

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462868

研究課題名(和文) う蝕・歯周病原菌の口腔内定着機構の解明

研究課題名(英文) Analysis for the existence of cariogenic and periodontal bacteria in oral cavity

## 研究代表者

小松澤 均 (KOMATSUZAWA, Hitoshi)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：90253088

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：口腔内常在細菌の多くはバクテリオシン、過酸化水素等の抗菌性因子を産生する。う蝕・歯周病原菌の口腔内定着機構を解明するため、ミュータンスレンサ球菌(Sm)を中心にレンサ球菌の抗菌性因子抵抗性について検討し、バクテリオシン耐性に関与する新規二成分制御系因子(Sm：2つ、化膿レンサ球菌1つ)を同定した。また、歯周病原菌であるAggregatibacter actinomycetemcomitans(Aa)のペプチド産生や病原性因子発現調節性を解明するためsmall RNAの同定を試み、small RNAを約120個同定した。同定したsmall RNAの一部は血清中で発現量に変化が認められた。

研究成果の概要(英文)：Commensal bacteria sometimes produce anti-bacterial agents such as bacteriocin and hydrogen peroxide. To investigate the mechanism for infection of cariogenic or periodontal pathogenic bacteria in oral cavity, we tried to identify the factors responsible for the resistance to bacteriocins in Streptococci, and to identify small RNAs which are related with the peptide production and regulation for virulence expression in A. actinomycetemcomitans (Aa). As the results, we identified two-component systems (TCSs) which are related with bacteriocin resistance (2 factors in S. mutans, 1 in S. pneumoniae) and found that these TCSs are important for the co-existence with other bacteriocin-producing bacteria. We identified around 120 small RNAs in Aa. Among these RNAs, the expression of some RNAs was altered when Aa was exposed to serum.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：口腔細菌 常在細菌 う蝕原因菌 歯周病原菌 抗菌性ペプチド small RNA

## 1. 研究開始当初の背景

口腔内の2大疾患であるう蝕・歯周病は細菌感染症であり、これまでに多くのう蝕・歯周病原因菌が同定されている。また、このような細菌は歯根膿瘍、誤嚥性肺炎、動脈硬化症など他の口腔・全身疾患にも関与していることから、口腔内細菌のコントロールは口腔・全身の健康にとって非常に重要である。しかし、口腔内細菌の定着機構の解明については分子レベルでの詳細な検討は多くはなされていない。これは口腔内への細菌の定着には宿主との相互作用および異種菌との相互作用と多くの因子が複雑に影響するため解析が困難であることが考えられる。特に、口腔内には多くの常在細菌が存在しており、全ての口腔細菌との関連性の検討は非常に困難である。

口腔は食物や呼吸の門戸であることから種々の微生物が侵襲するため、微生物感染に対する種々の抵抗性機構を有している。抵抗性因子としては唾液、歯肉・粘膜上皮、血清由来のものがあり、具体的にはリゾチーム、抗菌性ペプチド、ペルオキシダーゼ、ラクトフェリン、免疫グロブリン、補体などがある。細菌が口腔内に定着するためにはこのような因子に抵抗性を示す必要がある。これらの因子と細菌との関連性についての報告は多くあるが、分子レベルでの詳細な検討は多くはなされていない。特に、細菌側の抵抗性因子は不明な点が多い。申請者はこれまでに歯周病原因菌の外膜タンパクが血清抵抗性、サイトカイン誘導、付着・侵入性に関与していることを報告している(Asakawa et al., Mol. Microbiol. 50:1125-39,2003)。また、黄色ブドウ球菌およびミュタンスレンサ球菌の抗菌性ペプチド抵抗性機構についても明らかにしている(Matsuo et al., Microbiology 79:1660-70,2011, Matsuo et al., J. Oral Biosci. 52:252-9,2010)。さらに、これまでの病原性発現解析に関する研究の多くは細菌用培地で行われているが、生体中での発現性とは異なることが予想される。申請者らは黄色ブドウ球菌において血清中での培養することで病原性因子の発現性が細菌用培地の場合とは全く異なることを報告している(Oogai et al., Appl. Environ. Microbiol. 77:8097-105,2011)。したがって、口腔環境を考えた際には、唾液あるいは血清中での発現解析は非常に重要であると考えられる。このようなこれまでの申請者が得た知見を応用し、口腔細菌について口腔内で環境下での細菌の性状について分子レベルで明らかにすることは重要である。

