

平成 30 年 6 月 12 日現在

機関番号：32710

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15860

研究課題名(和文) 創薬ターゲットとなり得る*P. gingivalis*のフッ化物輸送タンパクの解明研究課題名(英文) Clarification of fluoride transporter that is possible drug discovery target in *P. gingivalis*

研究代表者

村田 貴俊 (MURATA, Takatoshi)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：10313529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：微生物のフッ化物毒性に対する耐性には2種類のフッ化物輸送タンパク(EricF、CrcB)が寄与していることが知られている。しかしながら、代表的な歯周病関連細菌である*Porphyromonas gingivalis*(*P. g*菌)には前記2種類のフッ化物輸送タンパクは存在しない。また、EricF、CrcBと一部相同なアミノ酸配列を有するタンパクを精査したがフッ化物毒性の抵抗に寄与しなかった。つまり、*P. g*菌が有する未知のフッ化物耐性メカニズムの存在を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Two unrelated families of fluoride exporters were recognized in microorganisms: EricF and CrcB that contribute to resistance to fluoride toxicity. However, *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), one of the major periodontopathic bacteria, doesn't possess either EricF or CrcB. Although a number of proteins that contain homologous part of amino acid sequences of CrcB were examined, it has not found the fluoride transporter that contribute to resistance to fluoride toxicity. These suggest unknown mechanism for resistance to fluoride toxicity in *P. gingivalis*.

研究分野：口腔衛生学

キーワード：フッ化物イオン *P. gingivalis*

1. 研究開始当初の背景

(1) フッ化物は微生物の生存に必須のエノラーゼを強力に阻害する抗菌物質である。しかしながら、地球上に相当量存在するフッ化物の毒性から身を守る手段として、微生物にはフッ化物耐性に寄与する 2 種類のフッ化物輸送タンパク(EriCF、CrcB : 文献)の存在が報告されている。一方、データベース検索によると、多くの微生物に前記 2 種類のフッ化物輸送タンパクが存在するにも関わらず、もっとも代表的な歯周病関連細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. g* 菌)にはどちらも存在しない。つまり、*P. g* 菌には未知のフッ化物耐性システムが存在すると考えられた。

(2) *P. g* 菌に存在する新規フッ化物輸送タンパクの解明は、その後のフッ化物輸送タンパク阻害剤開発へとつながる。う蝕予防のためのフッ化物応用は広く応用されているが、フッ化物輸送タンパク阻害剤との併用により、口腔に対するフッ化物応用が、う蝕予防だけでなく、歯周病予防にも貢献できると考えた。

2. 研究の目的

P. g 菌に存在する未知のフッ化物輸送タンパクを解明する。

3. 研究の方法

(1) DNA Data Bank of Japan (DDBJ) のウェブサイト上で、EriCF および CrcB と相同配列を有するタンパクをフッ化物輸送タンパク候補としてデータベース検索した。

(2) タンパク質発現用大腸菌 (*E. coli* BL21) のフッ化物輸送タンパクをコードする遺伝子 (*crcB*) を破壊したタンパク発現用大腸菌株 (*E. coli* Δ *crcB*) を作製した。*crcB* は、カナマイシン耐性カセットと置換することにより破壊した。発現ベクターに組込んだ

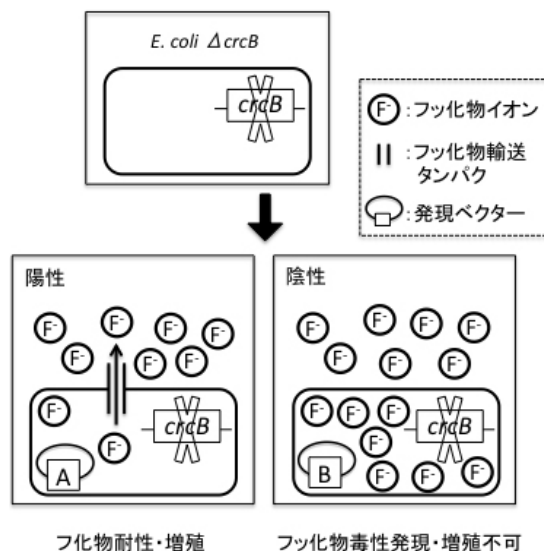


図 1

目的タンパク候補をコードする遺伝子で *E. coli* *crcB* を形質転換し、フッ化物耐性が回復するか確認した (図 1)。

(3) *P. g* 菌 (*Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 株) のフッ化物輸送タンパク候補をコードする遺伝子をエリスロマイシン耐性カセットと置換することにより破壊し、*P. g* 菌が有するフッ化物耐性が失われるか確認した (図 2)。

