

平成 21 年 6 月 29 日現在

研究種目：基盤研究 (C)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18592010
 研究課題名 (和文) 心内膜炎病原因子候補, *S. mutans* のコラーゲンアドヘシン (Cnm) の機能解明
 研究課題名 (英文) Distribution and Functional analysis of the Cnm homologue in mutans streptococci
 研究代表者
 山本 康人 (YAMAMOTO YASUHITO)
 東京歯科大学・歯学部・助教
 研究者番号：80200848

研究成果の概要：

グラム陽性菌のコラーゲン結合アドヘシンには、これらでよく保存されている基本構造があり、CBD (Collagen-binding domain) を含む A ドメインと、それに続く繰り返し配列からなる B リピード領域がそれである。*S. rattii* 107P 株よりクローニングした *cnm* ホモログは、*S. mutans* の Cnm と CBD で高い相同性 (75%超) を示しながらも下流に認められる B リピード領域では、違いがみられ、菌体の細胞外マトリックス (ECM) 成分への結合活性も異なっていた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	2,100,000	0	2,100,000
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	420,000	3,920,000

研究分野：微生物の分子生物学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔細菌、遺伝子、タンパク質、発現制御、感染症、細菌性心内膜炎、mutans streptococci、WAP (Wall-anchoring protein)

1. 研究開始当初の背景

申請者らが cold agglutination (Todd-Hewitt 液体培地で静止期まで培養した菌体を 4℃に 8 時間前後静置すると凝集塊が形成される) と呼ぶ現象は、*S. mutans* の *cnm* 遺伝子陽性株 (当研究室で保存している文献株 14 株中の 5 株; 陽性率 35.7%) では必ず観察されるが、現在までに報告されているコラーゲン結合アドヘシタンパクをもつグラム陽性菌 5 菌種からは、この現象

についての報告はない。しかし、サザンブロットハイブリダイゼーション分析の結果、cold agglutination を示さない *Streptococcus retti* (*S. retti*, 旧 *S. rettus*) FA-1 株および 107P 株が、*cnm* 遺伝子のホモログをもつことが示唆された。よって、*S. retti* から *cnm* 遺伝子のホモログを同定し、これと *cnm* を比較しその違いから cold agglutination 現象をになっている Cnm タンパクの構造的な特徴を明らかにす

る。また、*cnm* 遺伝子を保有し Cnm を菌体表層に発現することは cold agglutination を起こすための必要条件であるが、十分条件ではないことも考えられる。即ち cold agglutination という現象には、Cnm を含む菌体表層のいくつかの因子が関与しているのかもしれない。この点についても、*S. retti* の *cnm* 遺伝子ホモログの機能を解析し、これを *S. mutans* のそれと比べることによって明らかにすることができる。

多くの *S. mutans* 臨床分離株 (200 株以上) を用いて、*cnm* 遺伝子保有の有無と菌体のコラーゲンおよびラミニンに対する結合活性を試験する。これによって、*cnm* 遺伝子のミュータンスレンサ球菌 (*mutans streptococci*) における分布状況およびその結果と各株菌体のコラーゲンおよびラミニンに対する結合活性との間の相関を把握する。また、各株を糖鎖抗原に由来する血清型に分類し、これと *cnm* 遺伝子保有の有無との間での相関も調べる。

2. 研究の目的

申請者らは、*Streptococcus mutans* (*S. mutans*) Z1株から細胞外マトリックスタンパク、特にコラーゲンとラミニンに対し強い結合活性を有する新たな WAP (Wall-anchoring protein) をコードする遺伝子として *cnm* を分離した (*Microbiol Immunol*, 48(6): 449-456, 2004; *J Dent Res*, 83(7): 534-539, 2004)。従来 *S. mutans* では、コラーゲンやラミニンに対し強い結合活性を示す WAP の存在が報告されていなかったため、

