

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10日現在

機関番号：17701
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659987
 研究課題名（和文） 唾液タンパク質と口腔細菌の相互作用：菌体付着と菌体凝集を決定する因子の解明
 研究課題名（英文） Interaction between salivary proteins and oral bacteria: determinants for bacterial adherence and aggregation
 研究代表者
 於保 孝彦 (OHO TAKAHIKO)
 鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授
 研究者番号：50160940

研究成果の概要（和文）：唾液タンパク質と口腔細菌との相互作用で起こる2つの現象（エナメル質への菌体付着と唾液中での菌体凝集）が生じる条件を調べ、口腔細菌のクリアランスを強く進める条件を明らかにすることを目指した。その結果、齶蝕細菌ストレプトコッカス ミュータンスのクリアランスを進めるには、菌体凝集を強く誘導するために唾液凝集素のSRCRP5領域を活用することが有効であることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Bacterial aggregation in saliva is advantageous for oral health since bacteria are swallowed before adhering to oral tissues. The purpose of this study was to investigate mechanisms by which bacterial adherence to saliva-coated enamel surfaces or saliva-induced bacterial aggregation occur. The results indicate that SRCRP5 region in salivary agglutinin is useful for the clearance of *Streptococcus mutans*.

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	2,800,000	840,000	3,640,000

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：歯学、細菌、唾液

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会の到来とともに長期入院療養、介護を必要とする患者が増え口腔ケアの重要性が強調されている。口腔内には無数の細菌が棲息し、齶蝕や歯周疾患などの口腔内感染症のみならず、心臓、肺、腎臓などにしばしば重篤な感染症を引き起こすことが報告されている。口腔内感染症は病原性微生物が口腔内に定着することから始まるため、この定着を抑制できれば疾病の予防ができるという仮説に基づき、われわれは研究を行ってきた。

口腔内には常に唾液が存在し歯や粘膜表面を覆うことによる保護作用に加えて、口腔内の洗浄作用、湿潤作用など様々な機能を発揮している。唾液中の主な有機成分である唾液タンパク質と口腔内細菌との相互作用に

は2つの現象が知られている。すなわち固相表面に形成された唾液タンパク質から成る被膜への菌体の付着と液相における唾液タンパク質による菌体の凝集である。菌体付着は感染症の発症へつながるステップである一方、菌体凝集は口腔内に菌体が定着する前に細菌を排除することにつながり、生体にとっては有利な現象といえる。これまで齶蝕感受性と抵抗性のヒト集団を比較し、両群において唾液による齶蝕細菌の凝集能力に差があること、齶蝕抵抗性の集団では唾液ムチンの菌体凝集に関わるエピトープがより多く発現されていることなどが報告されている。このような研究結果から、唾液タンパク質の菌体付着作用と凝集作用を決定する因子を調べるという発想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、唾液タンパク質の持つ菌体付着作用と菌体凝集作用がどのような条件下で発揮されるかを調べ、新しい口腔ケア方法の開発へと導くことである。

口腔バイオフィームという新しい概念が提唱された今、それを構成する細菌のみでなく、宿主側の因子である唾液の機能に着目したバイオフィーム形成機序の解明が必須である。本研究により唾液タンパク質による菌体凝集を促進する条件が解明されれば、宿主側の因子である唾液に着目した新しい口腔ケア方法の開発が可能となる。本研究はバイオフィーム感染症の予防を最終目的として、新しい方向からのアプローチをする研究である。

3. 研究の方法

唾液タンパク質として、口腔バイオフィーム形成に重要な役割を果たす *Streptococcus mutans* の付着、凝集いずれも誘導する salivary agglutinin (gp-340) を用いた。

(1) gp-340 の精製と gp-340 の固相への吸着に及ぼす pH、塩濃度の影響

①ヒト安静時唾液を採取し、affinity adsorption 法を用いて gp-340 を精製した。

②gp-340 を各種 pH、各種塩濃度のリン酸緩衝液に溶解したものを 96 ウェルマイクロプレートに入れ、培養後、吸着した gp-340 の量を、ELISA 法で定量した。

③この結果から gp-340 の固相への吸着の至適条件を評価した。

(2) gp-340 と *Streptococcus mutans* 菌体との反応に及ぼす pH、塩濃度の影響

①*S. mutans* を培養して菌体を回収した後、各種 pH、各種塩濃度のリン酸緩衝液に懸濁した。

②*S. mutans* 懸濁液をキュベットに入れ、gp-340 を加えた後、550 nm における吸光度の変化を測定することにより、gp-340 の菌体凝集誘導能を評価した。

