

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 μ l用意し、*T. forsythia* 野生株及び S-layer 欠損株を 10^5 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 5×10^8 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 (ジア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 CaCl₂, 1mM MgCl₂, 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)