

## 論 文 要 旨

# The S-layer of *Tannerella forsythia* contributes to serum resistance and oral bacterial co-aggregation

*Tannerella forsythia* S-layer の血清抵抗性と  
他の口腔内細菌との共凝集への関与

下田平 直大

## 【序論および目的】

*Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) は、嫌気性のグラム陰性細菌で歯周病と関連性のある red complex に分類されている。S-layer は、細胞の最外層の構成物であり、多くの細菌に存在している。グラム陰性菌においては、*Compylobacter rectus*、*Compylobacter fetus* や *T. forsythia* に存在していることが報告されている。*T. forsythia* S-layer は、TfsA と TfsB の2種類の糖タンパクより構成されており、ヒト歯肉上皮細胞や口腔由来の癌細胞への付着・侵入能やヘマグルチニン活性、サイトカイン産生の抑制等の病原性の報告がされている。

血清は歯肉溝浸出液中に約70%含まれており、血清中には細菌に対して作用する補体が含まれる。補体を活性化させる細菌成分としてLPS、リポプロテイン、ペプチドグリカンなど補体を活性化させる細菌成分を有する一方、歯周病病原菌は血清に対する抵抗性を有している。また、細菌間の共凝集は歯肉溝におけるコロニー形成やバイオフィーム形成に重要な役割を担っていると考えられる。*T. forsythia* は、*Fusobacterium nucleatum* や *Treponema denticola* との共凝集について報告されている。本研究では *Tannerella forsythia* S-layer の血清抵抗性や他の口腔内細菌との共凝集への関与について検討した。

## 【材料および方法】

### (1) *T. forsythia* の S-layer 欠損株の血清中における増殖能試験

BF medium にて段階的に希釈した血清 [ヒト血清 (HS) 及び子ウシ血清 (CS)] 及び非働化血清を 96穴マイクロプレート中に 100 $\mu$ l 用意し、*T. forsythia* 野生株及び S-layer 欠損株を 10<sup>5</sup> 個加えて嫌気下 37 $^{\circ}$ C で 7日間培養した。経時的にマイクロプレートにて吸光度 (OD=660nm) を測定した。

### (2) 血清中における *T. forsythia* の生細胞及び死細胞の観察

*T. forsythia* 野生株及び S-layer 欠損株を 100% CS で 2時間インキュベートした後に、BD Cell Viability kit にて生細胞と死細胞を蛍光色素で染め分け、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

### (3) *T. forsythia* 野生株ならびに S-layer 欠損株の菌体表層における補体因子 C3b 結合能試験

*T. forsythia* と *E. coli* (各菌 5 $\times$ 10<sup>8</sup> 個) の、30% ヒト血清もしくは非働化ヒト血清中で 37 $^{\circ}$ C にて 30分間反応させた。反応後、菌体を 2.5% パラホルムアルデヒドにて固定し、0.05% tween20 PBS にてブロッキングした。一次抗体 (anti C3) を室温にて 30分間反応させ、洗浄後、二次抗体 (anti-mouse IgG conjugated Alexa594) を室温にて 30分間反応させた。洗浄後、DAPI (ジァミジノフェニルインドール) を用い DNA 染色を行った。洗浄後、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。

### (4) *T. forsythia* 野生株ならびに S-layer 欠損株の他の口腔内細菌との共凝集能試験

細菌を遠心した後、その沈渣を Co-aggregation buffer (150mM NaCl, 1mM CaCl<sub>2</sub>, 1mM MgCl<sub>2</sub>, Tris-HCl [pH 8.0]) に懸濁し、吸光度 (OD=550nm) を 1.0 に調整した。*T. forsythia* と口腔内細菌 *Streptococcus sanguinis*、*S. salivarius*、*S. mutans*、*S. mitis*、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*、*Porphyromonas gingivalis*、*Fusobacterium nucleatum* との共凝集能を測定するために、*T. forsythia* と口腔内細菌とを 2:1 の割合で混合し、経時的に上清の吸光

