

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18592014

研究課題名（和文） 口腔レンサ球菌によるバイオフィーム形成と
感染性心内膜炎発症メカニズムの解明研究課題名（英文） Analyses of biofilm formation by oral streptococci and
pathogenic mechanisms of infective endocarditis

研究代表者

高橋 幸裕（TAKAHASHI, YUKIHIRO）

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号：00281436

研究成果の概要：

口腔常在菌の一種である *Streptococcus gordonii* の口腔への定着、およびこの細菌による感染性心内膜炎の発症過程において、この細菌の表面にある Hsa という付着に関与する分子と、ヒトの血球細胞表面のシアル酸を含む分子が特異的に結合することが重要であることを明らかにした。また、この細菌の細胞壁を構成しているペプチドグリカンの合成の一過程を担う酵素が、細菌細胞の形態形成、歯垢形成、抗菌薬やヒト白血球の殺菌に対する抵抗性に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,800,000	0	1,800,000
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	510,000	4,010,000

研究分野：口腔細菌学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：感染症、細菌、生態学、糖鎖、歯学、シアル酸、バイオフィーム、感染性心内膜炎

1. 研究開始当初の背景

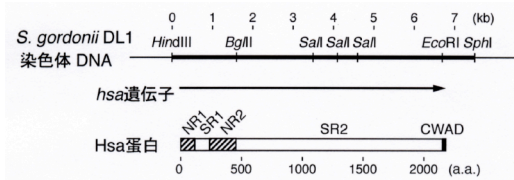
口腔レンサ球菌の一種である *Streptococcus gordonii* は、口腔におけるバイオフィーム(歯

垢) 形成や、それに続く齲蝕、歯肉炎の発症に関与しているのみならず、感染性心内膜炎の原因菌として歯学・医学領域において注目されている。これら細菌の口腔内への定着に

は、これまでに報告されている数種のアドヘジン（付着因子）が重要な役割を演じていると考えられている。特に、歯牙表面のペリクルに存在する唾液ムチンへの口腔レンサ球菌の結合や赤血球凝集活性はノイラミナーゼ（シアル酸分解酵素）前処理により消失することから、ムチンや赤血球表面のシアル酸を認識するアドヘジン（シアル酸結合性アドヘジン）の存在が示唆されていた。

最初に我々は *S. gordonii* DL1 株のシアル酸結合性アドヘジンの免疫化学的解析を行った。その結果、DL1 株は α -2-3 結合のシアル酸を末端に持つ複合糖質に特異的な付着活性（シアル酸結合性）を持ち、この活性は、DL1 菌体の持つ、糖を多量に含む抗原（Hs 抗原）によることを示した。さらに、抗 Hs 抗体は同菌の赤血球凝集活性を抑制すること、免疫電子顕微鏡法により Hs 抗原は DL1 株の菌体表層に存在することなどを明らかにした [Takahashi, Y. *et al.* (1997) *Infect. Immun.* 65 (12): 5042-5051]。

さらに、Hs 抗原をコードする遺伝子 (*hsa* 遺伝子) のクローニングを行い、*hsa* 遺伝子の塩基配列より、この遺伝子は 2,178 アミノ酸からなるセリンに富んだ蛋白 (Hsa 蛋白) をコードしていることが推定された (図参照)。



図： *S. gordonii* の *hsa* 遺伝子と Hsa 蛋白

また、DL1 株の *hsa* に薬剤耐性遺伝子を挿入した knock-out 株 (*hsa* 挿入変異株)、および DL1 株の *hsa* 遺伝子欠損株 (Δ *hsa* 株) では、Hs 抗原の発現と赤血球凝集活性が消失していることを確認し、さらに、*hsa* 遺伝子のコンプリメンテーションにより、 Δ *hsa* 株で欠如した Hs 抗原の発現およびシアル酸結合性が回復されることを確認した [Takahashi, Y. *et al.* (2002) *Infect. Immun.* 70 (3): 1209-1218]。これらの結果より Hs 抗原 (= Hsa 蛋白) は *hsa* 遺伝子によりコードされるシアル酸結合性アドヘジンであることが確定した。

2. 研究の目的

(1) *S. gordonii* シアル酸結合性アドヘジ

ンの菌株間での比較：*S. gordonii* の臨床分離株間ではシアル酸結合性に違いがあることが知られている。このことは、シアル酸結合性アドヘジンの発現や分子構造が多様であることが推察される。これを実証するために、*S. gordonii* の臨床分離株間でのシアル酸結合性の違いと、*hsa* 遺伝子の多様性との関連性を比較検討する。

