

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11961

研究課題名(和文) S.mutansのGbpC結合ドメインを用いた齲蝕免疫システムの構築

研究課題名(英文) Dental caries prevention methods using GbpC glucan-binding domain in S. mutans.

研究代表者

高島 由紀子 (TAKASHIMA, YUKIKO)

岡山大学・歯学部・博士研究員

研究者番号：30589768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：齲蝕病原性細菌 *Streptococcus mutans* には、グルカン結合タンパクC (GbpC) が存在し、これまでにバイオインフォマティクス的手法を用いて、GbpC をコードする gbpC の中央付近にグルカン結合領域が存在することを明らかとした。また、この領域を欠失させた *S. mutans* 株の上皮細胞への付着能が顕著に低下した。そこでこの結合領域をターゲットとする抗体を作製し、抗ペプチド抗体の作用についてラット齲蝕実験系において検討したところ、明確な齲蝕抑制効果が認められた。本研究の結果から、GbpCのグルカン結合領域の機能を抑制することによって齲蝕抑制が可能となることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、バイオインフォマティクス的手法を用いて齲蝕病原性細菌 *Streptococcus mutans* の表層タンパクの1つであるグルカン結合タンパク GbpC の立体構造からグルカン結合領域を明らかにし、その領域の配列をもとに抗ペプチド抗体を作製した。さらにラット齲蝕実験系において、ラット口腔内に抗ペプチド抗体の直接投与した実験群では、投与しない群と比較して齲蝕抑制効果が認められた。このペプチドの抗体産生誘導の検討や安全性の高いアジュバンドを必要とするなど課題は多いが、実現すればヒトが長年にわたって悩まされている齲蝕を減少させるワクチンの開発へと繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)： *Streptococcus mutans*, a major pathogenic bacterium involved in development of dental caries, produces multiple glucan-binding proteins (Gbps) that bind to glucan and other molecules. In our previous study, bioinformatics analysis results identified a glucan-binding domain (GBD) located in the middle of the gbpC encoding GbpC. In addition, an MT8148 strain deficient of GBD was constructed to examine adherence to human umbilical vein epithelial cells (HUVECs). Adhesion to HUVECs by the deficient strain was reduced as compared to that of the parental strain. In this study, we examined the inhibitory effects of an antibody against the peptide encoded by GBD on induction of dental caries using a rat caries model. The caries score in the group that receive administration of the antibody was decreased as compared to that of control group. These results suggest that inhibition of the function of the binding domain of GbpC is effective to prevent its involvement in dental caries development.

研究分野：小児歯科学

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

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

齲蝕病原性細菌 *Streptococcus mutans* の菌体表層に存在するグルカン合成酵素 (Glucosyltransferases; GTFs) は、スクロースを基質として粘着性のグルカンを合成し、歯面へと強固に付着し、その病原性を発揮する。菌体表層には、その他に GTFs の作用により合成されたグルカンと結合し、歯面への菌の付着に関与するグルカン結合タンパク (Glucan-binding proteins; Gbps) が存在しており、菌の歯面への堆積に関係している。これらのタンパクの作用が複雑に絡み合って機能することによりバイオフィルムを形成し、齲蝕を発生させると考えられている。これまでに、GbpA と GbpC は *S. mutans* の齲蝕発生と強く関与していることが、*in vitro* および *in vivo* 動物実験で明らかにされている。*S. mutans* MT8148 株を親株として各 Gbp の欠失変異株を作製し、デキストラン結合能を調べたところ、GbpC 欠失変異株である CD1 株において最も低下しており、他の Gbp と比較しても齲蝕原性が高いことが示されている。しかしながら、GbpC は齲蝕原性は高いもののグルカン結合領域は明らかとなっていなかった。GTFs 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、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明らかとなっている。このような繰り返し構造は、あらゆる菌のタンパクに存在し、高分子物質と結合することによりその機能を発揮する。GbpC には、これらの明らかな繰り返し構造は見つからず、そのためグルカン結合領域を特定することが困難であった。そこで我々は、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。アミノ酸配列からタンパクの高次構造を構築し、ループを形成する部分を 5 カ所抽出し、その抽出した各ドメインについて分子生物学的手法を用いて GbpC のグルカン結合領域の特定を行った。

粘膜免疫による齲蝕抑制効果については、これまで様々な表層タンパクを用いた実験が行われてきたものの、GTF を用いた場合には、粘膜免疫に必要な IgA 抗体を誘導できなかった。また、表層タンパク抗原 *c* を用いた場合には、心筋と交叉反応を起こすなど、タンパクの分子量が大きいために様々な別の反応を起こすことから、実用化に向けて進んでいない。そこで GbpC のグルカン結合領域のアミノ酸配列を利用したペプチドを使用することにより、これまでと異なった分子量の小さいタンパクを用いることのできるため、新しいワクチンの開発につながる可能性が示唆される。

