

平成22年 5月 21日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19791602

研究課題名（和文）

唾液タンパク質と GTFase の相互作用解析

研究課題名（英文）

The interaction of salivary proteins and GTFase.

研究代表者

田中 聖至（TANAKA SATOSHI）

日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師

研究者番号：00350166

研究成果の概要（和文）：齲蝕原因菌である *S.mutans* が産生する GTFase に対する唾液タンパク質（リゾチーム）の活性阻害作用の解析を行った。さらにリゾチームの SNPs と齲蝕感受性についての解析を行った。

研究成果の概要（英文）：The GTFase which is produced by *S.mutans* (cariogenic bacteria), and salivary proteins (lysozyme) were analyzed by inhibition assay. The SNPs of lysozyme also were analyzed for caries susceptibility.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2007年度 | 2,000,000 | 0 | 2,000,000 |
| 2008年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 2009年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 420,000 | 3,820,000 |

研究分野：小児歯科学

科研費の分科・細目：歯学

キーワード：GTFase、*S.mutans*、唾液タンパク質

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究者は日常の臨床の中で、昼食後ブラッシングをせずに来院する患者のプラーク量に個人差があることから、唾液中にプラーク、即ち不溶性グルカンの生成を阻害する物質が存在するのではという仮説を立てた。

(2) Glucosyltransferase (GTFase) の活性中心に対するワクチンを用いて不溶性グルカン産生を阻害することにより齲蝕を予防するという試みは、国内外問わずこれまで数多く報告されている。しかし、いずれの場合も実

験動物への応用で、齲蝕の減少例が報告 (Me ad M et. al. ; Monoclonal Antibodies to the Extracellular Glucosyltransferases from *Streptococcus sobrinus* 6715 Infect Immun Aug. 1987 1900-1905) されているものの、ヒトへの実用化には至っていない。

研究者は日常の臨床の中で、昼食後ブラッシングをせずに来院する患者のプラーク量に個人差があることから、唾液中にプラーク、即ち不溶性グルカンの生成を阻害する物質が存在するのではという仮説を基に、平成16年～18年に渡り科学研究費補助金若手研究 (B)

の補助を受け、「唾液中のGTFase阻害因子の検索」を行った。これまでの研究とは視点を異にして、GTFaseの活性中心を結合させたアフィニティカラムを作製し、アフィニティを持つ唾液タンパク質を検索した。その結果、唾液中のリゾチームが阻害因子としての役目を担っていることが確認され、その成果を第48回歯科基礎医学会で発表した。

しかし、

- 1) 500・MリゾチームでGTFase活性がコントロールに比べ50%阻害されたが、リゾチーム濃度が唾液中の濃度 (0.6・M) に比べ高濃度であった。
- 2) Inhibition assayに用いたリゾチームがニワトリ由来のものであり、ヒトリゾチームと約40%アミノ酸組成が異なり立体構造に違いがあった。
- 3) ヒト唾液リゾチームが試薬として販売されていない。
- 4) 大腸菌によるヒト唾液リゾチーム作成が困難であった。

等から、ニワトリリゾチームでGTFase活性阻害が確認されたものの、「ヒト唾液リゾチーム」によるGTFase阻害のメカニズムには不明な点が残されている。また、唾液アミラーゼがGTFaseのグルカン結合領域に作用して活性を阻害するという報告 (Christina J et. al. ; Identification and Characterization on a Nonimmunoglobulin Factor in Human Saliva That Inhibits *Streptococcus mutans* Glucosyltransferase ; Infect Immun Mar 2002 1136-1142) もあり、唾液中のタンパク質にGTFase阻害因子を求めるためには、唾液タンパク質とGTFaseとの相互作用解析を行うことが重要であり、さらに急務を要するものである。

(3) そこで今回、実験系に更なる発展をもたらすために、タンパク質の立体構造に配慮した唾液中のタンパク質および GTFase の作成を行い、およびそれらの相互作用解析を試みる。タンパク質の立体構造に配慮して、ヒトの唾液タンパク質をリコンビナントで作製するためには、従来の大腸菌を用いた発現システムではフォールディングや糖鎖の修飾などに対応が困難であるため、昆虫細胞およびバキュロウイルス発現系を用いることにより、それらの問題点を解消する。唾液タンパクと GTFase の相互作用を解析し、GTFase の阻害因子決定および定量することは齶蝕感受性のスクリーニングを可能とし、予防歯科学に有用である。

2. 研究の目的

(1) GTFaseに関する研究は、その酵素学的特色およびワクチンの生成に関するものが未だ主流であり、阻害因子を唾液中から検索するという本研究は、GTFase研究に新たな分野を提供するものである。研究者はこれまで

