

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592460

研究課題名(和文) 口腔常在細菌叢のコントロールによる口腔および全身性感染防御法の構築とその応用

研究課題名(英文) Development of protection for systemic and oral infection by control of oral microbes.

研究代表者

山口 泰平 (YAMAGUCHI TAIHEI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：80230358

研究成果の概要(和文)：

インターメディウスは口腔常在菌のひとつで全身性の化膿性病変をひき起こす。一部の菌は線毛を持っていた。この線毛遺伝子は線毛オペロンを形成し、4つの遺伝子を含んでいた。主要な遺伝子は486アミノ酸からなっていた。アンギノーサスレンサ球菌群の中では血清型gと untypable だけがこの遺伝子を持っていた。ノックアウト変異体は唾液中での凝集活性は失っていた。一方唾液凝集素への菌の付着活性は野生型と比較して65%に低下していた。

研究成果の概要(英文)：

Streptococcus intermedius is an oral commensal and a cause of systemic pyogenic disease. A part of the organism possessed curly-like fimbriae. Genomic analyses showed that the operon of the fimbriae was a typical pilus gene operon and constructed of at least 4 ORFs. A *fimI* was predicted to be the structural subunit encoding the 486-amino acid protein, FimI. Strains of the *Streptococcus anginosus* group containing the *fimI* gene were restricted to serotype g and untypable. Knockout mutants within *fimI* did not participate in saliva-mediated aggregation either. The adherent activity of mutants toward plastic wells coated with salivary agglutinin was about 65% that of the parent strain.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度			
2007年度			
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：口腔常在菌、唾液、凝集、付着、凝集素、カルシウム

1. 研究開始当初の背景

唾液凝集素を介した菌体と組織との付着反応は、口腔内常在菌に限らず広い菌種で確認されている。我々もインターメディウスレン

サ球菌を用いて唾液側の因子が唾液凝集素、菌側の因子が菌体表層の線毛であることを発表している。この中でデンタルカリエスの原因菌として知られるミュータンスレンサ

球菌も同一の唾液凝集素を介して凝集していることを示している。

一方で、唾液側の唾液凝集素については分子レベルで詳細な検討が進んでいる。このタンパクは肺や悪性脳腫瘍で見られる分子のバリエーションであり、分子量 34 万の分子である。詳細な解析から、菌との凝集、付着に関与する部分として 9 アミノ酸の配列が重要であることが明らかになっている。

我々のこれまでの研究により、この唾液凝集素は各個人によって唾液中の量に大きな差があること、この量と口腔内の所見（デンタルカリエス、歯周病）とは相関がないことが分っている。また、同程度の凝集素を含んでいる唾液でも、菌体の付着能には大きな差が認められた。これらのことから、唾液中の菌体付着を阻害する物質を単離、精製し、本体はアルブミンであることをつきとめた。さらに分子生物学的アプローチにより、活性部位は半ばより少し上流域で第 3 から 6 エクソンに相当する部分であることを示した。

2. 研究の目的

ヒト口腔常在菌の主成分はレンサ球菌であるが、これらはデンタルカリエス、歯周病の原因だけでなく、心内膜炎、髄膜炎、各種の膿瘍などの全身疾患とも関連している。我々はこれまで、膿瘍などの化膿性病巣から高頻度に回収されるインターメディウスレンサ球菌を材料に用いて、感染の成立に重要な付着反応を唾液と関連させて解析してきた。これらの研究の中で、唾液中のアルブミンが唾液凝集素による付着を阻害することを突き止めた。

本研究ではアルブミンの分子情報に基づき、分子生物学的手法、ペプチドライブラリ

の手法を応用することにより、菌体と唾液凝集素との付着阻害反応の分子メカニズムを明らかにすることである。唾液凝集素を介した菌体の付着は広い菌種で確認されており、本研究のモデル系による付着阻害が、どのくらいの普遍性を持っているのかを確認する。また、得られた情報から、菌体の付着、感染阻害に有効な物質（食品）の探索を試みる。またモデル動物による効果を評価することにより、感染症予防の基礎を確立することが研究期間内の達成目標である。

3. 研究の方法

(1) 菌体付着阻害物質の精製と機能ドメインの解析

データベースに基づいて、RT-PCR により cDNA を合成して発現ベクターに組み入れ、組み換えタンパク質を生成して付着阻害能を確認する。菌の付着実験は既報の方法を修飾したものをを用いる。唾液凝集素と各分画を混合して、マイクロプラスチックウェルあるいはハイドロキシアパタイトビーズに吸着させる。洗浄後、ラベルした菌液を添加する。一定時間の後、洗浄して、付着していない菌体を除き、残った、付着した菌量を放射線のカウントを指標に確認する。こうして、付着を阻害する物質を精製する。インターメディウスレンサ球菌を使用して実験を行う。アルブミンの cDNA はすでに得られている。(担当：山口、五月女)

