

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 22 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011年度～2012年度

課題番号：23792113

研究課題名（和文） 病原性リポ蛋白質制御酵素を標的とした新たな齲蝕細菌感染症治療・予防法の開発

研究課題名（英文） A study to develop a novel therapeutic/ preventive strategy for oral bacterial infectious diseases based on the obstruction of lipoprotein modification enzymes

研究代表者 有本 隆文 (Takafumi Arimoto)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：60407393

研究成果の概要（和文）：これまでの申請研究により、我々は、齲蝕原因菌の表層にリポタンパク質が複数存在することを見出し、それらの糖およびアミノ酸の取り込みに関与していることを明らかにしてきた。さらに、それらはリポタンパク質修飾酵素により局在性および機能が支配されていることを実証し、報告した。今回の申請研究では、齲蝕病原性に関与するリポタンパク質を同定し、それらと修飾酵素の関係を解明した。このことにより、リポタンパク質修飾酵素が、新しい齲蝕細菌感染症治療・予防法の開発に結び付く標的分子足りうることを実証できた。

研究成果の概要（英文）：We have been engaged in the work regarding surface lipoprotein on cariogenic bacterium, *Streptococcus mutans*. Until now, we have identified and functional analyzed lipoproteins related to sugar and amino acid uptake. Moreover, these lipoproteins have been clarified to be modified by lipoprotein modification enzymes, prolipoprotein diacylglycerol transferase (Lgt) and lipoprotein-specific signal peptidase II (LspA), which is very important for the physiological function of the lipoproteins. In this study, we identified that lipoprotein OpcC was involved in the acid tolerance which is one of cariogenic properties of *S. mutans* and demonstrated that the lipoprotein OpcC was under the control of Lgt and LspA in the localization and physiological function. Accumulated evidence and this finding strongly suggest that lipoproteins are definitely related to the pathogenic properties of *S. mutans*. Furthermore, lipoprotein modification enzymes should be attractive targets to develop a new strategy for prevention and therapeutic against dental caries.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：口腔微生物学

科研費の分科・細目：歯学・形態系・基礎歯科学

キーワード：lipoprotein, prolipoprotein diacylglycerol transferase, *Streptococcus mutans*, signal peptidase

1. 研究開始当初の背景

現在の感染症対策は抗菌薬マネジメントおよびワクチン使用が主流だが、抗菌薬の繁用は

、様々な抗菌薬に対する耐性菌（近年では、MRSA、VRE、超多剤耐性アシネトバクター、多剤耐性結核菌（XDR-TB）など）の出現を誘発し、現在、社会問題となっている。一方、ワクチンの使用は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・開発が要求されるため、なかなか実用化に踏み切れていない。以上のことから、新たな感染症対策の確立が喫緊の課題となっている。

2. 研究の目的

このような背景のもと、現在、私たちの研究室では、細菌感染に重要な役割を果たすと考えられている細菌表層リポタンパク質とその生合成酵素（prolipoprotein diacylglyceryl transferase: Lgt, lipoprotein specific signal peptidase II: LspA）に着目し研究を進めている。これらの酵素に着目する利点は、グラム陽性細菌ではこれら生合成酵素の欠損が細菌の生死に影響を与えない点にある。このことから、Lgt, LspAの詳細な機能解析は、細菌の生死に影響を及ぼさずに病原性のみを喪失させるという、従来のような抗菌薬やワクチンとは全く作用機序の異なる病原細菌感染症の治療と予防法に繋がると考えた。本研究では、齶蝕細菌の病原性リポタンパク質を探索し、その病原性と生合成酵素の関係を明らかにすることで、齶蝕細菌の病原性喪失におけるLgt, LspAの新規標的分子としての有効性を実証することを目的に掲げる。

3. 研究の方法

本研究では申請者らのこれまでの研究成果に基づき、①:リポタンパク質修飾酵素（LgtとLspA）を欠損した齶蝕細菌 *Streptococcus mutans* (Lgt欠損株、LspA欠損株)の齶蝕原性能（バイオフィーム形成能、酸産生能、耐酸性能）の変化を検討、②:*S. mutans*ゲノム情報を基に約30種類の各リポタンパク質欠損株の作製、③:①で変化が認められた病原性について各リポタンパク質欠損株の齶蝕原性の検討、これら①～③の項目を2カ年間に亘り並行して解析する。さらに、Lgt欠損株、LspA欠損株における全身感染症に密接に関わると考えられる病原性（薬剤耐性、軟組織付着能（各種培養細胞に対する）、活性酸素抵抗性、生体免疫応答との関係等）の変化を調べる。以上の結果から、新規齶蝕治療・予防法の標的分子としてのLgt, LspAの有効性を評価し、その阻害剤開発の基盤研究

