

Title	Streptococcus pneumoniae のコリン結合タンパク質 CbpJが肺炎発症に果たす役割の解析
Author(s)	後藤,花奈
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/72250
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学位論文

Streptococcus pneumoniae のコリン結合タンパク質 CbpJ が

肺炎発症に果たす役割の解析

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(小児歯科学)

後藤 花奈

要約

Streptococcus pneumoniae は、肺炎や敗血症の主な原因菌として知られている. S. pneumoniae が産生するコリン結合タンパク質(Choline-binding protein:Cbp)は、細胞 壁に含まれるホスホリルコリンへの結合を介して菌体表層に局在し、様々な生物学的 機能や病原性に重要な役割を果たす.本研究では、詳細な機能が不明であるCbpL およ び CbpJ が、S. pneumoniae の病原性に果たす役割を検討した.

全ゲノムが解読された S. pneumoniae 28 株について, cbpL および cbpJ 遺伝子の分布 を BLAST プログラムにより検索した. その結果, cbpL 遺伝子は全ての株に存在し, そのうち7株でフレームシフト変異を認めた。一方, cbpJ 遺伝子は28株中18株に存 在しており, フレームシフト変異を持つ株は認められなかった.CbpL と CbpJ の機能 を検討するため, S. pneumoniae TIGR4 株を親株として, cbpL と cbpJ の遺伝子欠失変 異株をそれぞれ作製した.

各菌株をそれぞれマウスに経鼻感染させ、マウス肺炎モデ ルとして使用した.マウスの生存率を比較した結果, cbpJ 欠失変異株感染マウスは, 野生株感染マウスと比較して、有意に高い生存率を示した、生存率の結果と相関して、 感染 24 時間後の肺胞洗浄液中の菌数は cbpJ 欠失変異により有意に減少した。野生株 感染 24 時間後の肺組織像には著しい炎症像が認められた一方, cbpJ 欠失変異株感染 マウスの肺組織の炎症は軽度であった.cbpL 欠失変異株の病原性は,野生株と比較し て、減弱する傾向が認められたが、有意な差は確認されなかった. CbpL と CbpJ が好 中球による殺菌からの回避に及ぼす影響を検討するため、ヒト好中球と各菌株を混和 し、培養後の生菌率を比較した、その結果、cbpL 欠失変異株と cbpJ 欠失変異株は、 野生株と比較して、有意に低い生菌率を示した. さらに、cbpJ 欠失変異株と好中球を 混和させた後に組換え CbpJ を添加したところ、生菌率は有意に上昇した. また、肺胞

上皮細胞株への菌体付着率に各菌株間で有意差は認められなかった.これらの結果か ら、CbpL および CbpJ は好中球による殺菌回避に寄与する一方で、肺胞上皮細胞への 付着因子として機能しないことが示唆された.次に、マウス敗血症モデルにおける各 菌株の病原性を検討した.各菌株を経静脈感染させ、マウス生存率を比較したところ、 各菌株間で差は認められなかった.また、マウス血液中における各菌株の生菌率を比 較したところ、いずれも同程度の生菌率を示した.そこで、血漿成分が cbpL および cbpJ の発現に与える影響を定量的 PCR により比較した.その結果、血漿成分の添加に より、各遺伝子の転写量は有意に減少した.したがって、血中では cbpL および cbpJ の発現量が低下し、血流感染時の病原性に関与する可能性は低いことが示唆された.

以上の結果から、CbpL は好中球による殺菌に抵抗性を示すものの、マウス肺炎モデ ルおよびマウス敗血症モデルでは病原性に有意な影響を与えなかった.一方で、CbpJ は肺感染時において、好中球による殺菌からの回避に寄与し、S. pneumoniae の病原因 子として働くことが示唆された.

はじめに

Streptococcus pneumoniae は、血液寒天培地上でα溶血性を呈する通性嫌気性のグラム陽性双球菌である. 莢膜多糖の抗原性により、97 種類以上の血清型に分類される. 健常である小児や成人の上気道、鼻腔および口腔内に常在する一方、中耳炎や肺炎だけでなく、敗血症や髄膜炎といった侵襲性感染症を惹き起こす. 侵襲性感染症の成立 過程における S. pneumoniae の免疫回避機構の詳細は不明である.

S. pneumoniae の下気道感染により、世界で毎年約 120 万人以上が死亡していると推 計されている ¹⁾. この下気道感染症は、5 歳未満の小児の主要な死因であり、2015 年に は約 30 万人の小児が命を落としている²⁾.現在, S. pneumoniae 感染症に対して, 莢膜 多糖を抗原とするワクチンが使用されている。わが国の小児に使用されているワクチ ンが対象とする血清型は、1,3,4,5,6A,6B,7F,9V,14,18C,19A,19F, 23F である. ワクチンの導入によって,世界的には S. pneumoniae 感染症による 5 歳未 満の小児の死亡者数は, 2000 年から 2015 年の間でほぼ半減した ^{2~4}). 日本における 5 歳未満の小児についても,ワクチン導入によって,S. pneumoniae による侵襲性感染症 の罹患率は、同様に減少した 5. しかし、莢膜多糖を抗原とするワクチンによる感染 防御効果は、ワクチンの対象である血清型に限局される、ワクチン導入後に、ワクチ ン対象外の血清型による感染症は増加している^{4,6,7)}.ワクチン導入前と比較して,ワ クチン対象外の血清型の分離頻度は、約3倍に増加した⁸⁾.近年、血清型 12F、15A、 24F の分離頻度が増加している⁸. そのため, S. pneumoniae 感染症を制御する新たな ワクチン抗原として、血清型間で広く保存され、抗原性が高い菌体表層タンパク質が 着目されている.

S. pneumoniae の細胞壁は、ペプチドグリカン、タイコ酸、リボタイコ酸によって構成されている。タイコ酸とリボタイコ酸には、ホスホリルコリンが非共有結合している。S. pneumoniae の菌体表層タンパク質の一種であるコリン結合タンパク質(Cholinebinding protein: Cbp)は、コリン結合性リピート領域を有し、ホスホリルコリンとの結合を介して、菌体表層に局在している⁹⁾. S. pneumoniae のコリン結合タンパク質には、補体活性化の抑制により好中球の貪食に抵抗性を与える Pneumococcal surface protein A (PspA)^{10,11)}や CbpA^{12,13},自己融解酵素である LytA¹⁴⁾などの重要な病原因子 が含まれる。また、PspA は、多くの S. pneumoniae 株に保存されており、動物感染モ デルでの感染防御抗原としての可能性が示されていることから¹⁵⁾、タンパク質ワクチ ン抗原候補として注目されている¹⁶⁾.しかし、ファミリー、クレード間で必ずしも免疫交 差性が認められない¹⁷⁾.そのため、異なるファミリーの PspA の抗原部位を融合するこ とによって広範な S. pneumoniae 株に対して効果を示す PspA ワクチン抗原が構築され ている¹⁸⁾.

本研究では、S. pneumoniae のコリン結合タンパク質のうち、病原性との関連が不明 な CbpL および CbpJ に着目した. CbpL は、9 つのコリン結合ドメインの繰り返し構造 を有し、アミノ基末端側(N 末端側)とカルボキシル基末端側(C 末端側)には、そ れぞれ細胞外カルシウム結合ドメインとリポタンパク質ドメインを有する.また、N 末端側のアミノ酸残基 24 番目と 25 番目の位置に推定シグナルペプチダーゼの認識部 位を有している.すでに立体構造が解明されており、全長 180Å を超える細長い形状を 示し、細胞外にカルシウム結合ドメインを露出することが示唆されている¹⁹. CbpJ は、 C 末端側に 6 つのコリン結合ドメインの繰り返し構造を有するが、他の機能ドメイン

構造は認められない. S. pneumoniae TIGR4 株を親株として,それぞれの遺伝子欠失変 異株を作製した.得られた遺伝子欠失変異株を用い,肺胞上皮細胞に対する付着試験, 好中球殺菌試験,およびマウス感染実験を行い,S. pneumoniae の病態形成に果たす役 割を検証した.

材料と方法

1. 使用菌株と培養細胞株

本研究で使用した細菌株およびプラスミドを表 1 に示した. S. pneumoniae の培養に は,酵母エキス (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)を重量体 積比 0.2%になるように添加した Todd-Hewitt 液体培地 (THY; Becton Dickinson and Company),重量体積比 1.5%の寒天 (和光純薬,大阪,日本)を含む THY 寒天培地, または羊脱繊維血液 (日本バイオテスト研究所,埼玉,日本)を重量体積比 5%になる ように添加した THY 血液寒天培地を用いて培養した.また,必要に応じて,スペクチ ノマイシン (ナカライテスク,京都,日本)を最終濃度 120 µg/mL になるように添加 して用いた. Escherichia coli XL-10 Gold 株 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) は, Luria-Bertani液体培地 (LB; ナカライテスク),またはLB寒天培地を用いて培養した. E. coli の形質転換株の選択には、カルベニシリン (ナカライテスク) もしくはスペク チノマイシンをそれぞれ最終濃度が 100 µg/mL と 120 µg/mL になるように添加した.

