

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593027

研究課題名(和文) 線毛 pili から捉えなおす口腔レンサ球菌の定着戦略と病原性

研究課題名(英文) Novel pathogenicity of pili of oral streptococci

研究代表者

岡橋 暢夫 (Nobuo, Okahashi)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：40150180

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：本申請研究の結果、口腔レンサ球菌 *Streptococcus sanguinis* にはユニークな複数の線毛 pili が存在することが明らかになった。そのひとつは病原レンサ球菌の pili と明らかに異なるものであり、唾液タンパク質と結合することによってバイオフィーム形成や口腔内への定着に密接に関与している。もうひとつの線毛 PI-2 型 pili は、肺炎球菌で報告されたものと 90% 以上の相同性を有している。この 2 型 pili は、大部分の口腔レンサ球菌で保有されており、唾液アミラーゼとの結合能を有することなどから、やはり菌の定着に関与していると考えられる。

研究成果の概要(英文)： *Streptococcus sanguinis* is a major member of the oral streptococci. In this study, we identified a unique cell surface filamentous structure named pili. We found that *S. sanguinis* pili are involved in biofilm formation. Further, pili subunit proteins are shown to bind salivary proteins such as amylase and salivary mucin. Another type-2 pili was also found in *S. sanguinis*. Further study revealed that type-2 pili-expressing oral streptococci are common inhabitants in healthy human. These results suggest that pili of oral streptococci contribute to the bacterial colonization in the human oral cavity.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：pili oral streptococci

1. 研究開始当初の背景

ヒトの口腔内には多彩な細菌が定着している。その中で、*Streptococcus sanguinis* などの口腔レンサ球菌は歯面でのバイオフィルムの初期形成に最も重要な役割を果たしている。これらの口腔レンサ球菌は単なる常在菌ではなく、細菌性心内膜炎を引き起こすなど、病原レンサ球菌としての性質も備えている。最近、動脈硬化病巣から歯周病細菌のみならず口腔レンサ球菌由来の DNA もかなりの頻度で検出されることが報告され、心内膜炎以外の心血管疾患にも口腔レンサ球菌が関与している可能性が疑われている。

最近、病原レンサ球菌に pili と呼ばれる線毛が存在し、細菌の病原性に関与していることが次第に明らかになってきた。2005 年に B 群レンサ球菌に pili が存在することが報告され、引き続いて A 群レンサ球菌、肺炎球菌にも同様に pili が存在し、それぞれ病原性に重要な役割を果たしていることが次々に明らかになって病原レンサ球菌の pili が一躍脚光を浴びることになった。レンサ球菌の pili はサブユニットタンパク質が共有結合によって高分子重合体を形成するため、従来の SDS-PAGE などでは検出出来ず長い間見過ごされていたのである。

では、口腔レンサ球菌ではどうなのだろうか？ ゲノム配列データベースを調査すると、ミュータンスレンサ球菌には pili は存在しないものの、2007 年に発表された *S. sanguinis* のゲノムには肺炎球菌の pili と相同性のあるタンパク質をコードする遺伝子が存在していることが示唆された。申請者は、このタンパク質に興味を抱いて遺伝子クローニング、抗体の作成などを行い、これらの遺伝子が実際に *S. sanguinis* で転写翻訳されて菌体表層に pili が発現していることを見出した。この発見は口腔レンサ球菌の病原因子に関する従来の常識を大きく変える可能性があり、研究をさらに展開するために本研究を計画した。

2. 研究の目的

2005 年に病原レンサ球菌で新しく発見された線毛 pili は、レンサ球菌の菌体表層構造や病原性に関する従来の常識を一変させ、現在も、その機能や発現制御に関する新知見が次々と報告されている。申請者は、口腔レンサ球菌 *S. sanguinis* にも pili が存在すること、それが実際に菌体表層上に存在していることを見出した。本申請では、従来全く知られていなかった口腔レンサ球菌 pili に関して、口腔への定着、バイオフィルム形成、心内膜炎発症との関連を明らかにし、病原レンサ球菌 pili との機能上、構造上の差異や類似点を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

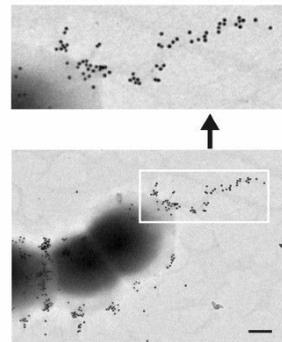
まず、pili に対する抗体を作成し、コンフォーカル観察、電子顕微鏡観察によって *S. sanguinis* 菌体上に存在する pili の構造と 3 つのサブユニットの局在を特定する。さらに、リコンビナント pili を用いて細胞マトリックスタンパク質や唾液タンパク質との結合能を検討する。また、pili 欠損株を用い、バイオフィルム形成に関する pili の関与を検討する。最後に、*S. sanguinis* 臨床分離株における pili の存在分布を PCR 法で調べ、病原性、特に心内膜炎との関連を明らかにする。