申請者らはこの Cnm タンパク (*cnm* 遺伝子産物) を、細菌性心内膜炎の新たな病原因子候補として注目した。また、Cnm 内で Collagen-binding domain (CBD) として機能する領域は、現在までに報告されている細菌のコラーゲン結合アドヘンシタンパク 5種のなかで、Cna (*Staphylococcus aureus* の病原因子) の CBD との間で最も高い相同性 (54.8% identity) を有しており、このことから Cnm が病原因子である可能性が示唆された。

申請者らは、*in vitro* および *in vivo* での実験をとおして *S. mutans* Cnm の機能を解析し、細菌性心内膜炎発症過程への Cnm の関与の有無とその機序を明らかにする。

3. 研究の方法

申請者らが cold agglutination (Todd-Hewitt 液体培地で静止期まで培養した菌体を 4℃に 8 時間前後静置すると凝

集塊が形成される) と呼ぶ現象は、*S. mutans* の *cnm* 遺伝子陽性株 (当研究室で保存してある文献株 14 株中の 5 株; 陽性率 35.7%) では必ず観察されるが、現在までに報告されているコラーゲン結合アドヘンシタンパクをもつグラム陽性菌 5 菌種からは、この現象についての報告はない。しかし、サザンブロットハイブリダイゼーション分析の結果、cold agglutination を示さない *Streptococcus retti* (*S. retti*, 旧 *S. rettus*) FA-1 株および 107P 株が、*cnm* 遺伝子のホモログをもつことが示唆された。よって、*S. retti* から *cnm* 遺伝子のホモログを同定し、これと *cnm* を比較しその違いから cold agglutination 現象をになっている Cnm タンパクの構造的な特徴を明らかにする。また、*cnm* 遺伝子を保有し Cnm を菌体表層に発現することは cold agglutination を起こすための必要条件であるが、十分条件ではないことも考えられる。即ち cold agglutination という現象には、Cnm を含む菌体表層のいくつかの因子が関与しているのかもしれない。この点についても、*S. retti* の *cnm* 遺伝子ホモログの機能を解析し、これを *S. mutans* のそれと比べることによって明らかにすることができる。

グラム陽性菌のコラーゲン結合アドヘンシタンパクには、これらでよく保存されている基本構造があり、CBD (Collagen-binding domain) を含む A ドメインと、それに続く繰り返し配列からなる B リピート領域がそれである。*S. mutans* Z1 株 Cnm の B リピート領域は、7 アミノ酸残基 (TTTTE・K/A・P) からなる単位の 2 回繰り返し構造と、6 アミノ残基 (TTTE・A/S/T・P) からなる単位の 19 回繰り返し構造からなる。

このうち、6 アミノ酸残基からなる単位の繰り返し回数・19 回を減じた変異株を、*cnm* 遺伝子を保有しない *S. mutans* UA159 株を親株とし、この菌の *cnm* 遺伝子欠失領域 (前年度までの成果として明らかにされた) に、繰り返し回数が減数処理された *cnm* 遺伝子とそのプロモーター領域を 2 点組換え形質転換によって導入することで作製する。繰り返し回数が減数処理された *cnm* 遺伝子は、5' 端に 20 塩基からなる粘着末端をもつ特別なプライマーを用いた複数回の PCR によって作製し、形質転換に必要な UA159 株ゲノム上の *cnm* 遺伝子欠失領域外側の塩基配列と共にプラスミド上にクローニングし、制限酵素で消化された断片を変異株の作製に用いる。こうして作製された変異株を用い、ELISA 法による全菌体のコラーゲンおよびラミニンに対する結合活性試験と cold agglutination 現象試験を行い、Cnm の B リピート領域の機能を解析

