

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593093

研究課題名(和文) 口腔細菌による全身性疾患に対する定着・感染機構を応用した宿主のリスク診断法の開発

研究課題名(英文) Development of evaluation system for systemic infectious disease by oral bacteria based on the adherence to host tissues

研究代表者

山口 泰平 (YAMAGUCHI, TAIHEI)

鹿児島大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：80230358

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：Streptococcus intermediusは唾液凝集素に付着し、唾液凝集素の量は個人差が大きいことを示した。次にGranulicatella adiacens とGranulicatella para-adiacensのフィブロネクチン結合タンパクを同定し、ヒトトランスフェリンが鉄イオン依存性に結合を阻害している分子機序の一部を明らかにした。さらにFusobacterium nucleatumは唾液アミラーゼと結合し、銅イオン依存性の2量体とより多く結合することを示した。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus intermedius adhered to salivary agglutinin. Concentration of salivary agglutinin varied among individuals considerably. Novel fibronectin-binding proteins derived from Granulicatella adiacens and Granulicatella para-adiacens were identified. The adherence was inhibited by serum transferrin in the dose dependent manner of Fe³⁺ ion. Fusobacterium nucleatum adhered to salivary amylase, and more bacterial cells adhered to dimer-molecule of amylase than to monomer-molecule.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系医学

キーワード：口腔細菌 感染 初期付着 付着因子 細胞外基質 フィブロネクチン トランスフェリン アミラーゼ

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、日常のブラッシング程度で容易に血流に入って一時的な菌血症をひき起こす。このことは健康な人では何ら問題にならないが、基礎疾患を有しているヒトでは心内膜炎、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。

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。この知見に基づき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。口腔内常在菌の多くは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。我々もインターメディウスレンサ球菌を用いて菌側の付着因子が菌体表層の線毛であること、その遺伝子構造はグラム陽性菌の線毛に共通する構造を有し、コアタンパクは唾液による凝集に重要な役割を担っていることを報告した。

一方で宿主側因子である唾液凝集素についても分子レベルで詳細な検討が進んでいる。このタンパクは肺や悪性脳腫瘍で見られるスカベンジャータンパクのバリエーションで、繰り返し配列中の9アミノ酸の配列が重要であった。この際、ミュータンズレンサ球菌、また、ヘリコバクターピロリ菌もこの唾液凝集素を介して凝集することが示された。

2. 研究の目的

これまでの研究により、唾液中の唾液凝集素量は個人差が大きいこと、この量と口腔内の所見(デンタルカリエス、歯周病)とは少なくとも健康な成人数人については相関がないことが分っている。また、同程度の凝集素を含んでいる唾液で、菌体の付着能に大きな差が認められた。これらのことから、唾液中の菌体付着を阻害する物質を単離、精製したところ、本体はアルブミンであることを突きとめた。さらに分子生物学的アプローチにより、活性部位は半ばより少し上流域で第3から第6エクソンに相当する部分であるこ

とを報告した。

口腔常在菌の一部はフィブロネクチンと結合することから感染性心内膜炎の成立機序が説明されることが多い。

しかし我々の予備実験では、これらの菌は血中のトランスフェリン、アルブミンと金属依存性に結合してフィブロネクチンとの結合を阻害した。このことは菌血症になった段階で、菌側の付着因子をブロックして感染を防御していると考えられる。

以上の知見は有害細菌の定着・感染を阻害するために唾液アルブミン、血清アルブミン、血清トランスフェリンが応用できる可能性を示唆している。これらは現在、比較的容易に入手できるものであり、実用化という点でも研究価値が大きい。同時にこれらの量、依存する血中金属イオンの量を測定することによりリスク判定をすることが可能となる。

本研究の第1の達成目標は唾液アルブミン、血清アルブミン、血清トランスフェリンによる細菌の定着機構をより詳しく解析することである。具体的にはこれらの分子情報に基づき、分子生物学的手法、ペプチドライブラリーの手法を応用することにより、菌体と唾液凝集素との付着阻害反応の分子メカニズムを明らかにすることである。さらに本研究のモデル系による付着阻害が、細菌種によってどのくらいの普遍性を持っているのかを確認する。

第2の達成目標はリスク判定が可能な検査法の開発である。このためには実際の患者さんにおいて、これらの分子、金属イオンの動態を調査する必要がある。このためには鹿児島大学附属病院に協力を依頼する予定である。定量法についての基本的な手技はごく一般的な方法を応用することを考えており問題ない。これにより疾患との関連を評価して一定の基準を確立することを目標とする。

