシラジカルが産生され、DNA やタンパクを傷害する (17). SpxB は、*Streptococcus mitis*, *Streptococcus gordonii*, *Streptococcus pneumoniae*, *S. sanguinis*, *S. oralis*, *Streptococcus infantis*, *Streptococcus parasanguinis*, *Streptococcus oligofermentas* を含む mitis 群レンサ球菌に広く保存されており、アミノ酸配列の同一性は 98%以上である (17). SpxB の転写は、アデノシル基との結合によりチオエステラーゼとしての酵素活性を持つ SpxR (SSA_1492) や、酢酸キナーゼである AckA (SSA_0192) により正に調節される (43, 44). 一方、NADH 代謝系における主要なレギュレーターである CcpA (SSA_1576) やチアミンピロリン酸キナーゼである Tpk (SSA_2118) により負に調節される (43, 44, 45). SpxB は糖代謝関連因子により調節されると推測されている (43, 44, 45). バイオフィーム中におけるクオラムセンシングや宿主免疫系からの回避における SpxB の役割については未だ多くが不明である. *In vitro* 混合感染バイオフィームモデルにおいて、*S. sanguinis* は SpxB により産生された H_2O_2 により *Streptococcus mutans* の成長を阻害したため、バイオフィーム中において SpxB による H_2O_2 産生能は *S. mutans* の生存に不利に働くことが示唆されている (46). また、*S. sanguinis* や *S. oralis* が産生する H_2O_2 は、単球由来細胞株や上皮細胞株の細胞死を誘導することが報告されている (22, 23, 24). 本研究では、ゲノム配列が解読され、遺伝子情報が明らかとなっている *S. sanguinis* SK36 株を供試した. そして、*S. sanguinis* は酸素存

在下でのみ SpxB の酵素活性により H₂O₂ を産生した (図 3). SpxB による H₂O₂ は血液中の主要な免疫細胞である好中球に対して細胞毒性を示し, 好中球殺菌能への抵抗に寄与することを明らかとした (図 5, 6).

感染性心内膜炎の増悪には複数の過程が関与する (38, 41, 42). まず, 損傷を受けた宿主心臓組織の表層に細菌が付着しコロニーを形成する. この過程には, 細菌付着因子群の関与が示唆されている (42, 47). そして, 好中球や単球を含む免疫系細胞がコロニー周囲に集積し, NETs と血小板の相互作用により疣贅が拡大する (14, 48). ラット感染性心内膜炎モデルにおいて, NETs や血小板は感染の足場となり, 心臓での疣贅拡大に寄与する (48). *S. sanguinis* は, 細胞壁架橋型タンパクである SrpA (serin-rich protein, SSA_0829) や血小板凝集関連因子 (PAAP, platelet aggregation-associated protein, SSA_1663) により, 高い血小板凝集能を有する (49, 50, 51). 本研究では, *S. sanguinis* 由来の H₂O₂ が NETs を誘導することを明らかとした (図 7, 8, 9, 10). NETs の構成要素の一つであるヒストンは周囲の血小板や赤血球の活性化と血液凝固因子の放出を促進し, 血小板とフィブリンの凝集を誘導するという報告がある (52, 53). *S. sanguinis* は, 上記の血小板凝集能および H₂O₂ による NETs 誘導能により, 血栓症や感染性心内膜炎を発症・増悪させることが推測される.

好中球は, *in vitro* において, IL-8, LPS, ROS などの刺激により MAPK カスケードのシグナル伝達を起こし, シトルリン化酵素である PAD4 を活性化する (54, 55). 好中球ヒストンのアルギニンがシトルリンに変化すると, ヒストンと DNA の結合力が減弱し, NETs が形成される. NETs の機能として, 殺菌 (11), 凝固系の促進 (56), 感染性心内膜炎の増悪 (48), 全身性エリテマトーデスの発症 (57),

および癌転移の抑制が報告されている (58). *S. sanguinis* を含む mitis 群レンサ球菌以外の H_2O_2 産生菌として, *Mycoplasma pneumoniae* が挙げられる. 肺炎, 脳炎, 心筋炎, 心内膜炎の発症に関与する *M. pneumoniae* はグリセロリン酸オキシダーゼをコードする *glpD* の作用により H_2O_2 を産生する (59, 60, 61). *M. pneumoniae* が産生する H_2O_2 も, 本研究で明らかとした *S. sanguinis* の H_2O_2 と同様に NETs を誘導する可能性がある. 今後, 微生物が産生する H_2O_2 による NETs 産生が血栓症や心内膜炎の増悪および他の全身疾患との関連について, *in vivo* 感染モデルを用いた解析が必要である.

