

Title	コラーゲン結合アドヘシンを保有するS. mutans株
Author(s)	佐藤, 裕; 岡本, 和子; 鏡, 明祥; 山本, 康人; 五十嵐, 武; 木崎, 治俊
Journal	歯科学報, 105(1): 61-67
URL	http://hdl.handle.net/10130/189
Right	

コラーゲン結合アドヘシンを保有する *S. mutans* 株

佐藤 裕^{1,2)} 岡本和子¹⁾ 鏡 明祥¹⁾
山本康人¹⁾ 五十嵐 武³⁾ 木崎治俊^{1,2)}

抄録：*S. mutans* Z1株において未同定120kDa タンパクが見いだされた。これはこの株の低温凝集性に関与していた。ランダム変異導入法により、Z1株のこの凝集に関与する *cnm* と名付けた遺伝子を同定した。このコードタンパクアミノ酸配列は、ブドウ球菌などのコラーゲンアドヘシンの配列と高い相似性を示した。このタンパクがコラーゲン結合性に関与しているかどうか確認するため、*cnm* 遺伝子フラグメントを大腸菌に導入してリコンビナントタンパクを含む抽出液を得た。そして、この抽出液は固定化したコラーゲンとラミニンに結合することが示された。また、*cnm* 遺伝子の失活により低温凝集性を欠失した変異株05A02株は、親株Z1と比べコラーゲンとラミニンの結合が顕著に減少していた。この *cnm* 遺伝子は *S. mutans* の一部の株に検出された。この Cnm タンパクは、コラーゲン結合アドヘシンファミリータンパクの株特異的な新たなメンバータンパクの一つであった。

INTRODUCTION

Streptococcus mutans はヒト歯の最も有力な原因菌であり、口腔バイオフィルムであるデンタルプラークに生息している。プラークに付着し、生息するため、*S. mutans* は、細胞壁アンカータンパクに分類されるタンパクを含めていくつかの細胞外タンパクや酵素を産生する。今までに5つの細胞壁アン

カータンパクが *S. mutans* において同定されており、それらは *pac*, *fruA*, *dexA*, *gbpC* と *wapA* (Burne and Penders, 1992; Ferretti *et al.*, 1989; Igarashi *et al.*, 1995; Okahashi *et al.*, 1989; Sato *et al.*, 1997)である。このグループのタンパクは細胞外に分泌され、そこで細胞外酵素 sortase により (Cosart and Jonquieres, 2000) 細胞壁ペプチドグリカンに共有結合で繋ぎとめられる。そして、このグループのタンパクはいくつかの共通する特徴をもつ構造をしていることが良く知られている (Navarre and Schneewind, 1999)。

我々は、この株の染色体 DNA への *Himar I* ミントランスポソンの導入によるインビトロランダム変異導入法により、*S. mutans* Z1株の低温凝集という性質に関与する *cnm* (DDBJ Acc. # AB102689) と仮に名付けられた遺伝子を最近同定した (Sato *et al.*, 2004)。この遺伝子は細胞壁アンカータンパクの新たなメンバーをコードし、黄色ブドウ球菌など他のいくつかの菌に存在するコラーゲン結合アドヘシンタンパクのグループと非常に高いホモロジーを有していた (Lannergard *et al.*, 2003; Nallapareddy *et al.*, 2003; Rich *et al.*, 1999)。一部の *S. mutans* 株はコラーゲンを認識し、結合すると報告されている (Liu *et al.*, 1990; Switalski *et al.*, 1993)。細胞外タンパクである *S. mutans* の antigen I/II はコラーゲンなどの細胞外マトリックスタンパク (ECM) の結

キーワード：*Streptococcus mutans*, コラーゲン結合アドヘシン, 細菌性心内膜炎, 株特異的遺伝子
東京歯科大学学生化学講座¹⁾, 東京歯科大学口腔科学研究センター²⁾, 昭和大学歯学部口腔微生物学講座³⁾
(2004年12月1日受付) (2004年12月24日受理)
別刷請求先：〒261-8502 千葉市美浜区真砂1-2-2
東京歯科大学学生化学講座 佐藤 裕

本論文は、Journal of Dental Research, Volume 83, 534-539, 2004. に掲載された論文を和文により二次出版したものである。

合に關与すると報告されている(Beg *et al.*, 2002; Love *et al.*, 2000)けれど, Cnm タンパクはこの菌種における株特異的なコラーゲン結合分子かもしれない。この報文において, 我々は *S. mutans* の全菌体と Cnm タンパクのコラーゲン結合性について, 検討したことを記載する。