度(OD=550nm) を測定した。

#### 【結果】

増殖能試験より *T. forsythia* S-layer 欠損株は野生株に比べて血清により増殖能が有意に抑制されることが明らかとなった。また、共焦点レーザー電子顕微鏡像より *T. forsythia* 野生株に比べて *T. forsythia* S-layer 欠損株は死細胞の割合が多いことが認められた。しかし、*E. coli* に比べると、S-layer 欠損株は死細胞の割合が少なかった。さらに、菌体表層における補体因子 C3b 結合能試験より *T. forsythia* 野生株に比べて *T. forsythia* S-layer 欠損株は C3b 結合能が高いことを示された。これらのことは *T. forsythia* 野生株においては S-layer が血清抵抗性に関与していることを裏付けるものである。

*T. forsythia* 野生株ならびに S-layer 欠損株と他の口腔内細菌との共凝集能試験において、*T. forsythia* 野生株と共凝集を示したのは、*S. sanguinis*、*S. salivarius*、*P. gingivalis*、*F. nucleatum* であった。しかし、*F. nucleatum* は *T. forsythia* 野生株よりも S-layer 欠損株とより強い共凝集を示した。

#### 【考察及び結論】

細菌が補体に対して抵抗性を示すメカニズムとして、主に次の3つが考えられる。プロテアーゼによる分解、補体抑制因子である Factor H や C4BP の菌体表層への沈着、多糖性物質による補体不活性化である。*T. forsythia* 野生株と *T. forsythia* S-layer 欠損株とにおいてプロテアーゼ活性や Factor H や C4BP の菌体表層における沈着に有意な差は認められなかった。一方で、S-layer による C3b 沈着の抑制が本実験において認められたことから、S-layer が血清抵抗性に関与していると考えられる。また、S-layer 欠損株において *E. coli* と比較して血清に対する抵抗性が高いことも示した。このことから、S-layer 以外にもプロテアーゼや Factor H 結合タンパクが存在していることが示唆される。

細菌間の共凝集はバイオフィーム形成に重要である。本研究より S-layer は *S. sanguinis*、*S. salivarius*、*P. gingivalis*、*F. nucleatum* との共凝集に関与していると考えられる。過去の報告より、*T. forsythia* BspA は *F. nucleatum* との共凝集に関与する。BspA が分泌型のタンパクでロイシンを多く含んでいるため、S-layer 欠損株は BspA を介して *F. nucleatum* とより強力に共凝集していると考えられる。

結論として本研究は、*T. forsythia* S-layer が血清抵抗性と他の口腔内細菌との共凝集に関係していることを示した。*T. forsythia* S-layer は歯肉溝におけるコロニー形成と歯周病発症に関係していると考えられる。

(Infection and Immunity, in press)

## 論文審査の要旨

報告番号	総研第 235 号	学位申請者	下田平 直大
審査委員	主査	於保 孝彦	学位 博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副査	仙波 伊知郎	副査 松口 徹也
	副査	徳田 雅行	副査 町頭 三保

### The Surface Layer of *Tannerella forsythia* Contributes to Serum Resistance and Oral Bacterial Coaggregation

(*Tannerella forsythia* S-layer の血清抵抗性と他の口腔内細菌との共凝集への関与について)

*Tannerella forsythia* (*T. forsythia*) は、嫌気性グラム陰性桿菌であり歯周病原性細菌の 1 つである。*T. forsythia* が有する S-layer は、最外層に存在している莢膜様構造物で、TfsA と TfsB の 2 種類の糖タンパクより構成されている。その病原性として、ヒト歯肉上皮細胞への付着・侵入能やヘマグルチニン活性、サイトカイン産生の抑制等が報告がされている。

