

## 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：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861601

研究課題名(和文) 全身疾患をもたらすStreptococcus mutans 新規病原性因子の同定

研究課題名(英文) The identifications of Streptococcus mutans novel virulence factors involved in systemic disease

研究代表者

藤島 慶 (FUJISHIMA, KEI)

鹿児島大学・医歯学域 歯学系・助教

研究者番号：50553153

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Streptococcus mutans(以下S. mutans)は歯科領域においてう蝕形成の原因菌として周知されている。その一方で、昨今全身疾患への影響についても高い注目を集めている。そこで全身疾患を引き起こすS. mutansの病原性因子として、菌体表層に発現する表層タンパクに着目した。今検証より、S. mutansの細胞への付着因子として、菌体内で生成されたタンパクを菌体表層へ局在化させるSortaseが関与し、さらにSortase依存性のタンパクとしてWapAが主要な役割を担う可能性が示唆されるデータが得られたので報告する。

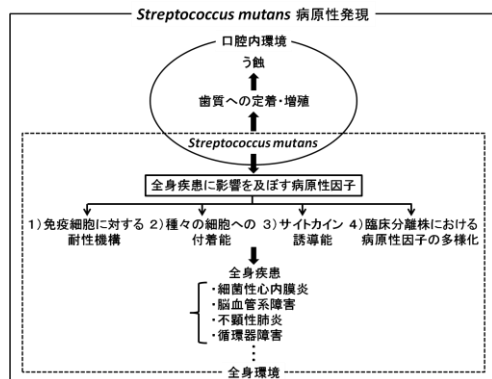
研究成果の概要(英文)：Generally Streptococcus mutans(S. mutans) are known as pathogenic bacteria of teeth caries in dental area, but recently S. mutans are also featured as virulence factors to systemic disease. So we have focused on superficial proteins as virulence factors of S. mutans. In this validation, we report that sortase which localize proteins produced intracellular to membrane are involved in the ability of attachment to hela cells. And more there are six proteins which is dependent on sortase, we also report it is likely that wapA plays a crucial role in attachment to hela cells.

研究分野：歯科保存系

キーワード：菌体表層タンパク

1. 研究開始当初の背景

近年、口腔内感染症と動脈硬化症、糖尿病、高血圧症などの全身疾患との関連性が報告され高い注目を集めている。なかでも心血管系疾患において、心不全や心臓の弁置換手術後の高齢者において、血管内に侵入した口腔細菌が心内膜や人口弁に付着、増殖し感染性心内膜炎を発症する事例は著明である。また最近、歯科領域において重要な病原性細菌である *Streptococcus mutans* の菌体表層タンパクである Collagen-Binding-Protein (CBP) がコラーゲン線維に付着しコラーゲン線維と血小板の結合障害を引き起こし出血性脳卒中を増悪させる直接的な病原性因子であるという報告がなされた (Nakano, K et al., Nat. commun. 2:1-10, 2011)。これまでに *S. mutans* のう蝕発症に関する研究は多くなされているが、全身への影響については十分な検証がなされていない。そこで申請者は下図に示す *S. mutans* の全身性に影響を及ぼす病原性因子に着目した。

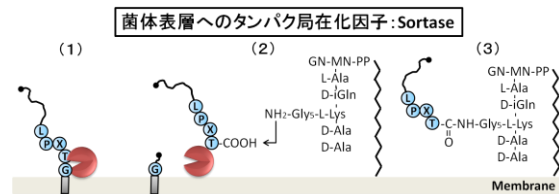


2. 研究の目的

歯科領域において *Streptococcus mutans* (以下 *S. mutans*) はう蝕形成の原因菌として周知されている。一方で全身への影響として菌血症や心内膜炎等の原因菌としても知られており、近年本菌と脳血管疾患との関連性が報告され、本菌の全身性に及ぼす影響についても更なる解析が必要である。申請者は全身疾患を引き起こすメカニズムの解明という観点から、*S. mutans* の生体防御システムへの対処機構及び種々の組織の細胞への影響に着目した。本研究では、種々の組織の細胞への付着、侵入、サイトカイン誘導能についてメカニズムの解明を行い、*S. mutans* の全身疾患に影響を及ぼす新たな病原性因子の同定を目指す。

*S. mutans* の全身疾患へ影響を及ぼす病原性因子について考えたとき、菌体表層に発現する表層タンパクが重要な役割を担っているのではと考えた。*S. mutans* の菌体

