

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18592009

研究課題名（和文） 病原細菌感染症の新しい治療と予防法の開発に関する基礎研究

研究課題名（英文） Basic study for development of new treatment and prevention against infectious disease by pathogenic bacteria

研究代表者

五十嵐 武（IGARASHI TAKESHI）

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：10159585

研究成果の概要：

抗生物質やワクチンとは作用機序の異なる新たな病原細菌感染症の治療と予防法の開発に繋がる基礎研究を進め目的で、ヒトのう蝕原性細菌（*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*）の感染に関わる表層蛋白質の病原性を制御する酵素 Sortase (SrtA) に焦点を当て、感染予防の新規標的分子としての Sortase の有用性について検討した。

その結果、*S. mutans* と *S. sobrinus* の両菌種において、Sortase 欠損株の性質から Sortase がバイオフィーム形成抑制に深く関わっていることを明らかにした。さらにこの抑制は Sortase 酵素の支配下にある GbpC（グルカン結合蛋白質）の局在性の変化が大きく影響していることを明らかにした。

以上の研究成果は、ヒトのう蝕原性細菌の感染予防には、グルカン結合蛋白質とその制御酵素である Sortase が有力な標的分子であることを示唆した。特に Sortase を標的分子とした感染防御機構は、既存の抗生物質やワクチンとは作用機序の異なる新規の作用機序による感染予防法になりうることを強く示唆した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,400,000	0	2,400,000
2007年度	500,000	150,000	650,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	330,000	3,830,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：Sortase、口腔レンサ球菌、齲蝕細菌、LPXTG 蛋白質、感染予防

1. 研究開始当初の背景

国内のみならず海外との交易・旅行が頻繁かつ容易に行われる今日において、多くの感染症が流行するようになってきている。現在、病原細菌の感染症の治療・予防対策には化学療法剤（抗生物質を含む）とワクチンが用いられ、大きな効果を上げていると共に、その開発も精力的に行われている。ところが、近

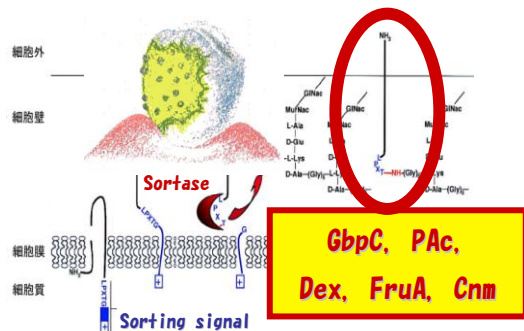
年、抗生物質に対する耐性菌の出現が頻出していることから、新たな薬剤開発の必要性が急務とされるようになってきた。

一方、生体免疫を利用する感染予防ワクチンは、莫大な効果をもたらす一方で、ワクチン抗原による副作用が懸念されるため、その使用には慎重を要し、より副作用の少ない抗原の選択・開発が要求され、全ての病原細菌

に対してなかなか実用化に踏み切れない現状にある。

このような背景のもと、私たちの研究室では抗生物質やワクチンとは作用機序の異なる新たな病原細菌感染症の治療と予防法の開発に繋がる基礎研究を進めている。そのなかで私たちは口腔内のう蝕細菌がもつ Sortase 酵素を発見し、感染に関わる表層タンパク質の局在性が Sortase 酵素により支配されている可能性を示唆すると共に、Sortase 酵素がう蝕細菌感染症の治療と予防に有用な標的酵素である可能性をも示唆した (図1)。

図1. 齶蝕細菌のSortaseと表層蛋白質



2. 研究の目的

(1) 本研究では抗生物質やワクチンとは異なる新たな病原細菌感染症の治療と予防法の開発を目的とした。実際にはヒトう蝕細菌の感染に関わる表層蛋白質の病原性とそれらを支配している Sortase 酵素に着目し、Sortase 欠損株における病原性の消失から、感染症予防の新規標的酵素としての Sortase の有用性について検討した。

3. 研究の方法

- (1) 実験には *S. mutans* と *S. sobrinus* を使用し、Todd-Hewitt 培地で培養した。
- (2) 変異株の作成：各種表層蛋白質ならびに Sortase の欠損変異株は、標的蛋白質をコードする遺伝子の相同組み換えによる挿入不活化により作成した。
- (3) 局在性の変化：*S. mutans* Sortase 欠損株における LPXTG 蛋白質の局在性の変化は、特異抗体を用いたウェスタンブロット法で行った。
- (4) 付着試験：付着試験は静置培養と回転培養で評価した。静置培養での付着試験は、24 穴組織培養プレートを用いて行い、培養後、プレート底部に付着した細菌をクリスタル紫で染色して判定した。一方、回転培養での付着試験は、培地を含む試験管をローテーターで回転させながら培養を行い、試験管の内壁に付着した細菌遶で判定した。付着細菌は NaOH 溶液で回収した。

