

財団使用欄

平成31年 1月 8日 受理

No. 2

完了報告書

(兼 会計報告書)

平成 30 年 12 月 25 日

公益財団法人 シオノ健康財団

理事長 塩野谷 貫一 殿

個人の方

氏名 辻 勉



団体の方

団体名

代表者



貴財団より助成いただいた活動が完了いたしましたので、下記のとおり報告します。

| | |
|-------|--------------------------------|
| 活動内容、 | 細菌の分泌タンパク質による宿主免疫系のかく乱作用に関する研究 |
|-------|--------------------------------|

※今後の連絡に必要となりますので、全ての項目にご記入ください。

| | | | | |
|-----------|-------------------|---|-----------------|--|
| 提出者に関する事項 | (フリガナ) 氏名又は団体名 | ツジ ツトム 辻 勉 | 生年月日 又は設立年月日 | |
| | (フリガナ) 提出担当者 | ツジ ツトム 辻 勉 | | |
| | 住 所 | | | |
| | 連絡先 ・ 郵送先 | 〒142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41 星薬科大学微生物学教室 (TEL) 03-5498-5753 (FAX) 03-5498-5753 (E-mail) tsuji@hoshi.ac.jp | | |

※提出後の住所・連絡先変更の際は、速やかに事務局までご連絡ください。

I. 活動成果及び今後の課題

(注) 各項目の記述には必要な分量のスペースを使ってください。

| |
|---|
| (1) 活動成果 |
| <p>黄色ブドウ球菌 <i>Staphylococcus aureus</i> は、ヒトの皮膚や鼻腔などの常在菌であり、表在性の皮膚疾患から骨髄炎、肺炎、敗血症などの侵襲性の高い重篤な疾患まで幅広い疾患の原因菌である。また、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) などの多剤耐性菌の蔓延が人類に対する大きな脅威となっている。宿主の免疫機構は、さまざまな機序により黄色ブドウ球菌を排除するが、一方で、黄色ブドウ球菌は、多種類の毒素や酵素類を分泌し宿主免疫機構に対抗している。そのなかで、Staphylococcal superantigen-like protein (SSL) は、細菌性スーパー抗原と類似した構造を有しているが、スーパー抗原活性を示さず、宿主免疫からの回避への関与が示唆されている。現在までに明らかにされている14種類のSSLファミリータンパク質のうち、私たちの研究グループはSSL5に着目し、この外分泌タンパク質が、好中球を介した免疫応答に与える影響について解析してきた。そして、SSL5がヒト好中球由来マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP)-9に結合し、その酵素活性を阻害することを明らかにした。本研究では、SSL5とMMP-9の結合の様式、特に糖鎖が関わる結合に注目し解析した。また、SSL5の宿主免疫機構に対する新たな標的を明らかにするために血漿タンパク質との相互作用について研究を進めた。</p> |
| 1) SSL5とMMP-9の結合における糖鎖の役割 |
| <p>ヒト単球系白血球細胞株 THP-1 の培養上清より精製したMMP-9をノイラミニダーゼにて処理したところ、組換え型SSL5に対する結合親和性が顕著に減少した。また、シアル酸欠損変異株であるLec2細胞にヒトMMP-9のcDNAを導入し、培養上清より精製したMMP-9は、親株であるCHO細胞由来のMMP-9に比べ、組換え型SSL5との結合が著しく減弱した。これらの結果から、MMP-9のシアル酸残基がSSL5との結合に重要であることが示された。</p> <p>MMP-9のN結合型糖鎖をペプチド-N-グリコシダーゼ (PNGase F) 処理によって切断除去後も、SSL5への結合は、未処理のMMP-9と比べ変化は見られなかった。一方、THP-1細胞をO結合型糖鎖伸長阻害剤 benzyl-GalNAc 存在下で培養し、培養上清から精製したMMP-9ではSSL5との結合が減弱することが分かった。以上の結果から、SSL5との結合にはMMP-9のシアル酸を含むO結合型糖鎖が重要であることが示唆された。</p> |
| 2) 血漿中のSSL5結合タンパク質の探索 |
| <p>ヒト血漿より固相化組換え型SSL5に対して結合した画分を回収し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離すると複数のバンドが検出された。最も強く検出された約100 kDaのバンドについてMALDI-TOF-MSによるフィンガープリント解析を行なったところ、plasma protease C1 inhibitor (C1インヒビター, C1Inh) であることが明らかになった。次に、C1InhのC末端にHisタグを融合したC1Inh-HisをHEK293FT細胞で発現させ、SSL5との結合をプルダウンアッセイにより評価したところ、C1Inh-HisはSSL5に直接結合することが示された。また、SSL5がC1Inhの機能に与える影響を調べるために、合成基質を用いて補体成分C1sの活性を測定した。SSL5の共存下でC1sの活性を測定したところ、C1Inh-HisによるC1sの活性阻害を軽減することが示された。</p> <p>次に、SSL5とC1Inhの結合における糖鎖の関与について調べた。C1Inh-Hisをノイラミニダーゼ処理することによりSSL5との結合が著しく減弱した。また、Lec2細胞で発現させたC1Inh-Hisは</p> |