阻害活性を有する部位を確定するために、段階的に短縮した組み換えタンパク質を精製して付着阻害能を確認する。さらに、狭めた範囲の中で全範囲をカバーするようデザインした一連の 15 から 20 残基程度の合成ペプチドを用意する。同様に菌体と唾液凝集素の結合反応の阻害活性を評価し、コアにな

るアミノ酸配列を決定する。分子レベルの反応をより詳細に解析するために、アラニン残基スキャン法を使用して活性を決定している配列を同定する。この実験系については、研究分担者の於保が経験を有している。またペプチド合成は業者に依託する。(担当：山口、於保)

(2) 本付着阻害反応の普遍性の確認 (担当：山口)

口腔内常在菌に限らず、より幅広い菌種について、以上の一連の結果を確認する。このことにより、本付着阻害反応が細菌感染成立の過程で重要な役割を果たしている菌種を確認する。当研究室では長年口腔細菌を扱ってきた関係上、はば広い菌種について保存している。

(3) 臨床材料を用いた疫学分析

口腔レンサ球菌の付着について、凝集、付着に関与する唾液凝集素と、付着阻害物質のアルブミンを同定している。これらの量のバランスで付着が調節されているものと思われる。これを確認するために、まとまった数のヒト唾液をサンプリングして、唾液凝集素、アルブミン量をELISA法で測定する。一部については菌体凝集活性、付着活性を測定する。また、口腔内所見(デンタルカリエス、歯周病)との関連について検討する。研究分担者の五月女は唾液収集の経験がある。(担当：山口、五月女、於保)

(4) アルブミンあるいは阻害活性を有する構成ペプチドを用いて、細菌叢への影響を調べる。

本研究の最終的な目的は細菌叢のコントロールにある。モデル動物やヒトにおいてプロフェッショナルトウスクリーニングなどの方法で一旦、口腔内を清掃して、細菌数を減らした状態でアルブミンあるいは阻害活性を有する構成ペプチドを作用させ、その後

合成される細菌叢における各種細菌の組成を調べ、その効果を検討する。この過程は本研究について非常に重要な部分を占める。

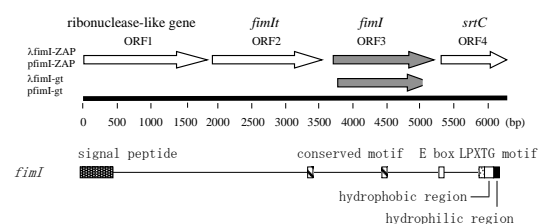
(担当：山口、五月女)

(5) 菌体の付着、感染阻害に有効な物質(食品)の探索を試みる。

アルブミンあるいは阻害活性を有する構成ペプチドを単体で用いることは、実用化について一般的ではないと思われる。アルブミンに類似的作用を有し、手軽に入手できる物質(食品)を見つけることができれば、極めて効果的に目的を達成することができるものと思われる。アルブミン含有という点に着目する。(担当：山口)

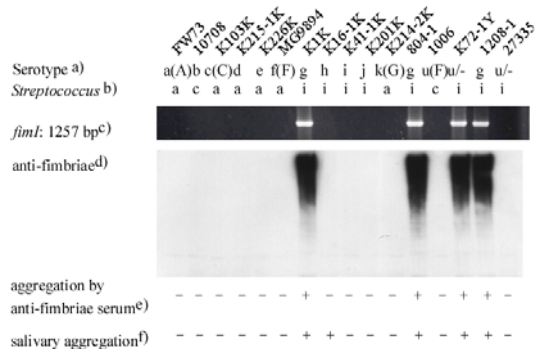
4. 研究成果

本研究に先立ち、細菌側因子の詳細な分析を行った。インターメディウスは口腔常在菌のひとつで全身性の化膿性病変をひき起こす。本菌種の一部の菌はねじれた線毛を持っていた。分子生物学的分析では1208-1という臨床分離株の線毛遺伝子はグラム陽性菌に特有の線毛遺伝子オペロンを形成しており、4つの遺伝子を含んでいた。その中で *fimI* 遺伝子は主要な構造物をコードしており486アミノ酸からなっていた。

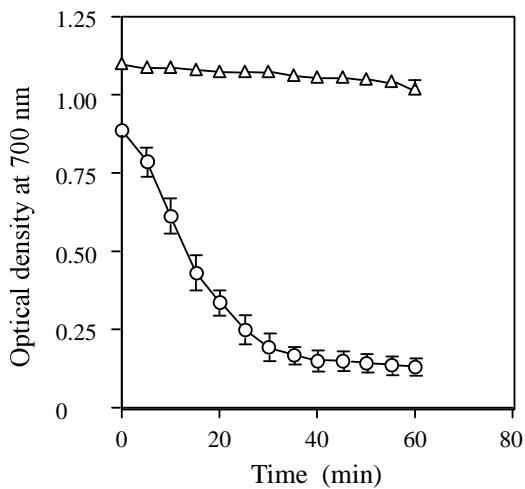


抗体を用いたウェスタンブロットではクローニングした遺伝子を含むファージや大腸菌では未成熟体として55,000分子量を示すタンパクと反応した。アミノ末端には疎水性のリーダー配列が認められ、成熟体として420から430アミノ酸からなるコア配列が確