また、口腔にはおよそ数百種もの細菌が存在すると言われている。これまでに多くの口腔内細菌が同定されているが、まだ未同定な細菌も多く存在している。口腔内細菌は口腔内で互いに共存・拮抗しながらヒト個体固有の細菌叢を形成している。細菌間での拮抗作用として他種の細菌に殺菌的に働く物質で

あるバクテリオシンが知られている。広義のバクテリオシンとしては溶菌酵素、過酸化水素、有機酸、抗菌性ペプチドなどがある。近年、こうしたバクテリオシンを認識し、耐性を担うことが報告されている(Cotter et al., Nat. Rev. Microbiol. 3:777-88, 2005)。また、細菌の増殖過程でペプチドを産生し、病原性因子発現や菌の増殖を調節する、いわゆる細菌間コミュニケーションについて報告されている(Antunes et al., 156:2271-82, 2010)。黄色ブドウ球菌では Autoinducing peptide と呼ばれ、他菌種にも影響を与えることが知られている。口腔内細菌ではミュタンスレンサ球菌等で解析はなされているものの、他菌種についてはほとんど解析されていない。さらに、細菌の産生するペプチドが細胞膜障害やサイトカイン誘導能など宿主細胞へ影響を及ぼすことも報告されている(Queck et al., PLoS Pathog. 5:e1000533, 2009)。このように細菌は種々の機能を持つペプチドを産生することが考えられ、これらペプチドの解析は細菌定着機構、病原性因子発現機構の解明には非常に重要である

## 2. 研究の目的

う蝕・歯周病原因菌は口腔という過酷な環境下で定着・増殖し病原性を発揮している。すなわち、宿主由来および他口腔内細菌由来の様々な因子に対して適応し、宿主や他細菌種に対して抵抗性を示し、口腔内に生存している。このような細菌の生存戦略機構の解明は細菌の口腔内定着機構・感染症発症の分子メカニズムや口腔外の種々の疾患発症メカニズムの解明につながると思う。本研究ではう蝕・歯周病原因菌を中心に他菌種との相互作用の観点から検討を行う。特に細菌の産生する抗菌性物質や生理活性物質などの低分子ペプチドに着目し、これら低分子ペプチドの網羅的な同定・性状解析を行い、他菌種への影響について明らかにし、口腔内細菌定着機構および感染症発症機構解明の新しい展開を提唱する。本研究成果は生体への細菌定着機構の分子メカニズムの解明に大きく寄与できると考える。

## 3. 研究の方法

### (1) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa)の small RNA 解析

Small RNA の解析のためには遺伝子間領域に置いて詳細な情報が必要となる。しかし、Aa HK1651 株の公開されているゲノム情報においては不明瞭な点も認められたため、in silico Molecular Cloning ソフトウェアを用い正確な遺伝子化領域の決定を行った。

対数増殖期の HK1651 株より total RNA を酸性フェノール法により抽出を行った。得られた total RNA を用い、ランダムプライマーによる cDNA 合成を行い、低分子の RNA を標的とした RNA-seq を行った。得られたシーケンス情報を基に、Aa HK1651 株の全転写産物

の発現性を解析し、遺伝子間やアンチセンス鎖に発現が見られる領域を新規 small RNA の候補として決定した。

同定した small RNA の発現性を定量性 PCR により確認をした。さらに、一部の RNA については血清中や唾液中での発現性を検証した。また、同定した small RNA 中にコードされるペプチドを明らかにし、抗菌性因子と相同性のあるペプチドの検索を行った。

