

令和元年6月21日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11011

研究課題名(和文) う蝕原因菌由来新規アセチル化酵素の機能解析とう蝕予防への展開

研究課題名(英文) A Novel Variation of Bacterial Peptidoglycan by New Acetylating Enzyme and Development of Caries Prevention

研究代表者

林 幾江 (Hayashi, Ikue)

広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・助教

研究者番号：00346503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：口腔常在菌中Streptococcus mutansとS. sobrinusはう蝕原因菌として知られている。7種の口腔常在連鎖球菌の細胞壁構造を調べた結果、う蝕原因菌にのみ架橋ペプチド鎖の-Thr-残基がアセチル化修飾されている特徴的な修飾構造を見出し、バイオインフォマティク解析により-Thr-をアセチル化修飾する責任遺伝子を特定した。また、代表的う蝕原因2菌種の細胞壁にのみ結合する塩基配列をペプチドグリカン加水分解酵素AmlIから見出した。唾液中のう蝕原因菌診断、定量を試みるため蛍光標識した細胞壁結合タンパク質を作成し、生菌に反応させた後フローサイトメトリー解析を行う基礎的検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

う蝕は多くの国民が罹患している感染症の一つであるが、歯質・糖質・口腔常在菌など複雑な因子が絡み合って生じる疾患である。口腔常在菌中Streptococcus mutans(ミュータンス菌)とS. sobrinus(ソブリナス菌)はう蝕原因菌として知られているが依然として効果的なう蝕予防法は開発されておらず、個人の歯磨きや洗口剤によるうがい、といった予防に頼っている。我々はこの代表的2菌種の特異的な構造を発見することでう蝕診断法、ひいては新規予防法を開発することを目指している。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus mutans and S. sobrinus are known as cariogenic bacteria in oral cavity indigenous bacteria. We examined the cell wall peptidoglycan structure of seven kinds of oral streptococci. We found a novel modified structure in which -Thr-residue of the cross-linked peptide chain was acetylated and modified only in caries causing bacteria. Bioinformatic analysis identified the gene responsible for acetylation modification of -Thr-. In addition, the specific protein that binds only to the cell walls of two representative caries-causing bacteria (S. mutans, S. sobrinus) found from peptidoglycan hydrolase AmlI was purified in large quantities. In order to attempt to diagnose and quantify cariogenic bacteria in saliva, fluorescently labeled cell wall-bound proteins were prepared, reacted with viable bacteria, and subjected to flow cytometric analysis.

研究分野：細菌学

キーワード：う蝕

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

う蝕は多くの国民が罹患している感染症の一つであるが、歯質・糖質・口腔常在菌など複雑な因子が絡み合って生じる疾患である。口腔常在菌中 *Streptococcus mutans* (ミュータンス菌) と *S. sobrinus* (ソブリナス菌) はう蝕原因菌として知られている。依然として効果的なう蝕予防法は開発されておらず、個人の歯磨きや洗口剤によるうがい、といった予防に頼っている。消毒剤等で処置を行った場合、その他の細菌類も生育阻害されるため口腔内環境が崩れ、再度、原因菌の繁殖を招き別の感染症を引き起こす原因となることも懸念される。口腔常在菌叢をかく乱することなく、細菌を選択的に除去・検出するため、抗原抗体反応や binding domain の結合特異性を利用するなど生物学的特異性を利用することで細菌を選択的に除去・検出する手法の確立が待たれている。

細菌は、表層をペプチドグリカンと呼ばれる強靱な巨大分子を主要構成成分とする細胞壁で覆われている。細胞壁は細菌の生存に必須の構造体で、その主要な構成成分のペプチドグリカンは *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) と *N*-acetylmuramic acid (MurNAc) からなる 2 糖の繰返しグリカン鎖がペプチド鎖で架橋結合している網目構造をなす巨大分子である (図 1)。そのグリカン鎖がアセチル化や脱アセチル化などの修飾を受けより複雑で多様な構造体となっている。ペプチドグリカンにアセチル化や脱アセチル化の修飾が起こるとリゾチームや抗生物質に対する抵抗性が増し、病原性発現の要因ともなることが報告され、細菌の成長や分離・分裂におけるペプチドグリカン修飾酵素の役割が解明されつつある。口腔常在連鎖球菌のう蝕原因菌にのみ存在する特徴的な構造をターゲットにしたう蝕細菌除去・検出法はう蝕予防分野において新たなブレークスルーとなる可能性を秘めている。