ヒト肺胞上皮由来の細胞株 A549(ATCC CCL-185)は、10%ウシ胎児血清(FBS; Thermo Fisher Science, Waltham, MA, USA) 含有ダルベッコ改変イーグル培地(D-MEM:和光純薬)にて 37℃, 5% CO₂存在下で培養した. ヒト白血病細胞株 HL-60 は 10%FBS 含有 RPMI-1640 培地(RPMI:和光純薬)にて、37℃, 5% CO₂存在下で培養 した.

表1. 本研究に使用した菌株とプラスミド

菌株	特徴	抗菌薬耐性	由来
S. pneumoniae			
TIGR4株	莢膜血清型4型		
<i>∆cbpL</i> 株	TIGR4株の <i>cbpL</i> 遺伝子変異株, Δ <i>cbpL</i> :: <i>aad</i> 9	スペクチノマイシン	本研究
<i>∆cbpJ</i> 株	TIGR4株の <i>cbpJ</i> 遺伝子変異株, <i>∆cbpJ</i> :: <i>aad</i> 9	スペクチノマイシン	本研究
E. coli			
XL-10 Gold株	組換えタンパク質発現用コンピテント大腸菌	テトラサイクリン	Agilent Technologies
プラスミド			
pQE-30	組換えタンパク質発現プラスミド	アンピシリン	Qiagen
pQE-30/cbpJ	pQE-30に <i>cbpJ</i> 遺伝子を挿入したCbpJ発現プラスミド	アンピシリン	本研究

2. in silico ゲノム解析

S. pneumoniae TIGR4 株の全ゲノム配列は, National Center for Biotechnology Information (NCBI) の GenBank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AE005672.3) よ り入手した. 全構造遺伝子から, Cbp モチーフをコードする遺伝子を選出した. シグ ナル配列は, SignalP 4.1 サーバー (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/) により推定 した. 機能ドメインは, MOTIF Search (https://www.genome.jp/tools/motif/) にて, PROSITE, Conserved Domain Database, および P-fam を使用し, 検索した²⁰⁻²²⁾.

3. 組換えタンパク質の作製

プラスミド構築に使用したプライマーを表 2 に示した. 推定シグナルペプチド配列 をコードする部位を除いた *cbpJ* 遺伝子配列について, GENEius ソフトウェア (Eurofins Genomics, Brussel, Belgium)を用いてコドン配列を *E. coli* での発現に最適 化させ,人工 *cbpJ* DNA を合成した. 合成 DNA を鋳型として, *cbpJ* 遺伝子に特異的な プライマー (表 2: pQEcbpJOPTiF / pQEcbpJOPTiR および pQEcbpJOPTvF / pQEcbpJOPTvR)を用いて PCR で増幅した. GeneArt[™] Seamless Cloning and Assembly Enzyme Mix (Thermo Fisher Science)を用いて, PCR 産物を pQE-30 プラスミド (Qiagen, Hilden, Germany) に組込み,発現プラスミドを構築した. E. coli XL-10 Gold 株に発現 プラスミドを形質転換し,形質転換体をカルベニシリン含有 LB 培地 100 mL で 37℃ に て振盪培養した. 波長 600 nm における吸光度 (OD₆₀₀) が 0.4 の時点で, 最終濃度 1 mM のイソプロピル-α-D-チオガラクトピラノシド(和光純薬)を添加した. 16°C で 24 時間培養した後, 菌体を回収した. 菌体をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS: 137 mM 塩化ナトリウム, 10 mM リン酸水素二ナトリウム, 2.68 mM 塩化カリウム, 1.47 mM リン酸二水素カリウム) 20 mL に懸濁し、リゾチーム (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland)を最終濃度 0.25 mg/mL となるように添加した.4℃ で 30 分間反応させた 後,超音波破砕機(UD-201:トミー精工,東京,日本)を用いて 10 分間の間欠的な超 音波破砕 (DUTY 30, OUT PUT 4) を行った. 遠心分離 (4°C, 8000 × g, 20 分間) に より得られた上清画分を Econo-Pac Chromatography Colum (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) に充填した TALON Metal Affinity Resin (タカラバイオ, 滋賀, 日本) と混和し, 4°C で一晩振盪した. 20 mL の PBS で 5 回洗浄した後, 5 mL の溶出緩衝液〔50 mM リ ン酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.0), 300 mM 塩化ナトリウム, 250 mM イミダゾール〕を 添加し, 溶出液を回収した. その後, 溶出液を計 3 L の PBS に対して透析し, 溶液を 置換した. 精製タンパク質の濃度は, BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Science) で 測定した.

4. 定量的 PCR

血漿成分存在下における *cbpL* 遺伝子と *cbpJ* 遺伝子の発現量を比較するため, *S. pneumoniae* TIGR4 株を 5 mL の THY 培地で対数増殖初期(OD₆₀₀ = 0.4~0.5) まで培養

した. 遠心分離 (4°C, 13,000 × g, 7 分間) により,上清を除去した後,体積比で 0, 10,もしくは 50%のヒト血漿を含む RPMI 培地 5 mL で再懸濁を行い,37°C で 3 時間 培養した.ヒト血漿は,健常成人の肘正中皮静脈より採取した血液から調整した.血 液に最終濃度が 30 units/mL となるようにヘパリン (持田製薬,東京,日本)を添加し, 遠心分離 (25°C, 500 × g, 10 分間) を行い,上清を血漿として用いた.

S. pneumoniae各菌株の *lytA*発現量を比較するため、5 mL の THY 培地中で、対数増 殖期初期(OD₆₀₀ = 0.4)、対数増殖期中期(OD₆₀₀ = 0.8)、定常期(OD₆₀₀ = 1.2)に達す るまで培養した.また、死滅期のサンプル検体として 24 時間後(OD₆₀₀ = 0.5~0.6)ま で培養した菌体を用いた.各菌株の全 RNA は、RNeasy Mini Kit (Qiagen)を用いて抽 出した.ついで、ランダムプライマーおよび SuperScript IV VILO Master Mix (Thermo Fisher Science)を用いて逆転写反応を行い、全 RNA から相補鎖 DNA (cDNA)を合成 した.次に、cDNA を鋳型として、各遺伝子に特異的なプライマー(表 2:TIGR4 16SrRNAF/TIGR4 16SrRNAR, lytA qPCR_F/lytA qPCR_R, cbpL qPCR_F/cbpL qPCR_R および cbpJ qPCR_F/cbpJ qPCR_R)および SYBR[®] Green Realtime PCR Master Mix (東 洋紡、大阪、日本)を用い、StepOnePlus Real-Time PCR system (Thermo Fisher Science) にてインターカレーター法で定量的 PCR を行った.16S rRNA を内部標準遺伝子とし て、 $\Delta\DeltaC_t$ 法にて相対定量を行った.

5. 遺伝子欠失変異株の作製

cbpL, *cbpJ* 遺伝子の上流および下流領域,およびスペクチノマイシン耐性遺伝子 *aad*9について,特異的なプライマー(表2:T4cbpLKOuF/T4cbpLKOuR, T4cbpLKOaF /T4cbpLKOaR, T4cbpLKOdF/T4cbpLKOdF, T4cbpJKOuF/T4cbpJKOuR, T4cbpJKOaF



図 1. cbpL, cbpJ 欠失変異株の作製

cbpL または *cbpJ* 遺伝子の上流領域 DNA と下流領 域 DNA をスペクチノマイシン耐性遺伝子である *aad*9 遺伝子と, PCR により連結させ, TIGR4 株に 形質転換した. 点線で表示する部位での相同組換え により, *cbpL* と *cbpJ* 遺伝子は *aad*9 遺伝子に置換 される.

/ T4cbpJKOaR, T4cbpJKOdF / T4cbpJKOdF)を用いて PCR にて増幅した.オーバーラ ップ PCR で 3 種の DNA 断片を連結させ,精製した. Competence stimulating peptide (CSP)を用いる形質転換は,Bricker らの方法に従って行った²³⁾. S. pneumoniae TIGR4 株を改変 THY 培地(1 mM 塩化カルシウム, 0.5%グリシン, 0.2%ウシ血清アル ブミン含有 THY 培地)で一晩培養し,培養菌液 150 μL を改変 THY 培地 5 mL に添加 し,37°C で OD₆₀₀の値が 0.03 に達するまで培養した.培養菌液 1 mL に最終濃度 500 ng/mL となるように CSP-2 (ニッピ・バイオマトリックス研究所,茨城,日本)を添加 して,37°C で 14 分間培養後,培養菌液 200 μL に上記の DNA 断片を添加した.菌液を 37°C で1時間培養後,THY 培地で4 倍に希釈し,37°C でさらに 2 時間培養した.その 後,スペクチノマイシン含有 THY 寒天培地に播種して,組換え体を選択した.

