

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11421

研究課題名(和文) 口腔アンギノースレンサ球菌による深部感染症の発症機構の解析と宿主リスク評価法

研究課題名(英文) analyses of infection in human organ by anginosus group streptococci and assessments of infectious risk factor

研究代表者

山口 泰平 (Yamaguchi, Taihei)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授

研究者番号：80230358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：インターメディウスレンサ球菌を用いて表層線毛を精製した。また、本線毛の1成分である組み換えSaf2、Saf3も用いた。これらをリガンドにしたアフィニティビーズを作成し、マウス肝臓中の結合物質を検索したところ、結合はSaf2で起こっており、カルバモイルリン酸合成酵素が同定された。相同性検索では、レンサ球菌の表層タンパクが抽出され、立体構造の解析から相同性を示すのはSaf2分子の中程よりやや下流域の65アミノ酸の部分に相当した。

研究成果の概要(英文)：The particular cell-surface fimbriae was purified from a *Streptococcus intermedius* strain. In this study, Saf2 and Saf3 proteins which were structural component of the fimbriae, were also used for making affinity agarose beads as ligand. Carbamoyl phosphate synthase was identified as Saf2-binding molecule by affinity purification technique from liver extract. Homologous search provided four molecules of other streptococcus species, and functional domain for adherence was identified in the short peptide composed of 65 amino acids located a little down-stream from mid-point of Saf2 protein.

研究分野：予防歯科学

キーワード：口腔常在菌 日和見感染 レンサ球菌 深部臓器感染 線毛 表層タンパク 付着因子

1. 研究開始当初の背景

現在では化学療法が発達し、細菌感染症は以前のような脅威ではなくなった。しかし耐性菌の出現により、これまで問題にならなかった弱毒菌を含めて、新たな脅威が生じている。ヒト口腔常在菌叢の主構成成分はレンサ球菌であるが、これらはデンタルカリエスの原因になるだけでなく、基礎疾患を有しているヒトでは肺炎、心内膜炎、髄膜炎、各種の膿瘍などの日和見感染をひき起こすことが知られている。我々は長年、口腔アンギノサスグループレンサ球菌のひとつであるインターメディウスレンサ球菌について病原性の研究を進めてきた。本菌は重度う蝕による根尖膿瘍だけでなく、肺炎の原因になったり、脳や肝臓で膿瘍を形成することが報告されている。実際、鹿児島大学附属病院でも年数件の報告がある。病態の解明、診断、予防法、治療法の確立には分子レベルでの解析が不可欠である。本菌の病原因子はいくつか報告があるものの、実際の感染、発病に際しての分子機構の解析は未だ不明瞭である。細菌感染の成立においては菌体側、宿主側双方について定着因子の解析がされ、相当数の研究が蓄積されている。これらの知見に基づいてカギとカギ穴の関係で定着機構が説明されることが多い。我々もインターメディウスレンサ球菌について菌側の付着因子が菌体表面の線毛であること、宿主側因子は唾液凝集素であることを示した。さらに口腔内常在菌の多くが唾液凝集素を介した口腔組織への定着・感染機構を利用していることが確認されている。

遺伝子解析の結果、本線毛は少なくとも5つの遺伝子のクラスターからなり、ソーテースC酵素によりコアタンパク Saf3 が縦列に重合して巨大な線毛構造を形成していた。さらに変異体を使った実験から、このコアタンパクが唾液凝集素を認識していることが判明した。しかし、上記した宿主の各臓器への感染機構はほとんどわかっていない。他の菌種を使った既報では付着機能はコアタンパクではなく線毛の先端に位置するチップタンパクに存在していた。そこで、インターメディウスレンサ球菌でも線毛のチップタンパクと思われる Saf2 に宿主への付着機能があり、深部感染に関与している可能性が示唆された。なお Saf1 は転写制御因子であ

ることが分かっている。

脳や肝臓の膿瘍で分離される菌はアンギノサスレンサグループレンサ球菌の中でもインターメディウスレンサ球菌が優位を占めている。これまでの研究から本研究の対象である線毛は遺伝子、タンパクの両方でインターメディウスレンサ球菌に局限しており、このことから宿主の深部感染への本線毛の関与が示唆されている。

