

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。レジンを一晩、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 で一晩培養後、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エン付着実験

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エ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 処理したレジエンと反応 (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 処理したレジエンおよび唾液処理したレジエンは未処理レジエンと比較して、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エ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エン付着実験の結果、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 $\alpha_2, 3$ -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。