

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09560

研究課題名(和文) 口腔レンサ球菌の感染に関わる新規病原因子の分子生物学的解析とその多様性の解明

研究課題名(英文) Molecular biological analysis and investigation of diversity regarding the de novo virulence factors associated with oral streptococcal infections

研究代表者

高橋 幸裕 (Yukihiro, Takahashi)

日本歯科大学・生命歯学部・教授

研究者番号：00281436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、う蝕と歯周病、さらには感染性心内膜炎など歯性感染症の原因となる口腔バイオフィーム(デンタルプラーク)形成の初期に歯に付着する口腔レンサ球菌のHsaアドヘジン(付着因子)を同定した。この研究の目的は、Hsaを含むこれらアドヘジンの多様性を解明することである。ヒト口腔サンプルから190株の口腔レンサ球菌を分離し解析した結果、Hsaの非繰り返し領域(NR2)は、赤血球凝集活性に何らかの関連があること、*Streptococcus gordonii* と同定された株でHsaと類似のタンパク質が存在する可能性が高いこと、NR2領域の推定アミノ酸配列は他の領域に比べて多様であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔レンサ球菌は、う蝕と歯周病、さらには感染性心内膜炎など歯性感染症の原因となる口腔バイオフィーム(デンタルプラーク)の初期形成に関与しているため、この研究のような付着因子の多様性の解明は、初期口腔バイオフィーム形成に関わる分子間結合様式の解明に寄与し、新たなプラークコントロール法の開発およびデンタルプラークをサンプルとした口腔バイオフィーム形成能および感染性心内膜炎病原性を評価する手段として臨床応用できる可能性を示すことができる。

研究成果の概要(英文)：Mitis group streptococci are the early colonizers of oral biofilms. Hsa adhesin of *Streptococcus gordonii* DL1 has the strong binding ability to the terminal sialic acid groups of host glycoproteins via the binding region, NR2, which is important for the pathogenicity of this organism. In this study, we isolated 186 wild-type strains of oral streptococci from healthy volunteers, and indicated certain relationship between the expression of NR2 region and the sialic-acid binding activity, detected by anti-NR2 antibody and by hemagglutinating activity, respectively. We also showed that *S. gordonii* strains were more likely to contain Hsa adhesins, and that the deduced amino acid sequence of the NR2 region was more diverse than the other regions. These results provide new insight into the adhesion process of oral streptococci.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：口腔レンサ球菌 アドヘジン 多様性 バイオフィーム 病原因子 デンタルプラーク 感染性心内膜炎

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

(1) 一般的背景

我が国において、う蝕と歯周病は、依然として歯科における2大疾患で、歯の喪失の主要な要因である。口腔レンサ球菌など特定の口腔細菌はそれらの病原体であり、これらの細菌が定着し、口腔バイオフィーム、すなわちデンタルプラーク（歯垢）を形成することが、う蝕および歯周病発症の最初のステップとして必須である。さらに、これら口腔バイオフィームを形成する口腔常在菌は、感染性心内膜炎や誤嚥性肺炎など、他臓器の感染症の原因菌として歯学・医学領域において注目されている。ペリクルを介して最初に歯に付着するのは、*Streptococcus gordonii* などのミティス群口腔レンサ球菌である。それらの付着および口腔内への定着には、数種のアドヘジン（付着因子）が重要な役割を演じている。1980年代から90年代にかけて多くの研究者によって研究されてきたのが、antigen I/II、およびLraiファミリーである[Nobbs *et al.* (2009), 高橋ほか総説 (2013)]。

