

黄色ブドウ球菌 staphylococcal superantigen-like (SSL) タンパク質による宿主免疫系の攪乱

辻 勉^{a,b}

Modulation of Host Immune System by Staphylococcal Superantigen-like (SSL) Proteins

Tsutomu Tsuji^{a,b}

^aHoshi University School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences; 2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142-8501, Japan; and ^bFaculty of Pharmaceutical Sciences, Josai University; 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0295, Japan.

(Received November 9, 2020)

Staphylococcus aureus is a common pathogen causing a wide range of infectious diseases in humans and animals. This bacterium secretes a variety of exoproteins, including toxins known as superantigens, such as toxic shock syndrome toxin-1 (TSST-1) and enterotoxins. Staphylococcal superantigen-like (SSL) proteins are a family of exoproteins showing structural similarities with superantigens but no superantigenic activity. This family is composed of 14 members (SSL1–SSL14), and recent studies have revealed that these members exhibit various immunomodulatory activities: e.g., inhibition of antibody and complement functions, impairment of leukocyte trafficking, modulation of receptor functions, inappropriate activation of immunocytes, and inhibition of blood coagulation. These activities have been proposed to contribute to immune evasion of the bacteria. The interactions between SSL proteins and their target molecules in the host immune system and the pathophysiological roles of SSL proteins in the bacterial infections are reviewed in this article.

Key words—staphylococcal superantigen-like protein; immunomodulation; bacterial exotoxin; *Staphylococcus aureus*

はじめに

グラム陽性細菌である黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、健康人の皮膚の常在菌であるが、皮膚の創傷に伴う化膿症を始め、腹膜炎、髄膜炎、敗血症などの重篤な感染症を引き起こす。細菌性食中毒の起原因菌の1つでもあり、また、抗菌薬に対して耐性を示すメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; MRSA) は、院内感染の主要な原因となっている。本菌は様々なタンパク質を細胞外に分泌する。そのなかには、ヒトや動物に対して強い毒性を示す毒素が知られ、感染により様々な機序で宿主に傷害を与える。例えば、消化器障害の原因となるエンテロトキシン (enterotoxin) や毒素性ショック症候群毒素

(toxic shock syndrome toxin-1; TSST-1) は細菌性スーパー抗原と呼ばれる毒素であり、免疫系の司令塔である T 細胞を多クローン性に活性化し、免疫系を混乱に陥れる。このような毒素の作用機序については免疫系への影響が詳しく調べられている。その後、スーパー抗原と立体構造が類似する分泌タンパク質ファミリーが発見され、総称してブドウ球菌スーパー抗原様タンパク質 (staphylococcal superantigen-like protein; SSL protein) と呼ばれている。¹⁻⁴⁾ 以前には、これらのタンパク質はブドウ球菌エンテロトキシン様毒素 (staphylococcal enterotoxin-like toxin; SET) と呼ばれていたこともある。SSL タンパク質は、スーパー抗原と類似の構造を有するが、スーパー抗原のような T 細胞活性化作用は示さず、その機能は不明であった。近年、このファミリータンパク質が宿主免疫系に混乱をもたらすことが明らかにされ、免疫系からの回避を介して感染成立を容易にする役割があることが推測されている。本稿では、SSL タンパク質の免疫攪乱作用について、私たちの研究を含めて紹介したい。

^a星薬科大学薬学部 (〒142-8501 東京都品川区荏原 2-4-41), ^b城西大学薬学部 (〒350-0295 埼玉県坂戸市けやき台 1-1)

e-mail: tsuji@josai.ac.jp

本総説は、2018 年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

1. SSL タンパク質とは？

黄色ブドウ球菌の産生する TSST-1 やエンテロトキシンは、スーパー抗原性外毒素（あるいは単にスーパー抗原）の作用を有する。通常の免疫応答では、ある特定の抗原に対応して活性化される T 細胞は、ごく限られた数のクローンであるが、スーパー抗原の場合には莫大な数の T 細胞クローンがまとめて活性化される。そのような意味で「スーパー」と命名されている。スーパー抗原は多クローン性の T 細胞活性化を引き起こすので、多種類のサイトカインが多量に産生され、生体防御を担当すべき免疫系が混乱し、逆に生体を傷害してしまう。全身的なショック症状や多臓器不全をもたらすこともある。スーパー抗原の標的となる分子は主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex; MHC) にコードされる細胞膜タンパク質のうちクラス II とよばれる分子である。抗原提示細胞表面に発現するクラス II 分子に結合したスーパー抗原が、あたかも免疫系の標的である抗原のように、T 細胞の抗原受容体である T 細胞レセプターを刺激し多数の T 細胞を活性化する。スーパー抗原についての研究過程で、黄色ブドウ球菌にはスーパー抗原に構造的な類似性のある分泌タンパク質ファミリーが存在することが明らかになった。これらの分子が SSL タンパク質であるが、メンバーのいずれも MHC クラス II 分子には結合せず、スーパー抗原のような T 細胞活性化作用も認められていない。

現在までに SSL1-SSL14 の 14 のメンバーが同定されており、分子量 25000-35000 のタンパク質である。それぞれの分子は 2 つのドメイン (N 末端側の OB ドメイン及び C 末端側の β -grasp ドメイン) から構成され、スーパー抗原に類似した構造を持っている。^{1,2,5)} これらの分子をコードする遺伝子は、病原性に深く関連する 2 つの遺伝子クラスターとして存在する。SSL1-SSL11 はゲノムアイランド α (genomic island α ; GI α) により、また SSL12-SSL14 は免疫回避クラスター 2 (immune evasion cluster 2; IEC2) によりそれぞれコードされる。⁶⁾ SSL タンパク質とスーパー抗原であるエンテロトキシン A (staphylococcal enterotoxin A; SEA) のアミノ酸配列の相同性は、菌株によっても異なるが、20-32% とそれほど高くない。一方、SSL タンパク質間での相同性はそれよりも高く、SSL3/SSL4 間

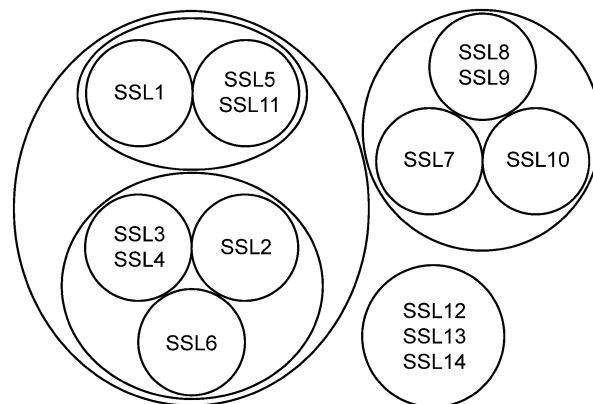


Fig. 1. Classification of SSL Proteins Based on the Amino Acid Sequence Homology

The SSL family proteins are primarily classified into two groups: SSL1 to SSL11 are encoded by genomic island α (GI α), and SSL12 to SSL14 are encoded by immune evasion cluster 2 (IEC2). The former group is further divided into two subgroups: SSL7 to SSL10 constitute a subgroup distinct from the other members, SSL1-SSL6 and SSL11.

