

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月30日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21792155

研究課題名（和文）：起炎菌不明とされてきた感染性心内膜炎の感染機序の解明および新規予防法の開発

研究課題名（英文）：Development of infection mechanism of culture-negative endocarditis

研究代表者：五月女 さき子 (SAKIKO SOUTOME)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：20325799

研究成果の概要（和文）：

Granulicatella adiacens 表層にあるフィブロネクチン結合タンパク質 Cha を同定した。Cha は相同性の高い *Streptococcus gordonii* DL1 の *cshA* の 2351 アミノ酸残基を持ち、N 末端側はユニークな配列、C 末端領域は 9 個と 1 つの不完全な 115 アミノ酸残基の繰り返し領域からなる。他の 4 菌種においても Fn 結合能を示したが、その強さは Cha 遺伝子の存在とは直接の関係がみられなかった。しかし N 末領域および繰り返し領域ともよく保存されていた。

研究成果の概要（英文）：

Granulicatella adiacens is a member of the oral microbiota, formerly known as nutritionally variant streptococci, and is often isolated from endocarditis patients. In the present study we identified a surface protein, designated Cha, which binds to fibronectin, by a plaque hybridization procedure using the *cshA* sequence as probe, which encodes a fibronectin-binding molecule of *Streptococcus gordonii* DL1. The *cha* sequence was highly homologous to *cshA* and encoded a product of 2351 amino acid residues. The protein comprised a unique sequence in the N-terminal half region. The C-terminal region contained nine complete, and one incomplete, 115-amino acid residue repeat blocks. Among eight strains of nutritionally variant streptococci, three *G. adiacens* strains and one *Abiotrophia defectiva* strain carried the *cha* gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学、社会系歯学

キーワード：レンサ球菌・フィブロネクチン・モノクローナル抗体・心内膜炎・

Granulicatella adiacens

1. 研究開始当初の背景

口腔に存在している菌が、全身的な疾患、感染症に関与しているといわれている。ヒトの口腔（咽頭、歯垢）に常在している *G. adiacens* は、感染性心内膜炎、敗血症、結膜炎、中耳炎、臍膿瘍、創傷感染巣など、極めて多様な感染症から分離されている。特に感染性心内膜炎の起炎菌として、同患者から分離したビリダンスレンサ球菌の 5～6% を占めるといわれている。わが国では、1982年に藤田ら（感染症誌, 56; 705-709, 1982）が本菌を含む Nutritionally variant streptococci による症例を最初に報告して以来複数の報告がみられる。しかし、本菌は特異的な栄養要求性を有し、通常の血液培地では生育しない。また、生育しても他のレンサ球菌と比較して培地上のコロニーが微小で判別しにくく、かつ分離が困難なため、かつ培養陰性で起炎菌不明症例の原因菌であった可能性がある。このことから、*G. adiacens* は、感染性心内膜炎の原因菌として従来予想されていた以上に大きな地位を占めるものと思われる。

一方、感染の第一歩は原因菌の宿主への定着により始まる。この際、宿主側は細胞外基質（extracellular matrix: ECM）タンパクが、細菌側は ECM 結合タンパクが関与していると言われている。ECM タンパクには、コラーゲン、Fn、フィブリノーゲン、ラミニン、ビトロネクチンなどがあり、*Streptococcus sanguis* や *Staphylococcus aureus* については、ラット心内膜炎誘発実験においてこれらの菌の Fn との結合能が同疾患の発症に関与していることが報告されている。これまでに申請者の所属する研究室では、各種レンサ球菌の宿主 Fn に対する付着性と心内膜炎誘発能の関連を示した（Okada *et al.*, FEMS Immunol. Med. Microbiol., 2000）。次に抗 Fn モノクローナル抗体を作製し、*G. adiacens* の Fn 分子上の結合領域は、これまで溶血性レンサ球菌や黄色ブドウ球菌で報告されていた領域とは全く異なる部分であることを示した。その後、本領域へは *G. adiacens* 以外の種々の細菌も結合することが明らかになり、その病原的意義が示唆された（五月女ら, 口衛会誌, 2004; Ito *et al.*, BBRC., 2004）。さらに宿主 Fn への付着に関与する *G. adiacens* の表層物質を検索したところ、全長 6,708 bp の遺伝子が確認され、データベース検索の結果、*Streptococcus gordonii* の Fn 結合タンパクの一つである CshA と高いホモロジーが得られた（五月女ら, 口衛会誌, 2006, 2007）。