MATERIALS AND METHODS

細菌株

S. mutans の野生株 Z1 株が実験に用いられた。この株は以前に東京歯科大学で分離された株のうちの 1 株である。そしてランダム変異導入法によりこの株から得られた変異株 05A02 も用いられた。この変異株では, ミニトランスポソンが *cnm* 遺伝子内に挿入されたことによりこの遺伝子が失活していた。なお, このミニトランスポソンを用いたインビトロランダム変異導入法の詳しいストラテジーは我々の極最近の報告に記載されている(Sato *et al.*, 2004)。この Z1 株はミティス・サリバリウス・バシトラシン寒天平板培地上で *S. mutans* に特徴的なコロニー形態を示した株として分離され, 且つ Shklair により報告された *S. mutans* に特異的なパイオタイプを示した(Shklair and Keene, 1974)。又, この株の 16S リボソーム RNA 遺伝子の塩基配列は, この株が *S. mutans* 種に属することを示していた(Bentley *et al.*, 1991)。極最近開発された *S. mutans* の血清型を分別する PCR 法(Shibata *et al.*, 2003)によると, この株は血清型 f と判定された。これらの他に使用された *S. mutans* 株は Fig. 3 に示されている。これら菌株は Todd-Hewitt 液体培地で培養され, 必要に応じ培地にカナマイシン 500 µg/ml が添加された。市販(Invitrogen, Carlsbad, CA)の大腸菌株 TOP10 はプラスミド pBAD/HisA およびその派生プラスミドの宿主として, また DH5α 株は, 特に指定のない限り遺伝子操作の通法(Noran, 1989)の宿主として用いられた。

DNA 塩基配列の解析

我々は, オクラホマ大学先端ゲノムテクノロジーセンター(<http://www.genome.ou.edu/smutans.html>)の *S. mutans* ゲノムデータベースと国際 DNA データベース(EMBL, GenBank, and DDBJ)に対して, 類似の DNA 配列を検索するために BLAST プ

ログラムを用いた。DNA シーケンスの解析とマルチプルアライメントは DNASIS-Mac program(Hitachi Software Engineering, Yokohama, Japan)を用いて行った。

Cnm タンパクのコラーゲン結合ドメインのクローニングと発現

Cnm タンパクの推定されたコラーゲン結合ドメインに相当する遺伝子フラグメントはプライマー 120-kDa FwFu(5'-ATCTGCAGTGATGTCAGCAGTAACATTTCA-3')と DSHpa 3R(5'-CTGTAGTAGTGGTTGTTCTTCCGT-3')を用いて PCR 増幅し, 発現ベクターである pBAD/HisA(Invitrogen)の 5'ヒスチジンタグ領域(*Pst* サイト)にインフレームで結合した。大腸菌 TOP10 に形質転換後, 得られた複数のクローンは通法どおり解析し(Noran, 1989), 目的のクローンであることを確認した。これらのクローンの一つ ZAXF は, ネガティブコントロール株として pBAD/HisA を持つ TOP10 株(strain pBAD)および別のヒスチジンタグタンパクを発現するプラスミド pSBP6 を持つ TOP10 株(strain SBP6(Sato *et al.*, 2002a))とともに, コラーゲン結合アッセイに用いた。各細菌細胞は, $2 \times 10^{-3}\%$ のアラビノースをインデューサとして培養し, 集菌洗浄後, コラーゲン結合アッセイ用の粗抽出液を得るため従前通り(Sato *et al.*, 2002b) 6 サイクルの超音波処理をした。各ヒスチジンタグタンパクが誘導発現されていることはアッセイ前に SDS ポリアクリルアミド電気泳動後クマシー染色により確認した。

リコンビナント Cnm タンパクの ECM タンパクへの結合

固定化された各 ECM タンパクへのリコンビナントタンパクの結合能の解析は, 最近報告された方法(Nallapareddy *et al.*, 2003)を少し改変した ELISA 法を用いた。簡単に記述すると, 1 µg の各 ECM タンパクまたはウシ血清アルブミン(BSA)を含む 100 µl の PBS(50mM potassium phosphate, pH 7.2; 150mM NaCl)を ELISA プレート(Code 3801-096, Asahi Techno Glass Corporation, Funabashi city, Japan)の各ウェルに加え 1 晩 4°C でインキュベートし, これらタンパクをコートした。プレートのウェルは PBST(PBS with 0.01% Tween20)で洗

浄後, 5% BSA でブロッキングし, いろいろな量 (1–10 µg proteins in 20 µL of PBS with 0.1% BSA) の粗抽出液を加え 37 °C, 1.5 時間反応させた。結合タンパク量は Anti-His HRP Conjugates (Qiagen) 抗体を用いて定量した。

S. mutans 野生株及び変異株の全菌体の ECM タンパクへの結合

野生株 Z1 および変異株 05A02 の全菌体の ECM タンパクへの結合の評価は, 既報 (Ruhl *et al.*, 1996) に則って, しかし少し改変した ELISA 法により行った。ECM タンパクは前述のように ELISA プレートの各ウェルにコート, 洗浄後, ブロッキングした。全菌体は一夜培養液より回収し, PBS で 3 回洗浄後, 分光光度計 (Ubest 35, JASCO Corporation, Tokyo, Japan) で濁度 1.0 に調製した。これは 1×10^9 cfu/ml にほぼ相当する。この 0.9 ml に 0.1 mg の NHS-LC-Biotin (Pierce, Rockford, IL, USA) を含む 0.1 ml の PBS を混合し, 全菌体細胞をビオチンラベルした。ラベルされた細胞は Ultrafree-CL 遠心フィルター濾過装置 (0.22 µm, Millipore Corporation, Bedford, MA, USA) のインナーチューブで懸濁, 濾過を 3 回繰り返し洗浄した。約 2×10^8 個の洗浄細胞を上記プレートのウェルで 37 °C, 1 時間反応させ結合アッセイを行った。結合した細胞は Streptavidin-HRP Conjugates (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) で評価した。