(2) Hsa 蛋白の binding site の同定：*hsa* 遺伝子の部分的改変により Hsa の binding site の同定を試みる。

(3) CD43 などのシアル酸含有膜蛋白が *S. gordonii* シアル酸結合性アドヘジンのレセプターである可能性の検証：ヒト白血球、赤血球表面に存在するシアル酸含有糖蛋白として白血球の CD43、赤血球のグリコフォリンなどが知られている。また、これら血球以外の宿主細胞にもシアル酸含有膜蛋白が存在することが知られており、それらはこのアドヘジンのレセプターである可能性が考えられる。そこで、実際にこれらのシアル酸含有糖蛋白に *S. gordonii* DL1 株が付着すること、また、その *hsa* 遺伝子を knock-out した変異株が、これらシアル酸含有糖蛋白に付着しないことを検証する。

(4) phosphoglucosamine mutase の分子遺伝学および酵素学的解析と *S. gordonii* における役割の解明：本研究期間中に、Hsa とは別に、ペプチドグリカン生合成の一過程を担うグルコサミン-6-リン酸からグルコサミン-1-リン酸への転換を触媒する酵素である phosphoglucosamine mutase (GlmM) がバイオフィルム形成に関与している可能性があることが予備実験の結果より示唆された。これを踏まえた phosphoglucosamine mutase の分子遺伝学および酵素学的解析と *S. gordonii* における役割の解明を行う。

① *S. gordonii* の同酵素をコードする遺伝子 (*glmM*) をクローン化する。

② リコンビナント GlmM を精製し、比活性および *K_m* の測定などの酵素学的解析を行う。

③ *glmM* 遺伝子欠損株の形態学的特徴、抗菌薬感受性、バイオフィルム形成などの表現型を野生型と比較し、この酵素の *S. gordonii* における役割の解明を行う。

④ *S. gordonii* は、多形核白血球の貪食による殺菌に抵抗性を示すことが知られている。*glmM* 遺伝子の変異がこの抵抗性に影響を及ぼすかどうかを検証する。

3. 研究の方法

(1) *S. gordonii* や他種の臨床分離株で Hsa の発現をウェスタンブロット法で、*hsa* 遺伝子をサザンブロット法、PCR 法で検索し、さらに、*hsa* 遺伝子の DNA シークエンシングにより Hsa 蛋白の binding site と推定される N 末端側のアミノ酸配列を株間で比較した。各菌株のこれらの結果とシアル酸結合性の関連性を比較検討した。

(2) binding site があると推測されている Hsa の N 末端側の非繰り返し領域 (NR2 領域、図参照) の特定のアミノ酸残基を置換した Hsa を産生する *S. gordonii* の変異株を作製し、シアル酸結合性を野生型と比較した。

(3) ビオチンでラベルした *S. gordonii* 細菌細胞、または Hsa の NR2 領域と GST とのリコンビナント融合蛋白を、SDS-PAGE で展開しニトロセルロース膜に転写した白血球膜成分へ overlay させ、その付着を比較検討した。

(4)

① *S. gordonii* の遺伝子ライブラリを大腸菌を宿主としたベクターを用いて作製し、異種で既知の *glmM* 遺伝子の情報より作製したプローブにより、コロニーハイブリダイゼーション法でライブラリをスクリーニングし、*glmM* 遺伝子をクローン化した。

② His タグを付与したリコンビナント GlmM を大腸菌に大量発現させ、ニッケルカラムで精製した。これを用いて、GlmM 蛋白の酵素活性を測定した [Shimazu, K. *et al.* (2008) FEMS Immunol. Med. Microbiol. 53: 166-177]。

③ *glmM* 遺伝子欠損株の形態学的特徴をグラム染色した菌体の光学顕微鏡により観察し、さらに超薄切片を透過電子顕微鏡法で観察した。ペニシリン系、蛋白合成阻害系の抗菌薬数種類に対する感受性を測定した。さらにガラスおよびポリスチレン表面に形成されるバイオフィルム形成を野生型と比較した。

④ ヒト末梢血から分離した多形核白血球と *S. gordonii* 生菌を一定時間混合した後、colony forming unit (CFU) を平板培養法で測定した。また、*S. gordonii* 各株の過酸化水素およびリゾチームに対する最小発育阻止濃度を測定した。

4. 研究成果

(1) *S. gordonii* の臨床分離株間でのシアル酸結合性と、*hsa* 遺伝子の多様性との関連性を比較検討した結果、株間でシアル酸結合性に違いがあること、NR2 領域のアミノ酸配列に多様性があることが明らかになった。

(2) Hsa の binding site は NR2 領域であることは確定したが、本研究では、結合に重要な NR2 領域内のアミノ酸残基の特定には至らなかった。