### (2) レンサ球菌のバクテリオシン耐性機構の解明

バクテリオシン感受性試験：種々のバクテリオシン産生菌を用いた direct 法を用いた。また、ナイシンおよびヌカシンについては精製標品を用いた MIC 法による評価を行った。

変異株の作成： *S. mutans* および *S. pyogenes* の二成分制御系因子の変異株の作成は相同性組換えを用いた方法により行った。相補株の作成は染色体 DNA への相同性組換えによる挿入により行った。

遺伝子発現解析：対数増殖期の菌を回収後、total RNA の抽出を行った。cDNA を合成後、定量性 PCR 法により、遺伝子発現解析を行った。

共培養試験：2 菌種の菌液を種々の割合で混合後、寒天培地にスポットし、8 時間を行う。その後、増殖した部分を寒天培地ごと切り取り、生理食塩水に入れ、激しく浸透後、普通寒天培地およびどちらか一方のみが増殖できる薬剤添加寒天培地に播種する。一晚培養後、それぞれの培地で増殖したコロニー数をカウントし、それぞれの菌種の割合を算出した。

### (3) 口腔からのレンサ球菌の分離

被験者の唾液を採取し、生理食塩水で懸濁、希釈後、MS 培地および MSB 培地に播種後、2 日間嫌気培養を行った。それぞれの培地で増殖したコロニーをピックアップし、再度、寒天培地に播種した。それぞれの菌種を培養後、DNA を抽出し、種特異的プライマーを用いた PCR 法により、菌種の同定を行った。

分離した菌の抗菌性因子（バクテリオシン、過酸化水素）産生性について検討を行った。特にミュータンスレンサ球菌についてはゲノム上で報告されているバクテリオシンをコードしている遺伝子の保有状況について検討した。

さらに分離した菌を用いたバイオフィーム形成実験を行い、バイオフィーム中における個々の細菌種の割合について検討を行った。また、ミュータンスレンサ球菌のみ他の被験者から分離した株に変えることで細菌種の割合に変化が起こるかについて検証した。

### (4) グリチルレチン酸の口腔内細菌に対する抗菌効果の検討

甘草由来の天然成分であるグリチルレチ

ン酸について、う蝕原因菌および歯周病原菌に対する抗菌効果について、MIC 法による薬剤感受性試験を行った。

## 4. 研究成果

### (1) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) の small RNA の同定

HK1651 株からの total RNA の抽出について種々の方法を用いて検討を行い、最終的に acid phenol 法により低分子 RNA についても効率よく回収を行うことができた (図 1)。

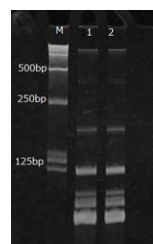


図 1. Aa Total RNA の電気泳動像。M サイズマーカー、1. Sample 1、2 sample 2。

RNA seq により 1055983 リード及び 844585 リードの塩基配列を得、HK1651 株のゲノム情報を基に、Aa 菌の配列情報のみを選択し、解析を行った。基本的には遺伝子間領域と遺伝子 coding 領域のアンチセンス鎖に存在する RNA で、リード数 50 以上、塩基配列が 30 ~ 600 nt の RNA を選択した。その後、定量性 PCR 法により、個々の遺伝子発現性の検討を行い、最終的に small RNA の同定を行った。既知の RNA モチーフを有する small RNA を表 1 に示す。

