

論 文 要 旨

***Staphylococcus aureus* SasA is responsible for binding to salivary agglutinin, gp340, derived from human saliva**

黄色ブドウ球菌表層タンパク SasA は
唾液由来凝集素 gp340 との結合に関与する

久 木 田 賢 司

【序論および目的】 (適宜、項目をたてて、必ず2頁で記載する)

黄色ブドウ球菌は多様な病原性因子を保有することで種々の化膿性疾患、食中毒、敗血症等を引き起こす病原菌の一つである。一方、本菌は常在菌として主に鼻腔や皮膚に存在している。口腔領域からも本菌はしばしば分離されており、特に、歯科補綴物装着患者からは高頻度で分離されるという報告もある。口腔領域においても本菌は顎骨骨髓炎、誤嚥性肺炎などの起炎菌の一つであることから、歯科領域においても十分注意すべき菌である。しかし、これまでに本菌の口腔内定着機構についてはほとんど明らかになっていない。

本研究では黄色ブドウ球菌の口腔内定着機構の解明を目的とする。申請者は唾液成分の一つであり、細菌やウイルスとの結合能を有することが報告されている唾液凝集素gp340に着目し、黄色ブドウ球菌との結合性について検討を行った。

【材料および方法】

1. gp340 の精製

唾液から gp340 の精製をおこなった。採取した唾液から遠心操作により、不溶性成分を除去後、gp340 との結合能がある *Streptococcus mutans* を添加し 37°C で 1 時間反応させた。その後、菌体を生理食塩水 (PBS) で洗浄し、菌体に 5mM EDTA を加え、溶出性画分を得た。得られた画分を用いてゲル濾過クロマトグラフィーを行い、gp340 の精製画分を行った。

2. 黄色ブドウ球菌の義歯床用レジンへの付着能の検討

義歯床用レジン (ACRON; GC) を用いてディスク型レジン試験片 (以下レジン) を作製した。レジンを一晚、唾液および精製 gp340 に浸漬した。PBS で洗浄後、付着実験に用いた。黄色ブドウ球菌 MW2 株を 0.5 ml PBS 中に 5×10^5 個になるよう調整後、レジンを浸漬し、37°C で 1 時間反応させた後、レジンを PBS にて洗浄後、付着した菌をレジンから剥がすためトリプシンを含む PBS で処理後、菌液を寒天培地に播種し、37°C で一晚培養後、コロニーカウントを行った。

3. トリプシン処理した黄色ブドウ球菌の付着能における影響

黄色ブドウ球菌の付着因子の同定を行うため、付着因子が菌体表層のタンパク性因子であるかどうかを検討した。種々の濃度のトリプシンで MW2 株を 37°C で 10 分間処理し、PBS で洗浄後、レジンへの付着能を上述の方法により検討した。

4. 黄色ブドウ球菌 SrtA および SasA の gp340 付着への関連性についての検討

黄色ブドウ球菌の表層タンパクの局在化に関与する因子である SrtA および細胞表層タンパクの一つであり糖鎖結合に関与することが他細菌種で報告されている BR (basic amino acids region) 領域と相同性を持つ SasA (*S. aureus* surface protein) について、それぞれの因子の欠損株を作製した。また BR 領域を含むあるいは含まない His-tag 融合 SasA 組換えタンパクを作製した。

得られた欠損株および組換えタンパクを用いて以下の2つの項目について検討した。

- 1) 黄色ブドウ球菌 MW2 野生株および遺伝子破壊株を用いたレジン付着実験
MW2 野生株および *srt* 遺伝子破壊株、*sasA* 遺伝子破壊株を用いてレジンへの細菌付着実験を行った。
- 2) SasA 組換えタンパクを用いた解析
 - ① SasA 組換えタンパクによる黄色ブドウ球菌の付着阻害性の検討
SasA 組換えタンパクを gp340 処理したレジンと反応 (37°Cで 10 分間)させた後、黄色ブドウ球菌を添加し、付着実験を行った。
 - ② ELISA 法を用いた gp340 と SasA 組換えタンパクの結合能の検討
37°C条件下で精製 gp340 をコーティングした 96 ウェルプレートに、SasA 組換えタンパクを反応させ、抗 His-tag 抗体を用いて rSasA 結合量を測定し結合能を検討した。
5. 糖鎖固定化チップを用いた SPR(surface plasmon resonance)分析による SasA 結合糖鎖の同定
SasA は糖鎖結合領域を有することから、SasA は糖タンパクである gp340 の糖鎖に結合することが予想されるため、種々の糖鎖が固定化されたチップを用いて、rSasA の結合能について検討を行った。