では 69%, SSL5/SSL11 間では 48%, SSL8/SSL9 間では 69% である。また、SSL12-SSL14 の 3 メンバー間では 58-69% と相同性が比較的高いのにに対し、SSL12-SSL14 と他の SSL メンバー間の相同性はいずれも 40% 未満である。^{2,7)} これらの相同性データから SSL タンパク質は Fig. 1 のようなグループに分類される。

2. SSL タンパク質の多彩な生物活性

前にも述べたように SSL タンパク質にはスーパー抗原の活性は見い出されず、その機能が不明であったが、近年、多くの研究によって多彩な作用を持つことが明らかになってきた。それらを Table 1 及び Fig. 2 にまとめた。宿主免疫系に対して様々な作用が報告されている。免疫応答に重要な役割を演ずる抗体及び補体成分に結合してそれらの機能を妨害するもの (SSL5, SSL7, SSL10)、白血球のケモカイン受容体や細胞接着分子に結合し白血球の体内交通を障害するもの (SSL5, SSL10, SSL11) 及



辻 勉

1953 年神奈川県川崎市に生まれる。1981 年東京大学大学院薬学系研究科博士課程修了。東京大学薬学部助手 (生体異物免疫化学教室、大澤利昭教授)。1986 年米国ワシントン大学病理生物学部客員助教授 (箱守仙一郎教授)。1992 年東京大学薬学部助教授 (入村達郎教授) を経て、1997 年星薬科大学教授 (微生物学教室)。2019 年より城西大学薬学部客員教授。

Table 1. Staphylococcal Superantigen-like (SSL) Proteins

	Target molecules and effects on host physiological functions	Reference
SSL1	MMP*-8 and MMP*-9: Inhibition of these enzymes	22
SSL3	TLR2***: Inhibition of ligand-induced macrophage activation	24, 25, 26
SSL4	TLR2**	25, 40
SSL5	PSGL-1***: Impairment of leukocyte trafficking Platelet membrane glycoproteins: Platelet activation MMP*-9: Inhibition of the enzymatic activity C1 inhibitor: Perturbation of complement functions C5a receptor, IL-8 receptor	15 27, 28 20, 22 13 16
SSL6	CD47 (integrin-associated protein)	35
SSL7	IgA: Inhibition of IgA binding to the receptor (FcαRI) Complement C5: Inhibition of complement activation	10 10
SSL8	Tenascin C: Impairment of tissue remodeling	33
SSL10	IgG1: Inhibition of complement activation CXCR4: Inhibition of leukocyte chemotaxis Fibrinogen and fibronectin Prothrombin: Inhibition of blood coagulation Phospholipid (phosphatidylserine)	11, 12 17 12 29 34
SSL11	Enhancement of neutrophil adhesion and suppression of cell motility Fc receptor (FcαRI) PSGL-1***	23 41 41
SSL12	Activation of mast cells and basophils	30, 31
SSL13	Neutrophil activation mediated by formyl peptide receptor 2	32

* Matrix metalloproteinase; ** Toll-like receptor 2; *** P-selectin glycoprotein ligand-1.

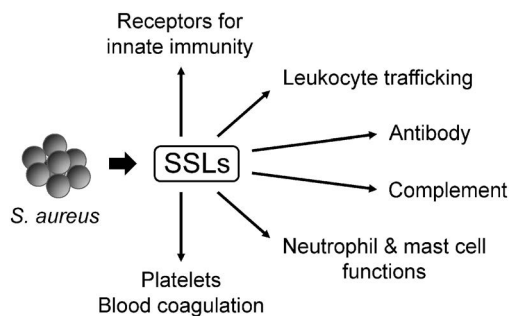


Fig. 2. Immunomodulatory Activities of SSL Proteins Secreted by *Staphylococcus aureus*

The SSL family proteins exhibit various effects on the host immune system, including effects on antibody functions, the complement system, receptor functions, leukocyte trafficking, neutrophil and mast cell functions, and platelets/blood coagulation.

び細胞外マトリックス分解酵素を阻害し白血球の組織浸潤を障害するもの (SSL1, SSL5), 微生物成分に対する自然免疫の受容体機能を妨害するもの (SSL3, SSL4) など免疫応答の様々な過程を障害し, 細菌の免疫回避に役立つことが推察されている。一方で, 好中球やマスト細胞 (肥満細胞) の活

性化をもたらすもの (SSL12, SSL13) が報告されている。SSL1-SSL11 は, 免疫系に対して抑制的に作用するものが多いが, SSL12 及び SSL13 には免疫細胞を活性化する作用が見い出されている。Figure 1 で示した構造的なグループ分けと対応しているように見えるが詳細は不明である。

免疫系に対する作用に加えて, 血小板の細胞膜糖タンパク質や血液凝固因子に結合するもの (SSL5, SSL10), 細胞外マトリックスタンパク質に結合し創傷治癒に影響を及ぼすもの (SSL8) も知られる。リン脂質 (ホスファチジルセリン) に結合するもの (SSL10) も報告されている。

SSL5 や SSL10 でみられるように, 1つの SSL タンパク質が複数の標的分子に結合するものもある。標的分子によって結合部位が異なることが示唆されているものもあるが, 後述のように, 標的タンパク質の翻訳後修飾 (糖鎖修飾やグルタミン酸残基のカルボキシル化) 部位を認識する例が示されている。

