

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20591

研究課題名(和文) プラーク構成細菌の高分子結合ドメインをターゲットとした新規齲蝕抑制法の開発

研究課題名(英文) Development of novel caries suppression method targeting polymer binding domain of plaque constituting bacteria

研究代表者

高島 由紀子 (Takashima, Yukiko)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30589768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：口腔バイオフィーム構成する細菌は他の細菌やそれらが産生する高分子タンパクと結合し、バイオフィームを形成している。それらのうち齲蝕病原細菌 *Streptococcus mutans* の菌体表層にはグルカン結合タンパクCが存在しており、これまでにグルカン結合ドメインをインフォマティクス的手法を用いて特定した。本研究では、このドメインに対する抗血清を作製し実験に供試した。抗血清を作用させた場合では、させない場合と比較してバイオフィーム形成量の低下や唾液タンパクとの結合に対する阻害作用が認められた。これらことから、このドメインを応用して齲蝕予防法の1つとして有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Oral bacteria bind to other bacterial organisms and molecular proteins for biofilm formation. *Streptococcus mutans*, implicated as the primary causative agent of dental caries in humans, produces multiple glucan-binding proteins (Gbps), which are considered to promote formation of biofilm on tooth surfaces. In our previous study, we used bioinformatics to identify the glucan-binding domain sequence DPTKTIF, which is located in the middle of the *gbpC* gene encoding GbpC. In the present study, we constructed anti-DPTKTIF serum, and examined its effects on biofilm formation and binding to saliva proteins. Biofilm formation by *S. mutans* in the presence of anti-DPTKTIF serum was lower than that in its absence. In addition, anti-DPTKTIF serum was shown to bind to lysozyme. Our results suggest that an anti-DPTKTIF agent may be useful for inhibition of *S. mutans* adherence to the pellicle on tooth surfaces, resulting in inhibition of biofilm formation.

研究分野：医歯薬学

キーワード： *Streptococcus mutans* グルカン結合タンパク 齲蝕 バイオインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

Streptococcus mutans は、ヒト口腔内の齲蝕の発生に関連する主な病原性細菌であり、この菌はグルコシルトランスフェラーゼ (Glucosyltransferases: GTFs) を産生し、スクロースを原料として、粘着性のグルカンを合成し、歯面へと付着する。同時に菌体表層には、GTFs の作用により合成されたグルカンと結合し、歯面への菌の堆積に関するグルカン結合タンパク (Glucan-binding proteins; Gbps) が存在している。*S. mutans* の GTF には、スクロースから分解したグルコースからグルカンを合成するためのグルカン結合ドメインが存在しており、数十個のアミノ酸を単位とした繰り返し構造であることが知られている。このような繰り返し構造は、様々な菌が持つタンパクに存在し、そのドメインには高分子物質が結合することが知られている。しかしながら、これまでに *S. mutans* の Gbps のうち、GbpC については、繰り返し構造が存在しないため、グルカン結合タンパクでありながら、グルカン結合ドメインが明らかとなっていなかった。そこでバイオインフォマティクス的手法を用いて立体構造に基づく機能解析を行ない GbpC のグルカン結合ドメインの特定を行った。

口腔内の初期のバイオフィームは、図1のように様々な口腔内細菌により構成されている。初期のバイオフィームは、歯面上にまずペリクルが形成され、アミラーゼ、ムチン、高プロリンタンパク (PRP)、高プロリン糖タンパク、スタテリン、リゾチーム、ラクトフェリンなどの 50 種類を超える唾液タンパクやペプチドによって構成されている。さらに、エナメル質表面のペリクルには、細菌が産生した高分子成分なども含まれるが、主に PRP などの糖タンパク質が結晶表面に吸着して形成され、さらにその糖タンパク質を介して *mutans streptococci* の初期付着が起こり、バイオフィームの初期の形成へと繋がっていく。バイオフィームの成熟の過程で、ペリクルに直接結合することができない細菌は、異種の細菌と相互に作用する共凝集によって結合し、バイオフィームへと参加していく。さらに、共凝集の他にも、グルカンなどの高分子が存在するとそれを仲立ちとして、異種

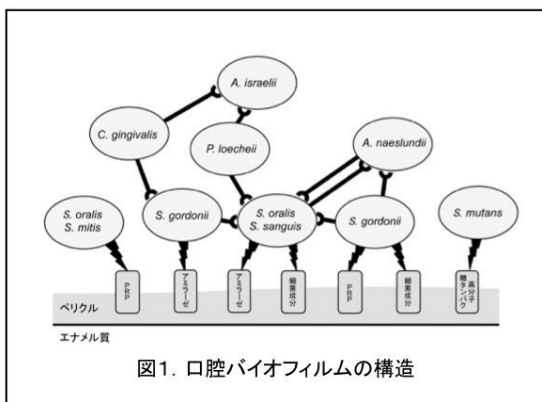


図1. 口腔バイオフィームの構造

の細菌同士でも結合してより強固なバイオフィームを形成していく。*S. mutans* の表層タンパクである PAc は、歯面への付着に関するタンパクであり、この PAc タンパクを抗原としたワクチンが齲蝕の抑制効果が認められることが報告されている。しかしながら、このような口腔内細菌における唾液タンパクや高分子成分との結合や他の菌との共凝集の詳細なメカニズムは未だ不明である。