3. 研究の方法

菌体付着阻害物質の精製と機能ドメインの解析

定着能を評価するための付着反応実験法は当研究室で既に確立している方法を用いる。インターメディウスレンサ球菌をトリチウムラベルして実験を行う。ヒト唾液、血清中の付着阻害活性を有する物質の精製は一般的なカラム操作により行う。既に唾液アル

ブミン、血清アルブミン、血清トランスフェリンに本活性があることを確認しているため、本研究では再確認と詳細な検討を実施する。

ヒトアルブミン、ヒトトランスフェリンについてデータベース上の mRNA の塩基配列に基づいてプライマーを合成し、RT-PCR により生成した cDNA を発現ベクターに組み入れる。ヒト肝臓由来の RNA は市販品を所有している。ヒトアルブミンの cDNA はすでに得られている。ヒトトランスフェリンについても cDNA 作成を行う。組み換えタンパク質を発現・精製して付着阻害能を確認する。この際、阻害活性を有する部位を確定するために、段階的に短縮した組み換えタンパク質をデザインして実験に供する。こうして各分子内の阻害活性を示す機能ドメインを探索して反応機構の一端を解明する。次に、決定した機能ドメインの全範囲をカバーするようデザインした一連の 15 から 20 残基程度の合成ペプチドを用意する。これらを用いて同様に菌体と唾液凝集素の結合反応の阻害活性を評価し、コアになるアミノ酸配列を決定する。分子レベルの反応をより詳細に解析するために、アラニン残基スキャン法を使用して活性を決定している配列を同定する。

本付着阻害反応の普遍性の確認

口腔内常在菌に限らず、より幅広い菌種について、以上の一連の結果を確認する。この実験により、本付着阻害反応が細菌感染成立の過程で重要な役割を果たしている菌種を確認する。

臨床材料を用いた網羅的疫学分析

口腔レンサ球菌の付着について、凝集、付着に関与する宿主側因子を幾つか同定している。これらの量のバランスで付着が調節されているものと思われる。これを確認するために、まとまった数のヒト唾液、血液をサンプリングする。臨床試料は鹿児島大学歯学部在籍する学生、代表申請者が所属する鹿児島大学附属病院口腔保健科外来で管理する患者さんの同意を得て採取する。注目している因子のうちでタンパクについては ELISA 法で定量する。金属イオンについては専用キット等を利用して定量する。一部については菌体凝集活性、付着活性さらに、それらへの阻害活性を測定する。また、口腔内所見（デンタルカリエス、歯周病）との関連について検

討する。

全身性細菌感染症との関連および検査法の確立

口腔常在菌に由来する感染性疾患を有する鹿児島大学附属病院で管理中の患者さんの生体試料、あるいは保存生体試料について同様の検討を行う。この中では各因子と疾患との関連性を統計学的手法により評価する。

4. 研究成果

Nutritionally variant streptococci (NVS) 8 株の Fn 結合能は、*Granulicatella adiacens* が最も強く、*G. para-adiacens* が続き、*Abiotrophia defectiva*、*Granulicatella elegans* の順であった。この中で *G. para-adiacens* の 1 株を用いて Fn 結合タンパクをカラムにより精製した。評価は Fn を固相化した ELISA 法を用いた。SDS-PAGE では活性画分には 200 kDa を上回る領域にブロードな精製物が確認できた。精製物を SDS 存在下で加熱処理すると 75 kDa のバンドが出現した。当該タンパクは調べた 8 株の中では *G. para-adiacens* に局限していた。免疫蛍光染色で菌体表層に存在することを確認した。精製タンパクによる Fn 結合反応は NaCl 濃度で 150 mM 以下、pH で 6.5 から 7.0 付近が至適であった。精製タンパクは確かに濃度依存的に Fn に結合し、親株の Fn 結合を阻害した。NVS による Fn 結合能についてはいくつか報告があり、種による特異性も示されている。*G. para-adiacens* は結合能、病原性が低い種に分類されているが、今回の研究では *G. adiacens* に次ぐ結合能を示し、結合活性を持つ新規の因子が同定された。生体内の条件では pH 7.5 付近に維持されていることを考慮すると、この値では付着量は低下していることになる。このことからアシドーシスの状態が病原体の患部への付着、感染を促進する 1 因子になることが示唆された。