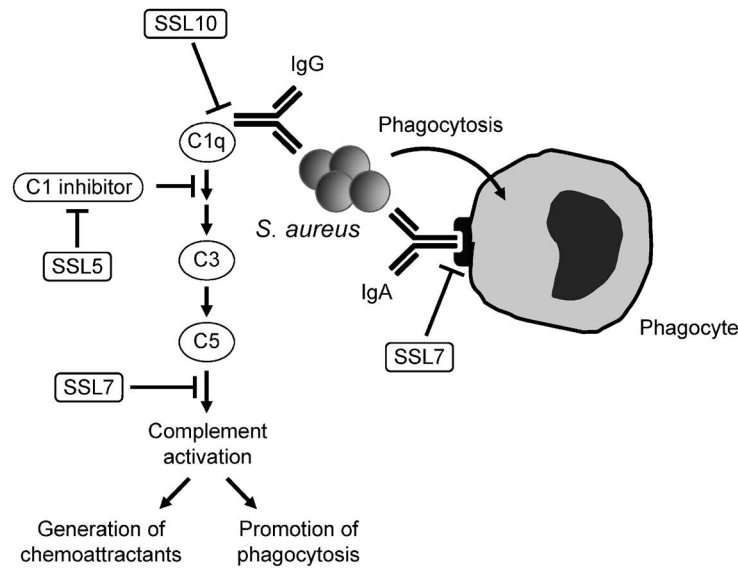


Fig. 3. Inhibitory Activities of SSL Proteins towards Antibody and Complement Functions

SSL7 binds to IgA receptors (Fc α RI) expressed on phagocytes and impairs their phagocytosis. SSL10 binds to the Fc region of IgG1 and inhibits complement activation *via* the classical pathway. SSL7 also binds to complement C5 and inhibits complement activation, leading to a failure in complement-dependent phagocytosis and the generation of chemoattractants for leukocytes such as C5a. SSL5 binds to plasma C1 inhibitor and perturbs the regulation of complement activation.

3. 抗体及び補体に対する作用

黄色ブドウ球菌が産生する抗体結合タンパク質としては、プロテイン A (staphylococcal protein A; SpA) 及びブドウ球菌免疫グロブリン結合タンパク質 (staphylococcal binder of immunoglobulin; Sbi) が知られている。^{8,9)} プロテイン A は、免疫グロブリン G (IgG) の精製や免疫沈降法などの生化学・分子生物学の実験によく利用される身近なタンパク質でもある。これらのタンパク質とは構造が異なる SSL7 が、抗体に結合する SSL タンパク質として初めて同定された。¹⁰⁾ SSL7 は、IgA クラスの抗体に結合する。IgA は血液中にも多く存在するが、粘膜分泌液にも含まれる抗体であり、粘膜の免疫に深く関わっている。SSL7 は、IgA の Fc 領域に結合し、抗体と抗原の結合には影響を与えないが、好中球、単球、マクロファージなどの食細胞の表面に発現する Fc レセプター (Fc α RI; CD89) と IgA との結合を阻害する。その結果、IgA が細菌に結合 (オプソニン化) することにより促進される食作用 (phagocytosis) が妨害されることになる (Fig. 3)。

その後、私たちを含めた 2 つの研究グループより SSL10 がヒト IgG に結合することが明らかにされた。^{11,12)} SSL10 は、特に IgG1 サブクラスに親和性が高い。SSL7/IgA の場合と同様に、SSL10/IgG1 間の結合は IgG1 の Fc 領域を介するので、抗原と

の結合は妨害しないが、古典経路による補体活性化の最初の補体成分である C1q と IgG1 の結合を阻害する (Fig. 3)。その結果、引き続く活性化経路での C3 の活性化による C3b の生成が抑制され、細菌表面への C3b の沈着が起こらず、食細胞の C3b 受容体を介した食作用が妨害される。一方で、補体活性化の最終段階で形成される膜侵襲複合体 (membrane attack complex; MAC) の形成も抑えられるが、ブドウ球菌などのグラム陽性細菌では膜障害作用への MAC の関与は少なく、影響は小さいものと考えられている。

補体活性化経路の重要な中間点に位置する C5 に対しても SSL7 が結合することが報告されている。¹⁰⁾ SSL7 は C5 の活性化を阻害し、白血球誘引物質である C5a の生成を抑制する。これによって、感染防御にあずかる好中球などの白血球の集積が妨害され、感染の成立に寄与するものと考えられる。最近私たちは、血液中に存在する SSL5 結合タンパク質が補体調節因子の 1 つである C1 インヒビター (C1 inhibitor) であることを報告した。¹³⁾ C1 インヒビターは補体成分 C1s のエステラーゼに対し阻害作用を持つが、SSL5 によってこの阻害作用が減弱されることが明らかになった。C1 インヒビターは、補体活性化の制御因子としてばかりでなく、カリクレイン/キニン系にも関与しているので、循環

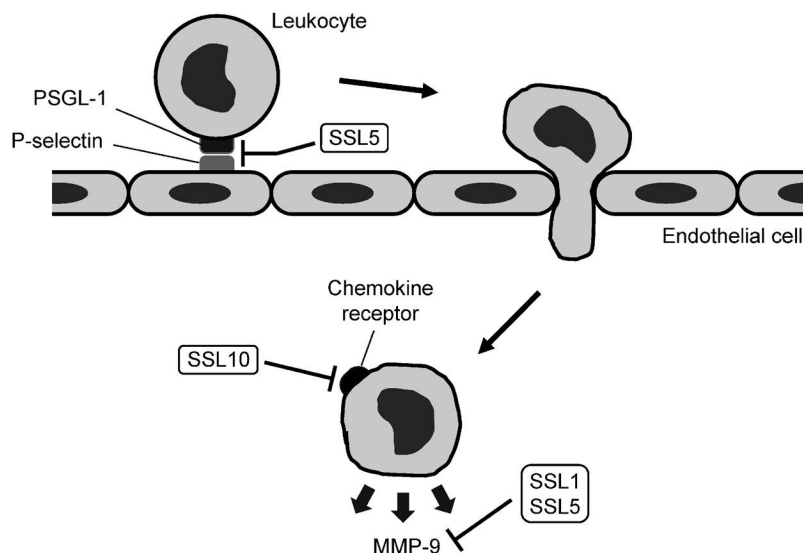


Fig. 4. Inhibitory Activities of SSL Proteins towards Leukocyte Extravasation and Recruitment to Infection Sites

SSL5 binds to P-selectin glycoprotein ligand-1 (PSGL-1) expressed on leukocytes and interferes with their rolling along the surface of activated endothelium, which is an initial step in leukocyte extravasation. SSL10 binds to chemokine receptor (CXCR4) and inhibits chemotaxis of leukocytes. SSL1 and SSL5 bind to matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and inhibit its enzymatic activity. MMP-9 is a collagenolytic enzyme and essential for the leukocyte invasion through extracellular matrices.