4. 研究成果

S. mutans Z1株からクローニングしたコラーゲンアドヘシスをコードする遺伝子 *cnm* の保有についての網羅的検索結果は、この遺伝子が *mutans streptococci* で普遍的に保存されていないことを明らかにし、さらに、*cnm* が存在する領域についても多型があることを示唆していた。また、前年度に *S. rattii* 107P株よりクローニングした *cnm* ホモログには、*S. mutans* の Cnm とコラーゲン結合領域(CBD)では高い相同性(75%超)を示しながらも CBD の下流に認められるアミノ酸残基の繰り返し配列(Bリピート領域)において、リピートユニットの長さや繰り返し回数に違いがみられた。この Bリピート領域での違いと菌体の細胞外マトリックス(ECM)成分への結合活性の関連を調べる第一段階として、*S. rattii* 107P株および 107P株と同様に *cnm* ホモログの存在が確認された *S. rattii* FA-1株を供試菌とし、ELISA 法による菌体のECM 成分(コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチン)への結合活性試験を、*S. mutans* Z1株をポジティブコントロール、05A02株(Z1株を親株とする *cnm* の欠失変異株)をネガティブコントロールとして行った。この結果、*S. rattii* 107P株および FA-1株の菌体はともにコラーゲンに対しては *S. mutans* Z1株と同程度によく結合するが、ラミニンおよびフィブロネクチンには結合活性を示さなかった。このことは、*S. mutans* Z1株と *S. rattii* 107P株菌体のECM 成分への結合活性に、コラーゲンアドヘシスの Bリピート領域の違いが影響をおよぼしている可能性を示していた。さらに、*S. rattii* 107P株および FA-1株と *cnm* の欠失変異株である 05A02株が cold agglutination 現象を起こさないことから、この現象に対する Bリピート領域の関与も示唆された。

グラム陽性菌のコラーゲン結合アドヘシンには、これらでよく保存されている基本構造があり CBD (Collagen-binding domain)を含む Aドメインと、それに続く繰り返し配列からなる B リピート領域がそれである。*S. mutans* Z1株 Cnm の B リピート領域は、7 アミノ酸残基(TTTTE・K/A・P)からなる単位の 2 回繰り返し構造と、6 アミノ残基(TTTE・A/S/T・P)からなる単位の 19 回繰り返し構造からなる。このうち、6 アミノ酸残基からなる単位の繰り返し数:19 回を減じた変異株の作成を、*cnm* 遺伝子を保有しない *S. mutans* UA159 株を親株とし試みた。B リピート領域の繰り返し数を減数処理した数種の *cnm* 遺伝子のプラスミド上へのクローニングは、当初の理論的な見通しとは異なり困難な道のりとなり、未だ全菌体を用いた結合活性試験に供することが出来る変異株を得ていない。同様に、前年度までに同定した他のミュータンスレンサ球菌の Cnm ホモログについても、その B リピート領域の繰り返し数を減数処理して *S. mutans* UA159 株への形質転換を試みたが、こちらの結果も同様であった。*S. rattii* 107P 株よりクローニングした *cnm* ホモログは、*S. mutans* の Cnm と CBD で高い相同性(75%超)を示しながらも下流に認められる B リピート領域では、リピートユニットの長さや繰り返し数に違い{(T)TTTE(A/G/K/T/V)P/S

からなり繰り返し数:31回}がみられ、菌体の細胞外マトリックス(ECM)成分への結合活性も異なっていた。*S. rattii* 107P 株のコラーゲンに対する結合活性は *S. mutans* Z1 株のそれと同程度であるが、ラミニンやフィブロネクチンには結合せず、また、cold agglutination 現象も起こさないことから、この現象に対する B リピート領域の関与が強く示唆された。

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 0件)

[学会発表] (計 1件)

- ① 山本 康人、佐藤 裕、木崎 治俊、*Streptococcus rattii* からの *cnm* ホモログの同定
第 48 回歯科基礎医学会学術大会、平成 18 年 9 月 21 日～23 日、鶴見大学・歯学部 (横浜市)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 康人 (YAMAMOTO YASUHITO)
東京歯科大学・歯学部・助教
研究者番号：80200848

(2) 研究分担者

佐藤 裕 (SATO YUTAKA)
東京歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：70085827
*平成18年度～平成19年度

(3) 連携研究者

佐藤 裕 (SATO YUTAKA)

東京歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：70085827
*分担研究領域が終了していたので、
平成20年度より連携研究者とした。