2. 研究の目的

これまでに、バイオインフォマティクス的手法を用いて GbpC のアミノ酸配列から推定される 3 次構造を構築し、グルカン結合ドメインを決定した (図 1)。本研究の目的は、この結合ドメインと同じアミノ酸配列であるペプチドを作成し、さらに上皮細胞に付着する可能性について明らかにし、ラット粘膜免疫誘導システムにおける有効性を示すことである。本研究を通じて、ペプチドによる粘膜免疫系を確立し、新たな齲蝕抑制物質の 1 つとして齲蝕ワクチンの開発に繋げていきたいと考えている。



図1 構築した GbpC の 3 次元構造における結合領域

3. 研究の方法

(1) 特定された結合ドメインの抗ペプチド抗体の作製

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。

ウサギへの免疫による抗血清の採取

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。

得られた抗血清の抗体価の確認

上記で得られた抗血清の抗体価をウェスタンブロッティングによって確認する。

(2) *Streptococcus mutans* MT8148 株の上皮細胞への付着実験

24 ウェル平底培養用プレートの底面に human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) を播種し、5%CO₂ 下にて24時間培養する。その後、*S. mutans* MT8148 株、GbpC 欠失変異株(CD1、CDGB4、CDGB5)をそれぞれプレートに加える。2時間37°Cで培養した後、付着しなかった菌体をPBSにて洗浄する。その後、菌体の付着した細胞を剥離し洗浄した液をMSB(15%スクロースおよびバシトラシン含有 Mitis-Salivarius 寒天培地)寒天培地に播種し、嫌気下にて48時間37°Cで播種し培養する。その後、コロニーカウントを行い、菌数を測定する。

(3) ラット齲蝕実験

結合ドメインのペプチドを免疫したラット齲蝕実験

実験動物として、生後15日目に強制離乳させた Specific pathogen-free (SPF) の Sprague Dawley 系ラットの雄を使用し、一群を10匹として実験に供試する。生後15日目および16日目の2日間、供試菌の定着を容易にするために以下に述べるような口腔内の抗生物質処理を行う。その後、生後17日目から生後22日目までの5日間、ラット口腔内に供試菌の感染および抗ペプチド抗体の投与を行う。*S. mutans* MT8148 株を Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地中で37°Cで18時間培養後、遠心し、1/100量の滅菌生理食塩水で懸濁したものを接種菌液とする。接種菌液を100mlを1日1回、マイクロピペットを用いてラット口腔内に直接接種する。供試菌の感染の当日から、スクロース46%含有う蝕誘発性飼料 Diet 2000 を与え、実験が終了するまで自由に摂取させる。飲料水としては、蒸留水を自由に摂取させる。生後72日目に二酸化炭素ガス下でラットを屠殺し、顎骨を無菌的に摘出する。上顎の歯牙をエリスロシンを用いて染色し、プラークを Regorati と Hotz の方法で求めた。さらに上下顎臼歯のう蝕スコアを Keyes の方法を Ooshima らがラット用に改変したもので算出する。また、下顎骨を取り出し、滅菌生理食塩水中で超音波処理して、プラークを歯面より分離させる。このプラーク懸濁液を連続希釈し、ストレプトマイシン含有

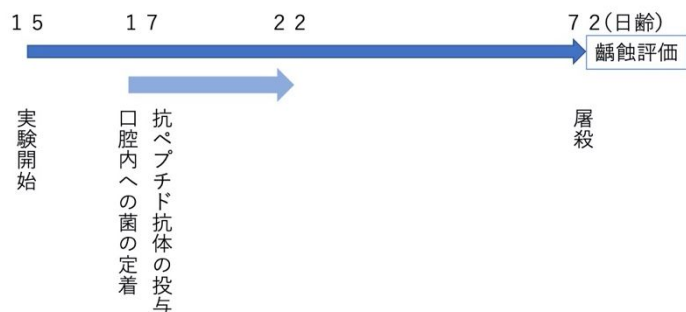


図2 ラット齲蝕モデル

MS 寒天培地に播種することにより、供試菌の下顎からの回収量を調べる。

4. 研究成果

(1) 抗血清の抗体価の確認

ウェスタンブロッティング法を用いて、作製された抗ペプチド抗体を1次抗体として、*S. mutans* MT8148株との反応を確認したところ、GbpCの大きさである75kD付近のバンドが認められた(図3)。