生体内における好中球の主要な殺菌は貪食と NETs により行われる. 感染好中球における菌体生存率 (図 12) は, 好中球殺菌試験でのそれ (図 5B) と比較して, 8 倍以上増加した. 好中球殺菌試験では好中球添加と同時に *S. sanguinis* を感染させているのに対し, 感染好中球における菌体生存率の実験では好中球を 30 分間の前培養後に *S. sanguinis* を感染させた点が異なるため, 30 分間の前培養中に好中球の初期貪食能が低下したことに由来することが示唆された. また, 活性酸素存在下で NETs 中に残存したミエロペルオキシダーゼは次亜塩素酸を産生し, 好中球の殺菌能に関与する (62, 63). 培養液中の H_2O_2 は, カタラーゼにより分解された結果, 次亜塩素酸による殺菌作用が減少し, 感染 3 時間後の全ての菌株における菌体生存率が増加した可能性が示唆された (図 12). WT 株もしくは W_r 株は好中球の貪食に抵抗していた (図 13). しかし, 感染好中球における WT 株もしくは W_r 株の菌体生存率はカタラーゼ添加により抑制されなかった (図 12). H_2O_2 依存的な抗貪食因子の報告はないが, $\Delta spxB$ 株では粗造な表面性状を呈したことから, 莢膜等の表層タンパクの発現量が変化し, 好中球による貪

食への抵抗性が低下することが示唆された (図 2B). 一方, NETs 形成量は *S. sanguinis* 由来の H_2O_2 依存的に増加した (図 10). 我々の先行研究において, *S. sanguinis* の細胞壁架橋型ヌクレアーゼが NETs を構成する網状 DNA を分解し, NETs による殺菌活性を抑制することで, *S. sanguinis* の生存率を増加させることを報告した (25). また, *S. sanguinis* は自身が産生する H_2O_2 により好中球による貪食能に抵抗した (図 12). *S. sanguinis* が産生した H_2O_2 は, 菌体生存に不利である NETs 形成を誘導するが, 細胞壁架橋型ヌクレアーゼにより NETs による殺菌を回避することで, SpxB による H_2O_2 産生は菌体生存に有益であることが示唆された (図 14).

高濃度の H_2O_2 は菌体にも為害作用を及ぼす. *S. sanguinis* における H_2O_2 分解機構に関与する因子として, SpxA1 により制御される NADH オキシダーゼ NOX (SSA_1127) のみが報告されている (64). *S. mutans* や *Streptococcus thermophilus* などのレンサ球菌において, H_2O_2 の分解機構に関与する因子として, スーパーオキシドディスムターゼ SodA (SSA_0721), NADP-チオレドキシシン還元酵素 TrxA2 (SSA_0211), グルタチオン還元酵素 Gor (SSA_1533) が報告されている (65, 66, 67). *S. sanguinis* の染色体上にこれらの遺伝子は存在する. *S. sanguinis* は NADH オキシダーゼによる H_2O_2 分解機構に加えて, これらの因子により H_2O_2 の強い酸化ストレスに抵抗すると推測される. また, 生体内には宿主細胞由来のカタラーゼが存在し, 産生した H_2O_2 は部分的に分解されることが推測される.

口腔レンサ球菌による感染性心内膜炎の詳細な発症機序は不明である. 本研究における解析から, *S. sanguinis* は H_2O_2 により血中における好中球の殺菌を回

避し、自然免疫機構に抵抗することが明らかとなった。*S. sanguinis* 由来の H_2O_2 による NETs 産生量の増加は、血栓症の増悪および感染性心内膜炎の心臓疣贅の拡大に関与する可能性があるため、今後、*in vivo* 感染モデルを用いた解析が必要となる。*S. sanguinis* による全身疾患発症メカニズムの詳細な解明は、NETosis 制御分子を標的とする薬剤の開発につながり、致死的な血栓症や感染性心内膜炎の予防および新規治療法の開発に貢献できることが期待できる。