ゲノム DNA は, Dr. GenTLE[™] (from Yeast) High Recovery (タカラバイオ)を用い て, 抽出した. 抽出したゲノム DNA を鋳型 DNA として, *cbpL* および *cbpJ* 遺伝子上 流領域のプライマーと下流領域のプライマー (表 2: T4cbpLKOuF / T4cbpLKOdF およ び T4cbpJKOuF / T4cbpJKOdF)を用いた PCR と電気泳動によって, 組換えが行われて いることを確認した. 表 2. 本研究で使用したプライマー

プライマー名称	塩基配列(5'~3')	由来
組換えタンパク質発現用プライマ	?	
pQEcbpJOPTiF	CACCATCACCATCACGACGATTCCGAAGGTTGGCAGTTTG	本研究
pQEcbpJOPTiR	AAGCTCAGCTAATTAACGAACCCACTCGCCATTATAGTTC	本研究
pQEcbpJOPTvF	GGCGAGTGGGTTCGTTAATTAGCTGAGCTTGGACTCCTGT	本研究
pQEcbpJOPTvR	ACCTTCGGAATCGTCGTGATGGTGATGGTGATGCGATCCT	本研究
qPCR用プライマー		
TIGR4 16SrRNAF	TGTAGCGGTGAAATGCGTAGATA	19)
TIGR4 16SrRNAR	CAAGCCAGAGAGCCGCTTT	19)
lytA qPCR_F	GCTGGAATTAAAACGCACGAGTA	本研究
lytA qPCR_R	GGTCAACGTGGTCTGAGTGGTT	本研究
cbpJ qPCR_F	GATGGCAGTTTGTCCAAGAAAA	本研究
cbpJ qPCR_R	ACTCGCCAGTAGGTTTCTTTGAG	本研究
cbpL qPCR_F	CATCCATTTTTCGAGCTGTAAGG	本研究
cbpL qPCR_R	TCTCCCTCGTGAATATCCGAAT	本研究
 遺伝子欠失株作製用プライマー		
T4cbpJKOuF	ATCATAAAGCAATCTATTGGCATAA	本研究
T4cbpJKOuR	TATTCAAATATATCCCTATATACCCTCCAATATTAAATCC	本研究
T4cbpJKOaF	TTGGAGGGTATATAGGGATATATTTGAATACATACGAACA	本研究
T4cbpJKOaR	ATAAGCGCCCTGTCATCAATTTTTTTATAATTTTTTAAT	本研究
T4cbpJKOdF	TTATAAAAAAATTGATGACAGGGCGCTTATAATTATATTA	本研究
T4cbpJKOdR	AACACTCTGACTTTTGTCATTGCCT	本研究
T4cbpLKOuF	TTGAGCCTAGGAGAACAAGAGAAG	本研究
T4cbpLKOuR	TATTCAAATATATCCTTCTTCTCCCATAATTATGATATC	本研究
T4cbpLKOaF	TTATGGGAGAAAGAAGGATATATTTGAATACATACGAACA	本研究
T4cbpLKOaR	GCCTACCAGTATCTGTCAATTTTTTTATAATTTTTTTAAT	本研究
T4cbpLKOdF	TTATAAAAAAATTGACAGATACTGGTAGGCGAAAAAATTC	本研究
T4cbpLKOdR	AACTTTTTGAACACCTTGTAGAAGG	本研究

6. 増殖曲線の比較

S. pneumoniae 野生株, cbpL 欠失変異株, もしくは cbpJ 欠失変異株を OD₆₀₀の値が 0.4 に達するまで培養し, 遠心分離 (4°C, 13,000 × g, 7 分間) により菌体を回収した. 菌体を PBS にて1回洗浄した後, PBS に再懸濁し, OD₆₀₀の値を 0.4 に調整した. 5 mL の THY 培地に菌液を 150 μ L 添加した後, 37°C で静置培養し, 定常期まで 30 分毎に OD₆₀₀ の値を測定した. 定常期から死滅期の増殖速度を測定するため, 上記と同様に, 37°C で 7 時間の培養を行った後, 1 時間毎に OD₆₀₀ の値を測定した.

7. グラム染色

S. pneumoniae 野生株, cbpL 欠失変異株, および cbpJ 欠失変異株を THY 培地中で, 定常期 (OD₆₀₀ = 1.2) および死滅期 (24 時間後の培養, OD₆₀₀ = 0.5~0.6) まで培養し た. 菌液をスライドガラスに塗布し,火炎固定後,グラム染色液 (I) (Sigma-Aldrich) で 1 分間の染色を行った.水洗後,グラム染色液 (II) (Sigma-Aldrich) で 1 分間の染 色を行った.水洗後,100% エタノール中で 20 秒間の脱色を行い,水洗後,グラム染 色液 (III) (Sigma-Aldrich) で 1 分間の染色を行った.再び水洗を行い,乾燥後,マリ ノール (武藤科学株式会社,東京,日本) で封入した.その後,オールインワン顕微 鏡 BZ-X710 (キーエンス,大阪,日本) にて検鏡を行った.

8. ペニシリンGに対する最小発育阻止濃度および最小殺菌濃度測定

ペニシリン G に対する最小発育阻止濃度 (MIC) および最小殺菌濃度 (MBC) の測 定は、山口らの方法で行った²⁴⁾. 96 ウェルプレートの各ウェルに 195 µL のペニシリン G (ナカライテスク) THY 培地、ならびにペニシリン G を含まない THY 培地と 5 µL あたり 0.5~1.0×10⁴ CFU に調整した *S. pneumoniae* 野生株, *cbpL* 欠失変異株変異, も しくは *cbpJ* 欠失変異株を混和した. アネロパック (三菱ガス化学、東京、日本) を用 い、37°C において嫌気条件下で 24 時間の培養を行った. ペニシリン G の最終濃度は 段階的に 8 µg/mL から 0.125 µg/mL とした. 培養後、OD₆₂₀ の値を測定し、0.06 以下を 完全に発育が阻害されていると判断した. 発育阻害が生じる最小の抗菌薬濃度を MIC とした. また、各培養菌液を 5 µL ずつ THY 血液寒天培地に播種し、嫌気条件下で、 24 時間の培養を 37°C で行い、生育コロニーを観察した. コロニーが観察されない最小 の抗菌薬濃度を MBC とした.

9. ヒト肺胞上皮由来細胞 A549 への S. pneumoniae の付着試験

A549細胞への付着試験は、Ozeri および山口らの方法に改変を加えて行った^{25,26)}. 24ウェルポリスチレンプレート(Corning, Stuben, NY, USA)を用い、 5×10^5 細胞 のA549細胞に対し、*S. pneumoniae* 野生株、*cbpL* 欠失変異株、もしくは *cbpJ* 欠失変 異株を 5×10^6 CFUで感染させ、 37° C、5% CO₂存在下で1時間培養した。PBSで2回洗浄 し、付着していない菌体を除去した後、0.2% EDTAを含む0.25% トリプシン溶液 (Thermo Fisher Science)を用いてA549細胞を回収した。細胞懸濁液をPBSにて段階希 釈し、THY血液寒天培地上に播種した。培養後に、生育したコロニー数を計測し、 A549細胞に付着した菌数を算定した。

10. 好中球殺菌試験

HL-60細胞の好中球様細胞への分化は, Collinsらおよび Wenらの方法に改変を加え て行った^{27,28)}. 1×10⁶ 細胞/mLに調整したHL-60細胞に, ジメチルスルホキシドを最終 濃度1.2%になるように添加し, 37°C, 5% CO₂存在下で5日間の培養を行い, 好中球様 に分化誘導した.

ヒト正常好中球を分離するため、健常成人の肘正中皮静脈より採取した血液に最終 濃度が30 units/mLとなるようにヘパリンを添加した.血球分離溶液 PolymorphprepTM (Alere Technologies AS, Oslo, Norway) に血液を重層し、遠心分離 (25°C, 450 × g, 35 分間)を行った.遠心後、上清を除外し、ACK緩衝液〔150 mM 塩化アンモニウム、1 mM 炭酸水素カリウム、0.1 mM EDTA (pH 7.2)〕を加えて溶血処理を行い、赤血球を 除去した.再び遠心分離して細胞を回収し、RPMI培地で2回洗浄した後、RPMI培地で 再懸濁し、細胞数を計測した. HL-60細胞もしくは好中球と混和した後の菌の生菌率を比較するため、2×10⁵ 細胞 に対して、1×10⁴ CFUの S. pneumoniae 野生株、cbpL 欠失変異株、もしくはcbpJ 欠失 変異株を添加した. 混和液を、37°C、5% CO₂存在下で静置培養した. 培養3時間後ま で1時間毎に培養液をTHY血液寒天培地に播種した. 37°Cで一晩の培養により、生育 したコロニー数を算定した. また、好中球による殺菌への抵抗性にCbpJが関与するか について検討するため、cbpJ 欠失変異株に最終濃度が0~100 nMとなるように組換え CbpJ (rCbpJ) を添加し、同様の実験を行った.

11. マウス血液中における生菌率の比較

6 週齢の ICR 雌マウス(日本エスエルシー,浜松,日本)をペントバルビタールナ トリウム(ソムノペンチル:共立製薬,東京,日本)の腹腔内投与(4.0 mg/匹)によ り安楽死させた後,心臓穿刺によって血液を回収した.採取した血液に最終濃度が 30 units/mL となるようにヘパリンを添加し,180 μLのマウス血液とPBSで5×10⁵ CFU/mL に調整した菌液 20 μL を混和し,37°C,5% CO₂存在下で 1~3 時間の培養を行った. 混和液をPBSで段階希釈した後,THY血液寒天培地に播種し,37°Cでの一晩培養によ り,生育したコロニー数を算定した.

