

Title	唾液PRPを介したA群レンサ球菌の咽頭付着機構の分子解析
Author(s)	村上, 旬平
Citation	大阪大学, 2002, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/1503
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	むら かつ じゅん べい 村 上 旬 平
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学位記番号	第 1 6 9 5 3 号
学位授与年月日	平成14年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	唾液 PRP を介したA群レンサ球菌の咽頭付着機構の分子解析
論文審査委員	(主査) 教授 浜田 茂幸 (副査) 教授 森崎市治郎 助教授 今里 聡 講師 藤原 卓

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

A群レンサ球菌（以下 GAS と省略）は咽頭粘膜等の粘膜上皮細胞に付着、侵入し、咽頭炎、扁桃炎などを発症させる。咽頭粘膜表面は唾液の流れに浸され、唾液成分のあるものは多くの細菌と相互に作用することが知られている。なかでも、唾液高プロリタンパク（PRP）については、数種の口腔細菌と結合することが報告されている。本研究では、GAS の咽頭上皮細胞付着に及ぼす PRP の影響を検討するため、PRP を介した GAS 付着機構を分子レベルで解析した。

【材料と方法】

1. 主要唾液成分の精製：ヒト全唾液をゲルろ過クロマトグラフィーに供試し、PRP、ムチン、スタセリンおよびアミラーゼ画分を得た。PRP 画分をもとに、HPLC を用いて酸性 PRP と塩基性 PRP を分離、精製した。
2. 咽頭由来 HEp-2 上皮細胞に対する GAS 付着・侵入試験：GAS 被験株として SSI-9 株（M1 型）、JRS4 株（M6 型）、NY-5 株（M12 型）を供試した。コンフルエントの HEp-2 細胞に唾液成分を添加し、30 分後に GAS (10^7 cfu) を接種した。3 時間感染後、細胞を回収、破碎して、寒天培地上に播種、培養した。生育コロニー数と接種菌数をもとに、GAS の付着・侵入率を算定した。また、3 時間感染後に細胞外付着菌を抗生物質にて処理し、侵入率を算定した。
3. GAS 咽頭付着マウスモデル：BALB/c マウス（メス、4 週齢）に 1～3 日間連続で $10^6 \sim 10^9$ cfu の GAS B514Sm 株（M50 型、J. R. Scott 博士より分与）を PRP と混和して経口感染させた。綿棒を用いてマウス咽頭部を拭取し、寒天培地上に播種、培養後の生育コロニー数の計測により GAS 付着の有無を検討した。
4. GAS 菌体凝集試験：GAS 菌体 ($A_{600}=0.3$) と PRP ($0 \sim 1,000 \mu\text{g/ml}$) を混和して 37°C で 8 時間静置し、凝集の程度を 4 段階で評価した。
5. GAS 表層に発現する PRP 結合タンパクの同定：SSI-9 株の 8M 尿素抽出画分に対し、ビオチン標識 PRP をプローブとしたウェスタンブロットを行った。PRP 結合タンパクを精製し、N 末端シークエンス、およびトリプシン消化によるアミノ酸内部シークエンスの結果に従って、アミノ酸配列を決定した。得られた配列を GAS ゲノムデータベースと照合し、PRP 結合タンパクを同定した。

6. 大腸菌による組換えタンパクの作製：タンパク発現ベクター pGEX-6P-1と目的タンパク遺伝子の PCR 産物から、組換えプラスミドベクターを作製し、大腸菌 XL-10Gold に形質転換して組換えタンパクを発現させた。
7. 免疫染色と共焦点レーザー顕微鏡による観察：細胞に付着した GAS 菌体あるいは菌体表層タンパクを免疫染色した。一次抗体として、それぞれ抗 GAS 抗体または抗 GrpE 抗体を使用し、二次抗体は AlexaFluor568 標識抗ウサギ IgG 抗体を用いた。共焦点レーザー顕微鏡下で、細胞への GAS 付着および侵入の観察、あるいは GrpE タンパクの菌体表層発現部位を分析した。
8. GrpE 欠失株の作成：クローニングベクター pSF152 に *grpE* 遺伝子の一部を組み込み pJM100 とした。これを B514Sm 株に形質転換し、GrpE 欠失株を得た。

【結果と考察】

単層培養した HEP-2細胞に対して GAS は、全唾液成分、PRP あるいはムチンの添加により、付着菌数および侵入菌数が有意に増加した ($P<0.05$)。本実験系に抗 PRP 抗体を添加すると、PRP による GAS の付着促進が阻害された ($P<0.05$)。一方、B514Sm 株をマウスに経口感染した場合、PRP 非添加の対照群に比して添加群では、GAS の咽頭粘膜への付着率が低かった。これらの結果から、PRP は GAS の咽頭粘膜上皮細胞への付着を促進させることが明らかとなった。

GAS の菌体表層に局在する Mタンパクや Fタンパクを欠失した変異株においても、野生株と同様に PRP の添加により菌体凝集反応が認められ、本菌の菌体表層には Mおよび Fタンパク以外に、PRP 結合タンパクが存在すると推測された。SSI-9株の 8M 尿素抽出画分には、PRP と結合する約 28kDa のタンパクの存在が、ウェスタンブロッティングにより認められた。同タンパクはアミノ酸シークエンスの結果からシャペロンタンパクの GrpE であると同定された。抗 GrpE 抗体を用いた免疫染色により、GrpE は菌体表層の全体ではなく細胞分裂時の剖面付近に局限して発現していることが顕微形態学的に示された。GrpE 断片の組換えタンパクを用いた解析により、GrpE は N末端側で PRP と結合することが示された。また、GrpE 欠失株では、菌形態や一部の生化学的性質に変化が認められ、野生株に比して HEP-2細胞への付着、侵入能が低下した。

【まとめ】

以上の結果より、GAS の咽頭粘膜付着メカニズムとして、これまで報告されてきた分子間接着以外に、菌体表層に発現したシャペロンタンパク GrpE と唾液 PRP との結合を介した付着系の存在が示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は A 群レンサ球菌 (GAS) の咽頭上皮細胞付着における唾液成分の影響を検索したものである。唾液高プロリンタンパク (PRP) の添加により本菌の培養細胞への付着およびマウス咽頭への定着が促進し、さらに GAS 細胞表層において PRP と結合するシャペロンタンパク GrpE が発現していることを明らかにした。これらの結果は、GAS の咽頭付着には唾液成分が介在することを示したものであり、博士 (歯学) の学位に値するものと認める。