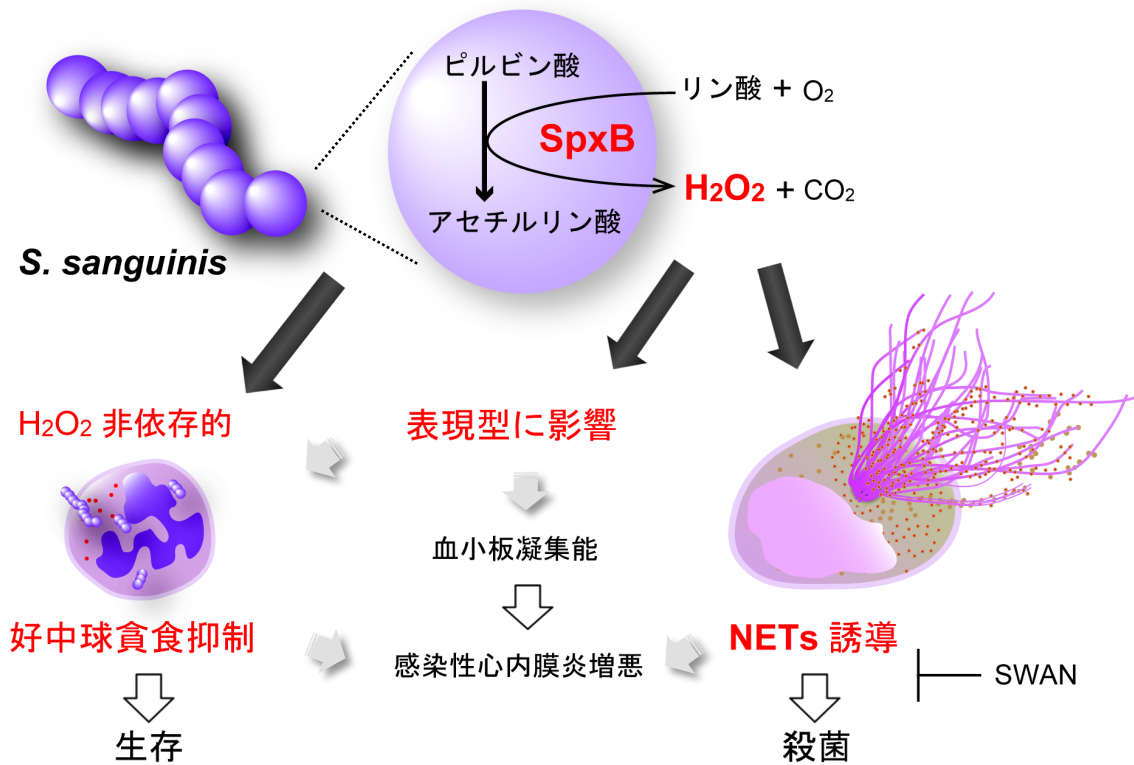


図 14. *S. sanguinis* が産生する H_2O_2 の好中球に対する影響.

S. sanguinis の SpxB の酵素活性により産生される H_2O_2 は NETs 形成を誘導する (図 7, 8, 9, 10). *S. sanguinis* は菌体表層の SWAN (streptococcal wall-anchored nuclease) のヌクレアーゼ活性により NETs を分解し, NETs による殺菌を回避する. *S. sanguinis* の表現型は *spxB* 欠失により変化したため (図 2B), SpxB 由来の H_2O_2 は細胞壁架橋型血小板凝集関連タンパクに影響を及ぼす可能性がある. 血小板凝集能は NETs との相互作用により感染性心内膜炎増悪への関与も示唆される. また, *S. sanguinis* は H_2O_2 非依存的な好中球に対する抗貪食能を有する (図 12). 末梢血殺菌試験および好中球殺菌試験の結果 (図 5) から, SpxB による H_2O_2 産生は NETs による殺菌以上に *S. sanguinis* の生存に有利に働く. 赤文字, 黒矢印, 本研究で解明. 灰矢印, 未知.