付着率 (%) は培養全菌数に対する付着細菌の割合で算出した。

- (5) 多糖発酵能：LPXTG 蛋白質の欠損株ならびに Sortase 欠損株の多糖発酵能は、菌体外多糖 (レバンまたはデキストラン) を基質として一晚培養した後の、培地中の pH の低下を測定して判定した。
- (6) グルカン依存性凝集：各種菌株のグルカン依存凝集能は、菌株懸濁液へのデキストラン添加による菌体凝集の有無により観察した。

4. 研究成果

ヒトのう蝕原性細菌 (*Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*) の感染に関わる表層蛋白質の病原性とその制御酵素 (Sortase) の関係について、次の成果を得た。

(1) *S. mutans* では、

① Sortase の触媒作用で 7 種の蛋白質 (DexA, FruA, GbpC, PAc, WapA, WapE, Cnm) が細胞表層に局在化し、それらの蛋白質はいずれも C 末端に LPXTG motif をもつ (LPXTG 蛋白質と呼ぶ) ことを明らかにした。

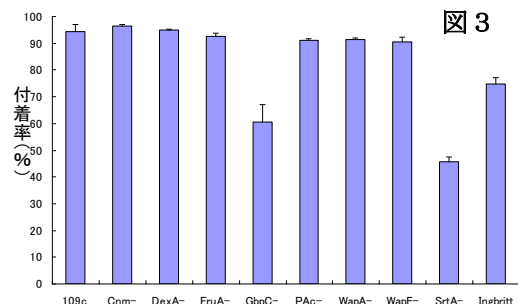
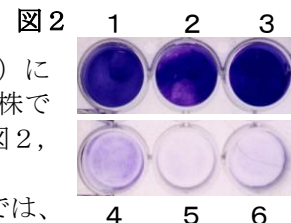
② LPXTG 蛋白質は付着・凝集・栄養供給など、感染に関わる機能を有していることを明らかにした。

③ Sortase の欠損により LPXTG 蛋白質は細胞表層から培養上清へと遊離する。この局在性の変化と共に、その蛋白質の機能が消失する。

④ *in vitro* の静置付着実験において、

シヨ糖非依存性付着は野生株 (図2, Well-4) に比べ Sortase 欠損株で優位に減少した (図2, Wells-5, 6)。

また、回転培養では、7 種の LPXTG 蛋白質のうち GbpC の欠損によりシヨ糖依存性の付着が有意に抑制された (図3, GbpC-)。また、同様な付着抑制効果が Sortase 欠損株 (SrtA-) でも観察された (図3, SrtA-)。



以上の結果から、*S. mutans* の感染予防には GbpC のみならず Sortase もまた、有力な感染予防の新規標的分子となりうるということが明らかになった (Haseba Y, et al. *Dentistry in Japan*, 43: 16-22, 2007)。

(2) *S. sobrinus* では、

① 4種の GbpC 様蛋白質 (GbpC1, GbpC2, Db1A, Db1B) を見出し、それらがいずれも LPXTG motif を持つ蛋白質で、デキストラン依存性凝集に関わることを明らかにした。

② さらにこの4種の LPXTG 蛋白質の局在性とその機能は Sortase の支配下にあることを明らかにした。

③ また、FruA 酵素の遺伝子、蛋白質、酵素額の性質を解析し、その結果、FruA は LPXTG 蛋白質の1つで、プラーク細菌の増殖と酸産生に関わる病原因子であることを明らかにすると共に、その病原性は Sortase の支配下にあることを明らかにした。

これらの成果は、*S. sobrinus* においても Sortase が感染に重要な役割を果たしており、有力な感染予防の新規標的分子となりうることを示唆した (Sato Y, et al. *Oral Microbiology and Immunology*, 24: 224-230, 2009.)。

(3) *S. gordonii* では、

S. mutans, *S. sobrinus* に加え、プラークバイオフィルムの主要構成細菌の1菌種である *Streptococcus gordonii* についても、Sortase とその支配下にある LPXTG 蛋白質の機能解析を進めた。

その結果、*S. gordonii* では、

① フルクトタン分解酵素 (Fructosidase) と核酸分解酵素 (Nuclease) がそのC末端に LPXTG motif をもち、Sortase の支配下にあることが明らかになった。Fructosidase 酵素はプラーク内での栄養供給と酸産生に寄与する病原因子としての生理機能を明らかにしたが、Nuclease 酵素については酵素学的な性質は解明したが、その生理学的意義と病原性への関与については、現在検討中である。

以上の結果から私たちは、ヒトのう蝕原性細菌の感染予防には、グルカン結合蛋白質とその制御酵素である Sortase が有力な標的分子であることを示唆した。特に Sortase を標的分子とした感染防御機構は、既存の抗生物質やワクチンとは作用機序の異なる新規の作用機序による感染予防法であることを示唆した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Sato Y, Okamoto-Shibayama K, Takada K, Igarashi T, Hirasawa M. Genes responsible for dextran-dependent aggregation of *Streptococcus sobrinus* strain 6715. *Oral Microbiology and Immunology*, 24(3): p 224-230, 2009. (査読有)
- ② Arimoto T, Igarashi T. Role of prolipoprotein diacylglycerol transferase (Lgt) and lipoprotein-specific signal peptidase II (LspA) in localization and physiological function of lipoprotein MsmE in *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiology and Immunology*. 23: 515-519, 2008. (査読有)
- ③ Haseba Y, Morisaki H, Takahashi M, Igarashi T. Role of sortase in biofilm formation of *Streptococcus mutans*. *Dentistry in Japan*, 43: 16-22, 2007. (査読有)