③これらの結果から *S. mutans* と gp-340 との反応（凝集）を生じる至適条件を評価した。

(3) 各種口腔レンサ球菌の共存状態での *S. mutans* と gp-340 との反応

①*Streptococcus sanguinis*、*Streptococcus gordonii*、*Streptococcus oralis* などエナメル質表面への early colonizer として知られている菌を培養し、回収した。

②*S. mutans* と各種 early colonizer との共存懸濁液を作製した。

③各共存懸濁液を用いて上記 (2) ②と同様に実験を行い、*S. mutans* の gp-340 による

凝集を評価した。

(4) ハイドロキシアパタイトビーズに吸着した gp-340 への *S. mutans* 菌体の付着に及ぼす各種 pH、塩濃度の影響

①ハイドロキシアパタイトビーズに各種 pH、塩濃度のリン酸緩衝液中に溶解した gp-340 で処理して、吸着させた。

②*S. mutans* 菌体を反応させ、ハイドロキシアパタイトビーズに付着した菌体を定量した。

(5) gp-340 の菌体付着、菌体凝集に関わる機能領域の決定

①gp-340 のアミノ酸配列をもとに 10-20 アミノ酸からなる断片ペプチドを合成し、マイクロプレートを被覆した後、*S. mutans* 懸濁液を加えて培養し、付着菌数を定量した。

②*S. mutans* 懸濁液に各種ペプチドを加え、それらの菌体凝集誘導能を評価した。

③これらの結果から *S. mutans* の付着、凝集に関与する gp-340 の機能領域を決定した。

(6) gp-340 の機能領域顕示状態の確認

①(5) の結果に基づき、gp-340 の *S. mutans* の付着に関する機能領域 SRCRP2 に対する特異抗体を作製した。

②リン酸緩衝液に溶解した gp-340 をマイクロプレートに入れて、37° C で 2 時間処理をした。

③固相に吸着した gp-340 における機能領域の顕示状態を、機能領域に対する特異抗体を用いた ELISA 法で確認した。

(7) gp-340 の *S. mutans* の凝集に関する機能領域の反応解析

①(5) の結果に基づき、gp-340 の *S. mutans* の凝集に関する機能領域 SRCRP5 を用いて、表層タンパク抗原 PAc を欠損させた変異株に対する凝集誘導作用を調べた。

②凝集反応液に EDTA を加えて、本ペプチドによる凝集反応における Ca イオンの関与を調べた。

4. 研究成果

(1) まず gp-340 の固相への吸着に及ぼす緩衝液の pH、塩濃度の影響を調べた。pH 4-7 の各種リン酸緩衝液に溶解した gp-340 は、ポリスチレン製マイクロプレートに同程度に吸着することが認められた。また pH 7、NaCl 濃度 10-1000 mM の各種リン酸緩衝液に溶解した gp-340 も同様にマイクロプレートに吸着することが認められた。

(2) 次に *S. mutans* 菌体の gp-340 による凝集誘導に及ぼす pH の影響を調べたところ、pH 6 以下の酸性条件では凝集が弱くなり、pH

5 では凝集を生じないことが認められた。さらにエナメル質表面への early colonizer として知られる *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii* 等のレンサ球菌を共存させて *S. mutans* の菌体凝集を調べたところ、同様の結果が得られた。

以上より、gp-340 のマイクロプレートへの吸着には pH や塩濃度は大きな影響を及ぼさないこと、*S. mutans* 菌体の gp-340 による凝集は、pH 7-9 で生じることが認められた。

(3) ハイドロキシアパタイトビーズに吸着したヒト唾液タンパク質 gp-340 への *S. mutans* 菌体の付着に及ぼす各種 pH、塩濃度の影響を調べたところ、マイクロプレートの場合と同様に pH 4-7 および NaCl 濃度 10-1000 mM で菌体付着に大きな差はなかった。

(4) gp-340 のアミノ酸配列をもとに 10-20 アミノ酸からなる 8 つの断片ペプチドを作製し、各ペプチドの菌体凝集誘導能を評価したところ、SRCRP5 による強い菌体凝集を認めた。(図 1)