謝辞

本研究を行う機会を与えて頂き、終始ご懇意なるご指導とご鞭撻を賜りました口腔細菌学教室 川端 重忠 教授に深甚なる謝意を心より表します。口腔細菌学教室での研究を薦めて下さった歯科保存学教室 林 美加子 教授に御礼申し上げます。本研究を遂行するにあたり、直接のご指導とご鞭撻ならびに多くのご教示を賜りました口腔細菌学教室 中田 匡宣 准教授に心より感謝し、厚く御礼申し上げます。また、様々なご助言とご高閲を賜りました口腔科学フロンティアセンター 岡橋 暢夫 准教授、口腔細菌学教室 住友 倫子 助教、山口 雅也 助教に謹んで感謝の意を表します。

最後に、本研究を行うに際し、ご理解とご協力を頂きました口腔細菌学教室 および歯科保存学教室の皆様へ深く御礼申し上げます。

参考文献

1. Horstkotte, D., Follath, F., Gutschik, E., Lengyel, M., Oto, A., Pavie, A., Soler-Soler, J., Thiene, G., von Graevenitz, A., Priori, S. G., Garcia, M. A., Blanc, J. J., Budaj, A., Cowie, M., Dean, V., Deckers, J., Fernández Burgos, E., Lekakis, J., Lindahl, B., Mazzotta, G., Morais, J., Smiseth, O. A., Lekakis, J., Vahanian, A., Delahaye, F., Parkhomenko, A., Filipatos, G., Aldershvile, J., and Vardas, P. (2004) Guidelines on prevention, diagnosis and treatment of infective endocarditis. The task force on infective endocarditis of the European Society of Cardiology. *Eur. Heart J.* 25: 267-276.
2. Pihlstrom, B. L., Michalowicz, B. S., and Johnson, N. W. (2005) Periodontal diseases. *Lancet* 366: 1809-1820.
3. Kawamura, Y., Hou, X. G., Sultana, F., Miura, H., and Ezaki, T. (1995) Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 406-408.
4. Facklam, R. (2002) What Happened to the Streptococci: Overview of Taxonomic and Nomenclature Changes. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 613-630.
5. Rosan, B., and Lamont, R. J. (2000) Dental plaque formation. *Microbes Infect.* 2: 1599-1607.
6. Diaz, P. I., Chalmers, N. I., Rickard, A. H., Kong, C., Milburn, C. L., Palmer, R. J. Jr., and Kolenbrander, P. E. (2006) Molecular characterization of subject-specific oral microflora during initial colonization of enamel. *Appl. Environ. Microbiol.* 72: 2837-2848.

7. Kuramitsu, H. K., He, X., Lux, R., Anderson, M. H., and Shi, W. (2007) Interspecies interactions within oral microbial communities. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 71: 653-670.
8. Douglas, C. W., Heath, J., Hampton, K. K., and Preston, F. E. (1993) Identity of viridans streptococci isolated from cases of infective endocarditis. *J. Med. Microbiol.* 39: 179-182.
9. Segal, A. W. (2005) How neutrophils kill microbes. *Annu. Rev. Immunol.* 23: 197-223.
10. Lacy, P., and Eitzen, G. (2008) Control of granule exocytosis in neutrophils. *Front. Biosci.* 13: 5559-5570.
11. Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S., Weinrauch, Y., and Zychlinsky, A. (2004) Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science* 303: 1532-1535.
12. Fuchs, T.A., Abed, U., Goosmann, C., Hurwitz, R., Schulze, I., Wahn, V., Weinrauch, Y., Brinkmann, V., and Zychlinsky, A. (2007) Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J. Cell. Biol.* 176: 231-241.
13. Nishinaka, Y., Arai, T., Adachi, S., Takaori-Kondo, A., and Yamashita, K. (2011) Singlet oxygen is essential for neutrophil extracellular trap formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 413: 75-79.
14. Al-Salih, G., Al-Attar, N., Delbosc, S., Louedec, L., Corvazier, E., Loyau, S., Michel, J. B., Pidard, D., Duval, X., and Meilhac, O. (2012) Role of vegetation-associated protease activity in valve destruction in human infective endocarditis. *PLoS One* 7: e45695.
15. London, J. (1968) Regulation and function of lactate oxidation in *Streptococcus faecium*. *J. Bacteriol.* 95: 1380-1387.