表層タンパクとしてペリクルへの付着能を有する PAc、脳卒中増悪因子 CBP、グルカン結合タンパク等が報告されているが、ゲノム上にはまだ未解析の細菌表層タンパクをコードする遺伝子が多数存在する。今回申請者は菌体内で生成されたタンパクを菌体表層に局在化させる Sortase に着目した。以下にタンパク局在化因子 Sortase について示す。



- (1) 細胞膜上に存在するSortaseはLPXTG配列をもつタンパクに作用する
- (2) Sortaseはトレオニンとグリシン間でタンパクを切断し中間体を形成後、中間体のトレオニンのカルボキシル基と細胞壁由来のN末端アミノ基が連結されることで複合体が形成される
- (3) 形成された複合体は細胞壁ペプチドグリカン層に組み込まれ、連結していたタンパクがペプチドグリカン層に表出する

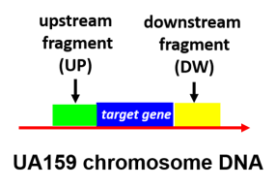
*S. mutans* は Sortase 依存性の表層タンパクとして FruA、SpaP、WapA、WapE、GbpC、DexA の 6 つを所有する。これらの Sortase を介した菌体表層タンパクによる *S. mutans* の細胞への付着能を検証し、新規の病原性因子を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

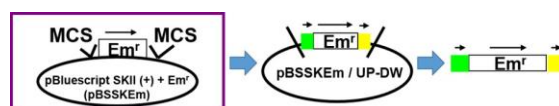
指標菌である *S. mutans* UA159 野生株において、Sortase の発現を制御する *srtA* の遺伝子欠損変異株を作成し、野生株と *srtA* の遺伝子欠損変異株における細胞への付着率の差異検証を行った。

(i) *S. mutans* UA159 野生株における遺伝子欠損株作製方法について

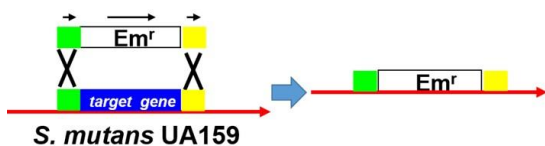
- ① 標的遺伝子の配列の確認及びプライマーの設計



- ② 標的遺伝子上流、下流域における遺伝子配列と同一の配列を持つ標的遺伝子部をエリスロマイシン耐性遺伝子で置換したフラグメントの作製



- ③ ダブルクロスオーバー法を用いた標的遺伝子のエリスロマイシン耐性遺伝子への置換による遺伝子欠損変異株の作製

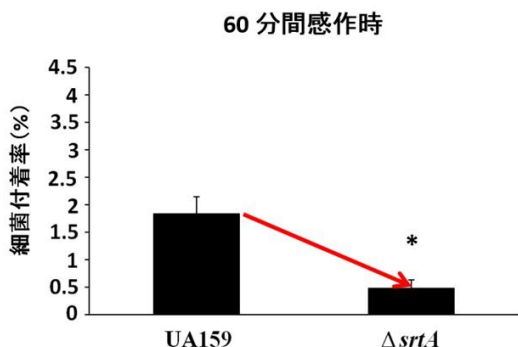


(ii) *S. mutans* UA159 野生株及び遺伝子欠損変異株を用いた細胞への付着能検証方法

- ・使用した菌株  
*S. mutans* UA159 野生株、*sortase* 欠損変異株及び *Sortase* 依存性の欠損変異株
- ・使用細胞  
Hela 細胞
- ・細菌及び細胞の調整  
OD=1.0 に調整した菌液を遠心してペレットの回収を行い、細胞培養培地 D-MEM にて懸濁、希釈を行った。細胞は 96 穴プレートにてコンフルエントになるまで培養した。
- ・細菌付着試験方法  
96 穴プレートにコンフルエントの状態に調整した Hela 細胞へ  $10^5$  個に調整した菌液を播種し、 $37^\circ\text{C}$   $5\%\text{CO}_2$  下にて 60 分、120 分間作用させた。作用後、PBS にて希釈し寒天培地にプレーティング後、 $37^\circ\text{C}$   $5\%\text{CO}_2$  下にて 24 時間培養した。培養後、プレート上のコロニーのカウントし細胞への付着能を算出した。