2. 研究の目的

これまでの研究により、口腔インターメディウスレンサ球菌の臨床分離株から線毛を同定、精製し、遺伝子情報まで決定していた。構成遺伝子を操作した変異体の解析からコアタンパク Saf3 に唾液凝集素への結合能が確認できたが、本来付着因子であるはずの線毛先端に位置するチップタンパク Saf2 の役割は未確認であった。本研究では、Saf2 タンパクが脳、肝臓などへの宿主深部への感染症の成立に重要な働きをしている、との仮説に基づき役割を解析していくことを目的とした。

本研究の第1の目的での第1段階は Saf2 タンパクの形態学的同定である。既報の他のグラム陽性菌の研究から Saf2 が対象の線毛のチップタンパクである可能性は非常に高い。しかしチップタンパクは既知の遺伝子クラスターの最下流に存在する srtC よりも下流に未同定の遺伝子として存在している可能性は否定できなかった。このため、形態的に Saf2 タンパクがチップタンパクであることを確認する必要があった。このためには免疫学的手法を用いた電子顕微鏡による観察により確認が可能である。一方で Saf1 よりも上流域は長い遺伝子のない領域が存在しており、この領域にチップタンパクはないものと考えた。

第2段階はチップタンパク(まず間違いなく Saf2 タンパクだと考えている)の宿主側の標的物質を同定することであった。感染宿主の病変でも特定の臓器に局限して病変を作るのは、これらの細胞が特異的に標的物質を有していることを示唆している。この目的には遺伝子操作により作成したチップタンパクを精製して、これに付着する宿主細胞成分を精製、同定する。この段階で細菌側付着因子と宿主側標的因子を決定できるので、

分子構造解析を行うことで両分子間の結合機構を解析した。

本研究の第2の目的は宿主の深部感染に関する主要な病原因子の同定である。アンギノーサスグループレンサ球菌では、これまでに10数個の病原因子が報告されているが、実際の疾病において主要な働きをしている因子はよく分かっていない。このため、深部感染症の患者さんから分離した菌株について、本線毛を含めた既報の病原因子の存在をスクリーニングすることで、病気との関連付けを行った。

本研究の第3の目的はヒトの口腔検体を非検材料として、本線毛あるいは上で調べた病原因子を持った菌株をスクリーニングすることで、リスク判定をすることであった。口腔常在菌叢の細菌構成は個人間でかなりの相違が報告され、その多くは生涯を通じてよく保存されている。このため、発症前に個人について特定の病原因子を持つ細菌を保有しているかどうかの情報は、その後のリスク、予後を判定する上で有効である。

3. 研究の方法

菌体表層の付着物質 Saf2 の組換えタンパク精製：使用するインターメディウスレンサ球菌の線毛遺伝子である saf クラスターは既に同定済であった。この中で Saf3 はコアタンパクであることが分かっているので、もうひとつの細菌細胞壁結合配列を持つ Saf2 に注目した。この遺伝子配列も分かっているので (AB326213) この情報と、親株の DNA を基にして組換えタンパクを作成した。方法は標準的な大腸菌を用いた系を用いた。発現した組換えタンパクはタグを使って精製した。

Saf2 タンパク質に対する抗体の作成：精製タンパクはマウスに数回皮下注射して抗体を作成する。

チップタンパクとしての Saf2 の同定：作成した抗体を用いて免疫染色法にて Saf2 の局在を確認する。方法として電子顕微鏡による免疫金染色法を予定している。

感染宿主の標的物質の同定：組換え Saf2 タンパクを合成樹脂ビーズに化学的に結合したアフィニティビーズを作成する。マウスの各臓器を摘出して溶解液中ですり潰すことにより抽出液を調整する。先に作成したビーズにより結合物質を精製する。得られた物

質は質量分析によりデータベースと照合して同定し、標的物質とする。

Saf2 タンパクと宿主標的物質の結合機構の解析：宿主標的物質が同定されれば、遺伝子情報がデータベースより得られるので、市販のヒトおよびマウス組織由来の RNA を基にして組換え標的タンパクを作成する。さらに部分変異を導入したタンパク、部分タンパクを作成して Saf2 タンパクとの結合機構を解析する。結合実験系は ELISA 法のような免疫学的方法、表層プラズモン共鳴法を用いる。

プロテオーム解析による結合機序の解析：上の実験で得られた結果から結合様式をコンピューターによる分子モデリングによって解析する。Saf2 タンパクと本研究で同定された標的物質の構造シミュレーションを行うことで結合メカニズムを解析する。これらの結果から、再度部分タンパク、変異導入により詳細な結合機序の解析を行う。