16. Pericone, C. D., Park, S., Imlay, J. A., and Weiser, J. N. (2003) Factors contributing to hydrogen peroxide resistance in *Streptococcus pneumoniae* include pyruvate oxidase (SpxB) and avoidance of the toxic effects of the fenton reaction. *J. Bacteriol.* 185: 6815–6825.
17. Spellerberg, B., Cundell, D. R., Sandros, J., Pearce, B. J., Idanpaan-Heikkila, I., Rosenow, C., and Masure, H. R. (1996) Pyruvate oxidase, as a determinant of virulence in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol.* 19: 803-813.
18. Zhu, L., Xu, Y., Ferretti, J. J., and Kreth, J. (2014) Probing oral microbial functionality--expression of *spxB* in plaque samples. *PLoS One* 9: e86685.
19. Liu, X., Ramsey, M. M., Chen, X., Koley, D., Whiteley, M., and Bard, A. J. (2011) Real-time mapping of a hydrogen peroxide concentration profile across a polymicrobial bacterial biofilm using scanning electrochemical microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 2668-2673.
20. Pericone, C. D., Overweg, K., Hermans, P. W., and Weiser, J. N. (2000) Inhibitory and bactericidal effects of hydrogen peroxide production by *Streptococcus pneumoniae* on other inhabitants of the upper respiratory tract. *Infect. Immun.* 68: 3990-3997.
21. Hoffmann, O., Zweigler, J., Smith, S. H., Freyer, D., Mahrhofer, C., Dagand, E., Tuomanen, E. I., and Weber, J. R. (2006) Interplay of pneumococcal hydrogen peroxide and host-derived nitric oxide. *Infect. Immun.* 74: 5058–5066.
22. Okahashi, N., Okinaga, T., Sakurai, A., Terao, Y., Nakata, M., Nakashima, K., Shintani, S., Kawabata, S., Ooshima, T., and Nishihara, T. (2011) *Streptococcus sanguinis* induces

- foam cell formation and cell death of macrophages in association with production of reactive oxygen species. *FEMS Microbiol. Lett.* 323: 164-170.
23. 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.
 24. 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: e88136.
 25. 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.
 26. Kilian, M., Mikkelsen, L., and Henriksen, J. (1989) Taxonomic study of viridans streptococci: description of *Streptococcus gordonii* sp. nov. and emended descriptions of *Streptococcus sanguis* (White and Niven 1946), *Streptococcus oralis* (Bridge and Sneath 1982), and *Streptococcus mitis* (Andrewes and Horder 1906). *Int. J. Sys. Bacteriol.* 39: 471–484.
 27. Takamatsu, D., Osaki, M., and Sekizaki, T. (2001) Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*. *Plasmid* 46: 140-148.
 28. Saito, M., Seki, M., Iida, K., Nakayama, H., and Yoshida, S. (2007) A novel agar medium to detect hydrogen peroxide-producing bacteria based on the prussian blue-forming reaction. *Microbiol. Immunol.* 51: 889-892.

29. Lancefield, R. C. (1957) Differentiation of group A streptococci with a common R antigen into three serological types, with special reference to the bactericidal test. *J. Exp. Med.* 106: 525-544.
30. Eggleton, P., Gargan, R., and Fisher, D. (1989) Rapid method for the isolation of neutrophils in high yield without the use of dextran or density gradient polymers. *J. Immunol. Methods* 121: 105–113.
31. Dacheux, D., Attree, I., Schneider, C., and Toussaint, B. (1999) Cell death of human polymorphonuclear neutrophils induced by a *Pseudomonas aeruginosa* cystic fibrosis isolate requires a functional type III secretion system. *Infect. Immun.* 67: 6164-6167.
32. Sur Chowdhury, C., Giaglis, S., Walker, U. A., Buser, A., Hahn, S, and Hasler, P. (2014) Enhanced neutrophil extracellular trap generation in rheumatoid arthritis: analysis of underlying signal transduction pathways and potential diagnostic utility. *Arthritis Res. Ther.* 16: R122.
33. Roberts, G. J., Jaffray, E. C., Spratt, D. A., Petrie, A., Greville, C., Wilson, M., and Lucasm, V. S. (2006) Duration, prevalence and intensity of bacteraemia after dental extractions in children. *Heart* 92: 1274–1277.
34. Lockhart, P. B., Brennan, M. T., Sasser, H.C., Fox, P. C., Paster, B. J., and Bahrani-Mougeot, F. K. (2008) Bacteremia associated with toothbrushing and dental extraction. *Circulation* 117: 3118-3125.
35. Cole, M. F., Evans, M., Fitzsimmons, S., Johnson, J., Pearce, C., Sheridan, M. J., Wientzen, R., and Bowden, G. (1994) Pioneer oral streptococci produce immunoglobulin A1 protease. *Infect. Immun.* 62: 2165-2168.

