

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月31日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792111

研究課題名（和文） 黄色ブドウ球菌の口腔内定着機構の解明

研究課題名（英文） Evaluation of oral cavity-colonization mechanism in *Staphylococcus aureus*

研究代表者

松尾 美樹 (MATSUO MIKI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：20527048

研究成果の概要（和文）：黄色ブドウ球菌(Sa)の口腔内定着には、Sa の持つ定着性因子、生体因子、口腔内細菌が産生する因子の少なくとも 3 因子が関与していることが明らかになった。Sa の定着性因子として sortase 依存性菌体表層タンパク SasA を明らかにした。さらに、環境応答因子である二成分制御系因子、薬剤等の排出に関わる ABC トランスポーターの関与も示唆された。生体因子としては高分子タンパクである gp340 が SasA と結合することで生体への定着を果たすことを明らかにした。また、先天性免疫機構である抗菌性ペプチドや、他の細菌が産生する抗菌性因子に対して抵抗性を持つことが、口腔内定着に重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要（英文）： It is revealed that at least 3 factors are related to colonization in oral cavity of *Staphylococcus aureus* (Sa): colonization factor in Sa, biogenic factors, and factors produced by oral bacteria. We showed that sortase-dependent cell surface protein SasA are the colonization factor in Sa. It is suggested that environmental response factor Two-component systems and ABC transporters, which are related to the efflux the drug, are important to colonization. It is observed that binding the high molecular protein gp340, as a biogenic factors, to SasA of Sa, made it possible to Sa-colonization in oral cavity. Furthermore, it is suggested that possess the resistance against antimicrobial peptides as congenital immunity and bacteriocins produced by other bacterium play an important role to colonization in oral cavity for Sa.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科

キーワード：二成分制御系、黄色ブドウ球菌、バクテリオシン、gp340、口腔内定着

1. 研究開始当初の背景

黄色ブドウ球菌はヒトの皮膚や粘膜に常在する細菌である。最も分離頻度の高い部位は鼻前庭や鼻咽腔であり、およそ 20

～30%のヒトに定着している。その他の定着部位としては皮膚、口腔、咽頭、消化管、膣などからも分離される。しかし、一方で黄色ブドウ球菌はヒトに種々の疾患

を引き起こす主要な病原菌の1つである。本菌はヒトに種々の化膿性疾患、食中毒、腸炎、肺炎など非常に多様な疾患を引き起こす。黄色ブドウ球菌感染症の治療の際には化学療法剤が頻用されるが、特にメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) に代表されるように、 β -ラクタム剤をはじめとする多くの薬剤に耐性を示す多剤耐性菌が問題視されている。MRSA の有効な治療薬にバンコマイシンがあるが、近年この薬剤に対しても低感受性あるいは耐性を示す菌の出現が報告されている。また、これまで MRSA 感染症の多くは病院内で起こる院内感染型であったが、入院などの医療行為の既往のないヒトに感染症を起こす市中型の MRSA の出現も問題視されている。歯科領域においても黄色ブドウ球菌は顎骨骨髓炎、インプラント埋入後の歯周炎、歯根膿瘍などの原因菌である。また、近年特に問題となっている高齢者に多く見られる誤嚥性肺炎の原因菌としても知られている。したがって、黄色ブドウ球菌感染症の問題は医科領域のみならず歯科領域においても非常に重要であり、口腔内の黄色ブドウ球菌を含めた口腔内細菌のコントロールの重要性が認識されており、特に高齢者や要介護者などの口腔ケアの実践は必要不可欠のものとなってきている。

そこで、黄色ブドウ球菌の口腔内定着機構の解明を行うことで、本菌の口腔内定着阻害により、誤嚥性肺炎などの予防に貢献できるのではないかと考えた。鼻腔と口腔は隣接し、つながっているにもかかわらず、鼻腔からの分離率に比べ口腔からの分離率は低いことが知られている。このことから、黄色ブドウ球菌は口腔という環境下では定着しにくいこ