サザンハイブリダイゼーション分析

野生株 Z1 株および UA159 株を含む標準菌株および臨床分離株の, 制限酵素 (*Hind* III) 消化染色体 DNA は, ECL direct nucleic-acid-labeling and detection system (Amersham Co. LTD., Tokyo, Japan) を用い, 以前に記載されたように (Sato *et al.*, 1997) 解析した。

Results

Cnm タンパクアミノ酸配列の特徴

cnm 遺伝子と相同な塩基配列は UA159 ゲノムデータベース上には検出されなかった。*cnm* 遺伝子から翻訳されたアミノ酸配列と相似性のある配列が国際 DNA データベース上で検索された。いくつかの類似性の高い配列は, 黄色ブドウ球菌や *Streptococcus equi* などからの細胞壁アンカータンパクで

あるコラーゲン結合アドヘシンのグループとして検出された。最も類似した標的配列領域は, 黄色ブドウ球菌 FDA574 株 (54.8% 同一アミノ酸) とメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 MW2 株のコラーゲン結合アドヘシン前駆体タンパク (Cna) のコラーゲン結合ドメイン (CBD) に相当する領域であった。次に類似性の高い配列は, 最近報告された *Enterococcus faecium* (Acm, 48.8% identity) と *S. equi* (Cne, 48.2% identity) の CBDs 領域であった。*Enterococcus faecalis* (Ace, 31.5% identity) の CBD 領域は *S. mutans* Cnm のそれとは若干類似性は低かった。5 つの CBD 領域のマルチプルアライメントは Fig. 1 に示されている。Cnm タンパクのもう一つの特徴は, その C 末端領域に認められた繰り返し配列であり, それは 2 つの TTTTE (K/A) P の繰り返しとそれに続く 19 回の TTTE (A/S/T) P の繰り返し配列であった (Fig. 4)。

コラーゲン結合アッセイ

cnm 遺伝子翻訳アミノ酸 N 末端領域の配列が既報コラーゲンアドヘシン前駆体タンパク CBD 領域と類似性を持つことから, Cnm 成熟タンパクの N 末端領域に存在すると考えられる CBD 領域を含むにアミノ酸配列に相当する *cnm* 遺伝子 5' 領域を PCR 法により増幅し, タンパクを過剰発現させるためその増幅産物を pBAD/HisA 発現ベクターにサブクローニングした。そのクローン ZAXF タンパクの発現は SDS ポリアクリルアミド電気泳動後の CBB 染色により容易に確認できたので, 市販の ProBond レジンカラムキット (Invitrogen) を用いて精製を当初試みた。しかしながら, そのプロトコルに従いタンパクは非変性状態でイミダゾールにより抽出すると直後に凝集してしまった。更には, pH を低下することにより抽出したタンパクはコラーゲンに全く結合性を示さなかった。それ故我々は Materials & Methods に記載したように大腸菌の粗抽出液を結合アッセイに用いた。ZAXF タンパクは固定化したコラーゲンタイプ I に濃度依存的に結合した。そしてやや弱いながらラミニンにも結合した。しかし, フィブロネクチンや対照である BSA には結合しなかった (Fig. 2 A)。アラビノース非存在下で培養した (uninduced ZAXF) ZAXF 菌体からのタンパクや 2×10^{-3} % アラビノース存在下で培養した

<i>S. mutans</i> Collagen-binding Adhesin		535					
SmuCnm_CBD	152	VTSIGTAE	VYSSSPTT	-GIFYNTGD	NDTDTNHYR	WFLNINNEA	200
SauCna_CBD	151	ITSSKSTN	VYHSEETS	SIFYNYTGB	HLFEDITAYR	WFLNINNEA	199
EfaCcm_CBD	151	TSYSD	NVTPSSSS	SSVIFYKTGB	HLFEDTKIIR	WFLNINNGT	200
SeqCne_CBD	147	KVQRRHAI	VYKPEASDG	TSSIFYTGB	SQNDFERYR	WFLNINNEA	196
EfaAce_CBD	155	AIQRLTIEG	VNLETGQIER	DYPIFYRVGD	L-AGESIQVR	WFLNVLNKS	203
SmuCnm_CBD	201	YDSRTRTE	DIOSGOTLDI	DRFDIIVVNG	SE--YRGOE	GINLAAR-Y	246
SauCna_CBD	200	YYSKATIKK	QIQGGQDL	TLNNTT	THNTYS	ATDKA-	247
EfaCcm_CBD	201	YEQPVKIS	ETQSGRDP	TETEQIHL	GQVYRGE	GQQLQD-	249
SeqCne_CBD	197	WANTVIVED	DIQGGCTDM	SEFDIIVVSG	YRNERFVEN	LIEHTT-	234
EfaAce_CBD	204	DTEISIA	RQGGOOLNK	ETFDIVD	KTKI----	SLAEQOQY	249
SmuCnm_CBD	247	-RATTSADPA	SGTISYTPQ	GYASLRST	M LTVDPD	QKT--FENNS	293
SauCna_CBD	248	-SKIVNIN	KTTDITLPG	GGLYSESI	NKIKIIEQ	QK--VANS	295
EfaCcm_CBD	250	-SIFNFS	NYEITLAK	RFVNRKIMV	S IIEE	IN--EHS	297
SeqCne_CBD	235	-NSV---	PHISLSD	YDQTVNV	A LKIDF	QK--AANS	280
EfaAce_CBD	250	GKIDF---	LDNFLFYR	KRFTIV	RITST	EAGHQATENSY	296
SmuCnm_CBD	294	AWKELGQ	AVDQEFNHS	VAN	316
SauCna_CBD	296	QAWYGHGNE	EVDGQFRHT	VH	318
EfaCcm_CBD	298	EAWFKFRNP	AVDQEFNHT	K	320
SeqCne_CBD	281	KIYVILYNT	QSSQESLRQ	VA	313
EfaAce_CBD	297	DINQLRQ	ATLENTSQV	KNV	319