とは視点を変えて、唾液中からGTFaseを検索するというこれまで具体化されなかった手法を平成16年～18年に渡り科学研究費補助金若手研究 (B) の補助を受け確立した。しかし、検索された阻害因子の効果を判定するに当たり、当該唾液タンパク質が十分量試薬として販売されていないこと、唾液から精製する段階で立体構造に変化が生じる可能性があることなどから、申請者はタンパク質のフォールディングや糖鎖による修飾を考慮して唾液タンパク質をリコンビナントで作製し、GTFaseとの相互作用を解析するという新たな手法を考察した。現在、齶蝕活動性試験は *S. mutans* 数や唾液緩衝能を検査するものが主流となっている。しかし、バイオフィルムの基質となる不溶性グルカンの生成に着目したものは無い。唾液中からGTFase阻害タンパク質が検出されれば、抗体ELISA法を用いて迅速に、しかも定量的に齶蝕感受性をスクリーニングすることが可能となる。また、リコンビナントでGTFase阻害タンパク質を生成し歯磨剤、洗口剤などに添加することにより、齶蝕予防が可能となり、予防歯科学に大変有用な基礎的研究である。

(2) 他の唾液タンパク質 (候補アミラーゼ) の GTFase 活性阻害作用の確認とリゾチーム SNPs の齶蝕感受性への関連の分析を行い、齶蝕予防へと役立てることを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 1) バキュロウイルス発現系の導入

従来通りの大腸菌を用いたリコンビナントプロテイン発現系で真核生物のタンパク質を発現させた場合、タンパク質の収量が僅かであったり、インクルージョンボディを形成して不溶化したり、実験系が構想どおりに進まないことが多い。これらを改善するために、インサートに種々のシグナルを付与して分泌能を高めたり、インクルージョンボディ形成を抑えたりする必要がある。しかし、原核生物である大腸菌を用いる以上、全てを解決する事は難しく、対応できたとしても非常に時間を奪われる。そこで、申請者は研究のスピードを上げるために、昆虫細胞とバキュロウイルス発現系の導入を試みる。そして、今回、種々のバキュロウイルス発現系の中で、高い組換え効率、フォールディングの向上、高い発現量を誇る、*flashBAC™* を用いてリコンビナントプロテインを製作することとする。(図1)

flashBAC™ システム は、組換えウイルス精製ステップが不要の新しいバキュロウイルス発現システムであり、*flashBAC™* のポリヘドリン領域には、昆虫細胞内でウイルスが増殖するのに必要な遺伝子 (ORF1629) が一部欠損したものと、BAC (Bacterial Artificial

Chromosome)が含まれている。 *flashBAC*TM DNAと、目的遺伝子を含むトランスファーベクターが相同組換えを起すと、同時に昆虫細胞内で増殖可能な遺伝子の欠損部位が正常部位と組み変わり、機能が回復するため、非組換えウイルスは昆虫細胞内での増殖は不可能となる。しかし、組換えウイルスは増殖が可能であるため、ブランクアッセイや精製等のスクリーニングを必要とせずに直接培養上清を昆虫細胞に使用することができ、研究スピードの上昇に非常に有用である。

2) Overlap extension法を用いたリコンビナントヒト唾液タンパク質の作製
真核生物のタンパク質をコードしている遺伝子に intron が存在するため、各 exon をそれぞれ 5'側または 3'側を 15~20 塩基対オーバーラップするプライマーを用いて、別個に PCR で増幅する。次いで、増幅された exon 同士を用いて PCR 反応を行うことにより、各 exon がそれぞれプライマーの役目を果たし、結合することが報告されている。

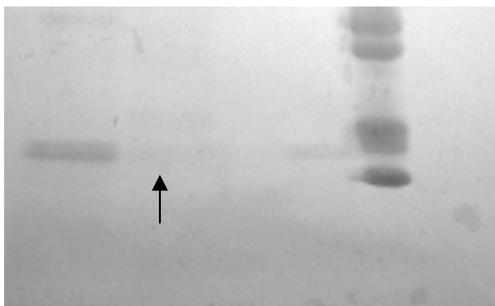
(Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension ; Horton RM et.al. ; Gene: Apr 1989 61-68) 今回この手法を用いてヒト唾液タンパク質を作製する試みは、mRNA を抽出するステップ省略に寄与するものであり、研究スピードの上昇に繋がる。この二つの手法を用いる事は研究を効率的に、しかも効果的に進める上で有用である。