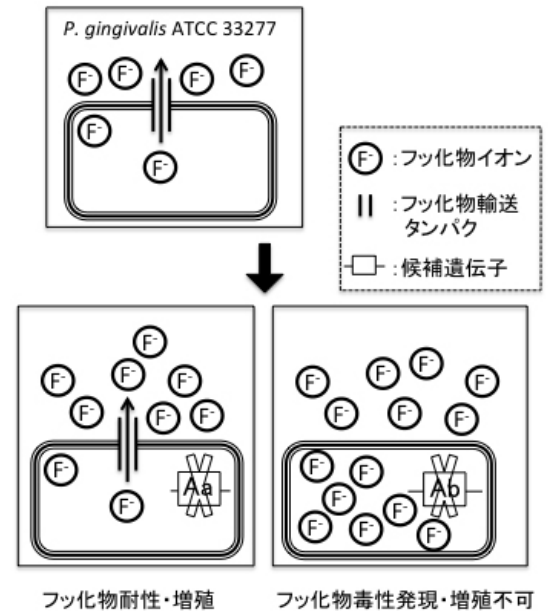


図 2

大腸菌の培養は Luria-Bertani 液体または寒天培地を、*P. g* 菌の培養はヘミン・メナジオンを添加したブレインハートインフュージョン液体培地を使用した。

フッ化物としてフッ化ナトリウム (NaF) を使用した。

菌の増殖は、必要に応じて OD655 で濁度を測定、評価した。

4. 研究成果

(1) DDBJ 上でのホモロジー検索では、*P. g* 菌には EriCF と相同配列を有するタンパクとして EriC (塩化物イオンチャネル) が検索されたが、CrcB と相同配列を有するタンパクは検索されなかった。次に CrcB に共通に保存されている 10 アミノ酸配列 (GFCGGLTTFSTFSAE) と相同性を有するタンパクを検索すると、相同性は低い複数のタンパク質が検索された。その中で、機能不明確、タンパク質のコードが予測される、かつ、保存アミノ酸配列と相同性が高い順に 20 タンパクを抽出し、EriC と合わせ、フッ化物輸送タンパク候補として以降の研究標的とした。

(2) *crcB* 遺伝子破壊株 *E. coli* *crcB* のフッ化物耐性を確認したところ、非破壊株では NaF 濃度 50 mM で増殖可能であったが、*E. coli* *crcB* はほとんど増殖できなかった (図 3)。この *E. coli* *crcB* に対してフ

ッ化物輸送タンパク候補のコード遺伝子で形質転換し、NaF 濃度 10 mM の液体培地で培養しフッ化物耐性の回復を評価した。

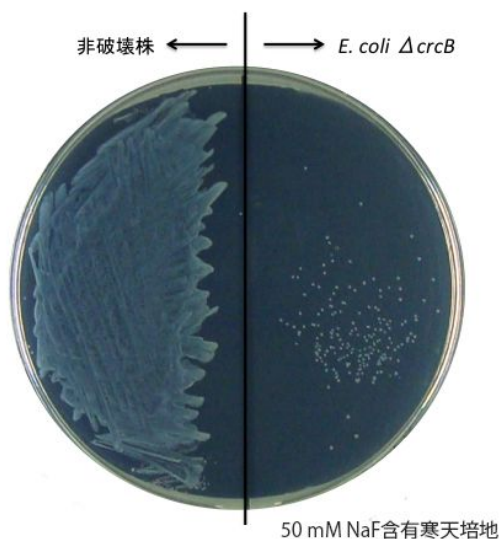


図 3

まず最初に EriC をコードする遺伝子で *E. coli* *crcB* を形質転換したが、フッ化物を添加していない培地中で増殖するが、フッ化物添加培地中では増殖は認められなかった。つまり、フッ化物耐性の回復は認められなかった(図 4)。順次候補たんぱく質をコードする遺伝子で形質転換したが、フッ化物耐性を回復させる遺伝子は認められなかった。