2. 研究の目的

G. adiacens ATCC49175 の Fn 結合タンパク

質の遺伝子情報を基に（1）菌体の Fn 結合部位を明らかにする。（2）結合部位を含む組み換えタンパクを作製し、（3）*G. adiacens* および、他のレンサ球菌の結合抑制を比較検討することで、その病原的意義を明らかにする。（4）感染性心内膜炎の患者さんから分離した菌株と解析・比較を行う（5）ラット心内膜炎モデルに應用することで、新規予防法の可能性を検索することである。

3. 研究の方法

感染が成立するための第一段階である宿主心内膜上の Fn への細菌の特異的付着を抑制するため、Fn 結合タンパクの Fn 結合部位を同定する。まず Fn 結合タンパク部分断片を作製し、それぞれと *G. adiacens* を共存させた状態で、*G. adiacens* の Fn への結合を抑制する領域を決定する。他のレンサ球菌を含む原因菌について同様に抑制効果を検討する。さらに感染性心内膜炎患者からの分離株で検討する。臨床応用の試みとして、あらかじめ組み換えタンパクで免疫したラット心内膜炎モデルを用いて同菌による心内膜炎発症の抑制効果を検討する。

4. 研究成果

(1) Cha の同定（図 1）

G. Adiacens のジェノミック DNA のファージライブラリーをプラークハイブリダイゼーションにてスクリーニングし、約 5kb の *EcoRI* 挿入断片を含んだ単一クローンを得た。精製後、シーケンス操作を行い、当該遺伝子の塩基配列を得た。

シーケンス解析により 5' 側が不十分であったため、5kb 断片の上流域で *EcoRI* と *AluI* 断片内にプライマーを設計し、インバーテッド PCR を行った。さらに *MspI*、*NlaIII*、*HaeIII* と連続して、同様にウォーキングインバーテッド PCR を行い、N 末へと伸延した。同時に *AluI* 断片の内部シーケンスを基にプライマーを設計し、新たに PCR プローブを作成した。これによりライブラリーを再スクリーニングして、5' 側の約 4 kbp のクローンを得た。

その結果全長 7,053bp、2,351 アミノ酸残基の遺伝子が確認された。配列は *S. gordonii* の Fn 結合タンパクである CshA と高い相同性を示し全体で 56% の一致、N 末で 56% の類似性を示した。C 末では 115 アミノ酸残基の繰り返し配列を 9 個と少し含んでいた。Kyte/Doolittle の疎水性分析により N 末端側にシグナルシーケンスと思われる疎水性の領域が、C 末端側には、グラム陽性菌の菌外表層タンパクに特有のソーティング配列（LPNTG）が存在した。

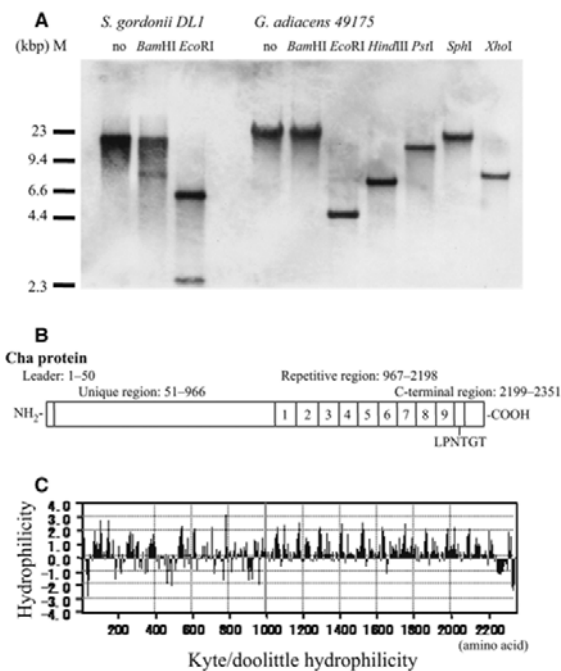


図 1

Identification of the *cha* gene from the *G. adiacens* ATCC 49175. (A) Southern blot hybridization of *S. gordonii* DL1 and *G. adiacens* 49175 DNA with a *cshA* probe. DNA (1 µg per lane) was digested with each indicated enzyme and hybridized with the ³²P-labelled probe under low stringency conditions. Probe DNA was produced by PCR designed to amplify the repetitive region of *cshA* in *S. gordonii*. M, the pattern of lambda DNA digested with *Hind*III as molecular weight markers. (B) Schematic representation of the Cha polypeptide feature is shown. (C) Kyte-Doolittle hydrophilicity analysis of the Cha polypeptide is shown with a sliding window of nine amino acid residues. The positive and negative indices represent the hydrophilic and hydrophobic regions, respectively

(2) Cha 遺伝子の他の菌種への分布 (図 2)

