

平成 21 年 5 月 7 日現在

研究種目：若手(B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19791350
 研究課題名（和文） 齲蝕細菌の Sortase を標的とした新規齲蝕予防法の開発
 研究課題名（英文） Development of a new preventive strategy in dental caries
 : target to Sortase produced by cariogenic bacteria
 研究代表者
 深町 はるか （FUKAMACHI HARUKA）
 昭和大学・歯学部・助教
 研究者番号：10433799

研究成果の概要：齲蝕細菌（グラム陽性球菌）がもつ Sortase（細胞膜に存在するシステインプロテアーゼの一種）が齲蝕細菌の表層病原タンパク因子の細胞局在性を触媒していることを明らかにし、Sortase が齲蝕細菌感染症の治療と予防に有用な標的酵素であることを示唆してきた。本研究では、表層タンパク質の膜局在性を支配する Sortase 阻害剤開発のための Sortase 活性の簡易・高感度測定法の開発を行った。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	390,000	3,490,000

研究分野：口腔微生物学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：Streptococcus mutans, Sortase,

1. 研究開始当初の背景

現在、病原細菌の感染症の治療・予防対策には化学療法剤（抗生物質を含む）とワクチンが用いられ、大きな効果をあげ、その開発も精力的に行われている。ところが、近年、抗生物質に対する耐性菌の出現が頻出していることから、新たな薬剤開発の必要が急務とされる。生体免疫を利用する感染予防ワクチンは、莫大な効果をもたらす一方で、ワクチン抗原による副作用が懸念されるため、その使用には慎重を要し、より副作用の少ない

抗原の選択・開発が要求され、全ての病原細菌に対してなかなか実用化に踏み切れないのが現状である。このような背景のもと、申請者らの研究室では抗生物質やワクチンとは作用機序の異なる新たな病原細菌感染症の治療と予防法の開発につながる基礎研究を進めている。近年、Staphyrococcus aureus をモデルとした研究で、グラム陽性菌の一部の表層タンパク質と細胞壁との結合は Sortase により媒介されることが明らかになった。これらの細胞表層タンパク質は、C 末端領域に共通して LPXTG モチーフを保有し、

本配列を Sortase が認識し特異的切断を受けて、生じたポリペプチド末端がペプチドグリカンにアミド結合することで細胞壁に配置固定される(下図 1)。これらの表層タンパク質は菌の宿主への付着や、細胞への侵入に密接に関与し、細菌の感染成立に必須とされることが明らかとなってきた。従って、グラム陽性菌における感染症対策を考える上で、表層タンパク質と細胞壁との結合機構は重要な標的となる。

このような背景のもと、歯科の 2 大疾患の一つである齲蝕を引き起こす齲蝕細菌(グラム陽性球菌: *Streptococcus mutans*) がもつ Sortase を発見した。その遺伝子解析を行なうと共に、齲蝕細菌の表層病原タンパク因子(下図 2)の細胞局在性が Sortase によって触媒されていることを明らかにしてきた。さらに、その遺伝子解析と Sortase 欠損変異株を用いた研究結果より、表層タンパク質の齲蝕原性は Sortase の不活化により喪失することを明らかにし、Sortase が齲蝕細菌感染症の治療と予防に有用な標的酵素であることを示唆してきた。よって、この Sortase の阻害という観点から、新たな感染症の予防法の確立を目指す。

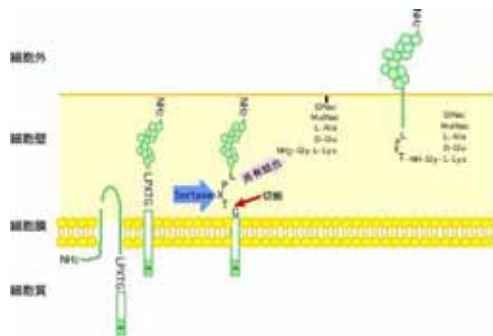


図 1 Sortase の作用機序

<i>S. mutans</i> における細胞壁アンカータンパク			
タンパク質	モチーフ	機能	サイズ (kDa)
SpaP / Pac	LPNTG	表層タンパク抗原	167
FruA	LPDTG	フルクタンナーゼ	155
DexA	LPQTG	デキストラナーゼ	95
GbpC	LPHAG	グルカン結合タンパク	63
WapA	LPSTG	細胞壁タンパク抗原A	45
WapE	LPDTG	(不明)	55
Cnm	LPNTG	コラーゲン結合タンパク	57

図 2 *S. mutans* の LPXTG タンパク質

2. 研究の目的

本研究では、抗生物質やワクチンとは異なる新たな病原細菌感染症の治療と予防法を開発することを最終目標としている。現在までのところ、Sortase に有効な阻害剤の報告はなく、また、阻害剤検索のための簡便な Sortase 活性測定法についても報告されてい