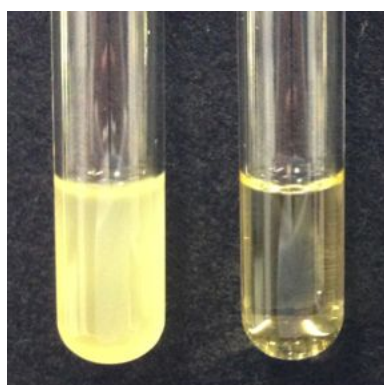


図 4

(3)一旦、*E. coli* *crcB* の形質転換を休止し、*P. g* 菌フッ化物輸送タンパク候補の遺伝子破壊実験をおこなうことにした。そのために、*P. g* 菌が元来持っているフッ化物耐性を調べた。その結果、*P. g* 菌は NaF 濃度 0.1 mM で増殖可能であったが 1 mM では増殖不可能であった(図 5)。従って、候補遺伝子の破壊により NaF 濃度 0.1 mM で増殖できない場合、その遺伝子がコードするタンパクがフッ化物輸送タンパクである可能性が高いとした。

しかしながら、標的候補タンパクをコード

する遺伝子を *P. g* 菌で順次破壊したが、NaF 濃度 0.1 mM で増殖不能株は認められなかった。

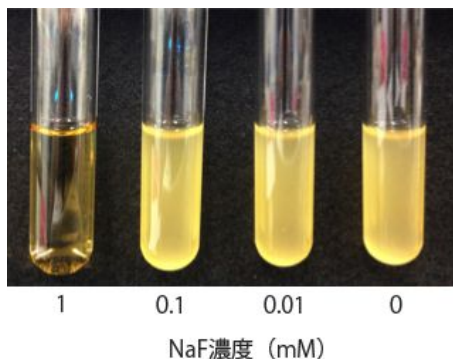


図 5

結論として、今回候補として取り上げた候補タンパクはフッ化物輸送タンパクの可能性が低いと考えた。

今後の展望として、*Enterobacter cloacae* 菌に存在する 5 つのフッ化物耐性関連遺伝子 (*G13*, *ppaC*, *uspA*, *eno*, *gpmA*: これらの遺伝子は直接 フッ化物イオンを輸送するタンパクをコードしない)が他の研究室から報告された。そのうち、3 つの遺伝子が *P. g* 菌に存在することがわかっている。これら遺伝子の近傍遺伝子に焦点を当てる予定である。

一方、*P. g* 菌の遺伝子を破壊する過程で、細菌の効率的遺伝子破壊法開発を試みていたが、遺伝子破壊に必要な酵素反応が polymerase chain reaction のみの、従来法と比較して、簡便、効率的で比較的安価な方法を開発したので国際誌で報告した。

引用文献

Baker JL, *et. al.* Widespread genetic switches and toxicity resistance proteins for fluoride. *Science* 335: 233-35, 2012.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takatoshi Murata, Ayako Okada, Khairul Natin, Nobuhiro Hanada, Generation of a gene-disrupted *Streptococcus mutans* strain without gene cloning *J Vis Exp* 査読有 2017, e56319, DOI: 10.3791/56319

〔学会発表〕(計 6 件)

Takatoshi Murata, Nobuhiro Hanada Essential role of *gtfC* on adherence to glass surface International Association for Dental Research 2018 年

村田貴俊、花田信弘 遺伝子クローニングを要しないミュータンス連鎖球菌の遺伝子破壊株作製法 第 59 回歯科基礎

医学会学術大会 2017 年
石川正夫、村川拓土、村田貴俊、花田信弘、渋谷耕司 ブラッククミン種子精油の口臭産生菌のメチルメルカプタン産生に及ぼす影響 第 66 回日本口腔衛生学会・総会 2017 年
岡田彩子、有吉芽生、曾我部薫、大塚良子、宮之原真由、村田貴俊、マティン カイルール、花田信弘 Liquid Carrier Type 3DS トレーを用いた殺菌洗口液の細菌学的・臨床的效果 第 66 回日本口腔衛生学会・総会 2017 年
山田秀則、岡田彩子、宮之原真由、曾我部薫、村田貴俊、武内博朗、野村義明、花田信弘 全身的な健康を歯科から考える予防医学としての概念を歯科へ「3DS 除菌外来」の試み 第 66 回日本口腔衛生学会・総会 2017 年
Takatoshi Murata, Nobuhiro Hanada Contribution of chloride channel permeases to fluoride resistance in *Streptococcus mutans* International Association for Dental Research 2016 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 貴俊 (MURATA, Takatoshi)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号 : 10313529