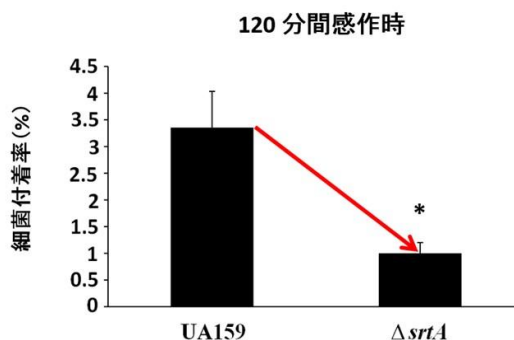
#### 4. 研究成果

*S. mutans* UA159 野生株、*sortase* 欠損変異株を Hela 細胞へ 60 分、120 分間感作させた時の細菌の細胞への付着能検証結果を以下に示す。



60 分間の感作において、*S. mutans* UA159 野生株は 1.7% 付着率を示し、*sortase* 欠損変異株における付着率は 0.5% であった。

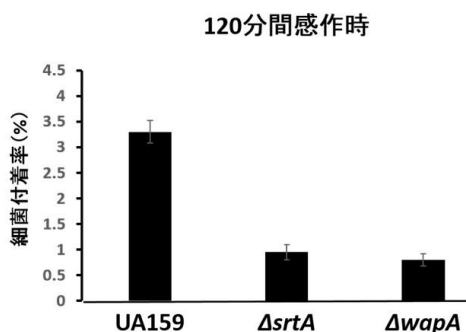
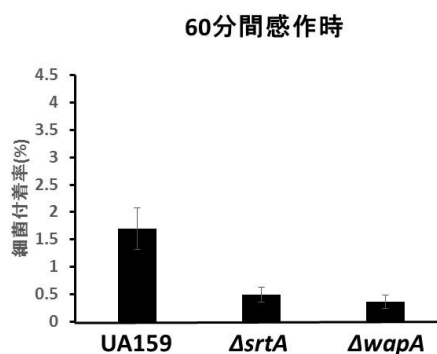
次に細菌を 120 分間感作時の付着能検証結果を示す。



*S. mutans* UA159 野生株では 60 分間の感作時に比較して、120 分間の感作時では、ほぼ倍近い 3.3% の付着率を示した。また *sortase* 欠損変異株における付着率は 0.95% を示した。

以上の付着能検証結果より、*sortase* 遺伝子欠損変異株の付着能は *S. mutans* UA159 野生株のそれより有意に低下することが明らかになった。つまり、*S. mutans* UA159 野生株の Hela 細胞への付着において、*Sortase* 依存性の菌体表層タンパクの関与が示唆された。

次に同様の手法を用いて、*Sortase* 依存性のタンパクを発現する遺伝子を欠損させた遺伝子欠損変異株の作製を行った。作製したこれらの遺伝子欠損変異株を用い、Hela 細胞への付着能検証を行った。以下に細菌を 60 分間、120 分間感作させた時の細胞への細菌の付着能の結果を示す。



以上の結果より、Hela 細胞への付着に関して *wapA* を欠損させた遺伝子変異株は、*sortase* 遺伝子欠損変異株の付着能と類似した傾向を示した。これより、Sortase 依存性のタンパクとして、WapA が主導的な役割を担っている可能性が示唆された。

これまでの検証結果をまとめると、*S. mutans* UA159 野生株において、菌体表層に発現するタンパクが細胞への付着に関与することが明らかになった。さらに菌体内で生成されたタンパクの菌体表層への局在化には Sortase が関与し、Sortase 依存性のタンパクのうち、Hela 細胞への付着に関して WapA が重要な役割を担っている可能性が示唆された。

今後は、実際の *S. mutans* の全身への感染経路を考慮し、血管内皮細胞への付着能検証や血清に対する抵抗性検証、また細胞への付着に関与する標的遺伝子を強発現させたコンプリメント株の作製を行い *in vivo* における検証も合わせて行う予定である。

## 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)

[学会発表] (計 1 件)

藤島慶、徳田雅行、鳥居光男，全身疾患に影響を及ぼす *Streptococcus mutans* 新規病原性因子の解析 第 141 回 日本歯科保存学会秋季学術大会 山形テルサ (山形県山形市) 2014 年 10 月

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤島 慶 (FUJISHIMA KEI)

鹿児島大学・医歯学域 歯学系・助教

研究者番号：50553153