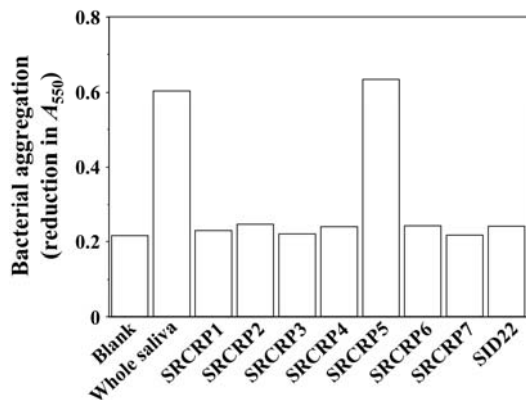


図 1. gp-340 由来ペプチドの *S. mutans* 凝集誘導作用

(5) 各ペプチドへの *S. mutans* 菌体の付着を調べたところ、SRCRP2 への強い付着を認めた。次に SRCRP2 に対する特異抗体を作製してマイクロプレートに吸着させた gp-340 における SRCRP2 の顕示状態を調べたが、本抗体でこの機能領域の検出はできなかった。すなわち gp-340 をマイクロプレートに吸着させた状態で SRCRP2 は表面に顕示されていない可能性が示唆された。

(6) さらに SRCRP5 は *S. mutans* の菌体凝集に関与する因子である表層タンパク抗原 PAc を欠損させた変異株の凝集も誘導することが認められた。この結果から、SRCRP5 は PAc 以外を認識し菌体凝集を誘導することが考えられた。

(7) EDTA を添加した状態でも SRCRP5 による

菌体凝集を生じたことより、本ペプチドによる菌体凝集に Ca イオンは必要でないことが示唆された。(図 2)

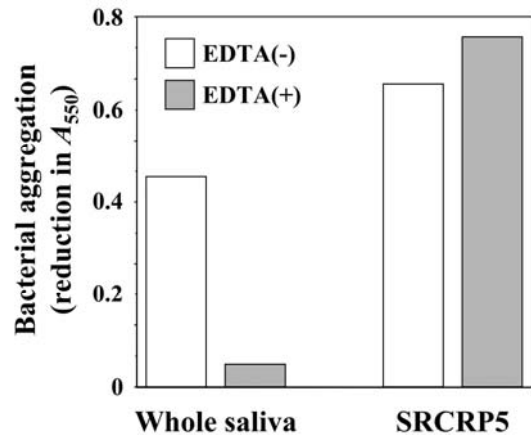


図 2. SRCRP5 による *S. mutans* 凝集誘導に及ぼす EDTA の作用

以上の結果から *S. mutans* のクリアランスを進めるには、菌体凝集を強く誘導するために gp-340 の SRCRP5 領域を活用することが有効であることが示唆された。

唾液タンパク質の作用としてこのような凝集作用を強く誘導する条件という視点からとらえた研究はこれまで世界的にも報告はない。本研究の成果を基に、口腔ケアの手法に唾液と細菌との相互作用の一つである菌体凝集能の活用という新しいアイデアが取り入れられるのみでなく、個人のバイオフィーム形成能の判定に唾液タンパク質を利用することも可能となる。さらに唾液タンパク質に限らず、医学、工学、農学など様々な領域でのバイオフィーム研究において、菌体と反応する各種タンパク質の付着と凝集機能に着目した新しい視点からのバイオフィーム形成阻害研究の発展に繋がる可能性もある。

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 2 件)

(1) Kukita, K., Kawada-Matsuo, M., Oho, T., Nagatomo, M., Oogai, Y., Hashimoto, M., Suda, Y., Tanaka, T., and Komatsuzawa, H.: *Staphylococcus aureus* SasA is responsible for binding to salivary agglutinin, gp340, derived from human saliva. Infect. Immun., in press.

(2) Kitada, K., and Oho, T.: Effect of saliva viscosity on the coaggregation between oral streptococci and *Actinomyces*

naeslundii. Gerodontol., 29: e981-987, 2012.

〔学会発表〕(計 2件)

(1) 久木田 賢司、松尾 美樹、小松澤 均、於保 孝彦、隅田 泰生、橋本 雅仁：
Staphylococcus aureus SasA is responsible for the binding to salivary agglutinin, gp340. 第 86 回日本細菌学会、2013 年 3 月 18 日、千葉.

(2) Zulfiqar Maria、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. 第 34 回九州口腔衛生学会、2012 年 10 月 17 日、鹿児島.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.hal.kagoshima-u.ac.jp/dental/Predent/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

長田 恵美 (NAGATA EMI)
鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：00304816