ない。そこで、本研究では、以下を明らかにすることを目的とした。

(1) 齲蝕細菌の表層タンパク質の膜局在性を支配する Sortase の簡易・高感度活性測定法の構築

(2) Sortase 阻害剤を検索・開発

(3) 検索した Sortase 阻害剤を用いて、齲蝕細菌のプラークバイオフィーム形成阻害へ与えるの影響の観察

以上の研究結果から、Sortase 阻害剤により、齲蝕細菌によるプラークバイオフィーム形成を有意に阻害することができれば、齲蝕予防への応用が期待される。

3. 研究の方法

(1) Sortase の簡易・高感度測定法の構築

当研究室では、これまでの研究から、齲蝕細菌 *S. mutans* の Dextranase が Sortase の有用な基質であることを明らかにしてきた。加えて、Dextranase はブルーデキストランを含むザイモグラフィーにより、その活性を鋭敏かつ容易に測定できることから、Dextranase を基質とした Sortase 活性測定法を開発する。

[Dextranase 活性測定方法：ブルーデキストランザイモグラフィー]

0.5% ブルーデキストランを含む SDS-PAGE(7.5% アクリルアミド)を行った後、0.5% rubrol-PX および 0.5% Triton-X100 を含む Tris 緩衝液(pH6.0)を用いて SDS を除去する。Dextranase 活性が回復すると、ブルーデキストランが分解され、バンドが形成される。

! 組換え大腸菌による Dextranase・GST 融合タンパク質の発現と精製

基質とする Dextranase は、2553 bp 850 アミノ酸からなる分子量 94 kDa のタンパク質であり、N 末端から 811-816 の位置に LPXTG モチーフをもつ。この Dextranase が Sortase の認識を受け、LPXTG モチーフで切断されると、Dextranase の分子量は 90 kDa となるが分解前後の分子量変化が 4 kDa と小さい。そこで、分解前後の分子量変化を大きくしブルーデキストランザイモグラフィーでの Sortase 活性を容易に識別するために、Dextranase の C 末端側にグルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST: 約 24 kDa) を融合させ、基質を作製する。この基質 Dextranase-GST は、分子量 118 kDa であり、Sortase により切断を受けると 90 kDa となる。

基質の作製方法は、Dextranase の塩基配列を元に、5 側に *Bam* HI、3 側に *Kpn* I サイトを付加し、*S. mutans* 染色体 DNA を鋳型として PCR を行う。C 末端に融合させる GST は、5 側に *Kpn* I、3 側に *Bam* HI サイトを付加

し PCR を行う。得られた断片をそれぞれ *Kpn* I で切断し、ライゲーションする。次に、このライゲーション mixture を鋳型として、Dextranase の forward プライマーと GST の reverse プライマーを用いて PCR を行う。得られた 3243 bp の断片を *Bam* HI で切断し、ヒスタグ融合タンパク質発現ベクター pQE80-L にクローニングする。このプラスミドを pQE-DG とする。*E. coli* BL21 に pQE-DG を導入した形質転換株から組換えタンパク質を精製した。

Sortaseの活性測定条件の検討のための組換えSortaseの発現と精製

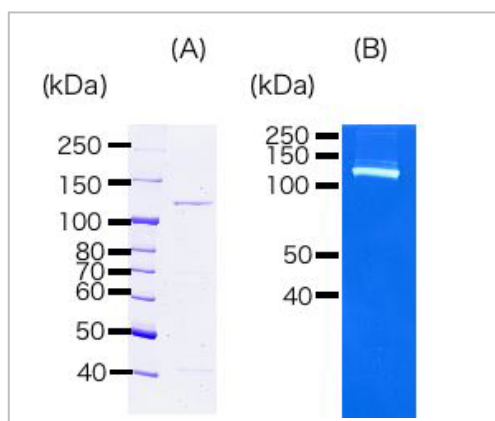
組換え Sortase は、5 側に *Bam* HI、3 側に *Sal* I サイトを付加し、*S. mutans* 染色体 DNA を鋳型として PCR を行い、GST 融合発現ベクター pGEX6P-1 にクローニングし、pSMS1 とし、*E. coli* BL21 を形質転換して、組換えタンパク質を得た。得られた組換え Sortase は、活性測定の standard として用いる。

菌体のもつSortaseによるDextranase-GST認識

S. mutans 菌体のもつ Sortase による LPXTG モチーフの認識を確認するために、*S. mutans* 菌体粗酵素抽出物および *S. mutans* Sortase 欠損株菌体粗酵素抽出物を用いることとした。そのための *S. mutans* Sortase 欠損株作製には、シングルクロスオーバー法を用いた。