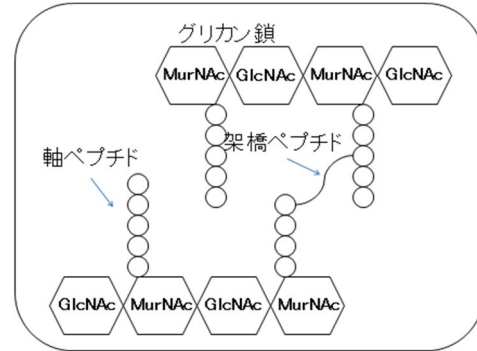


図1 ペプチドグリカンの基本構造

### 2. 研究の目的

口腔常在連鎖球菌の細胞壁にう蝕原因菌にのみ特徴的な構造が存在すると考え、この代表的 2 菌種 (*S. mutans*, *S. sobrinus*) の特異的な構造を精査し、う蝕原因菌をチェアサイドで簡便に検出し、カリエスリスクを評価すると共に、う蝕原因菌を選択的に除去する、新たなう蝕診断法、ひいては新規予防法を開発することを目指した。立案した以下の 2 つの仮説 (1) 口腔常在連鎖球菌の細胞壁にう蝕原因菌にのみ特徴的な構造が存在する (2) 代表的う蝕原因 2 菌種の細胞壁にのみ結合するたんぱく質が存在する について検証する。

### 3. 研究の方法

仮説 (1) 口腔常在連鎖球菌の細胞壁にう蝕原因菌にのみ特徴的な構造が存在する、に関して

口腔連鎖球菌のペプチドグリカンの構造解析

4% SDS 沸騰水中より調製したペプチドグリカンを mutanolysin で消化し、可溶化する。ムロペプチドを HPLC にて分離・分画し、各々の画分について質量分析、エドマン分解、アミノ酸分析からペプチドグリカン構造を解析する。

ペプチドグリカンの基本骨格構造をグリカン鎖、軸ペプチドの 3 位アミノ酸の種類、架橋様式 (直接結合、オリゴペプチド架橋)、アセチル化または脱アセチル化の修飾とその部位、軸ペプチド 2 位アミノ酸の amidation の有無、軸ペプチドのアミノ酸数の割合 (tri, tetra, penta 体)、グリカン鎖長、架橋度等について解析する。

口腔連鎖球菌ゲノム情報のバイオインフォマティクス解析

*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. cricetus*, 及び *S. downei* ゲノム情報をバイオインフォマティクス解析 (BLASTP program, TreeGraph 2, PRALINE algorithm, HMMTOP, in silico molecular cloning software 等) し、ペプチドグリカンの修飾にかかわる遺伝子、アセチル化遺伝子を探索する。得られたアセチル化酵素の数、構造情報 (膜貫通ドメイン、catalytic domain、立体構造)、系統樹解析等を行い、う蝕原因菌に特徴的に存在しているアセチル化修飾の責任遺伝子、即ちペプチド鎖の Thr 残基のアセチル化に関与するアセチル化遺伝子を同定する。グラム陰性菌のペプチドグリカン アセチル化酵素、PatA と PatB の 2 量体 (基質: MurNAc)、*Lactobacillus* のペプチドグリカン アセチル化酵素、OatB (基質: GlcNAc) これら遺伝子と新規に同定したペプチド鎖-Thr-のアセチル化遺伝子のホモロジー検索を行う。

*S. sobrinus* 形質転換のためのプラスミド構築

*E. coli*-*Streptococcus* shuttle plasmid vector である pVA838 や pDL289 を用いて *S. sobrinus* の形質転換を可能とするプラスミドを構築する。