(2) 申請者および共同研究者のこれまでの研究成果

申請者らは、antigen I/II、およびLraiファミリーとは構造および機能の異なる*S. gordonii* シアル酸結合性アドヘジン（Hsa）を世界に先駆けて同定し[Takahashi *et al.* (1997), Takahashi *et al.* (2002)]さらに① Hsa アドヘジンは、2,178 アミノ酸からなるセリンに富んだ長い繰り返し領域を持つ巨大な糖タンパク質であること[Takahashi *et al.* (2004)]、② ムチンをはじめシアル酸を末端に持つ宿主複合糖質に特異的に結合すること[Takahashi *et al.* (2002), Urano-Tashiro, Takahashi *et al.* (2016) ほか]、③ 感染性心内膜炎の発症に関与すること[Takahashi *et al.* (2006)]を明らかにした。また、申請者らの研究により、*S. gordonii* 以外でも、菌種・属を超えて、Hsa のホモログ（類似タンパク質）を持つ菌種があること、Hsa の宿主レセプターとの結合部位である NR2 領域では菌種間で類似性が低いことが示された[高橋ほか総説 (2013)]。最近申請者らは、口腔サンプルから、ヒト口腔に常在するレンサ球菌を新たに分離し、Hsa ホモログと、バイオフィーム形成能、赤血球凝集活性（シアル酸結合性および感染性心内膜炎病原性の指標となる）を比較した。その結果、Hsa ホモログを持つ株が持たない株よりバイオフィーム形成能が高い傾向にあるが、ホモログを持つ株間でもバイオフィーム形成能に差があること[Oguchi *et al.* (2017)]が明らかとなった。しかしながら、同菌種および他菌種の Hsa アドヘジンのホモログについて、その多様性と付着特異性などの病原性との関連についての研究はなされていない。

2. 研究の目的

この研究では、異なる野生菌株間での Hsa ホモログの多様性に関する詳細な解析を試みる。これら多様性の解明は、初期口腔バイオフィーム形成に関わる分子間結合様式の解明に寄与し、新たなプラークコントロール法の開発および口腔バイオフィームの病原リスクを評価する手段としての臨床応用が期待される。

3. 研究の方法

(1) サンプル採取と細菌株の分離：日本歯科大学生命歯学部学生、日本歯科大学大学院生命歯学研究科大学院生、日本歯科大学生命歯学部教職員および日本歯科大学附属病院に来院する患者よりデンタルプラークを採取した。なお、サンプル採取にあたっては、日本歯科大学生命歯学部倫理審査委員会の承認（NDU-T2018-46）を得ている。また、利益相反がないことを同委員会に申告している。採取したデンタルプラークを mitis-salivarius agar (Difco, Becton-Dickinson and Company, Sparks, MD, USA) に塗布し 37°C 48 時間培養した。得られたコロニーをさらにヒツジ血液寒天培地（コージンバイオ）に塗布し、単集落分離を行った。翌日コロニーを採取し、brain-heart infusion broth (Difco) で 37°C 一晚培養したものを臨床分離株として凍結保存した。

(2) 菌種の同定：Rapid ID32 Strep Api（シスメックス）のレンサ球菌および関連菌種の同定キットを用いて、酵素反応と専用データベースによる同定を行った[Frenay *et al.* (1992)]。また、Bacteria 16S rDNA PCR kit（タカラバイオ）を用いて、細菌の 16S リボゾーム RNA 遺伝子領域内の特定領域（約 1.5kb）の PCR による増幅を行い、DNA シーケシングを受託システム（タカラバイオ）へ依頼した。得られた DNA 配列から NCBI BLAST による相同性検索を行い、菌種を同定した [Weisburg (1991)]。

(3) ヒト赤血球に対する凝集活性の測定：ヒト赤血球に対する凝集活性は、Takahashi らの方法[Takahashi *et al.* (1997)]に従って測定した。赤血球を凝集させることのできた最高希釈倍率の 2 を底とする対数を、その菌株の赤血球凝集活性とした。

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

(4) Hsa および NR2 領域の類似抗原検出：ドットプロット法 [Takahashi *et al.* (2004)] により、抗 Hsa 抗体および抗リコビナント NR2 抗体を用いた抗原検出を行った。

(5) NR2 領域のシーケンス解析：抗リコビナント NR2 抗体と反応した株 (NR2+) について、TKs Gflex™ DNA Polymerase (タカラバイオ) を用いて NR2 領域の PCR を行った。得られた PCR 産物の DNA シーケンシングを受託システム (GENEWIZ) へ依頼し、サンガー法によるシーケンス解析を行った。解析より得たシーケンスをもとに推定されたアミノ酸配列は、Genetyx® Ver.14 (ゼネティックス) を用いてデータ解析した。