| |
|---|
| <p>SSL5 との結合が認められなかった。これらの結果から、MMP-9 の場合と同様に、C1Inh と SSL5 の結合においても C1Inh のシアル酸残基が重要であることが示された。</p> |
| <p>3) 抗 SSL5 モノクローナル抗体の作製</p> <p>SSL5 に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ (30G5C) を樹立した。本抗体は、他の SSL タンパク質に対する交差反応性が認められず、SSL5 に対する特異性の高い抗体であることが分かった。また、SSL5 と MMP-9 の結合を阻害しないことから、SSL5/MMP-9 相互作用の阻害物質の探索に応用可能であると考えられた。</p> |
| <p>(2) 今後の課題</p> <p>本研究の結果より、1) SSL5 と MMP-9 の結合にはシアル酸を含む O 結合型糖鎖が重要であること、2) SSL5 がヒト血漿中の C1 インヒビターと特異的に結合し、C1 インヒビターの活性を抑制すること、3) SSL5 と C1 インヒビターの結合にはシアル酸を含む糖鎖が重要であることが明らかになった。</p> <p>以前の報告より、SSL5 と白血球および血小板膜糖タンパク質との結合にシアル酸残基の関与が示唆されていたが、本研究の結果から、新たに MMP-9 との結合における O 結合型糖鎖の重要性が明らかにされた。SSL5 は白血球膜糖タンパク質 PSGL-1 および MMP-9 にシアル酸含有糖鎖を介して結合することで、白血球の血管外遊走および組織浸潤の 2 つのステップを効率的に抑制し、黄色ブドウ球菌に対する白血球の攻撃を回避していることが考えられた。また、C1 インヒビターに結合し、補体活性化制御作用を妨害することで過剰な補体活性化の誘導や補体成分の枯渇をもたらし、免疫応答を混乱させる可能性が示された。今後、SSL5 を介した黄色ブドウ球菌の免疫回避機構の詳細な解析や病態形成との関係性を明らかにするとともに、他の SSL タンパク質の作用についても解析することによって黄色ブドウ球菌感染に対する新たな治療戦略の開発に繋がるものと考えている。</p> |
| <p>[文献]</p> |
| <p>1) Kurisaka C, Oku T, Itoh S, Tsuji T. Role of sialic acid-containing glycans of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in the interaction between MMP-9 and staphylococcal superantigen-like protein 5. <i>Microbiol Immunol.</i> 62: 168-175 (2018)</p> |
| <p>2) Oku T, Kurisaka C, Ando Y, Tsuji T. Identification of human plasma C1 inhibitor as a target protein for staphylococcal superantigen-like protein 5 (SSL5). <i>Biochem Biophys Res Commun.</i> in press (2019)</p> |
| <p>3) Oku T, Soma H, Kurisaka C, Tsuji T. Generation of a monoclonal antibody against staphylococcal superantigen-Like protein 5 (SSL5) that discriminates SSL5 from other SSL proteins. <i>Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.</i> 37: 212-217 (2018)</p> |
| |
| |
| |