36. Qiu, J., Hendrixson, D. R., Baker, E. N., Murphy, T. F., St. Geme, J. W. 3rd., and Plaut, A. G. (1998) Human milk lactoferrin inactivates two putative colonization factors expressed by *Haemophilus influenzae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95: 12641-12646.
37. Peterson, L.J., and Peacock, R. (1976) The incidence of bacteremia in pediatric patients following tooth extraction. *Circulation* 53: 676–679.
38. Mylonakis, E., and Calderwood, S. B. (2001) Infective endocarditis in adults. *N. Engl. J. Med.* 345: 1318-1330.
39. American Academy on Pediatric Dentistry Clinical Affairs Committee; American Academy on Pediatric Dentistry Council on Clinical Affairs. (2009) Guideline on antibiotic prophylaxis for dental patients at risk for infection. *Pediatr. Dent.* 215-218.
40. Wilson, W., Taubert, K.A., Gewitz, M., Lockhart, P.B., Baddour L.M., Levison, M., Bolger, A., Cabell, C.H., Takahashi, M., Baltimore, R.S., Newburger, J.W., Strom, B.L., Tani, L.Y., Gerber, M., Bonow, R.O., Pallasch, T., Shulman, S.T., Rowley, A.H., Burns, J.C., Ferrieri, P., Gardner, T., Goff, D., and Durack, D.T. (2007) Prevention of infective endocarditis: guidelines from the American Heart Association: a guideline from the American Heart Association Rheumatic Fever, Endocarditis, and Kawasaki Disease Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young, and the Council on Clinical Cardiology, Council on Cardiovascular Surgery and Anesthesia, and the Quality of Care and Outcomes Research Interdisciplinary Working Group. *Circulation* 116: 1736-1754.
41. Stacy, A., Everett, J., Jorth, P., Trivedi, U., Rumbaugh, K. P., and Whiteley, M. (2014) Bacterial fight-and-flight responses enhance virulence in a polymicrobial infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111: 7819-7824.

42. Prendergast, B. D. (2006) The changing face of infective endocarditis. *Heart* 92: 879-885.
43. Chen, L., Ge, X., Dou, Y., Wang, X., Patel, J. R., and Xu, P. (2011) Identification of hydrogen peroxide production-related genes in *Streptococcus sanguinis* and their functional relationship with pyruvate oxidase. *Microbiology* 157: 13-20.
44. Moraes, J. J., Stipp, R. N., Harth-Chu, E. N., Camargo, T. M., and Höfling, J. F. (2014) Two-component system VicRK regulates functions associated with establishment of *Streptococcus sanguinis* in biofilms. *Infect. Immun.* 82: 4941-4951.
45. Zheng, L., Chen, Z., Itzek, A., Ashby, M., and Kreth, J. (2011) Catabolite control protein A controls hydrogen peroxide production and cell death in *Streptococcus sanguinis*. *J. Bacteriol.* 193: 516-526.
46. Kreth, J., Merritt, J., Shi, W., and Qi, F. (2005) Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. *J. Bacteriol.* 187: 7193-7203.
47. Fitzgerald, J. R., Foster, T.J., and Cox, D. (2006) The interaction of bacterial pathogens with platelets. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 445-457.
48. Jung, C. J., Yeh, C. Y., Hsu, R. B., Lee, C. M., and Shun, C. T. (2015) Endocarditis pathogen promotes vegetation formation by inducing intravascular neutrophil extracellular traps through activated platelets. *Circulation* 131: 571-581.
49. Herzberg, M. C., Brintzenhofe, K. L., and Clawson, C. C. (1983) Aggregation of human platelets and adhesion of *Streptococcus sanguis*. *Infect. Immun.* 39: 1457-1469.
50. Ford, I., and Douglas, C. W. (1997) The role of platelets in infective endocarditis. *Platelets* 8: 285-294.