調節, 血管拡張, 炎症など広範囲に影響を及ぼす可能性がある。黄色ブドウ球菌は, SSL5 タンパク質以外にも staphylococcal complement inhibitor (SCIN) と呼ばれる補体阻害因子¹⁴⁾を分泌することから, 補体の機能が多面的に攪乱されるものと考えられる。

4. 白血球の体内移動に対する作用

血液中の白血球が感染部位や炎症局所へ移動するときには, 血管内皮と白血球の相互作用, ケモカイン (chemokine) などの走化性因子による細胞の誘引と活性化, 細胞外マトリックスの分解をともなう組織浸潤などの複雑な過程を経ることが知られている。白血球のなかで最も数が多く, 細菌感染に際していち早く感染部位に移動してくる好中球の血管外遊走を例にとり模式的に表した (Fig. 4)。また, 図中にこれらの過程にいくつかの SSL タンパク質が関わっていることを示した。感染・炎症局所に近い血管では, 血管内皮細胞の表面にセレクチン (P-selectin 及び E-selectin) と呼ばれる細胞接着分子が発現し, 好中球表面に存在する P-セレクチン糖タンパク質リガンド-1 (P-selectin glycoprotein ligand-1; PSGL-1) と呼ばれる糖タンパク質に緩く結合する。血流の影響下で細胞が血管内皮に結合したり離脱したりしながら血管壁を転がる現象はローリング (rolling) と呼ばれ, 好中球の細胞外遊走の

第一段階と考えられている。SSL5 は PSGL-1 に結合することにより, PSGL-1 と P-セレクチンとの相互作用を妨害し, 好中球のローリングを障害する。¹⁵⁾ P-セレクチンは, 糖鎖を認識するレクチン活性を持つ細胞接着分子であり, PSGL-1 に豊富に存在する特定の糖鎖に結合する。SSL5 と PSGL-1 の結合も糖鎖依存的であり, SSL5 は, P-セレクチンと共通の PSGL-1 の糖鎖構造を認識することにより, P-セレクチンと PSGL-1 の相互作用を競合的に阻害するものと考えられている (後述)。

補体活性化にともない生成するアナフィラトキシン (anaphylatoxin) C5a やインターロイキン 8 (interleukin-8; IL-8) は強力な好中球誘引作用を持つ。これらの誘引物質の受容体は, G タンパク質共役受容体 (G protein-coupled receptor; GPCR) であるが, SSL5 は, これらの受容体に存在する糖鎖を介して結合し, その機能を障害することが報告されている。¹⁶⁾ さらに, SSL10 にも別のケモカイン受容体である CXC モチーフ型ケモカイン受容体 4 (CXCR4) への結合活性がある。¹⁷⁾ CXCR4 に対応するリガンド分子はストローマ細胞由来因子 1 α [stromal cell-derived factor 1 α ; SDF-1 α (CXCL12)] と呼ばれるケモカインであり, SSL10 及び SSL5 は, それぞれ別の機序で白血球の感染部位への集積を妨害することにより, 細菌の宿主免疫系からの回

避に寄与するものと考えられる。これらの SSL タンパク質に加え、黄色ブドウ球菌は、アナフィラトキシン C5a 受容体のアンタゴニストとしての作用を持つ chemotaxis inhibitory protein of *Staphylococcus aureus* (CHIPS)^{14,18)} 及び細菌由来成分であるホルミルペプチドに対する受容体のアンタゴニストとしての作用を持つ formyl peptide receptor-like 1 inhibitory protein (FLIPr)¹⁹⁾ と呼ばれるタンパク質を分泌する。このように、黄色ブドウ球菌が分泌する複数のタンパク質が共同して宿主の免疫細胞の体内移動を乱すことが推察される。

ケモカインの作用で活性化された好中球は、血管壁に強く接着し、血管内皮細胞の間隙を通り血管外に遊走する。そしてコラーゲンなどの細胞外マトリックスを分解しながら組織を浸潤していく (Fig. 4)。私たちは、好中球の細胞溶解液から SSL5 標的タンパク質を探索し、マトリックスメタロプロテイナーゼ 9 (matrix metalloproteinase-9; MMP-9) が SSL5 に結合することを明らかにした。²⁰⁾ MMP-9 はゼラチナーゼ B (gelatinase B) とも呼ばれるマトリックス分解酵素であり、IV 型、V 型、XI 型などのコラーゲンの分解を通して好中球の組織浸潤に重要な役割を持つ酵素である。黄色ブドウ球菌細胞壁のペプチドグリカンに応答して好中球の MMP-9 生成が亢進することも報告されている。²¹⁾ SSL5 は、精製 MMP-9 の酵素活性を非競合的に阻害し、*in vitro* の基底膜モデルや炎症モデルマウスでの好中球の浸潤を抑制することが示された。以上のように、好中球の感染局所への遊走に関して、血管内皮との相互作用、走化性と細胞活性化、組織浸潤などの各ステップが SSL5 及び SSL10 により阻害されるものと考えられる。その後、SSL1 も MMP-8 及び MMP-9 に結合し、酵素活性を阻害することが報告されている。²²⁾ 最近、好中球の運動性に関して SSL11 の役割が示唆されている。SSL11 は、好中球の接着性を上昇させ運動性を低下させるとの報告である。²³⁾ この作用の機序は明らかではないが、PSGL-1 には依存しないメカニズムのようである。

5. 自然免疫系の受容体に対する作用

免疫系は、自然免疫と獲得免疫という 2 つの大きなカテゴリーに分けられるが、免疫の基盤となっている自然免疫は進化的に古くからある免疫である。細菌感染に際しては、獲得免疫に先立って自然免疫

