

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20791635

研究課題名(和文)

ミュータンスレンサ球菌の菌株による齲蝕原性の違いに注目した遺伝子検査法の開発

研究課題名(英文)

The development of genetic tests regarding cariogenicity of mutans streptococci

研究代表者

金子 昇 (KANEKO NOBORU)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：00397126

研究成果の概要(和文)：

Streptococcus mutans の齲蝕原性として、非水溶性グルカン合成能に注目し、小学生の刺激唾液から分離した *S. mutans*、72 株について、非水溶性グルカン合成酵素をコードする *gtfB* 遺伝子の塩基配列を決定した。*gtfB* 遺伝子の 3'末端付近における反復配列の反復回数が、この菌のグルカン合成能に関連していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

An important virulence factor of *S. mutans* is a glucosyltransferase synthesizing water-insoluble glucan (WIG) from sucrose. We performed sequencing of the *gtfB* gene of 72 *S. mutans* isolates derived from primary school students.

GtfB coded by *gtfB* gene possess two functional domain. The carboxyl-terminal portion of GtfB is called the glucan binding domain and is coded by the direct repeating units. The results of this study indicated that the number of the repeating sequences in *gtfB* is associated with WIG synthesis by *S. mutans*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：歯学、ミュータンスレンサ球菌、齲蝕原性

1. 研究開始当初の背景

Streptococcus mutans は齲蝕の主な原因菌であるが、この菌が口腔内にそれほど存在し

ていないにもかかわらず、齲蝕を発症する児童に遭遇することがある。こうした児童では、*S. mutans* が菌数的には問題ないレベルにあ

るが、存在する *S. mutans* 株が、特に齲蝕を誘発する能力の高い菌株である可能性がある。

S. mutans は粘着性の非水溶性グルカンを合成し、これにより歯面へ強固に付着する性質を持つ。このグルカンを合成する能力は、菌株によってかなりばらつきがあり、同じ *S. mutans* でも、齲蝕原性に差があると言える。

S. mutans はグルカン合成酵素 (Glucosyltransferase : GTF) として、GtfB, GtfC, GtfD を持つ。このうち、特に GtfB は、非水溶性グルカンを合成する酵素であり、*S. mutans* の齲蝕原性を考える上で重要である。GtfB をコードする *gtfB* 遺伝子は、いくつかの実験室株で塩基配列が決定されており、また、この酵素が機能する上で重要な領域も、ある程度特定されている。

しかし、これらは少数の実験室株について調べられたものであり、実際に口腔内から分離した *S. mutans* 株について、*gtf* 遺伝子中のどの領域に変異が多く見られるのか、そしてその結果グルカン合成能はどのように変化しているのか、さらにその *S. mutans* 株を分離した児童の齲蝕状況との関連について調べた研究はまだない。

2. 研究の目的

S. mutans の非水溶性グルカン合成酵素 GtfB が機能する上で重要な領域はこれまでにある程度特定されている。

Chia らは、GtfB の 409-427 および 446-454 アミノ酸残基が触媒部位 (catalytic domain) であることを報告している。また、Giffard らは GtfB の C 末端の 3.5 個の繰り返し配列 (direct repeating unit) がデキストラン結合部位 (glucan-binding domain) でありグルカン合成に重要な領域であることを、さらに Abo らは、*S. sobrinus* の GtfI についてはあるが、C 末端の繰り返し配列が、グルカン合成に必須の領域であることを報告している。

本研究の目的は、実際に児童の口腔内から採

取した *S. mutans* 分離株について、*gtfB* 遺伝子の塩基配列を比較し、特に glucan-binding domain における変異と非水溶性グルカン合成能との関係を明らかにするとともに、この部位における変異と児童の齲蝕との関連性を評価すること、また、齲蝕活動性試験に利用できるような検査法を開発することである。

3. 研究の方法

小学生の刺激唾液を採取し、これをミュータンスレンサ球菌の選択培地である MSB 培地に接種・培養することで、*S. mutans* 臨床分離株を得た。これらの菌株は、各種糖発酵能を確認することで、*S. mutans* であることを確認した。

