

平成 20 年 9 月 26 日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19791352  
 研究課題名(和文) 感染性心内膜炎の原因となる口腔レンサ球菌と宿主細胞との相互作用の  
 解明

研究課題名(英文) Association of oral streptococci with the host cells in the  
 pathogenesis of infective endocarditis

## 研究代表者

矢島 彩子 (YAJIMA AYAKO)  
 日本歯科大学・生命歯学部・助教  
 研究者番号：00287773

研究成果の概要：*Streptococcus gordonii*は、歯垢を形成する細菌の一つで、感染性心内膜炎の原因菌としても注目されている。感染性心内膜炎の発症には、局所で菌体と血球系の細胞が結合し、疣贅といわれる大きな固まりを作ることが重要だと考えられている。そこで、これらの宿主細胞と*S. gordonii*の付着様式や各宿主細胞のレセプターの同定を試みた。その結果、赤血球では主にGlycophorin Aとband 3、単球とマクロファージではCD11bとCD43、好中球ではCD11b、CD43とCD50がレセプターであることが明らかとなった。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,500,000	0	1,500,000
20年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	510,000	3,710,000

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：*Streptococcus gordonii*, 感染性心内膜炎, アドヘジン, レセプター

## 1. 研究開始当初の背景

口腔常在菌の緑色レンサ球菌群は、口腔におけるバイオフィーム(歯垢)形成や、それに続く歯肉炎の発症に関与していると考えられ、歯学・医学領域において注目されている。

*Streptococcus gordonii*は、頬粘膜表面、歯垢

から分離され、 $\alpha$ 溶血を示す。また、口腔内にバイオフィームを形成するだけではなく、感染性心内膜炎の原因菌の一つでも知られている。*S. gordonii*、*Streptococcus sanguinis*、*Streptococcus oralis*などの口腔レンサ球菌は、唾液をコートしたヒドロキ

シアパタイト(sHA)に結合する。この結合はsHAのノイラミニダーゼ(シアリダーゼ)前処理により消失するため、細菌側に、sHA表面のシアル酸を認識するアドヘジンがあると推測されている。唾液の主要な蛋白であるムチンはシアル酸を末端に有する糖蛋白(シアロ糖蛋白)であり、これらシアロ糖蛋白が細菌とsHAとの結合のレセプターになっていると考えられている。また、赤血球や白血球などを含む宿主細胞にも、これら口腔レンサ球菌は結合することが知られている。これらの結合も同様に、宿主細胞のノイラミニダーゼ前処理で消失することから、共通のメカニズムとして、宿主のシアロ糖蛋白がこれら口腔レンサ球菌の認識に関連していると考えられている。我々は、赤血球凝集活性を持つ*S. gordonii*菌株の一つとしてDL1 (Challis)株を取り上げ、赤血球凝集を起こすアドヘジンの免疫化学的解析を行った。その結果、DL1株は $\alpha$ 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を持ち、この活性はDL1株菌体の持つ、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。また、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をコードしていることが推定された。この蛋白(Hsa)は、シグナル配列を含む非繰り返し領域(NR1)に続いて、短いserine-rich繰り返し領域(SR1)、2つめの非繰り返し領域(NR2)、'SASTSASVSASE'のドデカペプチドの113回の繰り返しを含む長いserine-rich領域(SR2)と、細胞壁結合領域(CWAD)から構成されている。Hsa蛋白は2つのserine-rich領域両方が共にN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を含む糖によりO-グリコシド修飾されていることを、GlcNAcに特異的に結合するコムギ胚レクチン(WGA)との反応により明らかにしている。また、DL1株の*hsa*挿入変異株(EM230株)、*hsa*遺伝子すべてを欠いた欠損株(CM100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*欠損株にプラスミド由来の

*hsa*遺伝子をコンプリメンテーション(元の遺伝子をプラスミドなどに組み込んで細菌に移入することで、染色体DNA上の遺伝子の欠損を補うこと)させたCM100(pAS8741)株では、*hsa*欠損株で消失したHs抗原の発現および赤血球凝集活性が回復することを確認した。これらの結果より、Hs抗原は*hsa*遺伝子によりコードされるアドヘジンであることが確定した。

一方、*S. gordonii*は赤血球凝集活性の他、血小板凝集能、白血球付着能があることも知られており、感染性心内膜炎の発症に関与していると考えられている。我々は、*S. gordonii* DL1株のもつアドヘジンであるHsa蛋白が宿主の細胞と結合していることを証明し、現在までにHsaの血小板レセプターがGPIIb $\alpha$ とGPIIbであることを同定した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、Hsaの血小板レセプターの同定に引き続き、赤血球や単球、マクロファージなどのレセプターを同定することである。このような口腔レンサ球菌のアドヘジンと宿主レセプターとの付着メカニズムを明らかにし、感染性心内膜炎の発症メカニズムを詳しく解析する事で、心疾患を持つ患者の歯科治療においても、シアル酸結合性を特異的にブロックする薬剤の開発など新たな予防処置に向けての研究の足がかりになると思われる。