【結果】

1. 精製 gp340 処理したレジンおよび唾液処理したレジンとは未処理レジンと比較して、黄色ブドウ球菌の付着能は有意に高かった。
2. 菌体に作用させるトリプシンの濃度依存性に黄色ブドウ球菌のレジン付着能の低下を認めた。したがって、黄色ブドウ球菌の付着因子は菌体表層のタンパク成分である可能性が示唆された。
3. *srtA* 遺伝子破壊株、*sasA* 遺伝子破壊株のいずれの株も MW2 野生株と比較して大きな付着能の減少が認められた。
4. SasA 組換えタンパクを用いた黄色ブドウ球菌のレジン付着実験の結果、組換えタンパクの濃度依存性に付着能の低下を認めた。しかし、BR 領域を欠失した組換えタンパクでは付着能の阻害は認められなかった。
5. ELISA 法での組換えタンパクにおける gp340 の付着能の検討の結果、BR 領域を有する組換えタンパクでは gp340 との強い結合能が認められたが、BR 領域を欠失した組換えタンパクでは gp340 との結合能は認められなかった。
6. 糖鎖固定化チップを用いた実験より、SasA 組換えタンパクは α 2, 3-結合を有する *N*-アセチルノイラミン酸と特に強固に結合することが明らかとなった。

【結論及び考察】

以上の結果から、黄色ブドウ球菌の表層タンパクである SasA が gp340 との付着に関与していることが示唆された。また、SasA の BR ドメインがこの結合に重要であることが分かった。さらに *N*-アセチルノイラミン酸が SasA のリガンドとして重要な構造であることが明らかになった。*N*-アセチルノイラミン酸は生体組織内で多くの糖タンパクに含まれるため、gp340 のみでなく種々の組織において付着・定着に関与していると考えられる。以上の結果から、SasA は黄色ブドウ球菌による感染に重要な役割を果たしていることが示された。

論文審査の要旨

報告番号	総研第 24 / 号	学位申請者	久木田 賢司
審査委員	主査	松口 徹也	学位 博士 (医学 <u>歯学</u> ・学術)
	副査	中村 典史	副査 佐藤 友昭
	副査	松山 孝司	副査 徳田 雅行

Staphylococcus aureus SasA is responsible for binding to salivary agglutinin, gp340, derived from human saliva

(黄色ブドウ球菌表層タンパク SasA は唾液由来凝集素 gp340 との結合に関与する)

黄色ブドウ球菌は、ヒトの常在菌として主に鼻腔や皮膚に存在しており、多様な病原性因子を保有することで種々の化膿性疾患、食中毒、敗血症を引き起こす病原菌の一つでもある。近年は、薬剤耐性を獲得した MRSA が、院内感染および日和見感染の原因菌として知られている。

本菌は口腔領域でもしばしば分離されており、特に歯科補綴物を装着している患者から高頻度に分離されるという報告もあり、顎骨骨髓炎や誤嚥性肺炎の起因菌ともなりうる。しかし、黄色ブドウ球菌の口腔内への定着機構は未解明というのが現状である。