Figure 1 . Alignment of Cnm CBD with CBDs from previously identified collagen-binding adhesins. All 5 sequences were numbered from the initiation codon of the precursor proteins. The putative CBD identified from the Cnm sequence was aligned with CBDs from *S. aureus*, *E. faecium*, *S. equi*, and *E. faecalis*, with the use of the DNASIS-Mac program. Identical amino acid residues are indicated as letters on a gray background.

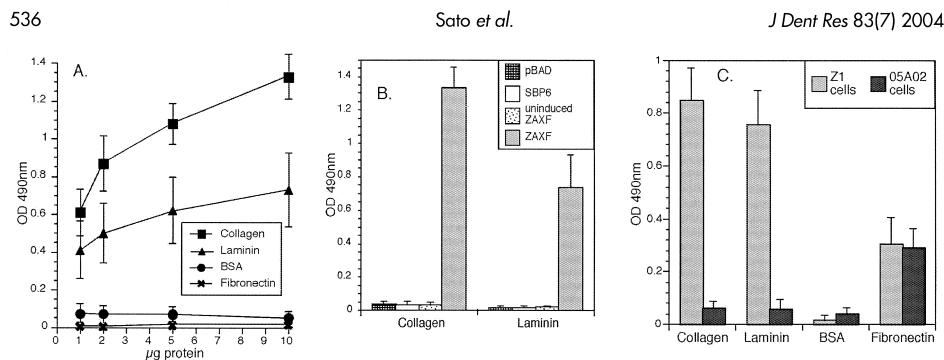


Figure 2 . Binding of recombinant putative CBD of Cnm protein to immobilized ECM proteins. (A) Strain ZAXF was grown in the presence of $2 \times 10^{-3}\%$ arabinose as an inducer, and the crude cell-free extract was prepared as described in the text. Binding of recombinant Cnm protein to immobilized ECM proteins, collagen type I, fibronectin, and laminin as a function of the concentration (1-10 μg in 20 μl of PBS with 0.1% BAS) of the extracts applied to the well. BSA was used as a negative control. (B) The extract contained 10 μg protein from strain ZAXF cells grown in the absence of arabinose (uninduced ZAXF) and those from strains pBAD (as a negative control) and SBP 6 (a strain expressing another histidine-tagged protein as a negative control) cells grown in the presence of $2 \times 10^{-3}\%$ arabinose were also used as controls for binding of recombinant Cnm protein to collagen type I and laminin. (C) Biotin-labeled strains Z 1 and 05 A 02 whole cells were examined for binding to the ECM proteins as described in the text.

We measured relative binding by monitoring absorbance at 490 nm following the peroxidase reaction for 3 min in the recombinant assays and for 4 min in whole-cell assays with o-phenylenediamine, and H_2O_2 was terminated with the addition of 2 M H_2SO_4 . All OD 490 nm values were corrected for the responses of peroxidase activities with the respective ECM proteins. Data points represent the means of OD490nm values \pm standard deviation from more than 3 independent experiments.

pBAD 株や SBP 6 株からのタンパクもコラーゲンタイプ I やラミニンに結合性を示さなかった (Fig. 2 B)。

ビオチンラベルされた *S. mutans* Z 1 株の全菌体

はコラーゲンタイプ I やラミニンに最も強く結合し、フィブロネクチンには弱く結合した (Fig. 2 C)。これに対し、05A02変異株の全菌体は、フィブロネクチンにだけ結合性を示しその程度は Z 1 株