## 3. 研究の方法

### (1)赤血球レセプターの同定

- ①Hsaの結合領域であるNR2のGST-fusion蛋白を大腸菌の系で作製し、GST-HsaNR2 fusion蛋白による赤血球凝集を確認する。
- ②様々な酵素や糖を用いて、赤血球凝集の阻害実験を行い、結合様式を調べる。
- ③精製した膜蛋白とGST-HsaNR2 fusion蛋白または菌体との結合を、dot blot法にて検出する。
- ④赤血球膜を可溶化したサンプルに、GST-HsaNR2 fusion蛋白を混ぜた後、Glutathione Sephaoreseでpull-downする。これをSDS-PAGEで展開後、膜に転写し、Glycophorin A抗体またはband 3抗体を用

いて確認することで、レセプターを同定する。

#### (2) 単球、好中球、マクロファージのレセプターの同定

①白血球系のcell lineであるHL-60細胞を、様々な試薬を用いて、単球、好中球、マクロファージに分化させる。

②*S. gordonii* DL1株(親株)またはEM230株(*hsa*変異株)のHL-60および各分化細胞への付着をギムザ染色で確認する。

③赤血球レセプターの同定と同様に、GST-HsaNR2を用いて、GST pull-down assayにより、HL-60および各分化細胞のレセプターを同定する。

④bacterial(菌体)overlay法により、DL1株と上記レセプターとの結合を確認する。

#### 4. 研究成果

##### (1)赤血球レセプターの同定

###### ①GST-fusion 蛋白の作製

下図のように、Hsa 蛋白の結合領域であるNR2のGST-fusion 蛋白を作製する。



②上記 fusion 蛋白が、赤血球凝集活性を有し、この活性はノイラミニダーゼ処理で消失することを確認した。また、様々な糖による阻害活性を測定すると、 $\alpha$ 2-3 シアリルラクトースでは阻害され、 $\alpha$ 2-6 シアリルラクトースでは阻害されなかった。このことから、レセプターは、 $\alpha$ 2-3 結合シアロ糖蛋白であることが考えられた。

③赤血球膜に存在する主なシアロ糖蛋白として、Glycophorin A と band 3 が知られている。これらの精製蛋白を膜にスポットし、GST-HsaNR2 または菌体で overlay を行った。その結果、DL1 株も GST-HsaNR2 もこれらに結合することが確認された。

④赤血球膜を可溶化したものに、GST-HsaNR2 を反応させ、その後 GST で pull-down し、anti-Glycophorin A または band 3 で検出した。

以上より、Hsa の赤血球レセプターは、主に

Glycophorin A と band 3 であることが証明された。

#### (2)単球、好中球、マクロファージのレセプターの同定

①HL-60からそれぞれ分化させた細胞に、DL1株またはEM230株反応後、ギムザ染色をすると、DL1株は付着するが、EM230株はほとんど付着しなかった。このことからこれらの細胞との付着には、Hsa蛋白を介して行われていることが確認できた。

②分化した細胞を可溶化し、SDS-PAGEで展開後、膜に転写し、DL1株またはEM230株をoverlayし、DL1株に特異的に結合するバンドを見つけた。

③同様なことをGST-HsaNR2またはGSTをoverlayし、同じようなバンドが検出できるか確認した。

④分化した細胞を可溶化し、これにGST-HsaNR2を添加後、pull-downしたサンプルをSDS-PAGEで展開後、膜に転写しそれぞれの位置から予測されるレセプターに対する抗体を用いて検出した。

以上より、単球とマクロファージではCD11bとCD43、好中球ではCD11b、CD43とCD50がHsaのレセプターであ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2件)

- ① Yumiko Urano-Tashiro, Ayako Yajima, Eizo Takashima, Yukihiro Takahashi, and Kiyoshi Konishi. Binding of the *Streptococcus gordonii* DL1 surface protein Hsa to the host cell membrane glycoproteins CD11b, CD43, and CD50. *Infection and Immunity*. 76. 4986-4991. 2008. 査読有
- ② Ayako Yajima, Yumiko Urano, Kisaki Shimazu, Eizo Takashima, Yukihiro Takahashi, and Kiyoshi Konishi. Hsa, an adhesin of *Streptococcus gordonii* DL1,

binds to a2-3-Linked sialic acid on Glycophorin A of the erythrocyte membrane. *Microbiology and Immunology*. 52. 69-77. 2008. 査読有

[学会発表] (計3件)

- ① 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. 2008.7.3. Toronto, Canada.
- ② 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.
- ③ 矢島彩子、浦野有美子、島津貴咲、高島英造、高橋幸裕、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49回歯科基礎医学会総会. 2007年8月31日. 北海道大学.

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

矢島 彩子 (YAJIMA AYAKO)

日本歯科大学・生命歯学部・助教

研究者番号：00287773