(3) 白血球の CD43 の他、数種類のシアル酸含有膜蛋白が Hsa のレセプターであることが明らかとなった。さらに、赤血球膜のシアロ糖蛋白であるグリコフォリン A とバンド 3 が Hsa のレセプターであることが明らかとなった。

(4)

① *S. gordonii* の *glmM* をクローン化し、DNA 塩基配列より GlmM 蛋白の一次構造が推定された。既知の異種 GlmM と比較して、活性中心とその周囲のアミノ酸配列が保存されていることが明らかになった。

② リコンビナント GlmM の比活性はブドウ球菌 GlmM のおよそ 2 倍、大腸菌のそのおよそ 1/10 であった。

③ 野生型に比べて *glmM* 遺伝子欠損株では、細菌細胞の連鎖の伸長および不均一化、肥大化、ペニシリン系の抗菌薬に対する感受性の増加、バイオフィルム形成能の減少が認められた。

④ *glmM* 変異株では多形核白血球の貪食による殺菌により感受性であることが示された。また *glmM* 変異株では、ペクチドグリカン消化するリゾチームに対して、野生型に比べてより感受性であることが示され、多形核白血球の貪食による *S. gordonii* の殺菌に対する抵抗性に GlmM が関与していることが明らかとなった。

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. Yumiko Urano-Tashiro, Ayako Yajima, Eizo Takashima, Yukihiro Takahashi, and Kiyoshi Konishi. 2008. Binding of the

Streptococcus gordonii DL1 surface protein Hsa to the host cell membrane glycoproteins CD11b, CD43, and CD50. **Infection and Immunity** 76: 4686-4691. 査読有.

2. Kisaki Shimazu, Yukihiro Takahashi, Yoshimori Uchikawa, Yoshihito Shimazu, Ayako Yajima, Eizo Takashima, Takaaki Aoba, and Kiyoshi Konishi. 2008. Identification of the *Streptococcus gordonii glmM* gene encoding phosphoglucosamine mutase and its role in bacterial cell morphology, biofilm formation, and sensitivity to antibiotics. **FEMS Immunology and Medical Microbiology** 53: 166-177. 査読有.
3. Ayako Yajima, Yumiko Urano-Tashiro, Kisaki Shimazu, Eizo Takashima, Yukihiro Takahashi, and Kiyoshi Konishi. 2008. Hsa, an adhesin of *Streptococcus gordonii* DL1, binds to α 2-3-linked sialic acid on glycoprotein A of the erythrocyte membrane. **Microbiology and Immunology** 52: 69-77. 査読有.

[学会発表] (計 5 件)

1. 田代有美子, 高橋幸裕, 矢島彩子, 高島英造, 古西清司. Identification of leukocyte receptors for the streptococcal sialic acid-binding adhesin. 第 82 回日本細菌学会総会. 2009 年 3 月 14 日. 名古屋国際会議場, 名古屋.
2. 島津貴咲, 高橋幸裕, 荻部洋行, 内川喜盛, 島津徳人, 矢島彩子, 高島英造, 青葉孝昭, 古西清司. *Streptococcus gordonii* における phosphoglucosamine mutase と菌体形態, バイオフィルム形成および抗菌薬感受性との関連性. 第 50 回歯科基礎医学会学術大会. 2008 年 9 月 24 日. TOC 有明コンベンションホール, 東京.
3. Ayako Yajima, Yukihiro Takahashi, Yumiko Urano-Tashiro, Kisaki Shimazu, Eizo Takashima, and Kiyoshi Konishi. Erythrocyte membrane receptors for *Streptococcus gordonii* sialic acid-binding adhesin. International Association for Dental Research 86th General Session & Exhibition. 2008 年 7 月 3 日. Metro Toronto Convention Centre, Toronto, Ontario, Canada.
4. 島津貴咲, 高橋幸裕, 矢島彩子, 高島英造, 古西清司. *Streptococcus gordonii* の

phosphoglucosamine mutase をコードする遺伝子の同定および機能解析. 第 81 回日本細菌学会総会. 2008 年 3 月 24 日. 国立京都国際会館, 京都.

5. 矢島彩子, 高橋幸裕, 浦野有美子, 島津貴咲, 高島英造, 古西清司. *Streptococcus gordonii* DL1 株シアル酸結合性アドヘジンの赤血球レセプターの同定. 第 81 回日本細菌学会総会. 2008 年 3 月 24 日. 国立京都国際会館, 京都.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 幸裕 (TAKAHASHI, YUKIHIRO)

日本歯科大学・生命歯学部・准教授

研究者番号 : 00281436

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者