(1) 非水溶性グルカン合成能の測定

得られた 72 株の *S. mutans* について、Brain Heart Infusion (BHI) 培地で継代培養を行った後、Sucrose を 1% 添加した Heart Infusion (HI) 培地に菌液を 20 μ l 接種し、16 時間、45° の角度で傾斜培養した。その後、試験管を voltex mixer で 10 秒間攪拌し、この操作を行ってもガラス試験管壁に剥離せずに残った基質を、粘着性の非水溶性グルカンと見なした。この非水溶性グルカンは、フェノール硫酸法によって定量を行い、HI 培地 1 ml 当たりの重量として算出し、これを *S. mutans* 菌株のグルカン合成能とした。

(2) 塩基配列の決定

72 株の *S. mutans* について、BHI 培地で培養後、DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) を用いて Genome DNA を抽出した。これを template として、*gtfB* 遺伝子の上流と下流の保存領域をプライマーとした PCR を行い、全ての *S. mutans* 株の *gtfB* 遺伝子を得た。これを template とし、また、*gtfB* 遺伝子内の複数の保存領域をプライマーとしてシーケンシングを行い、得られた塩基配列を再構成することで、全 72 株の *S. mutans* について、*gtfB* 遺伝子全体の塩基配列を決定した。

シーケンシング反応は、マクロジェンジャパンにて行われた。

4. 研究成果

まず、GtfB の catalytic domain である 409-427 および 446-454 アミノ酸残基をコードする領域について、変異の検討を行った。この部位をコードする 57 塩基中 7 カ所で一塩基多型の見られる部位があり、また 1 カ所で AT→GC となる変異が見られ、72 株の *S. mutans* は、多くのグループに分類することができた。ただ、これらの変異はいずれもサイレント変異であり、非水溶性グルカン合成酵素 GtfB における ANDVDNSNPVVQAEQLNWL のアミノ酸配列に変化が見られる *S. mutans* 株はなかった。また、446-454 アミノ酸残基をコードする塩基配列においても、この部位をコードする 27 塩基中 2 カ所で一塩基多型の見られる部位が有り、72 株中 15 株で変異が認められた。ただこちらにも GtfB における DSIRVDAVD のアミノ酸配列に影響を及ぼす変異はなかった。以上のことから、*gtfB* 遺伝子の catalytic domain に相当する部分における変異は、*S. mutans* の菌株による非水溶性グルカン合成能の違いとは関連していないことが示唆された。

次に、GtfB の C 末端側の direct repeating unit について、変異の検討を行った。通常、この繰り返し構造は 65aa のアミノ酸残基を 1 単位として 3.5 回の反復を示す。今回調べた *S. mutans* 株においても、ほとんどの株で 3.5 回の反復配列が認められたが、全 72 菌株中 9 株においては反復回数が増減しており、うち、6 株は 2.5 回の反復、3 株は 4.5 回の反復となっていた。なお、反復配列の上流において、反復配列の読み枠がずれるようなフレームシフト変異が生じている菌株はなかった。それぞれの反復回数の菌株における非水溶性グルカン合成能を比較すると、反復回数が 2.5 回の株が $29.0 \pm 21.6 \mu\text{g/ml broth}$ 、3.5 回の株が $85.2 \pm 41.1 \mu\text{g/ml broth}$ 、4.5 回の

株が $91.4 \pm 50.8 \mu\text{g/ml broth}$ であり、2.5 回の株は 3.5 回の株に比べ有意に低値を示した ($p = 0.007$; ANOVA + Scheffe's test)。ただ、それぞれの反復回数の *S. mutans* を保有する児童における DFT (decayed and filled teeth) は、反復回数が 2.5 回の株を持つ児童が 1.67 ± 1.51 、3.5 回の株を持つ児童が 1.40 ± 1.66 、4.5 回の株を持つ児童が 0.00 ± 0.00 であり、各菌株間に有意差は認められなかった。