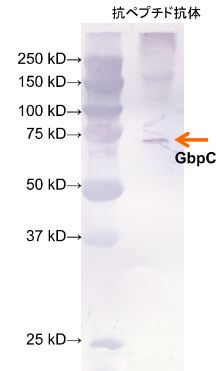


図3 抗ペプチド抗体の抗体価の確認

(2) *S. mutans* MT8148株の上皮細胞への付着阻害

HUVECへの付着能を比較したところ、GbpC欠失変異株

(CD1)および結合ドメインを欠

失させたCDGB4およびCDGB5において、親株であるMT8148株よりも有意に減少した(図4)。

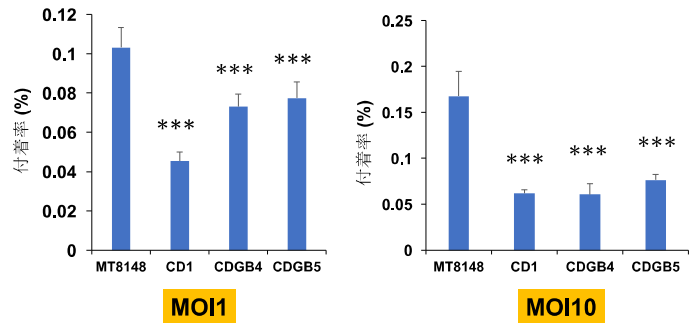


図4 *S. mutans* の上皮細胞への付着率

(3) ラット齶蝕実験

ラット口腔内の細菌数について調べた結果、菌数は抗ペプチド抗体の投与後、最も高濃度を投与されていた群では、コントロール群と比較して、1週目から4週目までは5.9%、6.8%、23.3%、5.2%と抑制されていた。しかしながら、5週目以降は菌数の増加が認められた。また、最も低濃度の抗体を投与されていた群でも同様に、1週目から3週目までは17.6%、19.2%、11.4%と抑制されていた。しかしながら、4週目以降は菌数の増加が認められた(図5)。

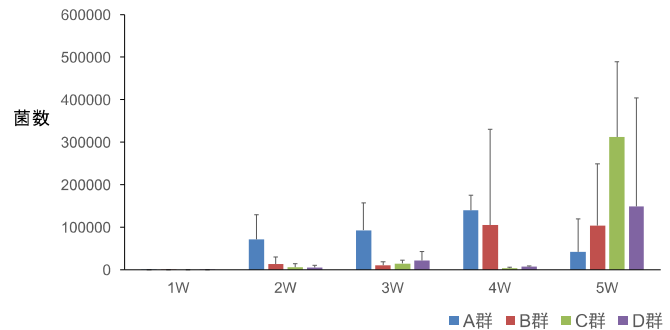


図5 ラット口腔内の *S. mutans* の菌数の比較

GbpCのグルカン結合領域に対する抗体のラット口腔内への直接投与によって *S. mutans* 菌の定着が抑制されることが明らかとなった。このことは、この抗体が齶蝕の発生抑制効果を持つことが示された。飼育日数が長期化するほど、効果は減少してきているため、今後抗体の投与時期や投与量などを検討する必要があると思われる。しかしながら、この結合領域に対する抗体による齶蝕抑制がある程度示されたことより、このような領域を利用した齶蝕予防法の開発につながる知見であると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Lapirattanakul J, Takashima Y, Tantivitayakul P, Maudcheingka T, Leelataweewud P, Nakano K, Matsumoto-Nakano M.	4. 巻 81
2. 論文標題 Cariogenic properties of Streptococcus mutans clinical isolates with sortase defects.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Arch Oral Biol.	6. 最初と最後の頁 7-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.archoralbio.2017.04.018.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yukiko Takashima, Yuko Morikawa, Atsushi Takagi, Yuki Matsumi, Tatsushi Matsumura, Seiji Iida, Shuhei Naka, Michiyo Matsumoto-Nakano.	4. 巻 28(1)
2. 論文標題 Odontoma associated with unerupted primary tooth in primary dentition-Three cases.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatric Dental Journal	6. 最初と最後の頁 19-24
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pdj.2017.10.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuki Matsumi, Yuko Morikawa, Eri Yoshida, Setsuyo Morimoto, Syo Yoshida, Tatsushi Matsumura, Seiji Iida, Yukiko Takashima, Shuhei Naka, Michiyo Matsumoto-Nakano	4. 巻 28(3)
2. 論文標題 Dental manegemant of unilateral multiple impacted primary teeth.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pediatric Dental Journal	6. 最初と最後の頁 119-124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pdj.2018.09.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森本節代、森川優子、高島由紀子、仲周平、稲葉裕明、仲野道代
2. 発表標題 乳酸菌が産生するバクテリオシンが口腔バイオフィルム形成に与える影響
3. 学会等名 第36回小児歯科学会中四国地方会大会及び総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 森本節代、高島由紀子、仲野道代
2. 発表標題 小児口腔より分離されたラクトバシラスがStreptococcus mutansのバイオフィルム形成に与える影響
3. 学会等名 第55回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 吉田衣里、松三友紀、高島由紀子、仲野道代
2. 発表標題 Streptococcus mutansにおける分子シャペロンDnaKの役割
3. 学会等名 第55回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高島由紀子、浅海春華、後藤花奈、森川優子、仲周平、仲野道代
2. 発表標題 Streptococcus mutans の Gbps 結合ドメインに対する抗体の齶蝕への影響
3. 学会等名 第38回日本小児歯科学会中四国地方会大会および総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	仲野 道代 (松本道代)	岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授	
	(Matsumoto-Nakano Michiyo)		
	(30359848)	(15301)	