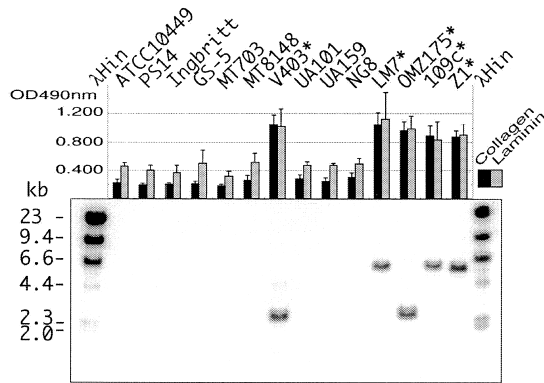


Figure 3 . Presence of the *cnm* gene in a population of *S. mutans*. *Hind*III-digested chromosomal DNA fragments from reference strains, including strain UA 159, and several natural isolates in addition to strain Z 1 were analyzed by Southern hybridization under high stringency conditions, with the *cnm* gene fragment as a probe. Asterisked are the *cnm* gene-positive strains. Binding assays of the strains to collagen/laminin were carried out as in Fig.2. Data points represent the means of OD 490 nm values \pm standard deviation from 4 (collagen) or 3 (laminin) independent experiments.

のそれと同様であった。リコンビナントタンパクと全菌体の結合アッセイプロファイルは互いに合致するものであった。

***cnm* 遺伝子の *S. mutans* 株間における分布**

S. mutans の色々な株における *cnm* 遺伝子の存在分布を調べるため、UA159およびZ1株を含め、我々の研究室で保管している保存株と分離株について、それらの *Hind* III 消化染色体 DNA のサザンハイブリダイゼーション分析を *cnm* 遺伝子フラグメントをプローブとして行った。調べた14株のうち5株が *cnm* 陽性であり (Fig. 3), それらは低温凝集性を示し且つコラーゲン/ラミニン結合性を示した。一方残りの9株はこれらの発現形質を示さなかった。興味深いことに、5株の陽性株のうち3株は血清型 e または f (LM7, OMZ175, Z1) であった。なお、AFLP 分析の結果から、これらの *cnm* 陽性株は全て異なるクローン (遺伝系統の異なる株) と考えられた。

S. mutans Collagen-binding Adhesin

537

1	ATGAAAGAAAGGTTTACGAAGCATTTAAAGTTTGGAAACCGTTGCCATGTTTCCCAATGTTTTCATAGCTTTAAGCAAGCTCAGGCAAGTG	100
1	M K R K G L R R L L K F F G T V A I I L P N F F I A L T K A Q A S	34
101	ATGTCAGCAGTAACATTCATCGCTGACGGTATCACCCGACTCAGATTAATGATGGCGTAAGACCCGCTTCGCTTTGAGTTTGTAGCATGCTCAAAA	200
34	D V S S N I S S L T V S P T Q I N D G G K T T V R F E F D E H A Q N	67
201	TATTAAGCAGGCGACACCATTTACTGTTAACTGGCAGAAATTCAGGAACAGTCAGABGAACAGTTTATACGAAACCATTAAAGCTGGAGGTTTCAGGCAAG	300
67	I K A G D T I T V N W Q N S G T V R G T G Y T K I I K L E V O G K	100
301	TATGTTGGTATTGGTAGTACGCAAGCAAAAGCAGTTGTTACTTTCAGTACAGATTACTGGCTTGCAAAATATCACCGCTGGGCTGAATTTGAAA	400
101	Y V G D L V V T Q D K A V V T F N D S I T G L Q N I T G W G E F E	134
401	TGGAAGCCGGAAATTTACTGACACTACTACCGAAATACTGGCAGCTCCCAAGTTACCAGCGGGCAAGACAGCTGAGGTTACTGCTTAAATCTGC	500
134	I E G R N F T D T T T G N T G S F Q V T S G G K T A E V T V Y K S A	167
501	TTCCAGGCTACCGGCTTTTCTACTATAAGCATGGGATATGACAGACAGATGACACCAATCATGTGGCTGGTTTTTGAATATCAACAATGAAATGCT	600
167	S G T T G V F Y Y K T G D M Q T D D T N H V R W F L N I N E N A	200
601	TATGTAGCAGTGATATTCGATTTGAAGATGACATTCAGTCTGGTCAAGCTTGGATATAGAGAGTTTGGATATCTGTAAGTGGCAGTGAAGCTTATC	700
201	Y V D S D I R I E D D I Q S G Q T L D I D S F D I T V N G S E S Y	234
701	GGCTCAAGAAAGTATTAATCAGCTTGCCAAAGATATGGTCAACTATTTTCAGCTGATCCGGCTAGTGGCCATATCAGTGTITATATTCCTCAAGGTA	800
234	R G Q E G I N Q L A Q R Y G A T I S A D P A S G H I S V Y I P Q G Y	267
801	TGCTCTTTGAAATCGCTTTAGCATCATGACTTGACTAAAGTTGACATCCTGATCAAAAGCAGTTTGAATAACAGTAAAGCTTGGTATAAGAAAGC	900
267	A S L N R F S I M Y L I K Y D N P D Q K T F E N N S K A W Y K E N	300
901	GGTAAAGATGCTGTTGATGATGAAATTAACCATCTGTAGCTAATGTTAAATGCCGCCGGGGTGGAGCGAAGCAACCCACTACTACAGAAAAGC	1000
301	G K D A V D G K E F N H S V A N V N A A G G Y D G R T T T T T E K	334
1001	CAACAACGACGACAGAGGCTCAACAACAACGGAAGCTCGAAGCAGACAGAGGCTCAACGACACAGAGCTCCAAACAACAACGAGCTCCACAGAC	1100
334	P T T T T I E A P I T T T E T P I T T T E A P I T T T E S P T I T T E A P I T T	367
1101	AACAGAAGCTCCAAACAACGGAAGCTCCAAACAACAACAGAGTCTCCAAACAACAACGAGGCTCCAAACAACAACGGAAGCTCCAAACAACAACGAGGCT	1200
367	T E A P I T T T E A P I T T T E S P T T T T E A P T T T T E A P T T T T E A	400
1201	CCAAACAACAACGGAAGCTCGAAGCAGACAGAGCTCCAAACAACAACGAGGCTCCAAACAACAACGGAAGCTCCAAACAACAACGGAAGCTCCAAACAACAACGAGGCT	1300
401	P I T T T E A P I T T T E A P T T T T E A P I T T T E A P I T T T E A P T T T E A P T T	434
1301	CAGAAGCTCCAAACAACAACGGAAGCTCCAAACAACAACAGAGTCTCCAAACAACAACGGAAGCTCCAAACAACAACGGAAGCTCCAAACAACAACGGAAGTATCTTCAGAAACAACCTAAAGC	1400
434	T E A P I T T T E A P T T T T E S P T T T T E A P T T T T E V S S E T T K A	467
1401	TGAAGAAGCTACTTAAGTAAAGAACAGAAAACAACACACATCAGTTCAGCAGGTCAACCTTCAACAACAACCTAATAAGCATCAGCAGCAACA	1500
467	E E T T T K Y K E P E K T T T S V P A G T T S N K P N K P S G K Q	500
1501	GGTCTGTTCAAGGAGCTTCAAGCAGCAGGCAAGAAAGCGGATGTTTGGTCACTCTGGCTTGGCACTGTCTCAGTCACTGCTAGTCTAGTTAAGC	1600
501	G A G T K G L P S T G E E S G I V L S L L G L A T V S V Y T G L V Y	534
1601	GTAATATCATAGCTGA	1617
534	R K Y H S *	539