認できた。一方、カルボキシル末端には細胞壁とのアンカーリングに働くと考えられているコンセンサス配列 LPXTG が存在していた。この線毛遺伝子を持つ菌株はアンギノサスレンサ球菌群の中では血清型 g と untypable だけに限局しており、これらの菌だけが唾液中での凝集反応に関与していた。



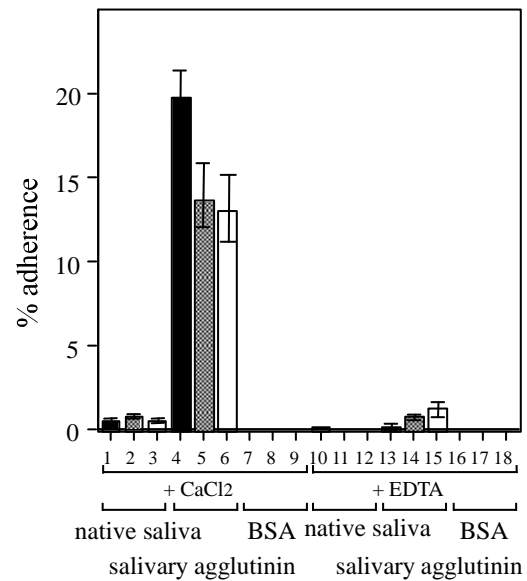
線毛遺伝子へエリスロマイシン遺伝子を挿入することによって得られたノックアウト変異体は確かに線毛構造を欠き、線毛に対する特異抗体による凝集も起こらなければ、ウエスタンブロットでシグナルも検出されなかった。さらにこの変異体は唾液中での凝集活性を失っていた。



唾液中での菌体凝集反応：丸は野生型、三角はノックアウト変異体を示す

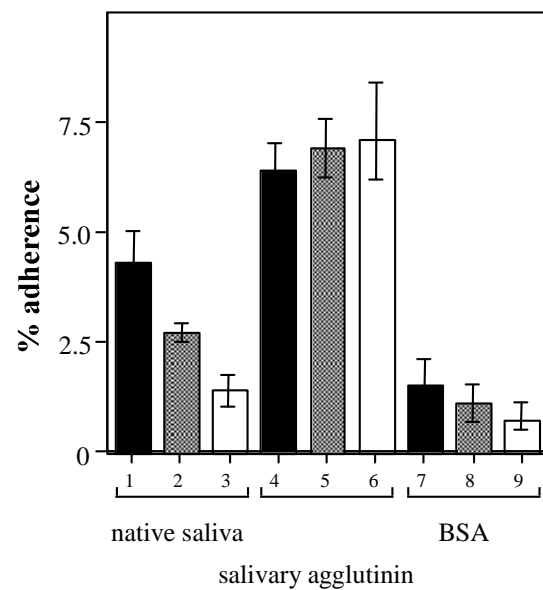
またプラスチックにコーティングした唾液凝集素への菌の付着活性は野生型と比較し

て 65%に低下していたが、やはりカルシウム依存性であった。この結果は別の成分が付着に関与していることを示していた。



プラスチックのコーティングした唾液サンプルへの菌体の付着反応：黒棒は野生型、灰棒、白棒はノックアウト変異体を示す

唾液中で処理したハイドロキシアパタイトビーズへの菌の付着については本線毛構造は関与していないようであった。



唾液サンプルで処理したハイドロキシアパタイトビーズへの菌体の付着反応：黒棒は野

生型、灰棒、白棒はノックアウト変異体を示す。

これ以降の研究によりアルブミン以外に血清トランスフェリンが付着阻害活性を示すことを明らかにした。この反応は鉄イオンが必要であった。現在、論文発表に向けて準備中である。

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田中千穂子、西山毅、五月女さき子、長田恵美、三重幸恵、北田勝浩、佐藤節子、日野陽一、山口泰平、於保孝彦

唇顎口蓋裂児の咀嚼能力および食事や口腔に対する保護者の意識に関する研究 (査読あり) 口腔衛生学会雑誌 2010年60: 88-95

②T. Yamaguchi, M. Matsumoto, Y. Sugimoto, S. Soutome, T. Oho.

Gene cloning and characterization of *Streptococcus intermedius* fimbriae involved in saliva-mediated aggregation. Research in Microbiology, (査読あり) 2009年160: 809-816

[学会発表] (計2件)

①山口泰平 口腔レンサ球菌のカルシウム依存性唾液凝集反応の解析 日本口腔衛生学会 2009年10月11日 岐阜

②西山毅 小児の咀嚼に関する保護者の意識 2009年10月11日 岐阜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 泰平 (YAMAGUCHI TAIHEI)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：80230358

(2) 研究分担者

於保 孝彦 (OHO TAKAHITO)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号：50160940

五月女 さき子 (SOUTOME SAKIKO)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：20325799