歯肉溝浸出液中には約 70% の血清が含まれており、溶菌作用を発揮する補体が含まれている。*T. forsythia* は血清に対する抵抗性を有しているがその詳細については明らかでない。また、細菌間の共凝集は歯肉溝におけるコロニー形成や歯周病原性菌バイオフィーム形成に重要な役割を担っていると考えられる。そこで本研究では、*T. forsythia* S-layer の血清抵抗性や他の口腔内細菌との共凝集への関与について検討を行った。*T. forsythia* ATCC43037 親株及び S-layer 欠損株を用いて血清感受性試験を行い、血清抵抗性のメカニズムの解析については、プロテアーゼ活性試験、Factor H 結合能試験、C3b 結合能試験を行った。また、*T. forsythia* S-layer の他の口腔内細菌との共凝集への関与を調べた。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) *T. forsythia* S-layer 欠損株は野生株と比較して、血清中において増殖が抑制された。
- 2) *T. forsythia* 野生株は S-layer 欠損株よりも有意に血清処理による死菌の割合が少なく、血清抵抗性が強いことを認めた。
- 3) *T. forsythia* 野生株と S-layer 欠損株では、プロテアーゼ活性に差は認められず、Factor H 結合能試験では、S-layer 欠損株が有意に高い結果を示した。C3b 結合能試験では、*T. forsythia* 野生株は S-layer 欠損株よりも C3 の結合能が有意に少ない結果を示した。
- 4) *T. forsythia* 野生株は *Streptococcus sanguinis*、*S. salivarius*、*Porphyromonas gingivalis* と共凝集を示したが、S-layer 欠損株とは共凝集を示さなかった。*T. forsythia* 野生株および S-layer 欠損株は、*Fusobacterium nucleatum* と共凝集を示した。また、*T. forsythia* 野生株と *S. sanguinis*、*S. salivarius* との共凝集は、N-アセチルマンノサミン添加により阻害された。

以上の結果より、*T. forsythia* 野生株は、S-layer が C3b の沈着を阻害をすることにより、S-layer 欠損株よりも血清抵抗性が強いことが示められた。また、*T. forsythia* 野生株と *S. sanguinis*、*S. salivarius*、*P. gingivalis* との共凝集には S-layer が関与していることが認められた。

本研究は、*T. forsythia* S-layer は歯周病への関与について重要な役割を担っている可能性が示された。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 235 号		学位申請者	下田平 直大
審査委員	主査	於保 孝彦	学位	博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副査	仙波 伊知郎	副査	松口 徹也
	副査	徳田 雅行	副査	町頭 三保

主査および副査の5名は、平成25年2月22日、学位申請者 下田平 直大 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 血清処理後の電子顕微鏡像から補体により破壊されていると考えられるか。

(回答) *Tannerella forsythia* (Tf) S-layer 欠損株の電子顕微鏡像では、細胞質が膨張し、膜構造が破壊されており補体が関与していると考えられる。