Figure 4 . The DNA nucleotide and deduced amino acid sequences of the *cnm* gene. (The DDBJ-EMBL-GenBank nucleotide sequence databases accession number is AB102689.) Underlines indicate, respectively, the N-terminal sequence determined from isolated Cnm protein, CBD homologous sequence, putative B repeats domain, and LPXTG motif.

Discussion

この Cnm タンパクは、黄色ブドウ球菌、*E. faecium*, and *S. equi* (Patti *et al.*, 1992; Lannergard *et al.*, 2003; Nallapareddy *et al.*, 2003) のコラーゲン結合アドヘシンと高い相同性を示した。また、Cnm タンパクアミノ酸残基152から316までの165残基はこれらのコラーゲン結合アドヘシンの CBD 領域と特に高い相同性を示した。更に、黄色ブドウ球菌の Cna のコラーゲン結合性に必須ないくつかのアミノ酸が Cnm タンパクにも保存されており、それらのアミノ酸は Cna 分子においてコラーゲン分子を受容する溝の壁を構成する重要なアミノ酸とされている (Symersky *et al.*, 1997)。これらの結果は、*S. mutans* の Cnm タンパクが、観察されたコラーゲン結合活性をもつであろうという推測を強く示唆していた。

以前に同定されたコラーゲン結合アドヘシン分子 (Patti *et al.*, 1992; Rich *et al.*, 1999; Lannergard *et al.*, 2003; Nallapareddy *et al.*, 2003) は CBD を含む A ドメインに続く B リピート領域をもっている。しかし、このリピートユニットの数や長さは種に依存して異なっていた。*S. mutans* の Cnm タンパクは、推定上の CBD 領域と C 末端領域のプロリンおよびリシンに富む細胞壁貫通領域との間に位置する (Fig. 4) 7 残基の 2 回繰り返し単位と 6 残基の 19 回繰り返し単位を含んでいた。*S. mutans* Cnm タンパクのこの繰り返し領域は、コラーゲン結合アドヘシン分子に共通する B リピート (繰り返し) 領域に相当すると考えられた。従って、Cnm タンパクはその CBD 部分の相同性ばかりでなく、そのドメイン構造の特徴も、全体として保存されていると我々は結論する。

リコンビナント CBD ドメインタンパク (ZAXF タンパク) を含む大腸菌の粗抽出液を用いた特異的結合アッセイにより、*S. mutans* Cnm タンパクはコラーゲン結合アドヘシンファミリーの新しいメンバーであることを示している。また ZAXF タンパクはラミニンにも結合性を示したことは興味深い。これは、野生型親株と *cnm* 変異株 05A02 で示されたコラーゲン/ラミニン結合性の相対的な差ばかりでなく、両株がフィブロネクチンには同等な結合性