4. 研究成果

(1) 組換え大腸菌による Dextranase・GST 融合タンパク質の発現と精製



(A) 7.5% SDS-PAGE 後、CBB 染色
(B) ブルーデキストランゼイモグラフィー

Dextranase-GST 精製条件を以下に示す。*E. coli* BL21 に構築した pQE-DG を導入した形

質転換株を一晩培養後、20 倍希釈し、37 で培養する。2 時間後 OD₅₅₀ がおよそ 0.3 に達した時点で、IPTG を終濃度 0.5 mM となるよう添加し、さらに 25 で 4 時間培養した。この菌体を超音波破碎機を用いて氷上で破碎後、遠心して上清を得た。Ni-NTA 担体を用いて、バッチ法で組換えタンパク質を結合させ、250 mM イミダゾールで溶出させた。得られた組換えタンパク質を PBS で一晩透析して Dextranase-GST として使用した。

Dextranase-GST の推定分子量は 118 kDa であり、目的のサイズのタンパク質が精製できたことが確認できる。ブルーデキストランゼイモグラフィーでは、活性を回復すると、白色のバンドが形成された。また、0.5% ブルーデキストラン添加の影響で、アクリルアミドゲル上での分子量マーカーの位置が無添加のゲルと比較して大きく出る。

(2) Sortase の発現と精製

Sortase 精製条件を以下に示す。*E. coli* BL21 に pSMS1 を導入した形質転換株を一晩培養後、20 倍希釈し、37 で培養する。2 時間後 OD₅₅₀ がおよそ 0.3 に達した時点で、IPTG を終濃度 0.5 mM となるよう添加し、さらに 37 で 2 時間培養した。この菌体を超音波破碎機を用いて氷上で破碎後、遠心して上清を得た。グルタチオンセファロースを用いて、バッチ法で組換えタンパク質を結合させ、グルタチオンで溶出させた。今後の実験過程において GST 融合タンパク質の状態で使用するため、GST タグの切断は行っていない。

(3) *S. mutans* Sortase 欠損株の作製

エリスロマイシン耐性遺伝子を *S. mutans* の染色体 DNA 上の Sortase 遺伝子にシングルクロスオーバーで導入し、*S. mutans* Sortase 欠損株を作製した。

本研究では、齧蝕細菌の表層タンパク質の膜局在性を支配する Sortase の阻害剤を見出し、新たな病原細菌感染症の予防法を開発することを最終目標としている。Sortase 阻害剤開発のためには、まず Sortase の簡易・高感度活性測定法の構築が必要であり、本研究で活性測定に必要な基質 Dextranase-GST の作製に成功した。今後は、得られた基質および組換え Sortase を用いて、活性測定条件を検討する。加えて、野生株の *S. mutans* と作製した Sortase 欠損株を用いて、菌体のもつ Sortase による認識を確認し、Dextranase-GST を用いた活性測定法の確立を目指す。

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 0件)

[学会発表](計 6件)

深町はるか,高橋真和,五十嵐武
*Prevotella melaninogenica*の
Dextranase 遺伝子の同定とその解析
第 82 回日本細菌学会総会
2009 年 3 月 12 14 日,名古屋

布施晴香,深町はるか,井上美津子,
五十嵐武
*Prevotella intermedia*のフルクタン分
解酵素の活性部位の検索
第 82 回日本細菌学会総会
2009 年 3 月 12 14 日,名古屋

布施晴香,深町はるか,井上美津子,
五十嵐武
*Prevotella intermedia*のフルクタン分
解酵素の解析
第 50 回歯科基礎医学会学術大会
2008 年 9 月 23 25 日,東京

矢野智也,深町はるか,山本松男,
五十嵐武
*Prevotella intermedia*のシステイン分
解酵素の解析
第 50 回歯科基礎医学会学術大会
2008 年 9 月 23 25 日,東京

深町はるか,森崎弘史,栗原華絵子,
有本隆文,五十嵐武
*Streptococcus mutans*の Trehalose-6-
リン酸分解酵素の解析
第 49 回歯科基礎医学会学術大会
2007 年 8 月 29 31 日,札幌

有本隆文,深町はるか,森崎弘史,栗原華
絵子,樋場八裕,五十嵐武
*Streptococcus mutans*のリポタンパク質
修飾酵素 prolipoprotein
diacylglycerol transferase の機能解析
第 49 回歯科基礎医学会学術大会
2007 年 8 月 29 31 日,札幌

[図書](計 0件)

[産業財産権]

取得状況(計 1件)

名称:L-システインの測定方法及び
測定用試薬

発明者:中野善夫,吉田康夫,吉村満美子,

深町はるか,西矢芳昭
権利者:株式会社産学連携機構九州
東洋紡績株式会社
種類:特許第 4228047 号
取得年月日:2008 年 12 月 12 日
国内外の別:国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

深町はるか (FUKAMACHI HARUKA)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号:10433799