とが考えられるが、一方で口腔に定着している黄色ブドウ球菌は口腔環境に適応するための因子を獲得しているか定着しやすい口腔環境がある可能性が考えられた。

口腔環境における黄色ブドウ球菌定着に影響を与える因子として口腔内常在細菌や宿主抵抗性因子が考えられる。これまでに *viridans streptococci* の産生する過酸化水素が黄色ブドウ球菌に殺菌的に働くことで定着を阻害することが報告されていた。しかし、口腔には数百種の口腔内細菌が存在しており、他の菌の影響を受けている可能性は十分に考えられる。また、口腔内には先天性免疫機構の因子としてリゾチーム、抗菌性ペプチド、ヒスタチンなどの種々の抗菌性因子やムチン、gp340 などの細菌凝集因子が存在し、細菌感染に抵抗性を示している。抗菌性因子などの細菌に対する抗菌活性等は報告されているものの、網羅的解析についてはなされておらず、また抗菌性因子に抵抗性を示す細菌側の因子についても詳細は明らかではなかった。

そこで、私は細菌特有の情報伝達系因子である 2 成分制御系 (TCS) に着目した。細菌は種々の口腔環境に適応するための因子として TCS を保有していることが知られている。TCS とは外界の刺激を察知するセンサーと、センサーの刺激により活性化されるレスポンスレギュレーターからなる因子で、最終的にレスポンスレギュレーターが種々の遺伝子発現を調節することで環境に適応することが知られている。私はこれまでにミュータンスレンサ球菌の TCS の解析を行ってきており、耐酸性やバイオフィーム形成、抗菌剤感受性等に関与する因子などについて網羅

的に明らかにしてきた。また、黄色ブドウ球菌についてもゲノム上に存在する 16 組の TCS のうち必須の TCS 一組を除く全 TCS 破壊株を作製し、種々の抗菌剤の感受性の変化について報告している。その中でヒトの産生する抗菌性ペプチドに関与する TCS も明らかにしている。したがって、黄色ブドウ球菌の口腔内定着に TCS が関与している可能性は高いことが考えられた。

2. 研究の目的

本研究では黄色ブドウ球菌の口腔内定着機構を解明するために黄色ブドウ球菌側の因子および口腔環境側の因子について明らかにすることを目的とした。具体的には、以下の 2 点に着目して研究を行った。1 つ目は、唾液凝集素 gp340 を介した歯科材料への結合能、2 つ目は 口腔内常在菌の産生する抗菌物質（バクテリオシン）に対する抵抗性である。

3. 研究の方法

(1) 黄色ブドウ球菌の種々のバクテリオシン感受性の評価

口腔レンサ球菌、エンテロコッカス、乳酸菌など収集可能な口腔細菌について臨床分離株である黄色ブドウ球菌 MW2 株に対する増殖阻害作用の有無について検討した。検証方法は、液体培地希釈法 (MIC 法) と direct 法を用いた。

(2) 黄色ブドウ球菌の口腔内定着に寄与する宿主因子の同定

黄色ブドウ球菌は唾液を介して歯科材料や口腔内に定着すると予想し、唾液を介した歯科床用レジンへの付着実験を行った。また、唾液中の因子で、細菌凝集に関与する gp340 に着目し、唾液中から

Superdex 200 カラムを用いてゲル濾過クロマトグラフィーにて精製した。精製 gp340 を用いて、細菌凝集試験や付着実験を行った。

(3) 黄色ブドウ球菌 TCS 変異株を用いたバクテリオシン感受性試験

黄色ブドウ球菌 TCS 変異株を用いて 1 と同様の方法でバクテリオシン感受性試験を行った。

(4) 黄色ブドウ球菌のバクテリオシン耐性因子の同定

バクテリオシンの排出に関与する因子としてトランスポーターが予想されたことから、相同性検索より抽出した抗菌剤排出に関与するトランスポーターの破壊株を作製し、バクテリオシン耐性因子の同定を行った。

(5) 黄色ブドウ球菌の定着因子の同定

定着性には菌体表層タンパクの関与が予想されたことから、菌体表層タンパクの破壊株を作製し、定着性に関与する因子の同定を行った。

4. 研究成果

本研究は黄色ブドウ球菌の口腔内定着機構の解明を目的としており、私は以下の 2 点に着目して研究を行った。1 つ目は、唾液凝集素 gp340 を介した歯科材料への結合能、2 つ目は 口腔内常在菌の産生する抗菌物質（バクテリオシン）に対する抵抗性である。1 については、黄色ブドウ球菌臨床分離株 50 株を用いた gp340 を介した歯科用材料付着能検証した結果、13 株にて gp340 依存性の歯科材料への付着が認められた。そこで、gp340 依存性の歯科材料への付着が認められた黄色ブドウ球菌の一つである MW2 株について、トランスポゾンによるランダム不活性化