12. マウス感染実験

マウス敗血症モデルとして、6 週齢の ICR 雌マウス(日本エスエルシー)に2×10⁶ CFUの菌懸濁液 100 μ Lをマウスの尾静脈から感染させた。マウス肺炎モデルとして、 同マウスに 3.0~5.0×10⁷ CFUの菌懸濁液 20 μ Lをマウスの鼻腔から麻酔下で感染させた。麻酔を行うため、マウス1匹あたり、塩酸メデトミジン 0.01 mg(ドミトール:日 本全薬工業,福島,日本),ミダゾラム 0.13 mg (ドルミカム:アステラス製薬,東京, 日本),酒石酸ブトルファノール,0.17 mg (ベトルファール:Meiji Seika ファルマ, 東京,日本)の三種混合麻酔薬をマウスの腹腔内に投与した.両感染モデルで感染 14 日後まで 12 時間毎に生存状態を確認した.マウス肺炎モデルでは,感染マウスの肺内 の生菌数を検討するため,経鼻感染 24 時間後に,ペントバルビタールナトリウム (共 立製薬)の腹腔内投与 (4.0 mg/匹)により安楽死させた後に,18G の注射針 (テルモ, 東京,日本)で気管に穴を開け,1 mL シリンジを用いて 800 µL の PBS を気管内に投 与し,気管支肺胞洗浄液 (Bronchoalveolar Lavage Fluid:BALF)として回収した. BALF を PBS で段階希釈した後,THY 血液寒天培地に播種し,一晩培養して生育した コロニー数を算定した.

競合試験として S. pneumoniae 野生株と cbpJ 欠失変異株の菌数の比率を約1:1.5 で 混和し,計2.5×10⁷ CFU の菌を含む PBS 20 μL を麻酔下で経鼻投与した. 感染24 時間 後に BALF を回収し,THY 血液寒天培地およびスペクチノマイシン含有 THY 血液寒天 培地に播種した.THY 血液寒天培地上に生育したコロニー数を野生株と cbpJ 欠失変 異株の合計菌数とし,スペクチノマイシン含有 THY 血液寒天培地上に生育したコロニ ー数を cbpJ 欠失変異株の菌数とした.野生株に対する cbpJ 欠失変異株の菌数の比を 算出し,菌数相対比とした.

13. ヘマトキシリン・エオジン染色

経鼻感染 24 時間後に採取した肺組織を 10%中性緩衝ホルマリン液(和光純薬,大阪,日本)に浸漬させ,室温で一晩固定した.パラフィン包埋したサンプルから切片を作製し,脱パラフィン処理と水洗の後にヘマトキシリン染色液とエオジン染色液で

染色した. エタノールで脱水後にスライドガラスに封入し,オールインワン顕微鏡 BZ-X710で観察した.

14. 統計学的解析

各実験は、少なくとも 3 回繰り返した.実験データの有意差検定には、Graphpad Prism7 ソフトウェア(GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)を用いて Mann-Whitney U 検定, Kruskal-Wallis 検定, Willcoxon の符号順位検定, One-way ANOVA および Tukey 多重比較検定もしくは Log-rank 検定を行った.全ての結果にお いて、P<0.05を以って有意差ありとした.

15. 実験承認

本研究は、大阪大学遺伝子組換え実験委員会(承認番号:4037)、病原体取扱安全管 理委員会[病原体保持承認番号:23(歯学研究科)-6]、大阪大学動物実験委員会(承 認番号:動歯-28-002-0)、大阪大学論理審査委員会(承認番号:H26-E43)の承認を得 て行った.

1. CbpL および CbpJ のバイオインフォマティクス解析と欠失変異株作製

cbpL 遺伝子は,全ゲノムが解読されている *S. pneumoniae* 28 株全てに存在し,その うち7株でフレームシフト変異を認めた(図 2A)一方,*cbpJ* 遺伝子は 28 株中 18 株 に存在するが,フレームシフト変異を持つ株は認められなかった.*S. pneumoniae* TIGR4 株の CbpJ には,N 末端側部のアミノ酸残基 27 番目と 28 番目の位置に推定シ グナルペプチダーゼによる推定切断部位を認めた(図 2B).

S. pneumoniae TIGR4株を親株として、CSP を用いた相同組換えにて cbpL 欠失変異 株および cbpJ 欠失変異株を作製した。得られた欠失変異株から抽出したゲノム DNA を鋳型 DNA として、各遺伝子の上流領域と下流領域に対するプライマーセットを用 いて PCR を行った. cbpL 遺伝子に関して、野生株では 2917 bp、cbpL 遺伝子欠失変 異株では 2688 bp 相当のバンドを確認した。また、cbpJ 遺伝子に関して、野生株では 2728 bp、cbpJ 遺伝子欠失変異株では 2499 bp 相当のバンドが確認され、それぞれの遺 伝子について相同組換えが行われたことを確認した(図 2C)。

2. CbpL および CbpJ が S. pneumoniae の自己融解に及ぼす影響

CbpL および CbpJ が S. pneumoniae の生育度に影響を及ぼすかを検討するために,野 生株, cbpL 欠失変異株および cbpJ 欠失変異株の生育度を検討した(図3). THY 培地 中における対数増殖期の生育度は, cbpL 欠失変異により亢進する傾向を認めた.また, 定常期から死滅期では, cbpJ 欠失により OD₆₀₀ の値が上昇したが,各菌株間で大きな 差は認められなかった(図3).

S. pneumoniae のコリン結合タンパク質において,LytA,LytB,LytC,およびCbpEが 細胞壁成分を分解する酵素として自己融解に寄与する^{9,29,30)}.また,CbpFはS. pneumoniae の自己融解の調節因子として作用する³¹⁾.コリン結合タンパク質である CbpL と CbpJ が S. pneumoniae の自己融解に及ぼす影響を検討するため、それぞれの株 の各時点における *lytA* 転写量の比較を行った.その結果,*cbpJ* 欠失変異株は対数増殖 期中期(OD₆₀₀ = 0.8) および死滅期(OD₆₀₀ = 0.5~0.6)の時点において *lytA* の転写量 が野生株と比較して有意に高かった(図 4).

次に,定常期(OD₆₀₀ = 1.2) および死滅期(OD₆₀₀ = 0.5~0.6)の各菌株のグラム染 色を行い,形態を比較したところ,各時点で全ての菌株間で差は認められなかった. 定常期においては,各菌株とも多くの菌体が紫色に染色され,形態が維持されていた. 一方,死滅期においては,各菌株とも大半の菌体がピンク色に染色され,自己融解に より細胞壁が分解されていることが示唆された(図 5).

細胞壁の分解を伴う自己融解により,*S. pneumoniae* のペニシリンに対する感受性は 亢進することが報告されている³²⁾. そこで,野生株,*cbpL* 欠失変異株,*cbpJ* 欠失変 異株のペニシリンGに対する MIC および MBC を測定した.*S. pneumoniae* は,MIC が 0.125 µg/mL 未満の場合にペニシリンG 感受性と判定される³³⁾.野生株,*cbpL* 欠失変 異株,*cbpJ* 欠失変異株の MIC および MBC は 0.125 µg/mL 未満であり,ペニシリンG に感受性を示した(表 3). 増殖曲線とグラム染色像,および MIC 測定の結果から, *cbpL* もしくは *cbpJ* の欠失は,自己融解に大きな影響を与えないことが示唆された.



- A. 全ゲノムが解読された S. pneumoniae 28 株におけるコリン結合タンパク質をコードする遺伝子の 分布を表す。青:遺伝子の存在、黄色:フレームシフト変異、灰色:遺伝子の欠落。
- B. CbpL および CbpJ は、それぞれ 332 アミノ酸残基で構成される.SS:シグナル配列、Exc:
 Extracellular calcium-binding ドメイン、LP:リポタンパク質ドメイン、黄緑色のボックス:コリン結合ドメイン.
- C. 遺伝子の欠失を確認するため、ゲノム DNA を抽出し、表 2 に示したプライマーを用い PCR を行った. M:分子量マーカー、WT:野生株、*ΔcbpL*: *cbpL* 欠失変異株、*ΔcbpJ* : *cbpJ* 欠失変異株.





A. 対数増殖期から定常期までの増殖曲線、B. 定常期から死滅期までの増殖曲線を示す.
 野生株(WT), *cbpL* 欠失変異株(*ΔcbpL*)および *cbpJ* 欠失変異株(*ΔcbpJ*) を THY 液体培地を用い、37°Cで培養し、波長 600 nm における吸光度を測定した(n=5).3回の実験を行い、代表的なデータを示している.誤差バーは標準誤差を示す.