表 1. 既知の RNA モチーフを有する small RNA

Strand	Start	End	Size	Flanking genes		RNA family
+	119016	119273	257	HK1651_00595	HK1651_00590	Glycine riboswitch
-	834292	834425	133	HK1651_04270	HK1651_04265	RNAI
+	844541	844593	52	HK1651_04365	HK1651_04360	Alpha_RBS
-	919835	920034	199	HK1651_04755	HK1651_04760	6S RNA
+	1010908	1010982	74	HK1651_06200	HK1651_06205	GcvB
-	1039508	1039878	370	HK1651_06385	HK1651_06390	tmRNA
+	1251680	1251822	142	HK1651_06415	HK1651_06420	TPP riboswitch
-	1283835	1283915	80	HK1651_06590	HK1651_06605	C4
-	1484687	1485072	385	HK1651_07480	HK1651_07490	RNaseP_bact_a
-	1820196	1820354	158	HK1651_09120	HK1651_09125	Bacteria_small_SRP
+	2013668	2013868	121	HK1651_10025	HK1651_10030	His_leader

得られた塩基配列情報を基に、低分子量ペプチドを明らかにし、相同性検索により抗菌性ペプチドをコードしている遺伝子の探索を行ったが、抗菌性ペプチドをコードする遺伝子は認識できなかった。

また、一部の small RNA について、血清中での発現性を検討した結果、発現性の変化が認められたものがあった。

### (2) 化膿レンサ球菌のバクテリオシン耐性に関与する因子の同定および解析

14 組の二成分制御系因子 (TCS) の個々の欠損株について、種々のタイプのバクテリオシン産生菌を用いた direct 法による感受性試験を行った。その結果、1 組の TCS (Spy\_1081-82 : srtRK) の欠損株においてランティビオテックスであるナイシン A の感受

性の増大を認めた(表2)。さらに、その下流に存在するABCトランスポーター

表2. TCS変異株のバクテリオシン感受性

strain	character	inactivated gene name	type AI		two peptides	
			<i>L. lactis</i>		<i>S. aureus</i>	
			ATCC11454	ISK-1	TY4	staphylococcin C55
		nisin A	mikacin ISK-1			
SF370	Wild type	-	8	23	0	
ΔTCS1	Δspy_244 in SF370, Spe <sup>r</sup>	<i>fasC</i>	8	23	0	
ΔTCS2	Δspy_337 in SF370, Spe <sup>r</sup>	<i>conS</i>	8	23	0	
ΔTCS3	Δspy_529 in SF370, Em <sup>r</sup>	<i>vicK</i>	8	23	0	
ΔTCS4	Δspy_875 in SF370, Spe <sup>r</sup>	<i>prtS</i>	8	23	0	
ΔTCS5	Δspy_1061 in SF370, Spe <sup>r</sup>	unassigned	8	23	0	
ΔTCS6	Δspy_1082 in SF370, Spe <sup>r</sup>	<i>srtK</i>	16	23	0	
ΔTCS7	Δspy_1107 in SF370, Spe <sup>r</sup>	unassigned	8	23	0	
ΔTCS8	Δspy_1236 in SF370, Spe <sup>r</sup>	<i>ciaH</i>	8	23	0	
ΔTCS9	Δspy_1553 in SF370, Spe <sup>r</sup>	unassigned	8	23	0	
ΔTCS10	Δspy_1558 in SF370, Spe <sup>r</sup>	<i>lysS</i>	8	23	0	
ΔTCS11	Δspy_1622 in SF370, Spe <sup>r</sup>	<i>yyqE</i>	8	23	0	
ΔTCS12	Δspy_1910 in SF370, Spe <sup>r</sup>	<i>salK</i>	8	23	0	
ΔTCS13	Δspy_2026 in SF370, Spe <sup>r</sup>	<i>ihk</i>	8	23	0	

(*srtEFG*)の発現性を検討した結果、ナイシンA添加により顕著な発現量の増大を認めた。また、このABCトランスポーターの変異株は顕著に感受性が増大をした(図2)。