とする。

4. 研究成果

1) 現在公表されている *S. mutans* のゲノムデータベースを用いてアミノ酸解析を行ったところ、表に示す推定リポ蛋白質の存在を示唆した。

<i>sloC</i>	<i>rnsB</i>
SMU.252	<i>pstS</i>
<i>oppA</i>	SMU.1177
SMU.337	SMU.1216
SMU.567	SMU.1217
<i>prtM</i>	<i>malE</i>
SMU.651	SMU.1631
SMU.690	SMU.1646
SMU.711	<i>opcC</i>
SMU.734	SMU.2061
SMU.807	SMU.2053
SMU.815	SMU.1942
SMU.817	SMU.1941
<i>msmE</i>	SMU.1727
SMU.963	SMU.1706
SMU.1067	<i>livK</i>

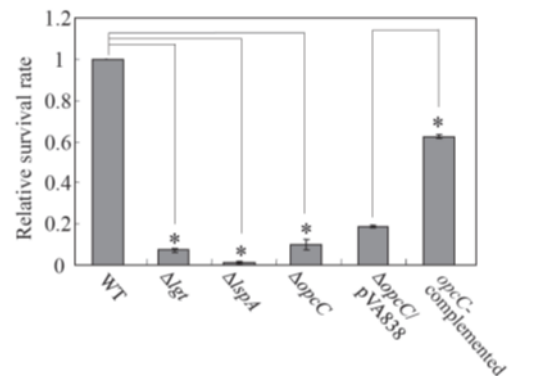
Table 1. *S. mutans* UA159株の推定リポ蛋白質

2) wvctorless-PCR法を用いて、*S. mutans* 109c株を親株とし、これらリポ蛋白質欠損株をすべて作成した。

3) これらリポタンパク質の齶蝕病原性への関与を網羅的に調べるために、まず、リポ蛋白質制御酵素欠損株（Lgt, LspA欠損株）を用いてこれを評価した。

i) 耐酸性能評価試験

pH 3.0の試薬刺激において、野生株とLgt, LspA欠損株の間で生存率に有意差を認めた。さらに、リポタンパク質OpcCの欠損によっても同様の生存率低下が確認された。（下図参照）



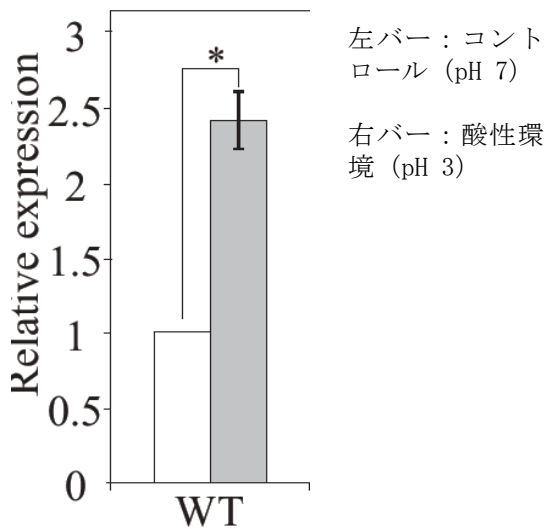
ii) OpcCとリポタンパク質修飾酵素Lgtの関係解明

さらに、OpcC の局在性を調べたところ、Lgt 欠損株では、細胞表層に存在しなかった（下図）。



lane1:野生株、lane2:Lgt 欠損株、Lane4:OpcC 欠損株、LaneM: size marker

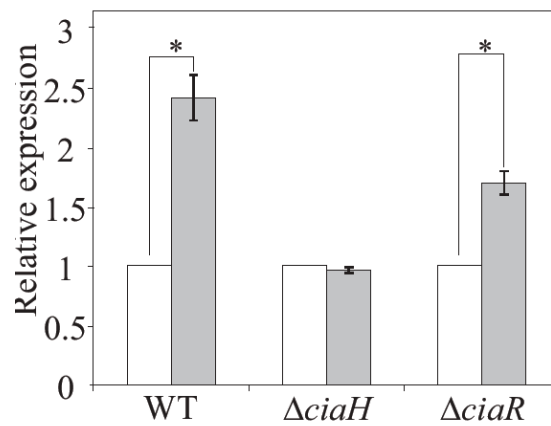
iii) リポタンパク質 OpcC の発現機構解明
酸性環境下における OpcC の重要性を調べるために、酸性環境下における OpcC 遺伝子の発現レベルを測定した（下図）。