(2) *S. sobrinus* 6715 株より抽出した GTFase とヒトリゾチームの相互作用解析。

(3) リゾチーム SNPs と DMFT の関連の評価。

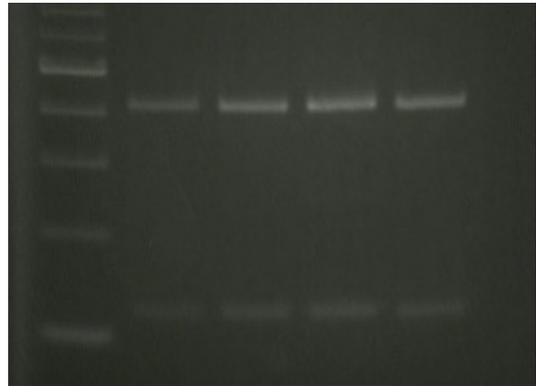
4. 研究成果

(1) *S. sobrinus* 6715 株より Gen Elute Bacterial Genomic DNA kit (SIGMA 社製) を用いて DNA を抽出し、5' - ttaaagcgctaaccacaaaa 3' - atggagaagaatgtacgttt primer にて GTF-I の増幅を試みた。T_m=45°C で 4850bp の product を得たため、インサートとし INPACT Kit with T7 Express Cells (ニューイングランドバイオラボ社製) を用いてリコンビナントプロテイン作成を行ったが、期待される成果が得られなかった。

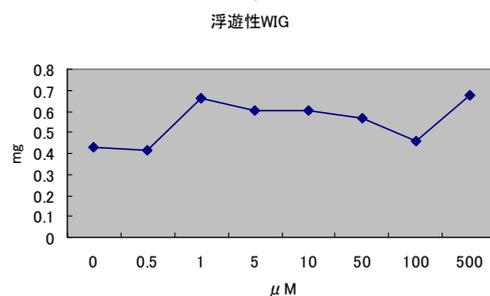
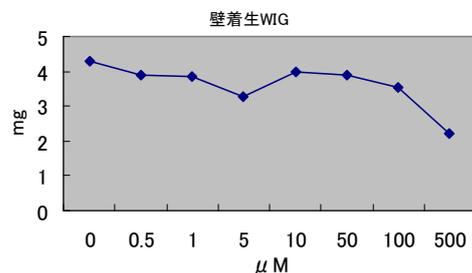


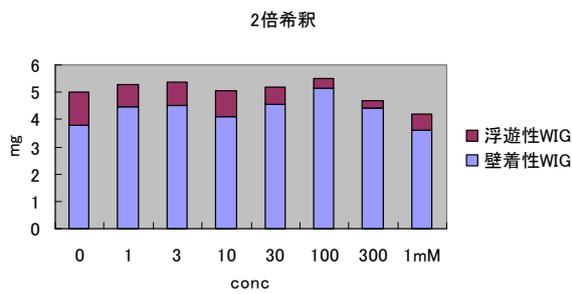
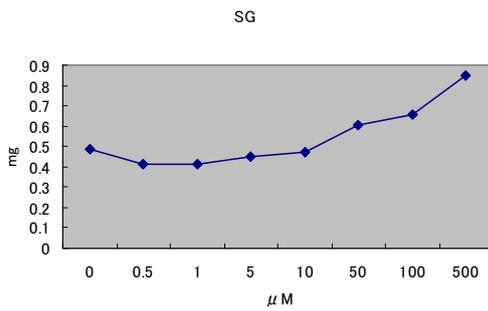
ヒト唾液リゾチームの作成を **Overlap extension法** で試みた。

ヒト頬粘膜より DNA を抽出し、これをテンプレートに用いてリゾチーム遺伝子 (NM_000239) を増幅した。まず、exon の両端を 5bp ずつ延長した primer を用いて、4exon の増幅を行った。exon1 は、5' - atgaaggctctcattgttt、3' - catccagtttgcttagctga、exon2 は 5' - aactggatgtgtttggccaa、3' - caaagcactgcaggataaat、exon3 は 5' - cagtgcctttgctgcaagata、3' - ccaccatgctcctaagccc、exon4 は 5' - gcatgggtggca t ggagaaa、3' - ttacacctccacaaccttga のプライマーを用いて exon を増幅した。その後、2% アガロースゲルにて PCR products の確認を行った。しかし、4exon とともに products が確認できなかったため、T_m 値、サイクル数の条件を検討した。種々の条件検討を行ったが products を得られず、リゾチーム遺伝子の増幅が困難であった。



(2) ヒトリゾチーム (植物発現組換え体: 細胞培養、和光純薬) を用いて、リゾチームの GTFase に対する活性阻害判定を行った。用いた GTF が *St. sobrinus* 6715 株培養上清からの抽出物であり、GTF-S と GTF-I の 2 種が混在していたため、若干の知見を得たものの良好な結果は得られなかった。





(3) ヒトリゾチームのSNPsと齶蝕との関連を考察した。ヒトリゾチームSNPsはExon3にその殆どが存在するため、同部に存在するタンパク質の立体構造に変化をもたらすSNPsについて着目した。renal amyloidosisでは、SNPsによりLYZ asp67→hisのミューテーションが生じて発症する。このようなLysozymeの立体構造変化が齶蝕に及ぼす影響を考察した。

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 0 件)

[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：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 聖至 (TANAKA SATOSHI)

日本歯科大学・新潟生命歯学部・講師

研究者番号：00350166