これまでに口腔レンサ球菌の一種である *Streptococcus intermedius* が唾液凝集素に付着し、唾液凝集素の量は個人差が大きいことを示した。次に *G. adiacens* と *G. para-adiacens* のフィブロネクチン結合タンパクを同定し、ヒトトランスフェリンが鉄イオン依存性に結合を阻害している分子機序の一部を明らかにした。H25 年度はさらに *Fusobacterium nucleatum* について解析を行

った。唾液アミラーゼは銅イオン存在下で濃度依存的に2量体を形成した。ヒト唾液中の銅イオン濃度は個人差があり、それに伴って単量体と2量体の比率が異なっていた。*F. nucleatum* (ATCC10953)は唾液アミラーゼに付着し、2量体に対する付着量は単量体よりも多かった。用いたアミラーゼ阻害剤4種はいずれも*F. nucleatum*とアミラーゼの結合を有意に阻害したが、acarboseが最も強く阻害し、vogliboseはわずかな阻害に留まった。これらの阻害傾向はアミラーゼの酵素活性阻害効果と類似し、単量体、2量体とも同一傾向であった。また、*F. nucleatum*はアミラーゼの酵素活性を濃度依存的に阻害した。以上の結果は*F. nucleatum*は唾液アミラーゼの酵素活性部位を認識して結合することを示唆していた。さらに、アミラーゼの2量体形成に大きな個人差があることを考慮すると、口腔内のデンタルプラーク形成に少なからず影響しているはずであり、個人の持つ抵抗力を測る指標を与えてくれた。今後、臨床症状との関連を調べていく予定である。

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 4件)

- (1) Yamaguchi T., Soutome S. & Oho T. Purification of a novel fibronectin binding protein from '*Granulicatella para-adiacens*'. Pathogens and Disease in press (2014) (査読あり)
- (2) Zulfiqar M., Yamaguchi T., Sato S. & Oho T. Oral *Fusobacterium nucleatum* s ubsp. *polymorphum* binds to human saliv ary α -amylase. Mol. Oral Microbiol. 28 (6), 425-434 (2013) doi: 10.1111/omi.12036. (査読あり)
- (3) 西山毅、長田恵美、五月女さき子、佐藤節子、山口泰平、於保孝彦 特定健康診査と歯周疾患健診の同時実施から得られた結果について 鹿歯会報 TEETHFUL 104, 8-10 (2012) (査読なし)
- (4) Yamaguchi T., Soutome S. & Oho T. I dentification and characterization of a fibr onectin-binding protein from *Granulicatella adiacens*. Mol. Oral Microbiol. 26, 353-364 (2011) doi: 10.1111/j.2041-1014.2011.00623.x. (査読あり)

[学会発表](計 6件)

- (1) 山口泰平、五月女さき子、於保孝彦 *Granulicatella adiacens*のフィブロネクチン結合能における血中トランスフェリンの役割 Lancefield レンサ球菌研究会 2013年6月28日 (東京)
- (2) 山口泰平、於保孝彦 intermedilysin のコレステロール認識機構の解析 日本口腔衛生学会 2013年5月17日 (長野)
- (3) Zulfiqar M.、山口泰平、佐藤節子、於保孝彦 *Fusobacterium nucleatum* の唾液アミラーゼへの付着機構の解析 九州口腔衛生学会 2012年10月7日 (鹿児島)
- (4) 山口泰平、於保孝彦 *Granulicatella para-adiacens* の持つ新規フィブロネクチン結合タンパクの精製 日本最細菌学会 2012年3月27日 (長崎)
- (5) 山口泰平 口腔細菌の定着・感染機構を応用した宿主のリスク診断 日本口腔衛生学会 2011年10月8日 (千葉)
- (6) 山口泰平、五月女さき子、於保孝彦 *Granulicatella adiacens*のフィブロネクチン結合能における血中トランスフェリンの役割 日本口腔衛生学会 2011年10月9日 (千葉)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 泰平 (YAMAGUCHI, Taihei)
鹿児島大学・歯学総合研究科・准教授
研究者番号：80230358

(2)研究分担者

杉元 康志 (SUGIMOTO, Yasushi)
鹿児島大学・農学研究科・教授
研究者番号：10100736

研究分担者

於保 孝彦 (OH0, Takahiko)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授

研究者番号： 50160940