2. 研究の目的

菌の結合に関するそれぞれの表層タンパクは、特異的な結合ドメインを保有し、特有の高分子タンパクと結合する可能性が高い。そのため、これらの結合ドメインを決定することは、バイオフィーム形成のメカニズム解明において非常に有益であると思われる。さらにそれらの結合ドメインへの高分子タンパクの結合を阻害する物質を開発することができれば、画期的なバイオフィーム制御法を確立できると考えている。

3. 研究の方法

(1) バイオインフォマティクス的手法を用いたグルカン結合ドメインの決定

National Center for Biotechnology Information の Conserved Domain Search (Version 2.16) を用いて、*S. mutans* GbpC のグルカン結合領域のアミノ酸配列から、同様の結合活性を持つ他菌種のタンパクの結合領域との相同性を検索し、相同性の高い領域を抽出する。さらに、Cn3D (Version 4.3、National Center for Biotechnology Information) を用いて、GbpC タンパクの 3 次元構造の構築を行い、前述の方法で抽出した相同性の高い領域のうち、図2に示す様に 3 次元構造上で低分子化合物が結合する可能性が考えられるループ状でポケットを形成している部分を選別する。推定される結合ドメインを欠失させた *Streptococcus mutans* を作製し、デキストラン結合能を測定し、結合ドメインを特定する。



図2. 構築した GbpC の3次元構造における推定グルカン結合領域(丸印)

(2) 決定されたグルカン結合領域のペプチドを作製

決定された結合領域のアミノ酸配列より、Life Technology 社に依頼し、アミノ酸の合成ペプチドを作製する。

(3) ウサギへの免疫による抗ペプチド抗体の採取

ウサギ (ニュージーランドホワイト種; 1.5 kg) に上記の合成ペプチドをフロイントの完全アジュバントとともに超音波処理を行い、油中水型乳剤を作製する。同乳剤を1週間毎に2回、ウサギの背部に皮下注射して免疫を行う。1週間後に耳介静脈より採血し、遠心分離を行い、血清を得る。

(4) 得られた抗ペプチド抗体の抗体価の確認

上記で得られた抗血清の抗体価を Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA 法) およびウェスタンブロットングによって確認する。 *gbpC* 遺伝子の全長を Polymerase Chain Reaction (PCR) 法を用いて増幅し、タンパク発現用ベクターに挿入したプラスミドを作製する。得られたプラスミドを大腸菌に形質転換後、大量培養し、遠心により上清を得た後、GST カラムを用いて精製し実験に供試する。得られたリコンビナント GbpC (rGbpC) 断片を ELISA プレートに播種した後、1次抗体として得られた抗ペプチド抗体を、2次抗体として抗ウサギ抗体を用いて発色させた後、吸光度を測定する。また、rGbpC を SDS-PAGE で泳動し、ウェスタンブロットング法を行う。

(5) 抗ペプチド抗体によるバイオフィーム形成時の阻害作用

S. mutans MT8148 株を SYTO[®]9 green fluorescent nucleic acid stain をで染色した後、1%スクロース含有 CDM 培地にて調整する。抗ペプチド抗体と Alexa Fluor[®] 647-labeled dextran を加えた後、チャンバースライドに播種する。24時間37℃にて嫌気培養した後、共焦点走査型レーザー顕微鏡にて撮影し、imageJ を用いて分析する。

(6) 抗ペプチド抗体による唾液タンパクと rGbpC との結合の阻害作用

rGbpC をグルタチオンセファロース 4B カラムに加えた後、抗ペプチド抗体を加える。洗浄後、唾液タンパクであるリゾチームを加える。グルタチオン溶液を加え、得られたサンプルを SDS-PAGE で泳動し、クマシー染色およびリゾチーム抗体を用いてウェスタンブロットング法を行う。

4. 研究成果

(1) 推定される結合部位の特定

バイオインフォマティクスの手法の1つである相同性の検索を NCBI Conserved Domain Search (Version 2.16) を用いて行った。GbpC のアミノ酸配列から、同様の結合活性を持つ他菌種の結合領域、*Streptococcus sobrinus* のデキストラン結合レクチン様タンパク、*Streptococcus criceti* の高分子タンパク抗原あるいは *Enterococcus faecalis* の凝集物質などのタンパクと比較し、相同性の高い領域を抽出した。さらに GbpC をコードする遺