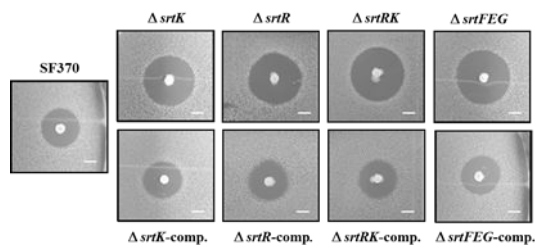


図2. nisin Aに対するSF370野生株ならびに欠損株の感受性

さらに、ナイシンA産生乳酸菌との共培養試験の結果、TCS欠損株およびABCトランスポーター欠損株では、親株に比べ占有率は大幅に減少した。

### (3) ミュータンスレンサ球菌のバクテリオシン耐性に関する因子の同定及び解析

14組のTCSの個々の欠損株について、種々のタイプのバクテリオシン産生菌を用いたdirect法による感受性試験を行った。その結果、1組のTCSがナイシンAに、もう1組のTCSがヌカシンの感受性に関与していることが明らかになった(表3)。同定したTCSの耐性の本体について検討した結果、ナイシンAには機能未知の因子が、ヌカシンについてはABCトランスポーターが関与していることが明らかになった(図3, 4)。

表3. *S. mutans* UA159野生株、TCS欠損株の各種バクテリオシンに対する感受性

Strains	Class I				Class IIa		Class IIb		Class IIc		Class IId	
	nisin A		mikacin ISK-1		isactin 4E1		mutacin III		isactin Q		isactin Q	
	direct	MIC <sup>a</sup>	direct	MIC	direct	MIC	direct	MIC	direct	MIC	direct	MIC
UA159	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64
TC545	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64
TC51	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64
TC52	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64
TC53	8	4	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64
TC54	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64
TC55	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64
TC56	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64
TC57	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64
TC58	1	64	8	8	7	5	0	3	8	8	8	8
TC59	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64
TC550	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64
TC581	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64
TC582	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64
TC583	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64
TC584	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64	1	64

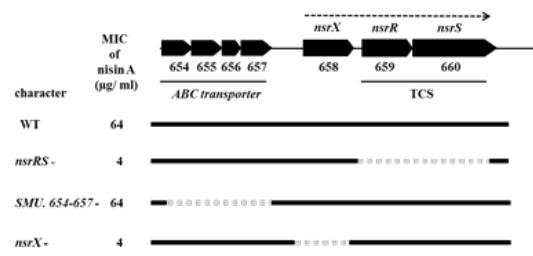


図3. ナイシン感受性に関する因子

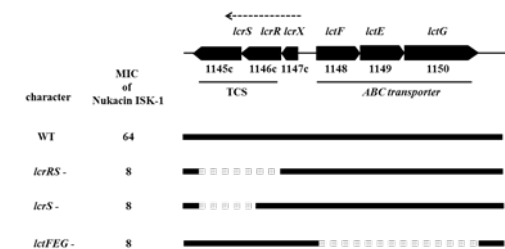


図4. ヌカシン感受性に関する因子

さらに、ナイシンA産生乳酸菌あるいはヌカシン産生ブドウ球菌との共培養試験の結果、それぞれのTCS欠損株および耐性因子欠損株では、親株に比べ占有率は大幅に減少した。

### (4) 口腔からのレンサ球菌の分離及び性状解析

口腔から *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. oralis*, *S. parasanguinis*等の種々のレンサ球菌を分離した。Direct法による感受性試験の結果、他のレンサ球菌や黄色ブドウ球菌に対して強い抗菌力を示すバクテリオシンを産生する *S. mutans*を1株分離した。遺伝子解析の結果、本菌株はmutacin IIIを産生することが明らかとなった。

種々の口腔レンサ球菌との共培養試験の結果、mutacin III産生株はMutacin III非産生 *S. mutans*に比べ、占有率が高いことが明らかとなった。

また、プラーク中においては種々の細菌種は生存過程で効率よく糖源を獲得し、効率よく代謝する必要がある。そこで、糖代謝能について解析するため、*S. mutans*の糖代謝系に関する因子である *glmS*, *nagB*の種々の糖代謝による遺伝子発現調節因子について検討を行ったが、因子の同定には至らなかった。