白血球の貪食抵抗性の評価：細菌の表層線毛のもう一つの主要な役割として白血球抵抗性があげられる。生体の深部組織に侵入するには宿主の抵抗因子として白血球が主要な役割を果たしている。そこでヒト末梢血あるいは分離した白血球と、野生型あるいは線毛の各成分を欠失した変異体を混合することで、生き残った細菌を比較することで抵抗性を評価する。また、血清の成分を線毛が結合して異物としての認識を逃れている機構が他菌種で報告されている。この場合は組換え線毛タンパク Saf2, Saf3 に付着する血清成分を上記の方法で精製、同定する方法、あるいは直接、血清をカラムにより各成分に分離して、それぞれを細菌と白血球の貪食実験系に加えて効果のある成分を同定する。ただし本活性はない可能性もあり得る。

深部感染症に関連する病原因子の特定および検査法の確立：アンギノーサスグループレンサ球菌は既にいくつかの病原因子が報告されている。しかし、解析は試験管レベルで行われており、実際の生体での作用は明らかではない。鹿児島大学附属病院では年に数件の深部膿瘍の患者さんを受け入れている。これらの中にはアンギノーサスグループレンサ球菌が分離される例が珍しくなく、一部の症例では患部由来の分離菌を保存している。そこで、これらの原因菌を用いて既報の

病原因子について遺伝子解析を行って関連性を評価する。対照は当該の患者さん、あるいは健常人の口腔由来の同菌種を利用する。原因菌と対照菌を比較することにより病変に関与する因子の特定ができるものと予想される。主要な病原因子を有する菌株を各個人が口腔内に保有しているかどうかを、口腔材料（唾液、歯垢、舌苔）を用いた遺伝子診断によるスクリーニングをすることにより、将来の深部膿瘍発生の個人レベルでのリスク判定、診断が可能な検査方法として確立する。

4. 研究成果

用いた細菌はインターメディウスレンサ球菌で以前に当教室で小児口腔から分離したものを用いた。表層線毛は以前報告した方法で精製した。また、本線毛の1成分である組み換え Saf2 タンパク質は、本研究が始まる以前に、元菌の DNA を用いて、PCR により該当する遺伝子を増幅して発現ベクターに組み込んで、大腸菌で発現、冷凍保存していたものを、精製した。

この精製 Saf2 タンパクをリガンドにしたアガロースビーズを作成した。本研究では肝臓の膿瘍形成能に焦点を当てたため、本研究が始まる以前から保存しておいたマウスの肝臓抽出液を出発材料として用いた。この抽出液を作成したアフィニティビーズと混合した後、洗浄して付着しなかった成分を除去した。溶液の pH を低くすることでビーズと結合していた成分を溶出、精製することができた。SDS-PAGE による分析では分子量は 15 万程度であった。当該のバンドを切り抜き、トリプシンで消化した後、質量分析にかけたところ、肝臓のミトコンドリア内に存在するカルバモイルリン酸合成酵素と同定された。同様な方法で精製線毛をリガンドとしたアフィニティビーズを用いた場合でも、同じくカルバモイルリン酸合成酵素が同定された。一方で Saf3 のビーズを用いた場合には結合物質は検出されなかった。このことから Saf2 が結合に関与していることが示唆された。

肝臓の抽出液を ELISA プレートに吸着、固相化した後、ラベルした菌混濁液を加えて結合試験を行ったところ、量依存的に付着量が増した。この反応中に精製線毛を加えたところ、やはり量依存的に付着量に阻害効果が見られた。さらに阻害物質としてリコンビナント Saf2 や Saf3 を加えた場合は saf2 では阻害がかかるものの、Saf3 ではそのような効果は認められなかった。この結果からも、結合には Saf2 が関与していることが示唆された。

そこで Saf2 のアミノ酸配列データを 3 次元立体構造解析して、相同性を示す物質をデ

ータベースで検索したところレンサ球菌の表層タンパク 4 種類が抽出された。これらはいずれもコラーゲン結合性、フィブロネクチン結合性を示す付着因子であった。立体構造の解析から相同性を示すのは Saf2 分子の中心よりやや下流域の 65 アミノ酸の部分に相当した。