を保持していたこととも合致している。*cnm* 遺伝子フラグメントをプローブとした *S. mutans* 株に対するサザンプロット分析は、調べた 14 株中 UA159 株を含めて 9 株がこの *cnm* 遺伝子を保持していないことを示していた。*S. mutans* の調べられた株のおよそ 20 - 25% がコラーゲン結合性を示したという 2 つの報告 (Liu *et al.*, 1990; Switalski *et al.*, 1993) が 10 年以上前にあった。これらの保有率は今回の我々の結果と良く一致する。これらの結果は、併せて、*S. mutans* 株の菌体のコラーゲン結合性は株特異的な Cnm タンパクにより媒介されているようであることを示唆している。

口腔ビリダスレンサ球菌は、感染性心内膜炎に関与する病原因子と見なされている。そして血液由来のフィブリノーゲン (フィブリン) のみならず内皮下のコラーゲン、シアロタンパク、フィブロネクチン、ラミニンなど細胞外マトリックスタンパクにたいするこれらの細菌の結合性はその潜在的な病原因子と見なされている (Sommer *et al.*, 1992; Sciotti *et al.*, 1997; Chia *et al.*, 2000; Beg *et al.*, 2002; Takahashi *et al.*, 2002)。*S. mutans* は、レンサ球菌による全ての細菌性心内膜炎の 8 - 18% を占めるとされ (Ryd *et al.*, 1996)、細胞外タンパク抗原 I が、コラーゲンを含む細胞外マトリックスタンパクへの *S. mutans* 菌体の結合に関与すると報告されている (Love *et al.*, 2000; Beg *et al.*, 2002)。*S. mutans* が細菌性心内膜炎の本当の病原因子であるかどうかしばしば疑問がもたれてきていた。この点に関して、株特異的な Cnm タンパクの発現は一つの重要な病原因子であるかもしれないし、その疑問に解答を与えるものかもしれない。それ故、感染性心内膜炎の患者から分離される *cnm* 遺伝子陽性株の頻度と健康な人におけるその頻度とを比較することは興味深いものであろう。そして、実験的心内膜炎のラットモデル系での病原性に *cnm* 遺伝子陽性と陰性の株とで明らかな差があるかどうかを見ることもまた興味深いことであろう。

我々の知識が及ぶ限り、この論文はヒト口腔常在ビリダスレンサ球菌からコラーゲン結合性アドヘシンの存在を示した最初の報告である。

謝 辞

本稿に貴重な助言を頂いたニューヨーク州立大学バッファロー校 H. K. Kuramitsu 教授に感謝いたします。また、以下の学術研究奨励金等の一部から支援を受けました。文部科学省ハイテク事業による私学助成(平13-17)、文部科学省科学研究費補助金基盤(平13-16)、日本ワックスマン財団学術研究助成奨励金(平15)。