質問2) 補体因子 C3b の沈着を S-layer が阻害していると考えているが、これは Tf に特異的なことなのか。

(回答) 同じグラム陰性菌である *Campylobacter rectus* についても S-layer による補体抵抗性の報告がされている。

質問3) レクチン経路による補体活性化は考えられないか。

(回答) Tf S-layer の糖鎖には、レクチン経路を活性化するマンノースおよびマンナンは存在していないので、レクチン経路は活性化しないと考える。

質問4) C3b の沈着は、細菌のレセプターを介さないのか。

(回答) 細菌に関しては C3b は非特異的に沈着すると考えられる。

質問5) TfsA と TfsB には構造的な違いがあるのか。また、付与された糖鎖に違いはあるのか。

(回答) アミノ酸配列は非常に類似しており、修飾される糖鎖についても同じ構造であることが報告されている。

質問6) 血清の濃度が高濃度でなければ Tf S-layer 欠損株の増殖能を抑制しないのではないのか。

(回答) 約70%の血清が含まれる歯肉溝浸出液を想定した濃度での実験である。

質問7) 子牛血清 (CS) とヒト血清 (HS) とを使用しているが、HS でも増殖能は同じ結果となるのか。

(回答) HS でも Tf S-layer 欠損株の増殖能を抑制することを確認している。

質問8) CS の濃度が実験により異なる理由はなにか。

(回答) 実験系により最適な CS の濃度、反応時間が異なっている。

質問9) Tf S-layer と莢膜ではどちらが外側に存在しているのか。

(回答) Tf には莢膜は存在していないため、最外層は S-layer である。S-layer は莢膜と同じような働きをしていると考えられる。

質問10) HS について個体差はあるのか。

(回答) HS について個体差は認められたが、Tf 親株と Tf S-layer 欠損株とではいずれも血清感受性に有意差を認める結果を得た。

質問11) 増殖能試験において吸光度の測定をしているが嫌気条件は守られているのか。

(回答) 複数の同じ測定用プレートを用意し個別に嫌気培養を行い、測定毎にプレートを破棄した。

(回答) 複数の同じ測定用プレートを用意し個別に嫌気培養を行い、測定毎にプレートを破棄した。

質問 12) どうやって生菌と死菌を染め分けているのか。原理は何か。

(回答) すべての菌体を染める蛍光色素を使用するとともに、細胞膜を通過しない PI (propidium iodide) を使用することで、染め分けを行った。

質問 13) 外膜タンパク精製法において、サルコシル溶液を使用する理由はなにか。

(回答) 外膜タンパク精製の通法に従った。サルコシル溶液は内膜タンパクを可溶化するが、外膜タンパクは可溶化しないため使用した。

質問 14) Tf の培養に *N*-アセチルムラミン酸を用いるのはなぜか。

(回答) Tf 培養の通法に従った。過去の報告によって、Tf の増殖は *N*-アセチルムラミン酸要求性の存在であることが報告されていたために用いた。

質問 15) Tf と他の口腔内細菌との共凝集能試験では定常期と対数期という培養時期が違う条件で行った理由はなにか。

(回答) Tf の増殖過程において表層分子の構成が異なることが考えられるために行った。

質問 16) Tf S-layer の中に *N*-アセチルマンノサミンはどのくらい含まれるのか。

(回答) 過去の報告にある S-layer 糖鎖の解析結果から、糖鎖構造の 1 ユニットが 7 つの糖から構成されており 1 ユニット中に *N*-アセチルマンノサミンが 1 つ含まれている。

質問 17) Factor H 結合能試験において、大腸菌の Omp100 発現株 RA11 の結合能が増えているのはなぜか。

(回答) Factor H 結合能がある *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* の外膜タンパク Omp100 を血清感受性の大腸菌株に発現させた株であるため、Factor H 結合能が認められた。

質問 18) *tfsA* と *tfsB* は一緒に相同性組換えによって置換されているのか。

(回答) *tfsA* と *tfsB* はタンデムに存在しており、ひとまとめでクロラムフェニコール耐性遺伝子に相同性組換えによって置換されている。

質問 19) 共凝集におけるメカニズムはどのようなものか。

(回答) 糖による阻害実験の結果より、*S. sanguinis*、*S. salivarius* の持つレクチンが Tf S-layer の *N*-アセチルマンノサミンを介して結合していると考えられる。

質問 20) Tf と他の口腔内細菌との共凝集能試験において、*tfsA* 単独欠損株と *tfsB* 単独欠損株では共凝集は認められたか。

(回答) *tfsA* 単独欠損株と *tfsB* 単独欠損株ではそれぞれ共凝集はほとんど認められず、有意差は得られなかった。

質問 21) 共凝集能試験において細菌の比率が異なると結果はどうなるのか。

(回答) Tf と *S. sanguinis* との共凝集能試験の予備実験では、1:1、2:1、1:2 の比率で検討を行った。その結果いずれも共凝集は認められたが、2:1 で最も有意な差が得られた。

質問 22) 培養実験において、4 日間は吸光度が上がらないのはなぜか。

(回答) Tf は培養に 5~7 日間かかるため、誘導期が長く対数期における吸光度の上昇が遅いと考えられる。

質問 23) Tf はヒトの細胞へ付着・侵入能はあるのか。

(回答) 過去の報告よりヒト歯肉上皮細胞への Tf の付着・侵入能が報告されている。

質問 24) Tf は細胞へ直接付着するのか。

(回答) Tf 表層成分が直接細胞に結合し付着すると考える。

質問 25) *Porphyromonas gingivalis* (Pg) は自己凝集すると思うが、本実験ではどうだったのか。

(回答) 本実験の条件(濁度 1.0、120 分間)では Pg の自己凝集は認められなかった。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。