図 4. S. pneumoniae の lytA の転写量測定

野生株(WT), *cbpL* 欠失変異株(*ΔcbpL*) および *cbpJ* 欠失変異株(*ΔcbpJ*) を対数増殖期初期
(OD₆₀₀ = 0.4), 対数増殖期中期(OD₆₀₀ = 0.8), 定常期(OD₆₀₀ = 1.2) および死滅期(培養 24 時間:
OD₆₀₀ = 0.5~0.6) まで培養し, 全 RNA 抽出を行った. cDNA 合成後, 定量的 PCR にて *lytA* の転写
量を測定した(n = 8~9). グラフ中の縦棒は平均値を, 誤差バーは標準誤差を示す. 統計解析は,
Mann-Whitney の *U* 検定により行った.



図 5. 定常期および死滅期における S. pneumoniae のグラム染色像

野生株(WT), *cbpL* 欠失変異株(*ΔcbpL*)および *cbpJ* 欠失変異株(*ΔcbpJ*)を THY 液体培地中 にて、37°Cで定常期または死滅期まで培養し、グラム染色を行った. 各菌株について、定常期および 死滅期の代表的な像を示している. 白枠は強拡大を示し、黒枠は強拡大した範囲を表す.

表 3. ペニシリン G の S. pneumoniae に対する MIC および MBC

S. ppoumopioo	ペニシリン	∕G (µg/mL)	
S. prieumoniae	MIC	MBC	
WT	< 0.125	< 0.125	
⊿cbpL	< 0.125	< 0.125	
⊿cbpJ	< 0.125	< 0.125	

野生株(WT), *cbpL* 欠失変異株($\Delta cbpL$)および *cbpJ* 欠失変異株($\Delta cbpJ$)のペニシリン G に対する MIC, および MBC を測定した.

3. マウス肺炎モデル

CbpL および CbpJ が S. pneumoniae の病原因子として機能するかを、マウス肺炎モデ ルを用いて調べた.野生株感染マウスと比較して、cbpJ 欠失変異株感染マウスの生 存率は有意に上昇した(図 6A).また、経鼻感染 24 時間後の BALF 中の菌数は、cbpJ 欠失変異株感染マウスでは、野生株感染マウスと比較して、有意に減少した(図 6B). cbpL 欠失変異株については、野生株感染時と比較して、マウスの生存率が上昇し、 BALF 中の菌数も減少する傾向であったが、有意差は認められなかった.

4. ヒト肺胞上皮細胞に対する付着試験

CbpL および CbpJ が付着因子として機能するかを解析するため、A549 細胞に対す る *S. pneumoniae* 野生株, *cbpL* 欠失変異株, もしくは *cbpJ* 欠失変異株の付着率を調 べた.野生株と比較して, *cbpL* 欠失変異株および *cbpJ* 欠失変異株の A549 細胞への 付着率に差は認められなかった (図 7). この結果から、CbpL および CbpJ は肺胞上皮 細胞への付着因子ではないことが示唆された.



図 6. マウス肺炎モデルにおける CbpL および CbpJ の病原性への関与

- A. 肺炎モデルとして、6 週齢の CD-1 マウスに 5.0 × 10⁷ CFU の S. pneumoniae 野生株(WT), cbpL 欠失変異株(△cbpL) もしくは cbpJ 欠失変異株(△cbpJ) を経鼻感染させ、感染後 14 日 間のマウスの生存率を示す(n = 8). 統計解析は、Log-rank 試験にて行った。
- B. 経鼻感染 24 時間後に BALF を回収し, 菌数を算定した. グラフ中の丸は各マウスにおける菌数 を, 横棒は平均値を, 誤差バーは標準誤差を示す. 統計解析は, Kruskal-Wallis 検定で行った.



図 7. cbpL または cbpJ の欠失による付着率の変化

A549 細胞に対する菌体付着率を比較した. 付着率は, 付着菌数 に対する感染菌数の割合で算定した(n = 6).3回の実験を行 い, 代表的なデータを示す. グラフ中の縦棒は平均値を, 誤差 バーは標準誤差を示す. 統計解析は, Kruskal-Wallis 検定にて行

5. S. pneumoniae 野生株および cbpJ 欠失変異株競合経鼻試験

マウス肺炎モデルにおいて、*cbpJ* 欠失変異株の病原性が大きく低下したことから、 野生株と *cbpJ* 欠失変異株に対する選択圧の差を検討するために、マウスに *S. pneumoniae* 野生株および *cbpJ* 欠失変異株を混和した菌懸濁液 (2.5×10^7 CFU/ 20 µL) を経鼻感染させた. 感染 24 時間後の BALF 中の各菌株の菌数を算定した. その結果、



図 8. 野生株および cbpJ 欠失変異株を用いた競合経鼻感染試験

- A. 野生株(WT) および *cbpJ* 欠失変異株(*ΔcbpJ*)を混和した菌懸濁液(2.5×10⁷ CFU)をマウス に経鼻感染させ、感染 24 時間後の BALF 中の各菌株の菌数を比較した(n = 8). グラフ中の丸は 各マウスにおける菌数を、横線は平均値を、誤差バーは標準誤差をそれぞれ示す。統計解析は、 Wilcoxon の符号順位検定で行った。
- B. BALF 中の野生株に対する, *cbpJ* 欠失変異株の菌数を比で示す. グラフ中の丸は各マウスにおけ る菌数相対比を,横線は平均値を,誤差バーは標準誤差をそれぞれ示す.

cbpJ 欠失変異株の BALF 中の生菌数は,野生株に比べ有意に少なかった(図 8). こ の結果から, *S. pneumoniae* の集団において, *cbpJ* を欠失した菌体が選択的に排除さ れることが示唆された.

6. マウス肺組織像の観察

経鼻感染 24 時間後の各菌株感染マウスの肺の病理組織学的解析を行った.野生株 感染マウスの肺組織では,著しい好中球の浸潤や出血が認められた.一方, cbpJ 欠 失変異株感染マウスの肺は,野生株感染マウスと比較して,炎症性細胞の浸潤は軽度 であった.また, cbpL 欠失変異株感染マウスの肺組織の炎症度は,野生株感染マウ スより低く, cbpJ 欠失変異株感染マウスより高かった(図 9).これらの結果から

CbpJ は, 肺炎発症における病原因子として機能することが示唆された. 一方で, CbpL は経鼻感染において病原性に及ぼす影響は少ないことが示された.

7. 好中球と混和した後の S. pneumoniae 生菌率の比較

CbpL および CbpJ が好中球による殺菌からの回避に寄与するかについて検討するた めに,好中球様に分化させた HL-60 細胞またはヒト末梢血から分離した好中球を用い, 各菌株の生存試験を行った。血清中には、好中球細胞外トラップ(neutrophil extracellular trap:NETs)を分解する DNA 分解酵素が含まれているため³⁴⁾, 血清非添 加の RPMI 培地を用いて好中球殺菌試験を行った. その結果, cbpL 欠失変異株およ び cbpJ 欠失変異株は,培養1時間後から3時間後まで,野生株と比較して,有意に 低い生菌率を示した(図 10A, B). また,好中球非存在下の RPMI 培地中における cbpL 欠失変異株および cbpJ 欠失変異株の生菌率を比較した.その結果,野生株と比 較し, *cbpJ* 欠失変異株が有意に高い生菌率を示した(図 10 C). これらの結果から, CbpL および CbpJ は、好中球の殺菌回避に寄与することが示唆された. そこで、cbpJ 欠失変異株に rCbpJ をそれぞれ最終濃度 0~100 nM となるように添加し、ヒト好中球 による殺菌回避への CbpJ の関与を検証した。その結果, cbpJ 欠失変異株は野生株と 比較し有意に低い生菌率を示した.培養1時間後において,100 nM の rCbpJ を添加し た場合, cbpJ 欠失変異株の生菌率が有意に上昇した.一方,培養2時間後,3時間後 は、1 nM の rCbpJ の添加により生菌率の有意な増加を認めた. また、rCbpJ の濃度依 存的に, 生菌率が上昇した (図 11). このことから, cbpJ 欠失による好中球混和後の 生菌率の低下が、CbpJ 以外の分子の発現変動によるものではなく、CbpJ が直接的に 作用して好中球の殺菌能を抑制したことが示唆された。



経鼻感染 24 時間後に肺を回収し、ホルマリン固定およびパラフィン包埋の後にヘマトキシリン・エ オジン染色を行った.黒枠は強拡大した範囲を表す.それぞれ代表的な像を示している.





好中球様に分化誘導した HL-60 細胞(A) とヒト好中球(B) に MOI が 0.05 となるように野生株 (WT), *cbpL* 欠失変異株($\Delta cbpL$)または *cbpJ* 欠失変異株($\Delta cbpJ$)を感染させた. 陰性対照と して, RPMI 培地で各菌株を培養した(C). それぞれ 37[°]C, 5% CO₂条件下で 1~3 時間培養し, 生菌 数を算定した. 生菌率は, 混和後の生菌数に対する感染菌数の割合で算出した(n = 6).3 回の実験 を行った中の代表的なデータを示している. グラフ中の縦棒は平均値を, 誤差バーは標準誤差を示 す. 統計解析は, One-way ANOVA および Tukey 多重比較検定で行った.