株を作製し、gp340 への付着因子の同定を行った。しかし、ランダム不活性化株 100 株を用いた付着実験から、gp340 を介した付着能に変化の認められるものは認められなかった。そこで、gp340 と付着する因子として、菌体表層タンパクに着目した。菌体表層タンパクには、sortase 依存性と sortase 非依存性があることから、sortase 不活性化株を作製し、gp340 を介した付着能を検証した。その結果、付着率は野生株に比較して有意に減少したことから、sortase 依存性タンパクであり、gp340 の構成成分である糖鎖結合性を持つドメインを持つ SasA に着目した。sasA 不活性化株を作製し、付着実験を行った結果、sortase 不活性化株同様有意に付着率は減少し、他の sortase 依存性表層タンパク不活性化株では付着率の減少は認められなかった。このことから、黄色ブドウ球菌は、sortase 依存性菌体表層タンパク SasA が唾液成分である gp340 を介して歯科床用レジンへ付着することが明らかになった(2013 年 *Infection and Immunity* にて報告)。

2 つ目のバクテリオシン耐性機構の解明については、黄色ブドウ球菌の二成分制御系因子(TCS)不活性化株 15 株ならびに未解析トランスポーター不活性化株 13 組について、口腔や腸管、皮膚に常在するバクテリオシン産生株に対する感受性検証を網羅的に行った。その結果、classI バクテリオシンであり、ランチビオティクスであるナイシンとヌカシン産生株に対して、3 組の TCS 不活性化株ならびに 4 組のトランスポーター不活性化株の感受性の増加が認められた。3 組の TCS のうち 1 組は、申請者らがバシトラシン耐性に関与することを明らかにした

TCS(BceRS)であった。このことから、BceRS は細菌の産生するバクテリオシンのうち、classI バクテリオシンであり、ランチビオティクスであるナイシンとヌカシン耐性にも関与するという新たな知見を得た。さらに、BceRS は、2 組の ABC トランスポーターを制御していることを私達は報告しているが、これらの ABC トランスポーターはナイシンやヌカシン作用時、BceRS を介して発現が誘導されることが明らかになった。また、ナイシンとヌカシン耐性に関与する残り 2 組の TCS (ApsRS, VraSR)については、ApsRS は陽性にチャージした抗菌剤への応答、VraSR は細胞壁合成阻害剤への応答をしていることが過去に報告されている。ナイシンとヌカシンは陽性にチャージしていることから、ApsRS が応答したものと考えられる。VraSR がヌカシンに応答したことに關しては、ヌカシンは細胞壁の合成系に何らかの阻害を引き起こしていることが予想される。これまでの結果については、現在論文投稿中である。

また、今回、黄色ブドウ球菌で得られた知見を、口腔内常在菌でう蝕原性細菌である *Streptococcus mutans* にて同様に検証したところ、黄色ブドウ球菌とは異なり、ナイシン、ヌカシン耐性に異なる TCS が応答していた。このことから、同じ生体常在菌であったとしても、バクテリオシン耐性機構は全く異なることが示唆された。この結果は、今年度 *Applied and Environmental microbiology* (2013, in press) に受理された。

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 8 件)