伝子配列から3次元構造を推測するため、マルチプルアライメントを行って分子系統樹を作製し、近縁ですでにタンパクの高次構造が解析されている遺伝子から3次元構造を構築し、結合領域と相同性の高い領域がどのような形態をとるのか調べた。タンパク質の結合部位は、多くの場合、鍵と鍵穴のような相補的な形態をしているため、このことを利用して結合部位を探索するプログラムが以前から開発されてきた。プログラムの1つである Cn3D (version 4.3) を用いて、GbpC の3次元構造を構築し、ループ状でポケットを形成している5つの領域を抽出した。これら5か所の領域のアミノ酸配列が同様の結合能を持つ他菌種の結合領域と高い相同性を持つこと確認した。その後、この5か所を欠失させた変異株を作製し、デキストラン結合能を測定したところ、GbpC 欠失変異株と同程度にまで低下したため、結合部位を特定できた。

(2) 抗ペプチド抗体によるバイオフィーム形成時の阻害作用

抗体を用いてバイオフィーム構成細菌のバイオフィーム形成時の阻害作用を共焦点走査型レーザー顕微鏡にて撮影し分析したところ、バイオフィームの高さおよび密度が共に抗体を添加しなかった場合と比較して明らかに減少したため、バイオフィーム形成時において抗体が阻害していることが確認できた。

(3) 抗ペプチド抗体による唾液タンパクと rGbpC の結合の阻害作用

口腔内に存在する高分子の唾液タンパクであるリゾチームと特定された結合ドメインをコードするペプチドとの結合を測定するためにブルダウンアッセイを行った。カラムにて rGbpC とリゾチームを反応させた後抽出したサンプルを SDS-PAGE で泳動した。クマシー染色の結果、抗ペプチド抗体をカラムに添加していない場合はリゾチームの分子量の大きさのバンドが認められなかったものの、添加した場合は、リゾチームの大きさの位置にバンドが認められた。さらに、高リゾチーム抗体を用いてウェスタンブロットング法により、確認したところ、クマシー染色の結果と同じバンドが認められた。以上の結果は、rGbpC とリゾチームの結合を抗ペプチド抗体が阻害していることを示している。

以上の結果より、バイオインフォマティクスを用いた分子結合領域の同定の有用性およびそれらに基づいて同定した結合領域に対する抗体による機能阻害が可能であることを示すことができた。これらのことは、このようなドメインを利用した齲蝕予防法の開発につながる知見であると思われる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計2件)

Naka S, Hatakeyama R, Takashima Y, Matsumoto-Nakano M, Nomura R, and Nakano K. Contributions of *Streptococcus mutans* Cnm and PA antigens to aggravation of non-alcoholic steatohepatitis in mice. *Sci Rep.* (in press) (査読有)

Takashima Y, Fujita K, Ardin AC, Nagayama K, Nomura R, Nakano K, Matsumoto-Nakano M. Characterization of the dextran-binding domain in the glucan-binding protein C of *Streptococcus mutans*. *J Appl Microbiol.* 2015 Oct;119(4):1148-57. (査読有)

〔学会発表〕(計5件)

高島由紀子、吉田翔、森本節代、吉田衣里、角田陽子、平野慶子、稲葉裕明、仲野道代、本院小児医療センター開設後の当科における患者実態調査、第35回日本小児歯科学会中四国地方会、2016年11月6日、岡山アークホテル、岡山

Takashima Y, Morikawa Y, Kazuyo F, and Michiyo Matsumoto-Nakano. Glucan-binding domain in GbpC of *Streptococcus mutans* contributes to binding to type I collagen. 94th General Session & Exhibition of the IADR. 22-25, June, 2016. Seoul, Republic of Korea.

Takashima Y, Morikawa Y, Kazuyo F, and Michiyo Matsumoto-Nakano. Binding mechanism of *Streptococcus mutans* glucan-binding domain of GbpC to saliva proteins. 63th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research. 30-31, October, 2015. 福岡国際会議場, 福岡

Takashima Y, Morikawa Y, Kazuyo F, and Michiyo Matsumoto-Nakano. Role of glucan-binding domain of GbpC in biofilm formation by *Streptococcus mutans*. 25th Congress of the International Association of Pediatric Dentistry. 1-4, July, 2015. Glasgow, Scotland.

高島由紀子、森川優子、藤田一世、仲野道代、*Streptococcus mutans* のバイオフィーム形成におけるグルカン結合領域の役割、第53回日本小児歯科学会大会、2015年5月21日～22日、広島国際会議場、広島

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高島 由紀子 (TAKASHIMA, Yukiko)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：30589768