図 11. 好中球による cbpJ 欠失変異株の殺菌に及ぼす rCbpJ の影響

ヒト好中球に MOI が 0.05 となるように野生株 (WT) または *cbpJ* 欠失変異株 (*ΔcbpJ*) を感染させた. *cbpJ* 欠失変異株には, rCbpJを 0~100 nM 添加した. 37°C, 5% CO₂条件下で 1~3 時間培養し, 菌数を算定した (n = 6).3 回の実験を行った中の代表的なデータを示している.グラフ中の縦棒は平均値を, 誤差バーは標準誤差を示す.統計解析は, One-way ANOVA および Tukey 多重比較検定で行

8. マウス敗血症モデル

CbpL および CbpJ が敗血症における病原因子として機能するかについて検討するため、 2×10^6 CFU の *S. pneumoniae* をマウスの尾静脈から感染させた。野生株感染群と比較して、*cbpL* 欠失変異株および *cbpJ* 欠失変異株感染群のマウスの生存率に有意な差は認められなかった(図 12)。



図 12. マウス敗血症モデルにおける CbpL および CbpJ の病原性への関与
敗血症モデルとして、6 週齢の CD-1 マウス
に 2.0 × 10⁶ CFU の S. pneumoniae 野生株 (WT), cbpL 欠失変異株 (ΔcbpL) もし くは cbpJ 欠失変異株 (ΔcbpJ) を経静脈
感染させ、感染後 14 日間のマウスの生存率
を示す. (n = 8) 統計解析は、Log-rank 試
験にて行った.

9. マウス血液中における S. pneumoniae 生菌率の変化

血中において CbpL および CbpJ が S. pneumoniae の生菌率に与える影響を解析する ため、マウス血液中の野生株、cbpL 欠失変異株、もしくは cbpJ 欠失変異株の生菌 率を評価した.培養1時間後のみで、cbpJ 欠失変異株は野生株と比較し有意に低い生 菌率を示したものの、培養2時間後および3時間後で各菌株の生菌数に大きな差は認 められなかった(図 13). この結果から、CbpL および CbpJ はマウス血液中における S. pneumoniae の生存に与える影響は少ないことが示唆された.

10. 血漿成分存在下における cbpJ および cbpL の転写量測定

好中球殺菌試験では病原性に差があり、血中殺菌試験では差が認められなかったこ とから、血漿成分が *cbpL* および *cbpJ* の発現に与える影響を与えるかについて定量的 PCR で検討した.その結果、血漿成分存在下において、*cbpL* および *cbpJ* の転写量は 血漿成分非存在下と比較し、有意に減少した(図 14).



図 13. マウス全血中における S. pneumoniae の生菌率

へパリン処理したマウス血液(180 µL)に、野生株(WT)、cbpL 欠失変異株(ΔcbpL)または cbpJ 欠失変異株(ΔcbpJ)を約1×10⁴ CFU(20 µL)を添加し、37°C、5% CO₂条件下で1、2、3
時間培養し、菌数を算定した、生菌率は、感染菌数に対する生育した菌数の割合で算出した(n =
6)、3回の実験を行った中の代表的なデータを示す、グラフ中の縦棒は平均値を、誤差バーは標準誤 差を示す、統計解析は、One-way ANOVA および Tukey 多重比較検定で行った。





S. pneumoniae TIGR4 株を THY 液体培地中にて,37°Cで対数増殖初期(OD₆₀₀ = 0.4~0.5) まで培養 後,ヒト血漿を 0,10 または 50%となるように添加し,37°Cで 3 時間の培養を行った後,全 RNA 抽 出をした.cDNA を合成した後,定量的 PCR にて *cbpL, cbpJ* の転写量を測定した(n = 8~9).グ ラフ中の縦棒は平均値を,誤差バーは標準誤差を示す.統計解析は,One-way ANOVA および Tukey 多重比較検定で行った.

考察

本研究では、S. pneumoniae のゲノムデータベースからコリン結合リピート配列が 認められる 16 種の菌体表層タンパク質を選出した.そして、詳細な機能が不明であ った CbpL と CbpJ に着目し、S. pneumoniae の病原性に果たす役割を解析した.本研究 の結果から、S. pneumoniae のコリン結合タンパク質 CbpJ が、好中球による殺菌から の回避に寄与することで肺炎発症における病原因子として働くことが示唆された(図 15).一方、CbpL は CbpJ と同様に、好中球による殺菌からの回避に寄与したが、マ ウス肺炎モデルおよびマウス敗血症モデルでは、病原性に有意な影響を与えなかった. cbpL と cbpJ の発現量はともに血漿存在下で低下し、血流感染における病原性に関与 しない可能性が示された.

フレームシフト変異と判定した遺伝子のうち,670-6B株の*cbpG*遺伝子,P1031株, SPN45 株,gamPN10373 株,NCTC7465 株の*cbpL*遺伝子,およびJJA 株の*pspA*遺伝 子において,コードするタンパク質のN末端側の配列は保存されているが,C末端側 に存在するコリン結合リピート領域が保存されていない.その他のフレームシフト変 異と判定した遺伝子は,翻訳開始直後にフレームシフト変異が存在する,または遺伝 子の構造が不完全であることから,機能していないと考えられる.

レンサ球菌は、菌体表層タンパク質と宿主分子の相互作用によって、自然免疫機構 の抑制や殺菌回避を行う. *S. pneumoniae* では、菌体表層への補体成分 C3 の結合の抑制 およびアポラクトフェリンによる殺菌からの回避に関与する PspA^{10,11,29)} や、宿主の H 因子を菌体表層へ誘導し、補体成分 C3b の結合を抑制する CbpA が、免疫回避に重要 な役割を果たす^{12,13,30,35)}. 固相の結合試験から、CbpL はコラーゲン、エラスチン、お



図 15. CbpJ が S. pneumoniae の病原性に果たす影響

S. pneumoniae の CbpJ は、好中球による殺菌回避に寄与し、肺炎発症における病原因子として働く ことが示唆された. また、血中においては、*cbpJ* の発現量は低下し、血流感染における病原性に寄与 しない可能性が示された.

よび C 反応性タンパク質(CRP)と親和性を有し、CbpJ は CRP と結合することが報告 されている³⁶. しかし、CbpL および CbpJ は、血漿非存在下で好中球による殺菌から の回避に寄与した. すなわち、細胞外マトリックスタンパク質や血中のタンパク質を 介する免疫回避機構とは異なる機序で働く可能性が高い. CbpL および CbpJ が抗貪食 能に影響を及ぼす機構として、食細胞表層の分子に直接作用し、食細胞の活性化を抑 制することが考えられる. これまで、CbpL はマウスマクロファージの貪食を抑制する ことが報告されている¹⁹. したがって、マクロファージと好中球に共通する分子が CbpL のレセプターである可能性が考えられる. 好中球による貪食の後、脱顆粒による 菌体の殺菌性分子群への暴露や活性酵素種による殺菌が起こるが³⁷、*cbpL と cbpJ の* 欠失はこの過程に影響する可能性がある. また、*cbpL や cbpJ* の欠失により、細胞外 殺菌機構である NETs³⁸⁾の誘導能や NETs に対する感受性の違いが生じたため、生菌数 が変化した可能性もある. さらに、好中球が分泌する LL-37 などの抗菌ペプチド³⁹へ の感受性が変化する可能性もある. cbpL や cbpJ の欠失が貪食効率,細胞内生存能, NETs の捕菌,殺菌活性への感受性等に影響するかについて検討する必要がある.

本研究において, *cbpL* 欠失変異株経鼻感染マウスの生存率は,野生株感染マウスと 比較して有意差は認められないものの,上昇する傾向が認められた.以前の研究では, D39 株を用いて, *cbpL* 欠失によりマウス経鼻感染における病原性は低下することが報 告されている¹⁹⁾. TIGR4株とD39株のCbpLアミノ酸配列の相同性は99%であるため, 両菌株の CbpL が異なる機能を持つ可能性は低い.一方で,D39 株には CbpJ が存在し ないことから,好中球による殺菌への抵抗性に CbpL がより重要な役割を果たすため に,経鼻感染マウスでの生菌率に差異が生じたと考えられる.