そこで学位申請者は、補綴物から分離される黄色ブドウ球菌に注目し、本菌と唾液成分の一つである gp340 における結合メカニズムの解析を行った。具体的には唾液から gp340 を精製し、義歯床用レジンにコートして黄色ブドウ球菌(変異株である *srtA* 遺伝子欠損株および *sasA* 欠損株も作製し、実験に使用した)と反応させ細菌付着実験を行うことで、黄色ブドウ球菌における gp340 に対する付着因子を同定した。次に変異型リコンビナントタンパク SasA を作製して gp340 との結合能を比較検討した ELISA 法、および糖鎖固定化チップを用いた SPR 分析(表面プラズモン共鳴分析)によりリコンビナントタンパク SasA による gp340 との詳細な結合メカニズムの検討を行った。さらに、定量性 PCR 法と細菌付着実験を行って臨床分離株による *sasA* 遺伝子発現と付着能の相関関係について検討した。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) 唾液および gp340 で処理したレジンには未処理のものに比べて有意に黄色ブドウ球菌が付着した。
- 2) 変異株で gp340 処理済みレジンへの付着能の減少を認めたことより、黄色ブドウ球菌の sortase 依存性表層タンパクである SasA が gp340 と結合することが分かった。
- 3) SasA の BR 領域(Basic amino acid region)が gp340 への結合性に重要であることが認められた。
- 4) SasA は gp340 の α 2-3 結合を有する *N*-アセチルノイラミン酸を含む糖鎖に結合した。
- 5) 黄色ブドウ球菌臨床分離株において、*sasA* 遺伝子発現量と gp340 の結合能に相関を認めた。

以上から黄色ブドウ球菌は表層タンパク SasA の BR 領域と、gp340 の α 2-3 結合を有する *N*-アセチルノイラミン酸を含む糖鎖との特異的な結合を介して、床用レジンへ初期付着することが分かった。つまり SasA は黄色ブドウ球菌による感染に重要な役割を果たしていることが示された。

本研究により、黄色ブドウ球菌と gp340 との結合メカニズムが解析されたことは、非常に興味深く、将来的に有用な研究結果であると考えられる。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 24 / 号	学位申請者	久木田 賢司
審査委員	主査	松口 徹也	学位 博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副査	中村 典史	副査 佐藤 友昭
	副査	松山 孝司	副査 徳田 雅行

主査および副査の5名は、平成 25年 3月 11日、学位申請者 久木田 賢司 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) gp340 と黄色ブドウ球菌との結合は、感染防御に働くのではないか？

(回答) gp340 は先天性免疫の因子の一つとして知られており、唾液中で細菌と凝集することで感染防御に働くと考えられる。

質問 2) gp340 は細胞膜に発現し、細胞膜上に存在されるのか？細胞外に分泌されるものなのか？

(回答) 唾液腺や上皮細胞から分泌されるものである。

質問 3) リコンビナントタンパクは大腸菌で作製したのか？また、作製したリコンビナントタンパクについて糖鎖の修飾や構造の変化については検討したのか？

(回答) 大腸菌で作製した。今回作製したリコンビナントタンパクでは糖鎖の修飾や構造変化については検討しなかった。

質問 4) リコンビナントタンパク SasA の変異型を用いた細菌付着実験で、分子量が異なるのにモル比では調整しなかったのか？

(回答) ELISA 法ではモル比を調整したが、細菌付着実験では他の変異型もリコンビナントタンパク SasA-N における至適濃度(20 μ g/ml)に調整して行った。細菌付着実験でも検討すべき点であったと思う。

質問 5) SPR 分析(表面プラズモン共鳴分析)では末端に α 2-3 結合を有する N-アセチルノイラミン酸を含む種々の糖鎖を検討しているが、その中で結合性に差異が認められたのはなぜか？