4. 研究成果

(1) *S. sanguinis* の線毛 pili の局在

S. sanguinis のゲノム配列から線毛 pili の 3 種類の pili サブユニットタンパク質 Pila, PilB, PilC に該当する遺伝子をクローニングし、それぞれのリコンビナントタンパク質を調製した。リコンビナント pili をマウスに免疫し、抗体を作製して、*S. sanguinis* における pili の局在を蛍光顕微鏡および電子顕微鏡で観察したところ、pili は菌体表層でほぼ一様に分布しており、長さは 1 - 2 μm であることが判明した (図 1)。3 つのサブユニットに対する抗体の染色像から、サブユニットのうち Pila が pili のバックボーンを形成していると考えられた。

図 1 菌体表層 pili の金コロイド電顕写真



(2) 線毛 pili の機能

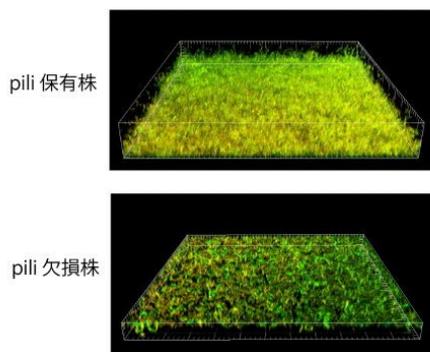
3 つの pili サブユニットタンパク質のそれぞれについて、宿主細胞への付着に関与している可能性を想定し、まず、細胞外マトリックスタンパク質の結合を調べた。リガントプロット法や BIACORE で測定すると PilC がフィブロネクチンと強く結合することが見いだされた。さらに唾液タンパク質との反応を調べたところ、PilC が複数の唾液タンパク質と結合することが分かり、そのひとつはアミラーゼであることが判明した。

(3) 線毛 pili とバイオフィルム形成

遺伝子工学的に pili 遺伝子を欠損した

S. sanguinis 変異株を作出し、そのバイオフィルム形成能を親株と比較した。唾液をコートした培養用プレート中で菌を培養してバイオフィルムを観察したところ、pili 欠損株では形成されるバイオフィルムの量が有意に減少していた(図2)。

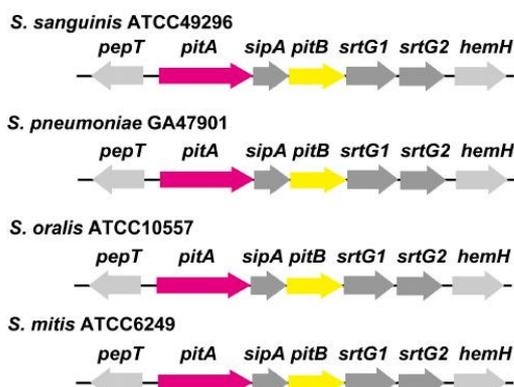
図2 バイオフィルム形成に対する pili の影響



(4) 口腔レンサ球菌における線毛 pili の検出と分布

S. sanguinis 以外の口腔レンサ球菌における pili 遺伝子の分布を調査するため、様々な口腔レンサ球菌からゲノム DNA を調製し、PCR 法で pili 遺伝子の検出を行った。その結果、*S. mutans* や *S. salivarius* からは pili 遺伝子は検出されなかった。その一方で、*S. oralis* や *S. gordonii* などミテイス群レンサ球菌には、かなりの頻度で 2 型の pili (PI-2 型 pili) の遺伝子が検出された。この PI-2 型の pili は肺炎球菌で発見されたものであるが、肺炎球菌の保有率は 20 - 30% と報告されている。一方ミテイス群口腔レンサ球菌では 60% 以上の保有率であり、保有株が広く分布していることが示唆された。また、PI-2 型の pili は 2 つのサブユニットタンパク質 PitA, PitB で構成されているが(図3) PitB も PilC 同様にフィブロネクチンと結合することが判明した。

図3 口腔レンサ球菌 PI-2 pili の遺伝子配列



3 年間にわたる研究によって、ミテイス群口腔レンサ球菌が保有する線毛 pili の病原性への関与を明らかにすることが出来た。

最も重要な知見は、口腔レンサ球菌の pili が唾液タンパク質と結合すること、バイオフィルム形成に関与していること、そして PI-2 型の pili がミテイス群口腔レンサ球菌に広く分布していることである。

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)

[雑誌論文](計 10 件)

Koide M, Kobayashi Y, Ninomiya T, Yasuda H, Arai Y, Okahashi N, Yoshinari N, Takahashi N, Udagawa N. (2013) Osteoprotegerin-deficient male mice as a model for severe alveolar bone loss: comparison with RANKL-overexpressing transgenic mice. *Endocrinol* 154:773-782.