他の菌に Cha 遺伝子がどの程度分布しているのかを検討するために、タイプ株を含む NVS、6 株について検討した。プライマーは 3 つ設計した。1 つは Cha 遺伝子のユニークな N 末端側の領域を含むようにプライマーを設計した。2 つ目は、繰り返し領域を全て含むようにプライマーを設計した。3 つ目は繰り返し領域の一単位の中にプライマーを設計し、複数個の繰り返し領域を増幅できるものを作成した。菌側は各菌株から全 DNA を抽出・精製し、これを鋳型にして 3 種の Cha に特異的なプライマーセットにより PCR を行った。

G. Adiacens 3 株と *A. defectiva* 1 株で Cha 遺伝子の存在が確認されたが、*G. para-adiacens* と *G. elegans* の各 2 株では確認できなかった。Cha 遺伝子を含む 4 株では、N 末領域、繰り返し領域ともよく保存さ

れていたが、C 末領域の解析から、各菌株について、繰り返しのコピー数、繰り返し領域とユニーク領域の移行部では、ヘテロジェナリティが認められた。

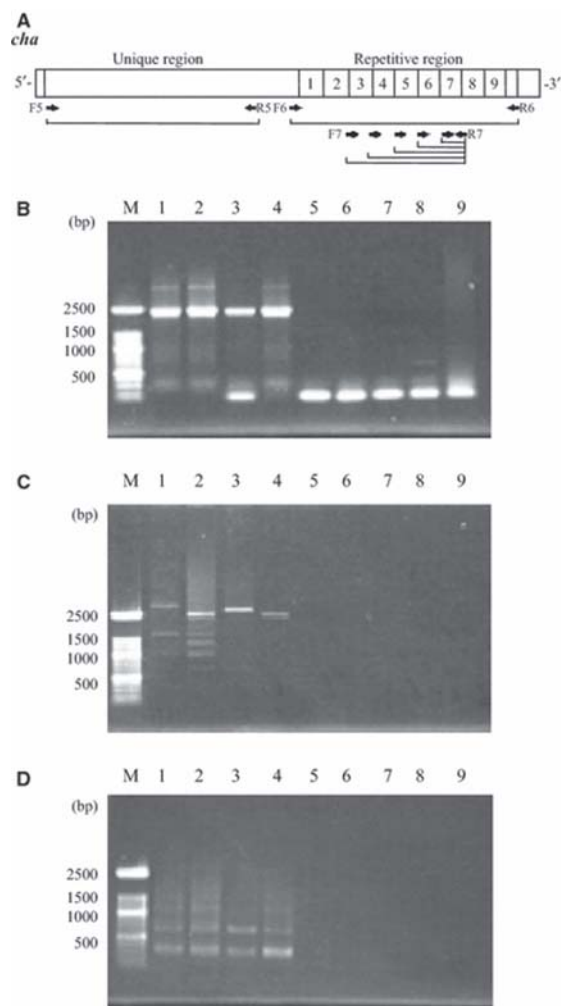


図 2

Distribution of the *cha* gene among NVS strains. (A) A structural feature of the *cha* gene in *G. adiacens* 49175 is indicated. The arrows indicate oligonucleotide primers constructed for the PCR analysis. (B) The primer pair for the unique region of *cha* was F5 and R5 to produce 2547 bp *G. adiacens* 49175 fragment. (C) The primer pair for the repetitive region of *cha* was F6 and R6 (3862 bp). (D) The primer pair for the repetitive unit of *cha* was F7 and R7 (345 bp). Lanes: 1, *G. adiacens* 49175; 2, *G. adiacens* G40; 3, *G. adiacens* HHP1; 4, *A. defectiva* 49176; 5, *G. para-adiacens* HKT1-1; 6, *G. para-adiacens* NMP2; 7, *G. elegans* YTM1; 8, *G. elegans* SI052-1; 9, no template; M, molecular weight markers.

(3) Cha タンパクの局在の検討 (図 3)

免疫蛍光顕微鏡にて Cha タンパクの局在を分析した。Cha の組み換え領域を図 3A のように設計した。2 つの領域は pET-28a(+)発現ベクターを用いた。SDS-PAGE で確認後、特異的抗血清にて反応させたところ、ユニーク領域 (rChaN)、繰り返し領域 (rChaR4) とともに強