### (5) 黄色ブドウ球菌の過酸化水素感受性に関する因子の同定および性状解析

口腔には *S. sanguinis*や *S. parasanguinis*等の過酸化水素産生菌が多く存在している。誤嚥性肺炎の1つであり、口腔内からもしばしば分離される黄色ブドウ球菌について、*S. sanguinis*や *S. parasanguinis*の産生する過酸化水素感受性について検討した結果、強い抗菌活性を示した。また、TCSの1つである *SrrAB*の過酸化水素抵抗に関与していることが明らかとなった(図5)。また、過酸化水

素耐性に関与していることが報告されているカタラーゼ、AhpC、Hmpなどの因子の発現性が増大していることが明らかとなった。

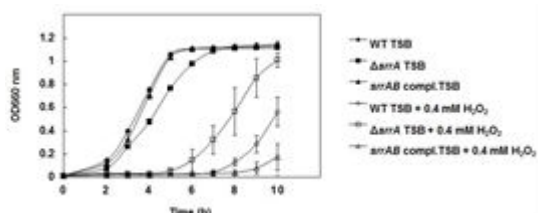


図5. *srrA* 欠損株の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 含有培地中における増殖性

(6) グリチルレチン酸の口腔内細菌に対する抗菌効果の検討

グリチルレチン酸について口腔レンサ球菌および歯周病原菌について、抗菌効果を検討した。その結果、グリチルレチン酸はレンサ球菌や黄色ブドウ球菌に対して抗菌力を示したが、歯周病原菌についてはほとんど効果が認められなかった。

グリチルレチン酸は現在、ヒトにも使用されており、今後う蝕予防の治療薬の1つとしての可能性が示唆された。

## 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 1件)

Kawada-Matsuo M, Oogai Y, Zendo T, Nagao J, Shibata Y, Yamashita Y, Ogura Y, Hayashi T, Sonomoto K, Komatsuzawa H. Involvement of the novel two-component NsrRS and LcrRS systems in distinct resistance pathways against nisin A and nukacin ISK-1 in *Streptococcus mutans*. Appl Environ Microbiol. 査読あり 2013, 79(15):4751-5.

[学会発表](計 4件)

松尾美樹、小松澤均 ランチビオティクス耐性に関与する *Streptococcus mutans* の新規二成分制御系因子 NsrRS と LcrRS の同定  
第87回日本細菌学会総会、平成25年9月21日 岡山コンベンションセンター(岡山県岡山市)

松尾美樹、小松澤均 齶蝕細菌の二成分制御系を介した生存戦略機構  
第87回日本細菌学会総会、平成26年3月26日 タワーホール舟堀(東京)

松尾美樹、立野一郎、長谷川忠男、小松澤均 化膿レンサ球菌の二成分制御系によるナイシン耐性機構  
第89回日本細菌学会総会、平成26年3月23日 大阪国際交流センター(大阪府大阪

市)

大貝悠一、小松澤均 黄色ブドウ球菌の Hmp は *Streptococcus sanguinis* の産生する過酸化水素感受性に関与する  
第89回日本細菌学会総会、平成26年3月25日 大阪国際交流センター(大阪府大阪市)

[その他]

ホームページ等

<http://w3.hal.kagoshima-u.ac.jp/dental/saikin/>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小松澤均 (KOMATSUZAWA, Hitoshi)

鹿児島大学・歯学領域歯学系・教授

研究者番号: 90253088

(2) 研究分担者

松尾美樹 (Matsuo, Miki)

鹿児島大学・歯学領域歯学系・准教授

研究者番号: 20527048

(3) 連携研究者

大貝悠一 (Oogai, Yuichi)

鹿児島大学・歯学領域歯学系・助教

研究者番号: 40511259