51. Plummer, C., Wu, H., Kerrigan, S. W., Meade, G., Cox, D., and Ian Douglas, C. W. (2005) A serine-rich glycoprotein of *Streptococcus sanguis* mediates adhesion to platelets via GPIb. *Br. J. Haematol.* 129: 101-109.
52. Fuchs, T. A., Brill, A., Duerschmied, D., Schatzberg, D., Monestier, M., Myers, D. D. Jr., Wroblewski, S. K., Wakefield, T. W., Hartwig, J. H., and Wagner, D. D. (2010) Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107: 15880-15885.
53. Yoo, D. G., Winn, M., Pang, L., Moskowitz, S. M., Malech, H. L., Leto, T. L., and Rada, B. (2014) Release of cystic fibrosis airway inflammatory markers from *Pseudomonas aeruginosa*-stimulated human neutrophils involves NADPH oxidase-dependent extracellular DNA trap formation. *J. Immunol.* 192: 4728-4738.
54. Wang, Y., Li, M., Stadler, S., Correll, S., and Li, P. (2009) Histone hypercitrullination mediates chromatin decondensation and neutrophil extracellular trap formation. *J. Cell Biol.* 184: 205-213.
55. Li, P., Li, M., Lindberg, M. R., Kennett, M. J., and Xiong, N. (2010) PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J. Exp. Med.* 207: 1853-1862.
56. von Brühl, M. L., Stark, K., Steinhart, A., Chandraratne, S., Konrad, I., Lorenz, M., Khandoga, A., Tirniceriu, A., Coletti, R., Köllnberger, M., Byrne, R. A., Laitinen, I., Walch, A., Brill, A., Pfeiler, S., Manukyan, D., Braun, S., Lange, P., Riegger, J., Ware, J., Eckart, A., Haidari, S., Rudelius, M., Schulz, C., Ehtler, K., Brinkmann, V., Schwaiger, M., Preissner, K. T., Wagner, D. D., Mackman, N., Engelmann, B., and Massberg, S.

- (2012) Monocytes, neutrophils, and platelets cooperate to initiate and propagate venous thrombosis in mice in vivo. *J. Exp. Med.* 209: 819-835.
57. Knight, J. S., Zhao, W., Luo, W., Subramanian, V., O'Dell, A. A., Yalavarthi, S., Hodgins, J. B., Eitzman, D. T., Thompson, P. R., and Kaplan, M. J. (2013) Peptidylarginine deiminase inhibition is immunomodulatory and vasculoprotective in murine lupus. *J. Clin. Invest.* 123: 2981-2993.
58. Cools-Lartigue, J., Spicer, J., McDonald, B., Gowing, S., Chow, S., Giannias, B., Bourdeau, F., Kubes, P., and Ferri, L. (2013) Neutrophil extracellular traps sequester circulating tumor cells and promote metastasis. *J. Clin. Invest.* 123: 3446-3458.
59. Hames, C., Halbedel, S., Hoppert, M., Frey, J., and Stülke, J. (2009) Glycerol metabolism is important for cytotoxicity of *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Bacteriol.* 191: 747-753.
60. Mariotti, P., Nociti, V., Stefanini, M. C., Frisullo, G., De Rosa, G., Colosimo, C., and Batocchi, A. P. (2010) Pneumonia's link with the head and heart. *Lancet* 376: 388.
61. Scapini, J. P., Flynn, L. P., Sciacaluga, S., Morales, L., and Cadario, M. E. (2008) Confirmed *Mycoplasma pneumoniae* endocarditis. *Emerg. Infect. Dis.* 14: 1664-1665.
62. Chen, L., Ge, X., Wang, X., Patel, J.R., and Xu, P. (2012) SpxA1 involved in hydrogen peroxide production, stress tolerance and endocarditis virulence in *Streptococcus sanguinis*. *PLoS One* 7: e40034.
63. Kiryu, C., Makiuchi, M., Miyazaki, J., Fujinaga, T., and Kakinuma, K. (1999) Physiological production of singlet molecular oxygen in the myeloperoxidase-H₂O₂-chloride system. *FEBS Lett.* 443: 154-158.
64. Derr, A. M., Faustoferri, R. C., Betzenhauser, M. J., Gonzalez, K., Marquis, R. E., and

- Quivey, R.G. Jr. (2012) Mutation of the NADH oxidase gene (*nox*) reveals an overlap of the oxygen- and acid-mediated stress responses in *Streptococcus mutans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 78: 1215–1227.
65. Yamamoto, Y., Higuchi, M., Poole, L.B., and Kamio, Y. (2000) Role of the *dpr* product in oxygen tolerance in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 182: 3740–3747.
66. Marco, S., Rullo, R., Albino, A., Masullo, M., De Vendittis, E., and Amato, M. (2013) The thioredoxin system in the dental caries pathogen *Streptococcus mutans* and the food-industry bacterium *Streptococcus thermophilus*. *Biochimie.* 95: 2145–2156.
67. Potter, A. J., Trappetti, C., and Paton, J. C. (2012) *Streptococcus pneumoniae* uses glutathione to defend against oxidative stress and metal ion toxicity. *J. Bacteriol.* 194: 6248-6254.