く反応を示した。

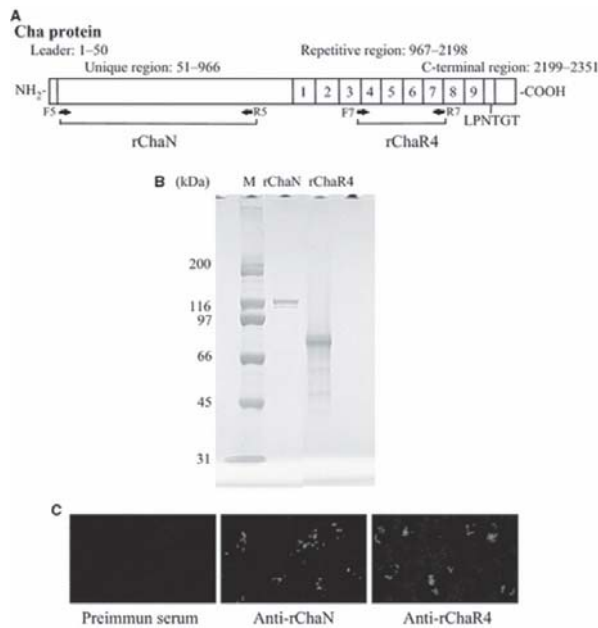


図 3

Expression and surface localization of the Cha protein on *G. adiacens* 49175. (A) The recombinant proteins rChaN and rChaR4 are indicated in the structural feature of the Cha protein in *G. adiacens* 49175. Arrows show nucleotide primers for the construction of DNA fragments coding each recombinant Cha protein. Specific antisera were established in mice by immunization of each recombinant protein separated from the tag peptide. (B) SDS-PAGE analysis confirmed the recombinant ChaN and ChaR4 proteins after affinity column purification. M, molecular weight markers. (C) Immunofluorescence microscopic analyses detected the Cha on the surface of *G. adiacens* pretreated with rChaN- or rChaR4-specific serum. Pre-immune mouse serum was used as a negative control.

(4) *G. Adiacens* のフィブロネクチンへの結合における組み換え Cha タンパクの役割 (図 4)

まず組み換えタンパクがフィブロネクチンとの結合能を有するかを確認するために ELISA 法によって検討した。固相化フィブロネクチンへ結合はユニーク領域 (rChaN)、繰り返し領域 (rChaR4) とも特異的血清を用いて検討したところ両者は濃度依存的に結合した。そこで *G. Adiacens* のフィブロネクチンへの結合を阻害する能力を有するか同様に ELISA 法によって検討した。ユニーク領域 (rChaN)、繰り返し領域 (rChaR4) とも *G. Adiacens* のフィブロネクチンへの結合を濃度依存的に抑制した。

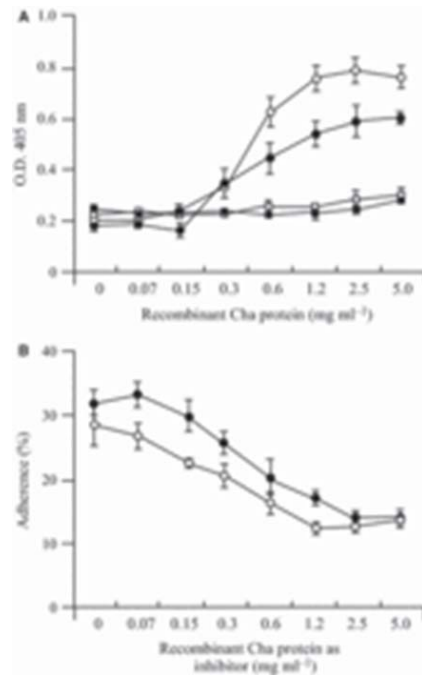


図 4

Adherence of recombinant Cha proteins to immobilized fibronectin. (A) Binding to immobilized fibronectin was estimated. Dilution of rChaN protein (○) or rChaR4 protein (●) were applied to wells coated with fibronectin. Protein binding was measured by anti-ChaN serum or anti-ChaR4 serum respectively. For control reactions, the same concentrations of rChaN protein (□) or rChaR4 protein (■) were applied to wells coated with human fibrinogen. Measurements were performed as above. Values shown represent the mean \pm standard deviation for duplicate assays from three independent experiments. (B) Inhibition of bacterial adherence to immobilized fibronectin was estimated. Radioactively labeled *G. adiacens* 49175 cells were mixed with the appropriate dilution of rChaN protein (○) or rChaR4 protein (●) and applied to wells coated with fibronectin. The results are presented as percentage adherence of the numbers of bacteria applied. Values shown represent the means \pm standard deviation for duplicate assays from three independent experiments.

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 1 件)

Taihei Yamaguchi, Sakiko Soutome, Takahiko Oho. Identification and characterization of a fibronectin-binding protein from *Granulicatella adiacens*. Molecular Oral Microbiology. 査読有

26(6) 2011. 353–364.
DOI:10.1111/j.2041-1014.2011.00623.x

6. 研究組織

(1) 研究代表者

五月女 さき子 (SOUTOME SAKIKO)
鹿児島大学医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号 : 20325799

(2) 研究分担者

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

於保孝彦 (OHO TAKAHIKO)
鹿児島大学・医歯学総合研究科・教授
研究者番号 : 50160940