(回答) N-アセチルノイラミン酸に結合している糖の種類が異なるためと思われる。

質問 6) gp340 は α 2-3 結合の N-アセチルノイラミン酸を持つのか？

(回答) 過去の報告から gp340 も、 α 2-3 結合を有する N-アセチルノイラミン酸を持つ。

質問 7) 補綴物に黄色ブドウ球菌が高頻度で認められるとあるが、どのような background の患者からか？

(回答) 過去の報告では義歯装着患者からの分離率が非装着患者より高いということだけであり、その他の患者情報は不明である。

質問 8) 金属には黄色ブドウ球菌は結合しないのか？

(回答) レジンと同様に金属にも唾液成分が付着することで、結合すると思われる。

質問 9) 細菌付着実験に Acron[®]を用いた理由は？

(回答) 臨床的にもよく使用されている加熱重合型のレジンであるため、本研究で使用した。

質問 10) レジンディスクの作製方法は？

(回答) 直径 10mm の棒状のレジンを作製後、1.5mm 幅に切断し、研磨して最終的に 1.2mm のディスクにした。

最終試験の結果の要旨

質問 1 1) レジンディスクの研磨の状態が付着率が異なるのではないかと？

(回答) 予備実験の段階で研磨が粗いと付着菌数の増加が認められたため、研磨の状態が付着率は異なると思われる。

質問 1 2) レジンディスクの表面性状は実際の患者さんが装着する状態を想定しているのか？

(回答) 研磨の程度は、実際に使用する研磨状態である。

質問 1 3) レジンと gp340 との結合はファンデルワールス力なのか？

(回答) レジンは電氣的にマイナスにチャージしているため、gp340 が引き寄せられると考えている。

質問 1 4) 黄色ブドウ球菌のレジンへの付着・定着と、ヒトへの感染との関係はどのように考えているか？

(回答) 感染が成立するためには細菌が組織に付着・定着することが必要と考える。

質問 1 5) 細菌付着実験で、*S. mutans* の反応上清を用いた理由は？

(回答) gp340 以外の唾液成分が黄色ブドウ球菌との結合に関与しているかを調べた。

質問 1 6) トリプシン処理では、gp340 とレジンとの付着に作用しないのか？

(回答) 本実験ではトリプシンは黄色ブドウ球菌のみ作用させているので、gp340 とレジンとの付着には影響を与えていないと考えられる。

質問 1 7) *srtA* 欠損株で、付着能が低下する意義は？

(回答) 黄色ブドウ球菌の表層タンパクの多くは、sortase 依存性に細胞表層に局在化するため、欠損株では表層因子が局在できないため付着能が低下すると考えられる。

質問 1 8) 黄色ブドウ球菌の結合能は、他菌との比較が必要ではないかと？

(回答) gp340 との結合能が高い *S. mutans* との比較検討は行っているが、それ以外の菌との比較はしていない。

質問 1 9) 37℃、10 分のトリプシン処理で菌は死んでしまわないのか？バイタルチェックはしたのか？

(回答) トリプシン処理の有無により菌数を調べ、バイタルチェックを行った。黄色ブドウ球菌は 37℃、10 分のトリプシン処理による細胞死の影響を認めなかった。

質問 2 0) BR 領域(basic amino acid region)が関与したという結果だが、このことをどう臨床に応用できるのか？

(回答) gp340 が付着しづらいレジン床の開発などが考えられる。

質問 2 1) SasA は糖タンパクか？

(回答) BR 領域以外ではセリン高含有領域があるため糖タンパクである。Fig.6(A)トリプシン処理の実験で確認した。

質問 2 2) SasA の病原性は？

(回答) 本研究により SasA は gp340 を介した組織や血小板などに付着定着性に関与する因子である。

質問 2 3) SasA の全長を含むリコンビナントタンパク(224kDa)は精製できたのか？

(回答) 作製を試みたが精製できなかったため、complement 株を作製して同様の実験を行い、確認した。

質問 2 4) *S. mutans* と gp340 の結合能に比較して、黄色ブドウ球菌と gp340 の結合能の違いは？

(回答) *S. mutans* と gp340 の結合能が黄色ブドウ球菌と gp340 との結合能よりも有意に高かった。

質問 2 5) gp340 と嫌気性菌との結合に関する報告は？

(回答) 歯周病菌の *Tannella forsythia* と結合するという報告がある。

質問 2 6) 黄色ブドウ球菌株間で、*sasA* 発現量に違いがあるのはなぜか？分離部位などとの関連性があるのか？

(回答) 分離部位による関連は検討していない。株間に多形性を認めるのはプロモーター活性による違いなどによるものと思われる。

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同等あるいはそれ以上の学力・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。