参 考 文 献

- 1) Beg, AM, Jones, MN, Miller-Torbert, T, Holt, RG(2002) Binding of *Streptococcus mutans* to extracellular matrix molecules and fibrinogen. *Biochem Biophys Res Commun* 298 : 75 ~ 9 .
- 2) Bentley, RW, Leigh, JA, Collins, MD (1991) Intragenetic structure of *Streptococcus* based on comparative analysis of small-subunit rRNA sequences. *Int J Syst Bacteriol* 41 : 487 ~ 94 .
- 3) Burne, RA, Penders, JE(1992) Characterization of the *Streptococcus mutans* GS-5 fruA gene encoding exo-beta-D-fructosidase. *Infect Immun* 60 : 4621 ~ 32 .
- 4) Chia, JS, Yeh, CY, Chen, JY(2000) Identification of a fibronectin binding protein from *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 68 : 1864 ~ 70 .
- 5) Cossart, P, Jonquieres, R(2000) Sortase, a universal target for therapeutic agents against gram-positive bacteria? *Proc Natl Acad Sci USA* 97 : 5013 ~ 5 .
- 6) Ferretti, JJ, Russell, RR, Dao, ML(1989) Sequence analysis of the wall-associated protein precursor of *Streptococcus mutans* antigen A. *Mol Microbiol* 3 : 469 ~ 78 .
- 7) Igarashi, T, Yamamoto, A, Goto, N (1995) Sequence analysis of the *Streptococcus mutans* Ingbritt dexA gene encoding extracellular dextranase. *Microbiol Immunol* 39 : 853 ~ 60 .
- 8) Lannergard, J, Frykberg, L, Guss, B(2003) CNE, a collagen-binding protein of *Streptococcus equi*. *FEMS Microbiol Lett* 222 : 69 ~ 74 .
- 9) Liu, T, Gibbons, RJ, Hay, DK(1990) *Streptococcus cricetus* and *Streptococcus rattus* bind to different segments of collagen molecules. *Oral Microbiol Immunol* 5 : 143 ~ 8 .
- 10) Love, RM, McMillan, MD, Park, Y, Jenkinson, HF (2000) Coinvasion of dentinal tubules by *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus gordonii* depends upon binding specificity of streptococcal antigen I/II adhesin. *Infect Immun* 68 : 1359 ~ 65 .
- 11) Nallapareddy, SR, Weinstock, GM, Murray, BE(2003) Clinical isolates of *Enterococcus faecium* exhibit strain-specific collagen binding mediated by Acm, a new member of the MSCRAMM family. *Mol Microbiol* 47 : 1733 ~ 1747 .
- 12) Navarre, WW, Schneewind, O(1999) Surface proteins of gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiol Mol Biol Rev* 63 : 174 ~ 229 .
- 13) Noran, O(1989) 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 14) Okahashi, N, Sasakawa, C, Yoshikawa, M, Hamada, S, Koga, T(1989) Molecular characterization of a surface protein antigen gene from serotype c *Streptococcus mutans*, implicated in dental caries. *Mol Microbiol* 3:673 ~ 8 .
- 15) Patti, JM, Jonsson, H, Guss, B, Switalski, LM, Wiberg, K, Lindberg, M et al. (1992) Molecular characterization and expression of a gene encoding a *Staphylococcus aureus* collagen adhesin. *J Biol Chem* 267 : 4766 ~ 72 .
- 16) Patti, JM, House-Pompeo, K, Boles, JO, Garza, N, Gurusiddappa, S, Hook, M(1995) Critical residues in the ligand-binding site of the *Staphylococcus aureus* collagen-binding adhesin (MSCRAMM). *J Biol Chem* 270:12005 ~ 11 .
- 17) Rich, RL, Kreikemeyer, B, Owens, RT, LaBrenz, S, Narayana, SV, Weinstock, GM et al.(1999) Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *J Biol Chem* 274 : 26939 ~ 45 .
- 18) Ruhl, S, Sandberg, AL, Cole, MF, Cisar, JQ(1996) Recognition of immunoglobulin A 1 by oral actinomyces and streptococcal lectins. *Infect Immun* 64 : 5421 ~ 4 .
- 19) Ryd, M, Schennings, T, Flock, M, Heimdahl, A, Flock, JK(1996) *Streptococcus mutans* major adhesion surface protein, P 1(I/II) does not contribute to attachment to valvular vegetations or to the development of endocarditis in a rat model. *Arch Oral Biol* 41 : 999 ~ 1002 .
- 20) Sato, Y, Yamamoto, Y, Kizaki, H(1997) Cloning and sequence analysis of the *gbpC* gene encoding a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 65 : 668 ~ 675 .
- 21) Sato, Y, Okamoto, K, Kizaki, H(2002a) *gbpC* and *pac* gene mutations detected in *Streptococcus mutans* strain GS-5. *Oral Microbiol Immunol* 17 : 263 ~ 6 .
- 22) Sato, Y, Senpuku, H, Okamoto, K, Hanada, N, Kizaki, H (2002b) *Streptococcus mutans* binding to solid phase dextran mediated by the glucan-binding protein C. *Oral Microbiol Immunol* 17 : 252 ~ 6 .
- 23) Sato, Y, Okamoto, K, Kagami, A, Yamamoto, Y, Ohta, K, Igarashi, T et al. (2004) Application of in vitro mutagenesis to identify the responsible gene for cold agglutination phenotype of *Streptococcus mutans*. 48 : in press.
- 24) Sciotti, MA, Yamodo, I, Klein, JP, Ogier, JA(1997) The N-terminal half part of the oral streptococcal antigen I/II contains two distinct binding domains. *FEMS Microbiol Lett* 153 : 439 ~ 45 .
- 25) Shibata, Y, Ozaki, K, Seki, M, Kawato, T, Tanaka, H, Nakano, Y et al. (2003) Analysis of loci required for determination of serotype antigenicity in *Streptococcus mutans* and its clinical utilization. *J Clin Microbiol* 41 : 4107 ~ 12 .
- 26) Shklair, IL, Keene, HJ(1974) A biochemical scheme for the separation of the five varieties of *Streptococcus mutans*. *Arch Oral Biol* 19 : 1079 ~ 81 .
- 27) Sommer, P, Gleyzal, C, Guerret, S, Etienne, J, Grimaud, JA(1992) Induction of a putative laminin-binding protein of *Streptococcus gordonii* in human infective endocarditis. *Infect Immun* 60 : 360 ~ 5 .
- 28) Switalski, LM, Butcher, WG, Caufield, PC, Lantz, MS (1993) Collagen mediates adhesion of *Streptococcus mutans* to human dentin. *Infect Immun* 61 : 4119 ~ 25 .
- 29) Symersky, J, Patti, JM, Carson, M, House-Pompeo, K, Teale, M, Moore, D et al. (1997) Structure of the collagen-binding domain from a *Staphylococcus aureus* adhesin. *Nat Struct Biol* 4 : 833 ~ 8 .
- 30) Takahashi, Y, Konishi, K, Cisar, JO, Yoshikawa, M (2002) Identification and characterization of *hsa*, the gene encoding the sialic acid-binding adhesin of *Streptococcus gordonii* DL1. *Infect Immun* 70 : 1209 ~ 18 .