本菌による人での肝臓膿瘍が文献報告され、また、鹿児島大学病院でも実際に患者に遭遇するが、通常は健康な人でいきなり発症することは考え難い。上述のようにカルバモイルリン酸合成酵素は通常は肝臓細胞中のミトコンドリア中に局在しており、体内に侵入したレンサ球菌に直接晒されることはない。一方で急性肝炎を発症した状況では肝臓の細胞が破壊されるため、周辺組織に漏れ、一部は血中に入ることから血中濃度の上昇が報告されている。そのことから、障害を受けた肝臓にレンサ球菌が到達することで細胞外に高濃度に溶出した標的分子（カルバモイルリン酸合成酵素）に付着、定着し、感染が成立するモデルが考えられる。急性肝炎についてはラットで実験モデルが報告されており、今後、この系を使って、得られた分子モデルが実際に生体で機能するかどうか検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- (1) 山口泰平、五月女さき子、西山毅、長田恵美、小幡純子、中野由、濱田 佳菜子、橋口千琴、峰元里子、田中謙光、上川義昭、久米健一、山本芳丈、稲田絵美、是枝 清孝、吉田礼子、森和代、堀之内美帆、福重雅美、下田平貴子、於保孝彦 医科歯科連携 歯のチェック室のあゆみ - 鹿児島大学歯学部紀要 38, 51-54 (2018) (査読なし)
- (2) 山口泰平 鹿児島大学病院における周術期口腔機能管理の現状と展望 - 鹿児島大学歯学部同窓会誌 26, 43-44 (2017) (査読なし)
- (3) 山口泰平 医科歯科連携医療 新たなシステム作りに向けて - 鹿児島大学同窓会連合会報 24, 15 (2017) (査読なし)
- (4) Kazuyo Mori, Miho Horinouchi, Ayumi Domitsu, Takako Shimotahira, Sakiko Sou tome, Taihei Yamaguchi, Takahiko Oho

Proper oral hygiene protocols decreased inflammation of gingivitis in a patient during chemotherapy with bevacizumab: a case report Clin. Case Reports 5, 1352-1357 (2017) doi:10.1002/ccr3.1034 (査読あり)

〔学会発表〕(計 6 件)

- (1) 山口泰平、於保孝彦 造血細胞移植後に発生する口腔粘膜炎に対する咬傷の影響についての考察 日本口腔ケア学会 2018年4月28日 (福岡)
- (2) 帆北友紀、山口泰平、森和代、於保孝彦、下田平貴子 右上顎癌に対して化学放射線併用療法実施後に重度の口腔粘膜炎を呈した1症例 日本口腔ケア学会 2018年4月28日 (福岡)
- (3) 山口泰平、於保孝彦 鹿児島大学病院における「歯のチェック室」の運用状況についての考察 日本口腔ケア学会 2018年4月23日 (沖縄)
- (4) 森和代、堀之内美帆、堂満愛弓、下田平貴子、山口泰平、於保孝彦、五月女さき子 ベパシズマブ投与により歯肉炎増悪をなした症例への口腔ケア介入 日本口腔ケア学会 2016年4月23日 (千葉)
- (5) Shimonaga S, Nakamura N, Kamijo Y, Arima K, Yamaguchi T. Analysis of cholesterol recognition mechanism *Streptococcus intermedius* Protein Discovery Summit 2016, 4th Protein Expression, Purification & Characterization Conference December (2016) USA
- (6) 下長奏介, 中村信孝, 外川内亜美, 上條陽平, 有馬一成, 山口泰平 *Streptococcus intermedius*が産生する溶血毒素 Intermedilysinのコレステロール認識機構の解析 平成28年度日本生化学会九州支部例会 2016年5月 (鹿児島)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: 新規なペプチド (又はその塩) 並びにそれを含む線維芽細胞増殖促進剤及び線維芽細胞又は軟骨細胞におけるエラスチン産生促進剤 (17P006)
発明者: 有馬一成、山口 泰平、小峯卓士、

宅野美月
権利者:
種類:
番号: 整理番号: 29NK999
出願年月日: 2016年9月5日
国内外の別: 国内のみ

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

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
有馬 一成 (ARIMA, Kazunari)
鹿児島大学・理工学研究科・准教授
研究者番号: 70332898

(3) 連携研究者
()

研究者番号:

(4) 研究協力者
()