[学会発表] (計 14 件)

- ① Sato Y, Okamoto-Shibayama K, Takada K, Igarashi T, Hirasawa M. Genes responsible for dextran-dependent aggregation of *Streptococcus sobrinus* strain 6715. 87th International Association for Dental Research, April 1-4, 2009. Miami.
- ② 栗原華絵子、有本隆文、深町はるか、森崎弘史、樫場八裕、五十嵐武：*Streptococcus gordonii* Challis 株の Nuclease の解析. 第 49 回歯科基礎医学会、2007 年 8 月 29-31 日、札幌。
- ③ 矢野智也、山本松男、栗原華絵子、深町はるか、五十嵐武：う蝕原性細菌 (*Streptococcus sobrinus*) が産生するプラーク構成多糖分解酵素の解析. 第 27 回昭和歯学会総会、2007 年 6 月 30 日、東京。
- ④ Yano Y, Fukamachi H, Takahashi M, Yamamoto M, Igarashi T: Molecular analysis of fructan-hydrolyzing enzyme of human cariogenic bacterium *Streptococcus sobrinus*. 107th American Society for Microbiology, May 21-25,

2007, Toronto.

- ⑤ 森崎弘史、栗原華絵子、有本隆文、五十嵐 武：Dextranase 産生菌による *Streptococcus mutans* の齶蝕原性バイオフィルム形成の抑制. 昭和大学歯学部ハイテクリサーチセンター平成 18 年度研究成果発表会. 2007 年 3 月 17 日、東京.
- ⑥ Sato Y, Okamoto-Shibayama K, Igarashi T, Kizaki H. Sortase gene mutation detected in *S. sobrinus* dtag-negative strain K1R. 85th International Association for Dental Research, March 21-24, 2007. New Orleans.
- ⑦ 矢野智也、栗原華絵子、山本松男、五十嵐 武：プラークバイオフィルム形成細菌 (*Streptococcus sobrinus*) のフルクタン分解酵素の解析. 第 80 回日本細菌学会総会、2007 年 3 月 26-28 日、大阪.
- ⑧ 五十嵐 武、森崎弘史、高橋真和、樋場八裕：*Streptococcus mutans* のバイオフィルム形成における Sortase の役割. 第 80 回日本細菌学会総会、2007 年 3 月 26-28 日、大阪.
- ⑨ 森崎弘史、栗原華絵子、有本隆文、深町はるか、平尾衣都子、五十嵐 武：*Streptococcus gordonii* の dextranase 発現系の構築と齶蝕予防への応用に関する基礎研究. 昭和大学歯学部 30 周年記念講演会、2006 年 11 月 4 日、東京.
- ⑩ 栗原華絵子、森崎弘史、有本隆文、高橋真和、五十嵐 武：*Streptococcus gordonii* Challis 株の Nuclease ホモログの解析. 第 48 回歯科基礎医学会、2006 年 9 月 21-33 日、鶴見.
- ⑪ 森崎弘史、栗原華絵子、有本隆文、樋場八裕、五十嵐 武：*Streptococcus mutans* の齶蝕原性バイオフィルム形成は Dextranase 産生菌との共培養により抑制される. 48 回歯科基礎医学会、2006 年 9 月 21-23 日、鶴見.
- ⑫ 栗原華絵子、森崎弘史、有本隆文、五十嵐 武：*Streptococcus gordonii* の FruA 遺伝子ホモログの分子生物学的解析. 第 26 回昭和歯学会総会、2006 年 7 月 22 日、東京.
- ⑬ Kurihara K, Igarashi T. Molecular characterization of fructosidase from *Streptococcus gordonii*. 84th International Association for Dental Research, June 28 - July 1, 2006. Brisbane.
- ⑭ Igarashi T, Morisaki H. Cell wall anchoring of WapA and FruA in *Streptococcus mutans*. 84th International Association for Dental Research, June 28 - July 1, 2006. Brisbane.

[図書] (計 2 件)

- ① 五十嵐 武：朝倉書店、IV 章 病気と微生物 3. 幼稚園・学校保健で問題となる感染症 2. 虫歯。微生物の事典、2008, p64-66.
- ② 五十嵐 武：医歯薬出版、III. う蝕の病因. 6. ミュータンスレンサ球菌のグルカン分解酵素。新・う蝕の科学、2006, p98-107.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五十嵐 武 (IGARASHI TAKESHI)
昭和大学・歯学部・教授
研究者番号：10159585

(2) 研究分担者

森崎 弘史 (MORISAKI HIROBUMI)
昭和大学・歯学部・講師
研究者番号：30317581

有本 隆文 (ARIMOTO TAKAFUMI)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号：60407393

(3) 連携研究者