## 仮説(2)について

う蝕原因菌細胞壁特異的結合分子に関して、我々が単離したペプチドグリカン加水分解酵素 Automutanolysin "Aml" (Microbiol Immunol 50: 729-742, 2006)の細胞壁結合ドメインを大量精製することに成功した。Aml 細胞壁結合ドメインの13 アミノ酸残基からなるリピート構造を有する(細胞壁結合ドメイン)組換えタンパクを FITC で蛍光標識し、ペプチドグリカン、加熱死菌、生菌状態の口腔連鎖球菌試料と混合・洗浄後、顕微鏡観察すると、*S. mutans*, *S. sobrinus* に FITC 標識した細胞壁結合ドメインタンパクが特異的に結合していた。この Aml の N 末端側に存在するリピート構造は、既存のモチーフと同一性を有していなかった。この組換えタンパクはう蝕原因菌細胞壁特異的結合分子として働くことがわかったので Aml 細胞壁結合ドメインによる唾液中のう蝕原因菌診断、定量を試みた。蛍光化 Aml 細胞壁結合ドメインを作成し、生菌に反応させた後フローサイトメトリ解析を行った。口腔連鎖球菌では *S. mutans*, *S. sobrinus* に強く反応し、*S. mitis* に軽度反応する結果が得られた。他の口腔連鎖球菌には反応せず、臨床でのう蝕原因菌診断に役立つ可能性が示された。またう蝕を持つボランティア唾液を用いた *S. mutans*, *S. sobrinus* 迅速診断では唾液採取から約 1 時間で定量が可能であり、既存の臨床検査法より時間短縮の可能性が示唆された。

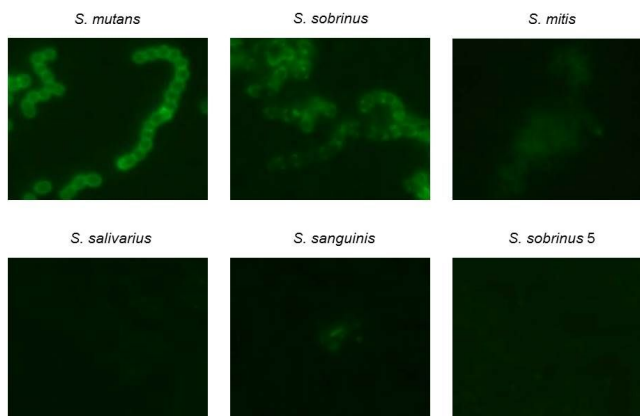


図4 口腔連鎖球菌に結合した蛍光標識細胞壁結合ドメインタンパク

上記う蝕原因菌結合分子の応用としてフローサイトメトリのセルソーティングシステムを用いた口腔常在菌からの *S. mutans*, *S. sobrinus* 除去法を検討した。すなわち唾液中の口腔常在菌に蛍光化 Aml 細胞壁結合ドメインを反応させフローサイトメトリで蛍光陽性分画と陰性分画をセルソートより分離し、陰性分画を回収する手法により 98% 以上のう蝕原因菌除去が可能であることが明らかになった。今後さらなる条件改善により口腔常在菌の制御を目指している。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 2 件)

Removal of mutans streptococci from saliva to establish non-cariogenic oral flora.-A first step on exploring a new method using flow cytometry and cell sorting-: [Ohara M](#), [Hayashi I](#), Oda Y, Furutani C, Ohbayashi T, Nishi H and Kawaguchi H: Int J Res Eng Sci, 5, 41-54, 2017 (査読有) .

Fluoresceination of Lactobacillus rhamnosus through the expression of green fluorescent protein: Mimura S, [Ohara M](#), [Hayashi I](#), Okada M, Nikawa H: International Journal of Research in Engineering and Science, 4, 70-46, 2016 (査読有) .

### 〔学会発表〕(計 2 件)

Removal of mutans streptococci from saliva by flow cytometry and cell sorting: [Ohara M](#), [Hayashi I](#), Kawaguchi H, Anthony T Maurelli: Annual meeting of University of Florida: Feb.15<sup>th</sup>, 2018.

FACScan によるう蝕原因菌迅速定量法：第 9 回日本総合歯科学会総会・学術大会、[小原 勝](#)、11 月 18 日～11 月 20 日、2016、岡山

### 〔図書〕(計 0 件)

### 〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：

国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：菅井 基行  
ローマ字氏名：Sugai Motoyuki  
所属研究機関名：国立感染症研究所  
部局名：薬剤耐性研究センター  
職名：センター長  
研究者番号（8桁）：10201568

研究分担者氏名：小林 純也  
ローマ字氏名：Kobayashi Junya  
所属研究機関名：京都大学  
部局名：生命科学研究科  
職名：准教授  
研究者番号（8桁）：30301302

研究分担者氏名：小原 勝  
ローマ字氏名：Ohara Masaru  
所属研究機関名：広島大学  
部局名：病院（歯）  
職名：助教  
研究者番号（8桁）：80253095

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。