4. 研究成果

(1) 菌種の同定：サンプルより 190 株の口腔レンサ球菌を分離した。*Streptococcus mitis* が 70 株、*Streptococcus salivarius* が 69 株、*Streptococcus sanguinis* が 19 株、*S.gordonii* および *Streptococcus oralis* がそれぞれ 14 株、*Streptococcus anginosus* が 4 株であった。

(2) 赤血球凝集活性：凝集活性 0~3 を Low 群、4~6 を Medium 群、7~9 を High 群とした。190 株中、Low 群が 141 株、Medium 群が 38 株、High 群が 11 株であった。

(3) Hsa および NR2 領域の類似抗原検出：ドットプロット法により、抗 Hsa 抗体のホモログが検出された株 (Hsa+) が 118 株、NR2+は 34 株であった。

(4) NR2 領域のシーケンス解析：NR2+の推定アミノ酸配列では、特定部位の変異傾向が認められた。

(5) 各項目間の分析：菌種と赤血球凝集活性の比較において、High を示した菌種別株数が最も多かったのは *S.gordonii*、ついで *S.sanguinis* であり、その他の菌種では High を示した株は認められなかった。また *S.gordonii* は High 群に属する株数が最も多く、それ以外の菌種では、Low 群の株数が最も多い結果となった (Table 1)。

Table 1. 菌種と赤血球凝集活性の比較

菌種名	総菌株数 (All) (株)	赤血球凝集活性					
		High		Medium		Low	
		菌株数 (株)	High/All	菌株数 (株)	Medium/All	菌株数 (株)	Low/All
<i>S.mitis</i>	70	N/A	-	24	34.3%	46	65.7%
<i>S.salivarius</i>	69	N/A	-	3	4.3%	66	95.7%
<i>S.sanguinis</i>	19	3	15.8%	2	10.5%	14	73.7%
<i>S.gordonii</i>	14	8	57.1%	3	21.4%	3	21.4%
<i>S.oralis</i>	14	N/A	-	6	42.9%	8	57.1%
<i>S.anginosus</i>	4	N/A	-	N/A	-	4	100.0%
Total	190	11	5.8%	38	20.0%	141	74.2%

赤血球凝集活性の程度を菌種ごとに分類し、その株数と割合を示す。「High/All」は、その菌種の株数に対して凝集活性 High を示した株数の割合、「N/A」は該当株なしを意味する。

凝集活性の程度別に Hsa+の割合を見ると、凝集活性 High、Medium、Low 共に 60~70%程度であった。その中で NR2+の割合は、High 群で 87.5%を占めており、Medium、Low 群でそれぞれ 33.3%、22.1%であった (Table 2)。

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

Table 2. 赤血球凝集活性と Hsa・NR2 領域類似抗原の比較

赤血球凝集活性	総菌株数 (All) (株)	Hsa+		NR2+	
		菌株数 (株)	Hsa+/All	菌株数 (株)	NR2+/Hsa+
High	11	8	72.3%	7	87.5%
Medium	38	24	63.2%	8	33.3%
Low	141	86	61.0%	19	22.1%
Total	190	118	62.1%	34	28.8%

それぞれの類似抗原を持つ株数を赤血球凝集活性の程度ごとに分類し、その株数と割合を示す。「Hsa+/All」はその凝集活性程度を示した株数に対して Hsa のホモログを持つ菌株数の割合、「NR2+/Hsa+」はその凝集活性程度の中で Hsa のホモログを持つ菌株数に対して NR2 類似タンパクを持つ株数の割合、「N/A」は該当株なしを意味する。

菌種と Hsa ホモログの関連では、*S.gordonii* では他の菌種と比べて最も多い 92.9% の確率で Hsa のホモログを認めた。その中で NR2+ は、*S.salivarius* および *S.anginosus* では認められず、その他の菌種では 40%~70% 程度であった (Table 3)。