Okahashi N, Nakata M, Sumitomo T, Terao Y, Kawabata S. (2013) Hydrogen peroxide produced by oral streptococci induces macrophage cell death. *PLoS ONE* 8:e62563.

Nemoto H, Nomura R, Ooshima T, Nakano K. (2013) Distribution of amoxicillin-resistant oral streptococci in dental plaque specimens obtained from Japanese children and adolescents at risk for infective endocarditis. *J Cardiol* 62: 296-300

Kojima A, Nakano K, Wada K, (他 10 名), Ooshima T. (2012) Infection of specific strains of *Streptococcus mutans*, oral bacteria, confers a risk of ulcerative colitis. *Sci Rep* 2 article #332.

Aikawa C, (他 10 名), Ooshima T. (2012) Complete genome sequence of the serotype k *Streptococcus mutans* strain LJ23. *J Bacteriol* 194:2754-2755.

Okahashi N, (他 7 名), Ooshima T, Nishihara T. (2011) *Streptococcus sanguinis* induces foam cell formation and cell death in association with production of reactive oxygen species. *FEMS Lett* 323:164-170.

Nakata M, (他 8 名), Okahashi N, Hamada S, Isoda R, Terao Y, Kawabata S. (2011) Assembly mechanism of FCT region of type I pili in serotype M6 *Streptococcus pyogenes*. *J Biol Chem* 286:37566-37577.

Mori Y, Yamaguchi M, Terao Y, Hamada S, Ooshima T, Kawabata S. (2011) a-enolase of *Streptococcus pneumoniae* induced formation of neutrophil extracellular traps. *J Biol Chem* 287:10472-10481.

Hoshino T, Kondo Y, Saito K, Terao Y, Okahashi N, Kawabata S, Fujiwara T. (2011) Novel epitopic region of glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. *Clin Vaccine Immunol* 18:1552-

1561.

Nakano K, (他 18 名), Ooshima T. (2011)
The collagen binding protein of *Streptococcus mutans* is involved in haemorrhagic stroke. Nat Commun 2:#485.

〔学会発表〕(計 11 件)

岡橋暢夫、中田匡宣、住友倫子、寺尾豊、川端重忠。口腔レンサ球菌が産生する過酸化水素がマクロファージの細胞死を誘導する。第 87 回日本細菌学会総会。2014 年 3 月。東京。

岡橋暢夫、沖永敏則、桜井敦朗、寺尾豊、中田匡宣、川端重忠、西原達次。過酸化水素は口腔レンサ球菌の隠れた病原因子かもしれない。第 55 回歯科基礎医学会学術総会。2013 年 9 月、岡山市。

岡橋暢夫、沖永敏則、桜井敦朗、寺尾豊、中田匡宣、川端重忠、西原達次。*Streptococcus sanguinis* はマクロファージの泡沫化と細胞死を誘導する。第 86 回日本細菌学会総会。2013 年 3 月。千葉市。

森田知里、住岡龍一、中田匡宣、岡橋暢夫、本多真理子、住友倫子、川端重忠。*Streptococcus sanguinis* の細胞架橋型ヌクレアーゼの機能解析。第 86 回日本細菌学会総会。2013 年 3 月。千葉市。

Nomura R, Nakano K, Naka S, Ooshima T. Contribution of protein antigen to *Streptococcus mutans*-induced cerebral hemorrhage deterioration. 90th General Session of the International Association for Dental Research. June 2012, Iguacu Falls, Brazil.

Okahashi N, Nakata M, Terao Y, Isoda R, Sakurai A, Sumitomo T, Yamaguchi M, Kimura KR, Oiki E, Kawabata S, Ooshima T. Pili of oral *Streptococcus sanguinis* bind to salivary amylase and promotes biofilm formation. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. September 2011, Sapporo, Japan.

Naka S, Nakano K, Nomura R, Ooshima T. Distribution of *Streptococcus mutans* strains with collagen-binding properties. 23rd Meeting of International Association of Pediatric Dentistry. June 2011, Athens, Greece.

(他 4 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
出願年月日：
国内外の別：

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

岡橋 暢夫 (OKAHASHI NOBUO)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：40150180

(2) 研究分担者

大嶋 隆 (OOSHIMA TAKASHI)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：80116003

(3) 連携研究者

()

研究者番号：