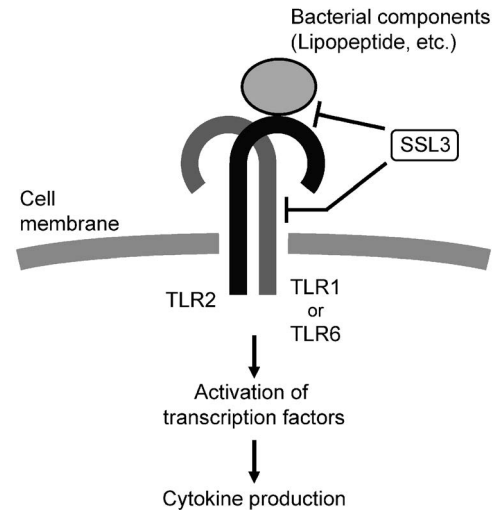


Fig. 5. Binding of SSL Proteins to Toll-like Receptor 2 (TLR2) and Impairment of Signal Transduction

SSL3 interferes with the interaction between Toll-like receptor 2 (TLR2) and its ligands, such as bacterial lipopeptides. SSL3 also inhibits the dimer formation of TLR2 and TLR1/TLR6. The binding of SSL3 to TLR2 impairs cellular signaling for the activation of transcription factors and cytokine production. SSL4 also blocks TLR2-mediated cellular activation.

がはたらく。自然免疫を担う好中球やマクロファージは、リンパ球の抗原受容体のような厳密な抗原識別は行わずに、微生物に特徴的な分子の共通構造を大まかに認識するパターン認識受容体 (pattern-recognition receptor; PRR) を用いて異物を識別する。このような受容体の代表が Toll 様受容体 (Toll-like receptor; TLR) である。ヒトでは 10 種類 (TLR1–TLR10) が知られ、それぞれ対応する微生物成分が異なる。

SSL3 に結合する免疫細胞の分子を探索したところ TLR2 が同定された。²⁴⁾ SSL3 に最も相同性の高い SSL4 も TLR2 に結合する。²⁵⁾ TLR2 は、細菌成分であるリポペプチドやペプチドグリカンを認識する受容体であるが、SSL3 はリポペプチドあるいはブドウ球菌菌体の刺激によるマクロファージの活性化を抑制し、炎症性サイトカインの産生を低下させる (Fig. 5)。SSL3 と TLR2 複合体の結晶構造解析が行われ、²⁶⁾ その結果から、① SSL3 が TLR2 のリガンド結合部位の入口に近い部位に結合し、リポペプチドなどに対するリガンド結合ポケットを狭めること、② SSL3 の結合部位は、TLR2 と TLR1 あるいは TLR6 との 2 量体形成に関わる領域と重なっており、ヘテロ 2 量体形成の妨害を介して受容体から細胞内へのシグナル伝達を抑えることが明らかになった。SSL3 は、このような機序で TLR2 の受容

体機能を障害すると考えられる。

6. 血小板及び血液凝固に対する作用

SSL タンパク質は、宿主の免疫系ばかりでなく血小板や血液凝固系に対しても影響を与える。例えば、SSL5 は、血小板の細胞膜糖タンパク質 glycoprotein (GP) Ib α 及び GPIIb/IIIa (α IIB β 3 インテグリン) を介して血小板に結合する^{27,28)} SSL5 を洗浄血小板に加えると血小板凝集が観察される。このような SSL5 の作用は、SSL5 が血小板膜糖タンパク質 GPIb α に結合することが引き金となり、細胞接着分子 α IIB β 3 インテグリンの活性化を介するものと推察されている。SSL5 によって誘導される血小板活性化は、血小板膜糖タンパク質 GPVI の細胞外ドメイン由来の可溶性フラグメントにより阻害されることから、GPVI も SSL5 の結合部位を構成する可能性が示されている。SSL5 による血小板活性化作用は、血漿の存在下では減弱することから、血漿中に活性化を抑制する因子の存在が示唆される。前に述べたように、血漿中には C1 インヒビターなどの SSL5 結合タンパク質が存在するので、これらのタンパク質が SSL5 と血小板膜糖タンパク質の相互作用を競合的に阻害するのかもしれない。このような血小板活性化作用は、感染にともなう血栓形成に関与する可能性がある。

SSL タンパク質の血液凝固系に対する作用についても調べられている。SSL10 は、血液凝固因子であるプロトロンビンに結合し、血液凝固を抑制することが示された。²⁹⁾ プロトロンビンを含む血液凝固因子は、タンパク質の翻訳後修飾としてグルタミン酸残基にビタミン K 依存的なカルボキシル化 (γ -カルボキシグルタミン酸, γ -carboxyglutamic acid; Gla) 修飾を受けている。SSL10 は、プロトロンビンなど血液凝固因子の Gla を含むドメインに結合し、凝固因子の活性化カスケードを抑制すると考えられる。一方、黄色ブドウ球菌は、血液凝固を促進する作用を持つコアグラーゼ (coagulase) を産生することが以前より知られている。コアグラーゼは、プロトロンビンに結合し構造変化を引き起こすことにより、フィブリノーゲンのフィブリンへの転換を促進する。黄色ブドウ球菌は、血液凝固系に対して反対の作用を持つコアグラーゼと SSL10 とを産生していることになる。コアグラーゼは、菌体表面でフィブリン凝集を促進させ、免疫系からの攻撃

を回避するという役割が示唆されている。SSL10 の場合には、血液凝固系が抑制的に変調されることになるが、感染との関連性は不明であり今後の研究が待たれる。

7. 免疫細胞の活性化作用

これまでの報告では、SSL タンパク質の主な作用は免疫抑制であったが、最近になり免疫細胞の活性化をもたらすことを示す研究報告がなされている。その 1 つは、アレルギー反応に深く関わるマスト細胞 (肥満細胞) である。骨髄由来のマスト細胞に SSL12 を加えると、細胞の活性化にともない脱顆粒反応が誘導され、顆粒内に蓄えられているヒスタミンなどの生理活性物質の放出が観察される。³⁰⁾ 同時に IL-6 及び IL-13 などサイトカイン産生が促進されることが明らかにされた。また、マウスの皮内に SSL12 を投与することにより血管透過性の亢進も認められた。これらの反応は IgE に依存しないことも併せて示された。マスト細胞と類縁の好塩基球に対しても、SSL12 は IL-4 の放出を誘導した。³¹⁾ このようなマスト細胞や好塩基球の活性化は、黄色ブドウ球菌感染による炎症・アレルギー性皮膚疾患の増悪との関連を示唆するものである。また、SSL14 にもマスト細胞に対して弱いながら活性化作用が認められている。