Table 3. 菌種と Hsa・NR2 領域類似抗原の比較

菌種名	総菌株数 (All) (株)	Hsa+		NR2+	
		菌株数 (株)	Hsa+/All	菌株数 (株)	NR2+/Hsa+
<i>S.mitis</i>	70	34	48.6%	14	41.2%
<i>S.salivarius</i>	69	52	75.4%	N/A	-
<i>S.sanguinis</i>	19	10	52.6%	7	70.0%
<i>S.gordonii</i>	14	13	92.9%	9	69.2%
<i>S.oralis</i>	14	8	57.1%	4	50.0%
<i>S.anginosus</i>	4	1	25.0%	N/A	-
Total	190	118	62.1%	34	28.8%

それぞれの類似抗原を持つ株数を菌種ごとに分類し、その株数と割合を示す。「Hsa+/All」はその菌種の株数に対して Hsa ホモログを持つ菌株数の割合、「NR2+/Hsa+」はその菌種の中で Hsa ホモログを持つ菌株数に対して NR2 類似タンパクを持つ株数の割合、「N/A」は該当株なしを意味する。

(6) まとめ：以上の結果より、Hsa の NR2 領域が赤血球凝集活性に何らかの関連はあるが、シアル酸結合能を持つアドヘジンが存在する可能性が高い *S.gordonii* 株でも、NR2 類似抗原の保有率は他菌種に比べ顕著に高いとは言えず、NR2 領域のシーケンス解析からも推定アミノ酸配列の多様性の高さが推測された。また、NR2 領域推定アミノ酸配列に特定部位の変異が認められることから、NR2 領域内においてシアル酸結合に関与する特定の配列の存在が予測される。

<引用文献>

- 1) Freney J. *et al.* Description and evaluation of the semiautomated 4-hour rapid ID 32 Strep method for identification of streptococci and members of related genera. *J. Clinical Microbiology.* 30 (10), 2657-2661 (1992).
- 2) Hsu, S.D. *et al.* Adhesive properties of viridans streptococcal species. *Microb. Ecol. Health Dis.* 7, 125-137 (1994).
- 3) Nobbs, A.H. *et al.* Streptococcus adherence and colonization. *Microbiol Mol Biol Rev.* 73 (3), 407-450 (2009).
- 4) Takahashi, Y. *et al.* A specific cell surface antigen of *Streptococcus gordonii* is associated with bacterial hemagglutination and adhesion to α 2-3-linked sialic acid-containing receptors. *Infect. Immun.* 65, 5042-5051 (1997).
- 5) Takahashi, Y. *et al.* Functional analysis of the *Streptococcus gordonii* DL1 sialic acid-binding adhesin and its essential role in bacterial binding to platelets. *Infect. Immun.* 72, 3876-3882 (2004).
- 6) Takahashi, Y. *et al.* Identification and characterization of hsa, the gene encoding the sialic acid-binding adhesin of *Streptococcus gordonii* DL1. *Infect. Immun.* 70, 1209-1218 (2002).
- 7) Urano-Tashiro, Y. *et al.* Two arginine residues of *Streptococcus gordonii* sialic acid-binding adhesin Hsa are essential for interaction to host cell receptors. *PLoS one.* doi:10.1371/journal.pone.0154098 (2016).
- 8) Takahashi, Y. *et al.* Contribution of sialic acid-binding adhesin to pathogenesis of experimental endocarditis caused by *Streptococcus gordonii* DL1. *Infect. Immun.* 74, 740-743 (2006).
- 9) 高橋幸裕ほか. 口腔レンサ球菌のアドヘジン. *日本細菌学雑誌*, 68(2), 283-29 (2013).
- 10) Weisburg *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173 (2), 697-703 (1991).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石川結子, 才木桂太郎, 田代有美子, 山中 幸, 林田尚斗, 高橋幸裕
2. 発表標題 Analysis of diversity virulence factor associated with oral streptococcal infection
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	石川 結子 (ISHIKAWA Yuiko)		
研究協力者	才木 桂太郎 (SAIKI Keitarou)		
研究協力者	田代 有美子 (TASHIRO Yumiko)		
研究協力者	山中 幸 (YAMANAKA Yuki)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------