以上より、*S. mutans* の菌株間で見られる非水溶性グルカン合成能の差は、*gtfB* 遺伝子の 3'末端付近の反復配列における、反復回数の違いが、原因の一つとなっていることが示唆された。ただ、反復回数が増減した菌株が少数しか得られなかったこともあり、今回、反復回数と齲蝕状況との間に有意な関連は認められなかった。今後、サンプル数をさらに増やした調査、および非水溶性グルカン合成能に影響を与える別の変異についても検索していく必要がある。

次に、この 3'末端付近の反復配列の反復回数を容易に判定できるような検査を開発した。すなわち、反復配列の上流と下流の保存領域をプライマーとして用い、*S. mutans* の Genome DNA を template として PCR 反応を行うことで、反復配列部分の DNA サイズから、反復回数を判定できる検査法を開発した。PCR の反応条件を次に示す。

primer1 : AATGGCTGTATCTCGGTG
primer2 : TAACTTAAGAGACGTTTTT

初期変性

95°C、4分

PCR 反応 (36 サイクル)

95°C、30秒

55°C、30秒

72°C、1分

PCR 産物の泳動結果を図 1 に示す。反復回数に応じて、サイズの異なるバンドが得られたことから、この検査法により、*S. mutans* の *gtfB* 3'末端付近における反復回数を正し

く判定できることが確認された。

a b c d e f g

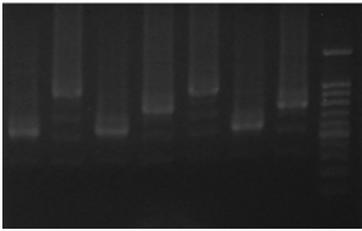


図 1

a, c, f : 2.5 回の反復の株
d, g : 3.5 回の反復の株
b, e : 4.5 回の反復の株

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)

1. Shinzawa-Fukushima M, Kanaya T, Kaneko N, Morita S, Miyazaki H, Saito I: Availability of air powder polishing with crystalline cellulose as a prophylactic method for orthodontic patients with a multi-bracket appliance. *Orthodontic Waves*, 69: 75-81, 2010. (査読有り)
2. 葭原明弘, 金子 昇, 杉本智子, 清田義和, 佐藤 徹, 宮崎秀夫: 乳・幼児健診に併設し実施する間接健診および個別指導が行動変容に及ぼす影響, *口腔衛生学会雑誌*, 60(1): 11-16, 2010. (査読有り)

[学会発表] (計 5 件)

1. Kaneko N, Umetsu H, Yoshihara A, Sakuma S, Hanada N, Miyazaki H: Glucan synthesis by *Streptococcus mutans* and caries incidence in schoolchildren. 88th General Session of the IADR, 2010.7.14-17, Barcelona (Spain).
2. Naito H, Takayama K, Masuda H, Tachino A, Ishihara Y, Kaneko N,

Miyazaki H: Relationship between salivary *Porphyromonas gingivalis* and periodontal conditions. 87th General Session of the IADR, 2009.4.1-4, Miami (USA).

3. 金子 昇, 濃野 要, 今井 奨, 葭原明弘, 花田信弘, 宮崎秀夫: 血清および唾液中 *Porphyromonas gingivalis* 抗体価と冠動脈性心疾患リスク因子との関連性の検討, *口腔衛生会誌*, 59(4): 496, 2009.
4. 金子 昇, 花田信弘: 血清および唾液中抗 *Porphyromonas gingivalis* 抗体価と冠動脈性心疾患のリスク因子との関連, *日本細菌学雑誌*, 64(1): 163, 2009.
5. 梅津英裕, 金子 昇, 葭原明弘, 佐久間 汐子, 宮崎秀夫: フッ化物洗口実施児童における *Streptococcus mutans* の非水溶性グルカン合成能とう蝕との関係, *新潟歯学会雑誌* 38(2):131-132, 2008.

6. 研究組織

(1)研究代表者

金子 昇 (KANEKO NOBORU)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号: 00397126

(2)研究分担者

(3)連携研究者