SSL13 は、ホルミルペプチド受容体 2 (formyl peptide receptor 2; FPR2) を介して好中球を活性化する。³²⁾ SSL13 は走化性因子としての活性を示し、さらに脱顆粒反応や活性酸素産生を亢進させる。これらの作用はヒトの好中球に特異的らしく、マウスの好中球に対する作用は強くない。この報告では、これらの結果から SSL13 が免疫回避という役割よりも、病原微生物に対する警告分子としてはたらく可能性が示されている。SSL1-SSL11 とは異なり、SSL12-SSL14 には免疫系を賦活化する傾向がある。前にも述べたが、SSL12-SSL14 と他の SSL メンバーのアミノ酸配列の類似性が低いこと (Fig. 1) と無関係ではないかもしれない。

8. その他の作用

免疫との関係性は高くはないが、細胞外マトリックス (extracellular matrix; ECM) タンパク質に結合する SSL タンパク質も見い出されている。結合組織に豊富に含まれるフィブロネクチン (fibronectin; FN) に SSL10 が結合する¹¹⁾ ことに加え、SSL8

が別の ECM タンパク質であるテネイシン C (tenascin C; TNC) に結合することが明らかにされている。³³⁾ TNC は接着タンパク質の 1 つであり、インテグリンなどの細胞接着分子、フィブリノーゲン、プロテオグリカンや FN などの他の ECM 成分と結合する。TNC と FN の相互作用は創傷治癒に重要であり、この相互作用が SSL8 によって阻害されると、創傷治癒の遅延がもたらされると考えられる。培養ケラチノサイト (角化細胞) の実験では、TNC による細胞の伸展抑制や運動促進の効果が SSL8 の添加により減弱することが確かめられている。

リン脂質に結合する SSL タンパク質が見い出されている。SSL10 はホスファチジルセリン (phosphatidylserine; PS) を含むリポソームに特異的に結合することが示された。³⁴⁾ 細胞膜の構成成分である PS は、アポトーシスを起こした細胞の表面に表出することが知られている。SSL10 あるいはその活性フラグメントは、アポトーシスを起こした白血病細胞 (Jurkat 細胞) に結合することが示された。PS は、マクロファージなどの食細胞がアポトーシス細胞を貪食するときの目印 (いわゆる “eat me” シグナル) となっているので、SSL10 はアポトーシス細胞の処理過程に影響を与える可能性が考えられる。

SSL タンパク質と好中球表面分子の相互作用を調べる目的で、ファージ・ディスプレイ (phage display) 法が用いられ、SSL6 が好中球の CD47 と結合することが明らかになった。³⁵⁾ CD47 は、細胞接着分子インテグリンに会合するタンパク質 (integrin-associated protein) であり、多くの血液細胞に発現するが、T 細胞では細胞の活性化における共刺激シグナルの伝達に関与すると言われている。³⁶⁾ また、CD47 は前述のリン脂質 PS とは逆に “don't eat me” シグナルを担う分子として食細胞の攻撃に対して防護的にはたらくことが知られている。³⁷⁾ 実際に SSL6 が CD47 に結合すると好中球による赤血球の貪食が促進されることが示されている。³⁵⁾ 異なる SSL タンパク質が異なる機序で食作用を調節することは興味深い。SSL タンパク質と宿主免疫系の相互作用の複雑さが窺える。

9. SSL タンパク質と糖鎖の相互作用

1 つの SSL タンパク質が複数の異なる標的分子

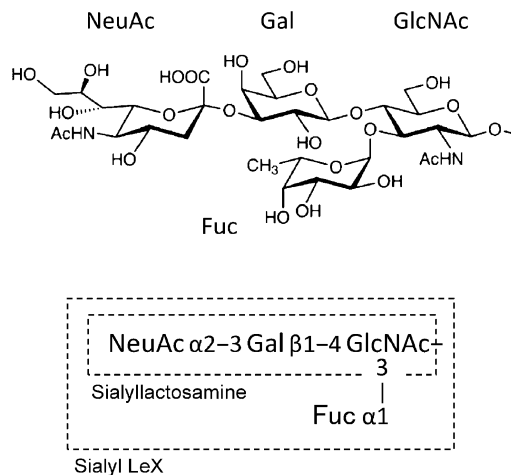


Fig. 6. Structures of Sialyllactosamine and Sialyl Lewis X (sLeX) Carbohydrates

NeuAc, N-acetylneuraminic acid; Gal, galactose; Fuc, fucose; GlcNAc, N-acetylglucosamine.

と結合する例はこれまで見てきたように珍しくない。例えば SSL5 は、白血球細胞膜 PSGL-1、血小板細胞膜 GPI α や GPVI、マトリックス分解酵素 MMP-9、血漿タンパク質 C1 インヒビター、走化性因子 C5a 受容体や IL-8 受容体など多様な分子が標的分子となるが、これらはいずれも糖鎖を含む糖タンパク質である (Table 1)。SSL5 は、これら標的分子の糖鎖構造を認識しているという証拠が蓄積されてきている。PSGL-1 のカウンター受容体である P-セレクトインは、PSGL-1 分子内に豊富に含まれる糖鎖の末端に存在するシアリルルイス X (sialyl Lewis X) (シアリル LeX) 構造 (Fig. 6) を認識する。シアリル LeX 糖鎖は、シアリ酸 [N-アセチルノイラミン酸 (N-acetylneuraminic acid)], ガラクトース (galactose), フコース (fucose), N-アセチルグルコサミン (N-acetylglucosamine) からなる四糖構造である。白血球をシアリダーゼ処理しシアリ酸を除去することにより SSL5 との結合が消失することからシアリ酸の重要性が示されている。