本研究の結果から、CbpJ は A549 細胞への付着に影響せず、自然免疫からの回避に 寄与することが示唆された.しかし、野生株と *cbpJ* 欠失変異株を用いたマウス経鼻競 合感染試験では、BALF 中に認められた野生株と *cbpJ* 欠失変異株の平均菌数の比率は 約2:1であり、単独感染時の比率である約 1000:1と比較して、その差は小さかった. 競合感染試験においては、野生株の発現した CbpJ が好中球に作用することで、好中球 の殺菌活性が抑制され、*cbpJ* 欠失変異株の一部が、野生株と同様に好中球による殺菌 を回避したと推察される.すなわち、肺感染時に CbpJ を持つ菌体と持たない菌体が混 在した場合、CbpJ を持たない菌体が選択的に淘汰される割合は、単独感染と比較して 低いことが示唆された.一方で、S. pneumoniae の血液循環への侵入や宿主間の伝播の 際には、特定のクローンが増殖し、遺伝的多様性が消失もしくは減少するようなボト ルネック効果が起こることが報告されている^{40,41}.ボトルネック効果が働くような感 染環境では、CbpJ が機能しない菌体はより選択的に淘汰される可能性がある.

cbpL および cbpJ の転写量は、血漿成分存在下で減少することが示唆されたが、そ の機序は明らかではない. S. pneumoniae はヒスチジンキナーゼとレスポンスレギュレ ーターから構成される 13 対の二成分制御系(Two-component regulatory system: TCS) と1種のオーファンレスポンスレギュレーターを持つ. これまでに病原性に関与する 複数の TCS が報告されており、TCS02 や TCS06 はコリン結合タンパク質である PspA や CbpA の発現を制御することが示されている^{42,43}.また、TCS の病原性への関与に 関しては、菌株特異的あるいは感染部位特異的に機能することが示唆されている^{44,45}. 血中における S. pneumoniae の転写制御機構には不明な部分が多いが、TCS のヒスチジ ンキナーゼが血漿成分に応答し、cbpL および cbpJ の発現を調節する可能性があり、 今後の検討が必要である.

S. pneumoniae は mitis 群レンサ球菌に属する.同群に分類される Streptococcus mitis や Streptococcus oralis においても, cbpJと高い DNA 配列相同性を示す遺伝子が存在する. 一方で,他のレンサ球菌には存在しないことから, cbpJ は mitis 群レンサ球菌に特異的 な遺伝子であると考えられる.進化の過程においては,ゲノム上での遺伝子重複によ り直上または直下に相同性の高い遺伝子が生じる場合がある.TIGR4 のゲノム上には, cbpJ の直上にコリン結合タンパク質をコードする cbpK (SP_0377)が存在する⁴⁶⁾. CbpK は CbpJ と 50%の配列相同性を有するが,コリン結合ドメインを除く領域に相同 性は認められないため,異なる機能を持つ遺伝子であると推察される.

CbpJ は S. pneumoniae 感染症に対する感染防御抗原となる可能性がある. PspA は有 望視されているタンパク質抗原の一つであるが, S. pneumoniae の菌株間で多様性があ り,複数種の PspA をワクチンとして用いる必要がある¹⁶. CbpJ の菌株間における配 列保存性は高いため, CbpJ を産生する菌株に対して単一の抗原で効果が得られること

が期待できる.しかし, CbpJ は S. pneumoniae の全ての菌株には保存されていないた め, S. pneumoniae に対する普遍的なワクチン抗原にはならない.そのため, CbpJ と他 の菌体表層タンパク質を併用して免疫を行うことが望ましいと考えられる.また, CbpJ は血漿存在下での発現量が少なく, 経鼻感染において病態形成に寄与することか ら, 皮下免疫ではなく経鼻免疫が望ましいと考えられる.

S. pneumoniae の病原性と菌体表層に局在するタンパク質の機能解明は、本菌による 感染症を理解するために必要である. S. pneumoniae による肺炎の発症に関わる細菌因 子群として、貪食回避に働く莢膜、細胞膜への孔形成や補体活性化を惹き起こす外毒 素 Pneumolysin^{29,47)}、細胞壁分解活性によりPly放出に関与するLytA、補体C3の結合を 阻害し好中球による貪食への抵抗性に寄与するPspA、ABC輸送体として金属イオンの 取り込みを担うPsaAなどが報告されてきた^{11,14,48)}.本研究の結果から、これらの分子 群とCbpJが協調して機能することにより、S. pneumoniae は宿主の免疫を回避し肺炎を 惹き起こすと考えられる.しかし、詳細なCbpJの機能について未だ不明な点が存在す る.今後の更なる解析により、CbpJの病原因子としての機能とワクチン抗原としての 有用性、安全性を明らかにすることが必要である.

結論

CbpJは, S. pneumoniae の肺感染時において,好中球の殺菌回避に寄与することで病 原因子として働くことが示唆された.一方で,CbpLは in vitro では好中球からの殺菌 回避に寄与したが,マウス肺炎モデルでは病原性に寄与しなかった.さらに,CbpJお よびCbpLは,血漿存在下でそれぞれの遺伝子発現量が低下し,血流感染において病原

因子として働かないことが示唆された.これらの結果から, S. pneumoniae による肺炎 に対して、CbpJがワクチン抗原などの薬剤標的となりうる可能性が示された.

謝辞

本研究の遂行にあたり、多大なる御指導と御教授を賜りました口腔分子感染制御学 講座 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。

本研究の進行の終始にわたり,直接の御指導と御鞭撻を賜りました口腔分子感染制 御学講座 口腔細菌学教室 山口雅也 助教に心より感謝し,篤く御礼申し上げます.本 研究を行うに際し,様々な御指導を賜りました口腔分子感染制御学講座 口腔細菌学教 室 広瀬雄二郎 特任助教に謹んで感謝の意を表します.また,本研究に対し多くの御 教示を賜りました口腔分子感染制御学講座 口腔細菌学教室 中田匡宣 准教授ならびに 住友倫子 講師に感謝申し上げます.

そして、本研究を行う機会を与えてくださった、口腔分子感染制御学講座 小児歯科 学教室 仲野和彦 教授に心より御礼申し上げます.

最後に、本研究を行うに際し、御理解と御協力を頂きました口腔分子感染制御学講 座 口腔細菌学教室ならびに小児歯科学教室の皆様に厚く御礼申し上げます.

文献

- GBD 2016 Lower Respiratory Infections Collaborators. (2018) Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory infections in 195 countries, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect Dis.* 18: 1191-1210.
- 2) Wahl B, Brien KL, Greenbaum A, Majumder A, Liu L, Chu Y, Lukšić I, Nair H, McAllister DA, Campbell H, Rudan I, Black R, Knoll MD. (2018) Burden of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* type b disease in children in the era of conjugate vaccines: global, regional, and national estimates for 2000–15. *Lancet Glob Health.* 6: e744-757.
- 3) Moore MR, Link-Gelles R, Schaffner W, Lynfield R, Lexau C, Bennett NM, Petit S, Zansky SM, Harrison LH, Reingold A, Miller L, Scherzinger K, Thomas A, Farley MM, Zell ER, Taylor TH Jr, Pondo T, Rodgers L, McGee L, Beall B, H Jorgensen JH, Whitney CG. (2015) Effect of use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine in children on invasive pneumococcal disease in children and adults in the USA: analysis of multisite, population-based surveillance. *Lancet Infect Dis.* 15: 301-309.
- 4) Waight PA, Andrews NU, Ladhani NJ, Sheppard CL, Slack MP, Miller E. (2015) Effect of the 13-valent pneumococcal conjugate vaccine on invasive pneumococcal disease in England and Wales 4 years after its introduction: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 15: 535-543.
- 5) Suga S, Chang B, Asada K, Akeda H, Nishi J, Okada K, Wakiguchi H, Maeda A, Oda M, Ishiwada N, Saitoh A, Oishi T, Hosoya M, Togashi T, Oishi K, Ihara T. (2015) Nationwide population-based surveillance of invasive pneumococcal disease in Japanese children: Effects of the seven-valent pneumococcal conjugate vaccine. *Vaccine*. **33**: 6054-6060.
- Pilishvili T, Lexau C, Farley MM, Hadler J, Harrison LH, Bennett NM, Reingold A, Thomas A, Schaffner W, Craig AS, Smith PJ, Beall BW, Whitney CG, Moore MR. (2010) Sustained Reductions in Invasive Pneumococcal Disease in the Era of Conjugate Vaccine. *J Infect Dis*. 201: 32-41.
- Miller E, Andrews NJ, Waight PA, Slack MP, George RC. (2011) Herd immunity and serotype replacement 4 years after seven-valent pneumococcal conjugate vaccination in England and Wales: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis.* 11: 760-768.
- 8) 国立感染症研究所.(2018)13価肺炎球菌結合ワクチン(PCV13)導入後の小児侵 襲性肺炎球菌感染症(IPD)の現状. *IASR*. **39**:107-128.