結果、酸性環境下でコントロールと比較して約 2.5 倍の遺伝子発現量増加が確認できたことから、OpcC の酸刺激時における重要性が明らかとなった。

iv) OpcC の遺伝子発現は two-component system (TCS), CiaRH によって支配される。

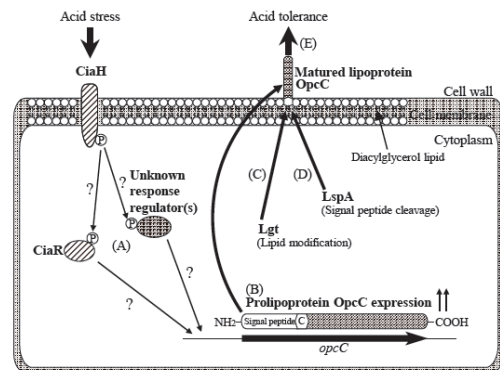
次に、この酸性環境下における OpcC の遺伝子発現の情報調節が何によってコントロールされるのかを調べた。細菌は、細菌独特の環境ストレス感知応答システム (TCS) を有することが明らかにされている。*S. mutans* でも 14 種類の TCS の存在が示唆されており、いくつかの TCS が耐酸性に関与するとされているが詳細は不明である。そこで今回我々は、示唆されている TCS と OpcC の遺伝子発現の間に関係があるか調べてみた。すると TCS のうち CiaRH との間に関係があることが明らかとなり、さらにその中でもセンサーキナーゼである CiaH との密接な関係を明らかにした（下図）。



左バー：コントロール (pH 7)
右バー：酸性環境 (pH 3)

結果に示すように、OpcC 遺伝子の酸性環境下での発現増加は CiaR (レスポンスレギュレーター) の喪失では抑制されなかったが、CiaH の喪失により、ほぼ完全に発現が抑制された。この結果は、OpcC の発現に CiaH の酸性環境感知が非常に重要であることを示唆している。

以上の結果から、我々は、*S. mutans* におけるリポタンパク質 OpcC を介した新しい耐酸性メカニズムを提唱するに至った（下図）。



本研究結果をまとめて、Dental Medicine Research に報告した。

今回の研究結果は、Lgt によって細胞表層に局在するリポタンパク質の中には病原性に関与するものも存在し、Lgt を機能阻害することでそれらの病原性を喪失できる可能性を示唆した。

これらの研究結果は、齲蝕細菌に関する病気の予防・治療法の開発は、齲蝕細菌への応用のみならず、グラム陽性細菌全体への応用が可能であると考えられる。

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 3 件)

1) Kasei Cho, Takafumi Arimoto,

Takeshi Igarashi, Matsuo Yamamoto.

Involvement of lipoprotein PpiA of

Streptococcus gordonii in evasion of

phagocytosis by macrophages. Molecular

Oral Microbiology 査読あり 2013. in press.

2) Taniguchi, Makoto; Arimoto, Takafumi;

Igarashi, Takeshi; Relationship between

CiaRH and Lipoprotein OpcC in the

Acid Tolerance of *Streptococcus mutans*.

Dental Medicine Research 査読あり 33

(1) 2-11, 2013.

3) Saeki, Ayumi; Segawa, Taku; Abe,

Tsugumi; Sugiyama, Masahiro; Arimoto,

Takafumi; Hara, Hiroshi; Hasebe, Akira;

Ohtani, Makoto; Tanizume, Naoho;

Ohuchi, Manabu; Kataoka, Hideo;

Kawanami, Masamitsu; Yokoyama,

Atsuro; Ken-ichiro. Toll-like receptor

2-mediated modulation of growth and

functions of regulatory T cells by oral

streptococci. Molecular Oral

Microbiology 査読あり 2013. in press.

[学会発表] (計 3 件)

① K. Chou, T. Arimoto, M. Taniguchi, T. Ando, M. Yamamoto, T. Igarashi.

Relationship between lipoprotein PpiA and scavenger receptors in *Streptococcus gordonii* evasion of phagocytosis

第 8 5 回日本細菌学会総会、March 27-29, 長崎, 2012

② A. Saeki, T. Segawa, H. Kataoka, A. Hasebe, T. Arimoto, . . . K. Shibata.

Modulation of growth and functions of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells by oral streptococci

第 8 5 回日本細菌学会総会、March 27-29, 長崎, 2012

③ T. Segawa, A. Hasebe, A. Saeki, H. Kataoka, T. Arimoto, . . . K. Shibata.

Roles of lipoproteins in clearance of oral streptococci

第 8 5 回日本細菌学会総会、March 27-29, 長崎, 2012

[その他]

ホームページ等

<http://www.showa-u.ac.jp/sch/dent/major/dbisei/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有本 隆文 (ARIMOTO TAKAFUMI)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：60407393

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：