SSL5 とシアリル LeX 糖鎖の相互作用が X 線結晶解析により調べられ、³⁸⁾ SSL5 分子の C 末端付近に存在する糖鎖結合部位にシアリル LeX 糖鎖が結合することが明らかにされている。この相互作用では、シアリル LeX 糖鎖に含まれるフコース (Fuc) の役割が P-セレクトインとシアリル LeX 糖鎖の相互作用の場合と比べ、それほど大きくないことが異なる。すなわち、シアリルラクトサミン (sialyllac-

tosamine) の三糖構造 (Fig. 6) が SSL5 との結合に重要であるらしい。血小板ではシアリル LeX 糖鎖の発現が低く、SSL5 と血小板膜糖タンパク質との相互作用では、GPI α 及び GPVI に含まれるシアリルラクトサミン構造が結合に関わることが推測される。GPI α の可溶性フラグメントであるグリコカリシン (glycocalicin) の主要な O 結合型糖鎖にはシアリルラクトサミン構造が含まれている。³⁹⁾ これは 37 年前に筆者が大学院修了直後に行った研究の結果であり、年月を経て今につながっていることにはいささか驚いてしまう。SSL4 及び SSL11 についても結晶解析が行われ、SSL5 と類似の構造を有することが示されている。^{40,41)} SSL タンパク質の構造解析から、SSL2, SSL3, SSL4, SSL5, SSL6, SSL11 には、C 末端付近に糖鎖結合モチーフが保存されており、この部位がシアル酸含有糖鎖との相互作用に関与するものと推測されている。

MMP-9 と SSL5 の相互作用における糖鎖の役割について、私たちの研究の一例を最後に紹介したい。⁴²⁾ 結果は下記のようにまとめられる。

- ① 単球系白血病細胞株 THP-1 より精製した MMP-9 をシアリダーゼ処理しシアル酸を除去すると SSL5 との結合能が大きく減弱した。
- ② シアル酸を糖鎖末端に付加することができない CHO 細胞の変異株である Lec2 細胞で発現した組換え型 MMP-9 は、野生株で発現した MMP-9 に比べ、SSL5 との結合能が極めて低かった。
- ③ N 結合型糖鎖を切断するペプチド-N-グリコシダーゼ F (peptide-N-glycosidase F; PNGase F) で MMP-9 を処理しても SSL5 との結合能にほとんど変化はなかった。しかし、O 結合型糖鎖の生合成阻害薬 (ベンジル-N-アセチル- α -ガラクトサミニド, benzyl N-acetyl- α -galactosaminide; benzyl-GalNAc) 存在下で培養した THP-1 細胞由来の MMP-9 では、無処理の細胞由来のものとは比べ、SSL5 との結合能が低かった。

これらの結果から、MMP-9 に豊富に存在する O 結合型のシアル酸含有糖鎖が SSL5 との結合に重要であることが強く示唆される。

おわりに

細菌毒素に関する研究は、微生物学、細菌学、感

染症学、予防医学などの分野で重要な位置を占め、極めて長い歴史を有する研究領域である。この歴史の中で、宿主に与える影響が強力な毒素についての研究が進展し、感染症の病態の解明や予防・治療に大きく貢献してきた。しかし、細菌の産生する外分泌物質は多種多様であり、いまだ未知のものが多く、今後明らかにすべき対象分子も多い。本稿のテーマである SSL タンパク質もその例であり、宿主の免疫系に与える影響が少しずつ解析されてきている。1 つの SSL タンパク質をとっても、複数の標的分子と相互作用を示すことが明らかにされており、SSL タンパク質の全体像を捉えるためにはもう少し時間を要すると思われる。かならずしも毒性が顕著でないこのような分泌物質の性質が解明されることにより感染症の病態生理の理解が深まり、予防と治療の戦略にも貢献できる可能性が期待される。

謝辞 本稿で紹介した私たちの研究の多くは、星薬科大学微生物学教室伊藤佐生智博士 (現 名古屋市立大学薬学部) 及び奥 輝明博士とともに行われたものであり、両博士に心より感謝申し上げます。また、築地 信博士を始め、研究に携わった星薬科大学微生物学教室所属の大学院生と卒論生に深謝いたします。星薬科大学での教育研究活動の全般に様々に便宜を図りご支援頂きました瀬山義幸名誉教授及び福井哲也名誉教授、約 20 年間にわたり貴重な助言と激励を頂きました栗原医院院長栗原正明博士に厚く御礼申し上げます。最後に、これまで長年にわたりご指導ご鞭撻を賜りました故 大澤利昭先生、入村達郎先生 (東京大学名誉教授)、箱守仙一郎先生 (ワシントン大学教授) に深く感謝申し上げます。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Foster T. J., *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**, 948–958 (2005).
- 2) Fraser J. D., Proft T., *Immunol. Rev.*, **225**, 226–243 (2008).
- 3) Spaan A. N., Surewaard B. G. J., Nijland R., van Strijp J. A. G., *Annu. Rev. Microbiol.*,