- ① M. Kawada-Matsuo, M. Oogai, Y. Zendo, T. Nagao, J. Shibata, Y. Yamashita, Y. Ogura, Y. Hayashi, T. Sonomoto, K. Komatsuzawa, H.; Involvement of the novel two-component NsrRS and LcrRS systems in distinct resistance pathways against nisin A and nukacin ISK-1 in *Streptococcus mutans*. Appl Environ Microbiol. 2013; in press; 査読有
- ② K. Kukita, M. Kawada-Matsuo, T. Oho, M. Nagatomo, Y. Oogai, M. Hashimoto, Y. Suda, T. Tanaka, H. Komatsuzawa.; *Staphylococcus aureus* SasA is responsible for binding to salivary agglutinin, gp340, derived from human saliva. Infect Immun. 2013; 81(6):1870-9, 査読有
DOI: 10.1128/IAI.00011-13
- ③ K. Fujishima, M. Kawada-Matsuo, Y. Oogai, M. Tokuda, M. Torii, H. Komatsuzawa.; *dpr* and *sod* in *Streptococcus mutans* Are Involved in Coexistence with *S. sanguinis*, and PerR Is Associated with Resistance to H₂O₂. Appl Environ Microbiol. 2013; 79(5): pp1436-43; 査読有
DOI: 10.1128/AEM.03306-12
- ④ M. Kawada-Matsuo, Y. Mazda, Y. Oogai, M. Kajiya, T. Kawai, S. Yamada, S. Miyawaki, T. Oho and H. Komatsuzawa; GlmS and NagB regulate amino sugar metabolism in opposing directions and affect *Streptococcus mutans* virulence; Plos One, 2012; 7(3): e33382. 査読有
DOI: 10.1371/journal.pone.0033382
- ⑤ Y. Mazda, M. Kawada-Matsuo, K. Kanbara, Y. Oogai, Y. Shibata, Y. Yamashita, S. Miyawaki and H. Komatsuzawa; Association

of CiaRH with resistance of *Streptococcus mutans* to antimicrobial peptides in biofilms; molecular oral microbiology, 2012; 27(2): pp124-35. ;査読有

DOI: 10.1111/j.2041-1014.2012.00637.x ;

⑥ M. Matsuo, Y. Oogai, F. Kato, T. Kawai, M. Sugai, H. Komatsuzawa;

Growth-phase dependence of susceptibility to antimicrobial peptides in *Staphylococcus aureus*; Microbiology.

2011; 79(4): pp1660-70. ;査読有

DOI: 10.1099/mic.0.044727-0

⑦ Y. Yoshida, M. Matsuo, Y. Oogai, F. Kato, N. Nakamura, M. Sugai, H. Komatsuzawa;

Bacitracin sensing and resistance in *Staphylococcus aureus*; FEMS Microbiol

Lett., 2011; 320(1): pp33-9. ;査読有

DOI: 10.1111/j.1574-6968.2011

⑧ M. Kawada-Matsuo, Y. Yoshida, N.

Nakamura, H. Komatsuzawa; Role of two-component systems in the resistance of

Staphylococcus aureus to antibacterial agents; Virulence, 2011, 2(5): pp427-30. ;査読有

DOI: 10.4161/viru.2.5.17711

[学会発表] (計 5 件)

① M. Kawada-Matsuo and H. Komatsuzawa, Resistant pathway of nisin and nukacin ISK-1 involving novel TCSs NsrRS and LcrRS in *S. mutans*, 第 86 回 日本細菌学会総会, 2013 年 3 月 18-20 日 (千葉)

② 松尾美樹、於保孝彦、小松澤均, *Streptococcus mutans* の GlmS と NagB は糖代謝調節因子であり、病原性発現に影響を与える, 第 54 回 歯科基礎医学会総会, 2012 年 9 月 16 日 (福島)

③ M. Kawada-Matsuo, Y. Oogai, T. Oho, S. Yamada and H. Komatsuzawa, GlmS and NagB modulate VicRK affecting

Streptococcus mutans virulence, 第85回 日本細菌学会総会, 2012年3月27日 (長崎)
④松尾美樹, 柴田幸江, 山下喜久, 小松澤均, *Streptococcus mutans* のバイオフィルムにおけるCiaRH を介した抗菌性ペプチド耐性機構の解明, 第53回 歯科基礎医学学会学術大会, 2011年10月1日 (岐阜)

⑤M. Matsuo, Y. Oogai, T. Oho and H. Komatsuzawa, Coordinate expression of GlmS and NagB is essential for sugar distribution to glycolysis and cell wall synthesis, and affects the virulence in *Streptococcus mutans*, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, 2011年9月9日 (Hokkaido)

[その他]

ホームページ等

<http://www.hal.kagoshima-u.ac.jp/dental/Saikin/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松尾 美樹 (MITSUO MIKI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・

助教

研究者番号：20527048