- Bergmann S, Hammerschmidt S. (2006) Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology*. 152: 295-303.
- Tu AH, Fulgham RL, McCrory MA Briles DE, Szalai AJ. (1999) Pneumococcal Surface Protein A Inhibits Complement Activation by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 67: 4720-4724.
- Ren B, Szalai AJ, Hollingshead SK, Briles DE. (2004) Effects of PspA and Antibodies to PspA on Activation and Deposition of Complement on the Pneumococcal Surface. *Infect Immun.* 72: 114-122.
- Lu L, Ma Y, Zhang JR. (2006) *Streptococcus pneumoniae* Recruits Complement Factor H through the Amino Terminus of CbpA. *J Biol Chem.* 281: 15464-15474.
- Ogunniyi AD, Woodrow MC, Poolman JT, Paton JC. (2001) Protection against *Streptooccus* pneumoniae Elicited by Immunization with Pneumolysin and CbpA. *Infect Immun.* 69: 5997-6003.
- 14) Berry AM, Paton JC. (2000) Additive Attenuation of Virulence of *Streptococcus pneumoniae* by Mutation of the Genes Encoding Pneumolysin and Other Putative Pneumococcal Virulence Proteins. *Infect Immun.* 68: 133-140.
- 15) Briles DE, Hollingshead SK, King J, Swift A, Braun PA, Park MK, Ferguson LM, Nahm MH, Nabors GS. (2000) Immunization of Humans with Recombinant Pneumococcal Surface protein A (rPspA) Elicits Antibodies That Passively Protect Mice from Fatal Infection with *Streptococcus pneumoniae* Bearing Heterologous PspA. *J Infect Dis.* 182:1694-1701.
- Hollingshead SK, Becker R, Briles DE. (2000) Diversity of PspA: Mosaic Genes and Evidence for Past Recombination in *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 68: 5889-5900.
- 17) Nabors GS, Braun PA, Herrmann DJ, Heise ML, Pyle D, Gravenstein S, Schilling M, Ferguson LM, Hollingshead SX, Briles D, Becker R. (2000) Immunization of healthy adults with a single recombinant pneumococcal surface protein A (PspA) variant stimulates broadly cross-reactive antibodies to heterologous PspA molecules. *Vaccine*. 18: 1743-1754.
- 18) Piao Z, Akeda Y, Ishi K, Ubukata K, Briles D, Tomono K, Oishi K. (2014) Protective properties of a fusion pneumococcal surface protein A (PspA) vaccine against pneumococcal challenge by five different PspA clades in mice. *Vaccine*. **32**: 5607-5613.
- 19) Gutierrez-Fernández J, Saleh M, Alcorlo M, Mejía A, Pantoja-Uceda D, Treviño M, Voß F, Abdullah MR, Galan-Bartual S, Seinen J, Sanchez-Murcia P, Gago F, Bruix M, Hammerschmidt S, Hermoso JA. (2016) Modular Architecture and Unique Teichoic Acid

Recognition Features of Choline-binding protein L (CbpL) Contributing to Pneumococcal Pathogenesis. *Sci Rep.* **6**: 38094.

- Sigrist CJ, de Castro E, Cerutti L, Cuche BA, Hulo N, Bridge A, Bougueleret L, Xenarios I.
 (2013) New and continuing developments at PROSITE. *Nucleic Acids Res.* 41: D344-347.
- 21) Marchler-Bauer A, Zheng C, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer LY, Geer RC, Gonzales NR, Gwadz M, Hurwitz DI, Lanczycki CJ, Lu F, Marchler GH, Song JS, Thanki N, Yamashita RA, Zhang D, Bryant SH. (2013) CDD: conserved domains and protein three-dimensional structure. *Nucleic Acids Res.* 41: D348-352.
- 22) Finn RD, Bateman A, Clements J, Coggill P, Eberhardt R, Eddy SR, Heger A, Hetherington K, Holm L, Mistry J, Sonnhammer EL, Tate J, Punta M. (2014) Pfam: the protein families database. *Nucleic Acids Res.* 42: D222-230.
- 23) Bricker AL, Camilli A. (1999) Transformation of a type 4 encapsulated strain of *Streptococcus pneumoniae. FEMS Microbiol Letters.* **172**: 131-135.
- 24) Yamaguchi M, Nakata M, Sumioka R, Hirose Y, Wada S, Akebe Y, Sumitomo T, Kawabata S. (2017) Zinc metalloproteinase ZmpC suppresses experimental pneumococcal meningitis by inhibiting bacterial invasion of central nervous systems. *Virulence*. 8: 1516-1524.
- 25) Ozeri V, Rosenshine I, Mosher DF, Fässler R, Hanski E. (1998) Roles of integrins and fibronectin in the entry of *Streptococcus pyogenes* into cells via protein F1. *Mol Microbiol.*, 30: 625-637.
- 26) Yamaguchi M, Terao Y, Ogawa T, Takahashi T, Hamada, S. Kawabata S. (2006) Role of *Streptococcus sanguinis* sortase A in bacterial colonization. *Microbes Infect.* 8: 2791-2796.
- 27) Collins SJ, Rusgetti FW, Gallagher RE, Gallo RC. (1979) NORMAL FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF CULTURED HUMAN PROMYELOCYTIC LEUKEMIA CELLS (HL-60) AFTER INDUCTION OF DIFFERENTIATION BY DIMETHYLSULFOXIDE. J Exp Med. 149: 969-974.
- 28) Wen X, Jin T, Xu1 X. (2016) Imaging G Protein-coupled Receptor-mediated Chemotaxis and its Signaling Events in Neutrophil-like HL60 cells. J Vis Exp. 115: e54511.
- 29) Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. (2008) The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol.* 6: 288-301.
- 30) Perez-DI, Galan-Bartual S, Hermoso JA. (2012) Pneumococcal surface proteins: when the whole is greater than the sum of its parts. *Mol Oral Microbiol*. **27**: 221-245.

- 31) Molina R, Gonzalez A, Stelter M, Perez-Dorado I, Kahn R, Morales M, Campuzano M, Campillo NE, Mobashery S, Garcı JL, Garcıa P, Hermoso JA. (2009) Crystal structure of CbpF, a bifunctional choline-binding protein and autolysis regulator from *Streptococcus pneumoniae*. *EMBO report*. 10: 246-251.
- 32) Tomasz A, Waks S. (1975) Mechanism of action of penicillin: Triggering of the pneumococcal autolytic enzyme by inhibitors of cell wall synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S* A. 72: 4162-4166.
- 33) 日本臨床微生物学会. (2016) 抗菌薬感受性試験のための標準検査法-第26版: 78-87.
- Brinkmann V, Zychlinsky A. (2007) Beneficial suicide: why neutrophils die to make NETs. Nat Rev Microbiol. 5: 577-582.
- 35) Zhang JR, Mostov KE, Lamm ME, Nanno M, Shimida S, Ohwaki M, Tuomanen E. (2000) The Polymeric Immunoglobulin Receptor Translocates Pneumococci across Human Nasopharyngeal Epithelial Cells. *Cell*. **102**: 827-837.
- 36) Frolet C, Beniazaa M, Roux L, Gallet B, Noirclerc-Sacoye M, Vernet T, Di Guilmi AM. (2010) New adhesin functions of surface-exposed pneumococcal proteins. *BMC Microbiol*. 10: 190.
- 37) Lambeth JD. (2004) NOX ENZYMES AND THE BIOLOGY OF REACTIVE OXYGEN. *Nat Rev Immunol.* **4**: 181-189.
- Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. (2004) Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. *Science*. 303: 1532-1535.
- Nijnik A, Hancock RE. (2009) The roles of cathelicidin LL-37 in immune defences and novel clinical applications. *Curr Opin Hematol.* 16: 41-47.
- 40) Gerlini A, Colomba L, Furi L, Braccini T, Manso AS, Pammolli A, Wang B, Vivi A, Tassini M, van Rooijen N, Pozzi G, Ricci G, Andrew PW, Koedel U, Moxon ER, Oggioni MR. (2014) The Role of Host and Microbial Factors in the Pathogenesis of Pneumococcal Bacteraemia Arising from a Single Bacterial Cell Bottleneck. *PLoS Pathog.* 10: e1004026.
- Kono M, Zafar MA, Zuniga M, Roche AM, Hamaguchi S, Weiser J. (2016) Single Cell Bottlenecks in the Pathogenesis of *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog.* 12: e1005887.
- 42) Ng WL, Robertson GT, Kazmierczak KM, Zhao J, Gilmour R, Winkler ME. (2003) Constitutive expression of PcsB suppresses the requirement for the essential VicR (YycF) response regulator in *Streptococcus pneumoniae* R6. *Mol Microbiol.* **50**: 1647-1663.

- 43) Standish AJ, Stroeher UH, Paton JC. (2005) The two-component signal transduction system RR06/HK06 regulates expression of *cbpA* in *Streptococcus pneumoniae*. *Proc Natl Acad Sci* U S A. 102: 7701-7706.
- 44) Throup JP, Koretke KK, Bryant AP, Igraham K, Chalker KA, Ge Y, Marra AF, Wallis N, Brown J, Holmes D, Rosenberg M, Burnham M (2000) A genomic analysis of twocomponent signal transduction in *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol*. 35: 566-576.
- 45) Paterson GK, Blue CE, Mitchell TJ. (2006) Role of two-component systems in the virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *J Med Microbiol*. **55**: 355-363.
- 46) Gámez G, Castro A, Comez-Mejia A, Gallego M, Bedoya A, Camargo M, Hammerschmidt S. (2018) The variome of pneumococcal virulence factors and regulators. *BMC Genomics*. 19: 10
- 47) Marriott HM, Mitchell TJ, Dockrell DH. (2008) Pneumolysin: A Double-Edged Sword During the Host-Pathogen Interaction. *Curr Mol Med.* 8: 497-509.
- 48) Johnston JW, Myers LE, Ochs MM, Benjamin WH Jr, Briles DE, Hollingshead SK. (2004) Lipoprotein PsaA in Virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Surface Accessibility and Role in Protection from Superoxide. *Infect Immun.* 72: 5858-5867.