- 67, 629–650 (2013).
- 4) Thammavongsa V., Kim H. K., Missiakas D., Schneewind O., *Nat. Rev. Microbiol.*, **13**, 529–543 (2015).
 - 5) Williams R. J., Ward J. M., Henderson B., Poole S., O'Hara B. P., Wilson M., Nair S. P., *Infect. Immun.*, **68**, 4407–4415 (2000).
 - 6) McCarthy A. J., Lindsay J. A., *Infect. Genet. Evol.*, **19**, 7–14 (2013).
 - 7) Itoh S., *Seikagaku*, **89**, 861–865 (2017).
 - 8) Atkins K. L., Burman J. D., Chamberlain E. S., Cooper J. E., Poutrel B., Bagby S., Jenkins A. T. A., Feil E. J., van den Elsen J. M. H., *Mol. Immunol.*, **45**, 1600–1611 (2008).
 - 9) Kim H. K., Thammavongsa V., Schneewind O., Missiakas D., *Curr. Opin. Microbiol.*, **15**, 92–99 (2012).
 - 10) Langley R., Wines B., Willoughby N., Basu I., Proft T., Fraser J. D., *J. Immunol.*, **174**, 2926–2933 (2005).
 - 11) Itoh S., Hamada E., Kamoshida G., Yokoyama R., Takii T., Onozaki K., Tsuji T., *Mol. Immunol.*, **47**, 932–938 (2010).
 - 12) Patel D., Wines B. D., Langley R. J., Fraser J. D., *J. Immunol.*, **184**, 6283–6292 (2010).
 - 13) Oku T., Kurisaka C., Ando Y., Tsuji T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **508**, 1162–1167 (2019).
 - 14) Rooijackers S. H. M., Ruyken M., van Roon J., van Kessel K. P. M., van Strijp J. A. G., van Wamel W. J. B., *Cell. Microbiol.*, **8**, 1282–1293 (2006).
 - 15) Bestebroer J., Poppelier M. J. J., Ulfman L. H., Lenting P. J., Denis C. V., van Kessel K. P. M., van Strijp J. A. G., de Haas C. J. C., *Blood*, **109**, 2936–2943 (2007).
 - 16) Bestebroer J., van Kessel K. P. M., Azouagh H., Walenkamp A. M., Boer I. G. J., Romijn R. A., van Strijp J. A. G., de Haas C. J. C., *Blood*, **113**, 328–337 (2009).
 - 17) Walenkamp A. M. E., Boer I. G. J., Bestebroer J., Rozeveld D., Timmer-Bosscha H., Hemrika W., van Strijp J. A. G., de Haas C. J. C., *Neoplasia*, **11**, 333–344 (2009).
 - 18) Postma B., Poppelier M. J., van Galen J. C., Prossnitz E. R., van Strijp J. A. G., de Haas C. J. C., van Kessel K. P. M., *J. Immunol.*, **172**, 6994–7001 (2004).
 - 19) Stemerding A. M., Köhl J., Pandey M. K., Kuipers A., Leusen J. H., Boross P., Nederend M., Vidarsson G., Weersink A. Y. L., van de Winkel J. G. J., van Kessel K. P. M., van Strijp J. A. G., *J. Immunol.*, **191**, 353–362 (2013).
 - 20) Itoh S., Hamada E., Kamoshida G., Takeshita K., Oku T., Tsuji T., *Infect. Immun.*, **78**, 3298–3305 (2010).
 - 21) Wang Y. Y., Myhre A. E., Pettersen S. J., Dahle M. K., Foster S. J., Thiemermann C., Bjørnland K., Aasen A. O., Wang J. E., *Shock*, **24**, 214–218 (2005).
 - 22) Koymans K. J., Bisschop A., Vughs M. M., van Kessel K. P. M., de Haas C. J. C., van Strijp J. A. G., *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 1072 (2016).
 - 23) Chen C., Yang C., Barbieri J. T., *Sci. Rep.*, **9**, 4211 (2019).
 - 24) Yokoyama R., Itoh S., Kamoshida G., Takii T., Fujii S., Tsuji T., Onozaki K., *Infect. Immun.*, **80**, 2816–2825 (2012).
 - 25) Bardoel B. W., Vos R., Bouman T., Aerts P. C., Bestebroer J., Huizinga E. G., Brondijk T. H. C., van Strijp J. A. G., de Haas C. J. C., *J. Mol. Med. (Berl.)*, **90**, 1109–1120 (2012).
 - 26) Koymans K. J., Feitsma L. J., Brondijk T. H. C., Aerts P. C., Lukkien E., Lössl P., van Kessel K. P. M., de Haas C. J. C., van Strijp J. A. G., Huizinga E. G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 11018–11023 (2015).
 - 27) de Haas C. J. C., Weeterings C., Vughs M. M., de Groot P. G., Van Strijp J. A., Lisman T., *J. Thromb. Haemost.*, **7**, 1867–1874 (2009).
 - 28) Hu H., Armstrong P. C. J., Khalil E., Chen Y. C., Straub A., Li M., Soosairajah J., Hagemeyer C. E., Bassler N., Huang D., Ahrens I., Krippner G., Gardiner E., Peter K., *PLoS One*, **6**, e19190 (2011).
 - 29) Itoh S., Yokoyama R., Kamoshida G., Fujiwara T., Okada H., Takii T., Tsuji T., Fujii S., Hashizume H., Onozaki K., *J. Biol. Chem.*, **288**, 21569–21580 (2013).
 - 30) Kobayashi M., Kitano T., Nishiyama S., Sanjo H., Onozaki K., Taki S., Itoh S., Hida S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **511**, 350–355 (2019).
 - 31) Nishiyama S., Urabe A., Morikawa A.,

- Kobayashi M., Onozaki K., Itoh S., Hida S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **532**, 200–204 (2020).
- 32) Zhao Y., van Kessel K. P. M., de Haas C. J. C., Rogers M. R. C., van Strijp J. A. G., Haas P. A., *Cell. Microbiol.*, **20**, e12941 (2018).
- 33) Itoh S., Yamaoka N., Kamoshida G., Takii T., Tsuji T., Hayashi H., Onozaki K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **433**, 127–132 (2013).
- 34) Itoh S., Yokoyama R., Murase C., Takii T., Tsuji T., Onozaki K., *Microbiol. Immunol.*, **56**, 363–371 (2012).
- 35) Fevre C., Bestebroer J., Mebius M. M., de Haas C. J. C., van Strijp J. A. G., Fitzgerald J. R., Haas P. J. A., *Cell. Microbiol.*, **16**, 1646–1665 (2014).
- 36) Reinhold M. I., Lindberg F. P., Kersh G. J., Allen P. M., Brown E. J., *J. Exp. Med.*, **185**, 1–11 (1997).
- 37) Kojima Y., Volkmer J. P., McKenna K, Civelek M, Lusic A. J., Miller C. L., Drenzo D., Nanda V., Ye J., Connolly A. J., Schadt E. E., Quertermous T., Betancur P., Maegdefessel L., Matic L. P., Hedin U., Weissman I. L., Leeper N. J., *Nature*, **536**, 86–90 (2016).
- 38) Baker H. M., Basu I., Chung M. C., Caradoc-Davies T., Fraser J. D., Baker E. N., *J. Mol. Biol.*, **374**, 1298–1308 (2007).
- 39) Tsuji T., Tsunehisa S., Watanabe Y., Yamamoto K., Tohyama H., Osawa T., *J. Biol. Chem.*, **258**, 6335–6339 (1983).
- 40) Hermans S. J., Baker H. M., Sequeira R. P., Langley R. J., Baker E. N., Fraser J. D., *Infect. Immun.*, **80**, 4004–4013 (2012).
- 41) Chung M. C., Wines B. D., Baker H., Langley R. J., Baker E. N., Fraser J. D., *Mol. Microbiol.*, **66**, 1342–1355 (2007).
- 42) Kurisaka C., Oku T., Itoh S., Tsuji T., *Microbiol. Immunol.*, **62**, 168–175 (2018).