

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22791775

研究課題名（和文） 齲蝕予防を目的としたリプレースメントセラピーの新戦略

研究課題名（英文） The new strategy of the replacement therapy for prevention of dental caries

研究代表者

高橋 真和 (TAKAHASHI MASAKAZU)

昭和大学・歯学部・兼任講師

研究者番号：40420921

研究成果の概要（和文）：

齲蝕予防を目的としたリプレースメントセラピーに用いる多糖分解酵素産生菌を構築するために、ヒトの齲蝕原性プラークバイオフィルムの分解に有効と考えられているムタナーゼ（不溶性グルカン分解酵素）産生菌の検索およびその遺伝子のクローニングと性状解析を行った。続いて、プラスミド由来発現系を利用して多糖分解酵素を過剰産生する口腔常在菌株を構築した。

研究成果の概要（英文）：

In order to construction of polysaccharide degradation enzymes producing bacteria for caries prevention by replacement therapy, we firstly identified and analyzed the genes encoding a mutanase (water insoluble glucan degradation enzyme). Secondly, we constructed the bacterium which is overexpress of polysaccharide degradation enzymes by using plasmid-borne expression system.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔細菌学

1. 研究開始当初の背景

齲蝕原性細菌、緑膿菌、ブドウ球菌などに代表される病原細菌は、体表面に付着後、菌体外粘着性多糖体を合成しながら増殖を続け、細菌と菌体外多糖からなる不溶性で粘着性のバイオフィルムを形成する。このバイオフィルムは外部環境とは異なる独自のコミュニティを形成し、様々な物質の透過性を減少させるため、免疫系や各種化学療法剤に抵抗性を示すようになり、治療を難しくさせるとともに、病状の慢性化をもたらす原因になっている。また、病原細菌バイオフィルム

は歯表面や呼吸器、尿路、膣、小腸などの粘膜表面およびカテーテルや人工心臓弁などの医用生体材料表面にも形成されることから、臨床医学上大きな問題となっており、その対策が急務かつ重要課題となっている。このような背景のもと、申請者らの研究室では口腔内の典型的な細菌バイオフィルム感染症である齲蝕の治療と予防法の開発に関する基礎研究を進めている。

齲蝕は、*Streptococcus mutans* によるバイオフィルム感染症である。この齲蝕原性細菌が感染する前に、歯に無害な細菌を効果的に

使って齲蝕の発症を予防しようという発想が細菌置換療法（リプレースメントセラピー）である。これまでに、国内外でリプレースメントセラピー用の菌株開発が行われてきたが、未だ理想的な菌株は開発されていない。

齲蝕原性プラークバイオフィルムを形成する多糖は、グルコースの多糖体で不溶性のムタン、水溶性のデキストランおよびフルクトースの多糖体であるフルクタンからなる。我々の研究グループでは、これまでに齲蝕原性細菌のバイオフィルム形成は、形成初期段階からの継続的にデキストラン分解酵素（デキストラナーゼ）を作用させることで、部分的にバイオフィルム形成を抑制できることを報告してきた。そこで、我々は、口腔内常在細菌に多糖分解酵素を産生させリプレースメントセラピーに供する、という齲蝕予防戦略の発想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、口腔バイオフィルムの主要構成成分である菌体外多糖体（ムタン、デキストラン、フルクタン）に着目し、その分解酵素を過剰産生する口腔常在菌株を構築し、齲蝕予防を目的としたリプレースメントセラピーに応用することを目標とし、本研究期間では、以下を明らかにすることを目的とした。

- (1) 齲蝕原性細菌の産生するプラークバイオフィルム中には、 α 1,3 結合をもつ不溶性のグルカン（ムタン）が多く存在し、歯面に強固に付着するので、齲蝕原性プラークバイオフィルムの分解には、このムタンを分解することが有効と考えられる。そこで、ムタン分解酵素（ムタナーゼ）産生菌の検索およびその遺伝子のクローニングと性状解析を行う。
- (2) プラスミド由来発現系を利用して多糖分解酵素を過剰産生する口腔常在菌株の構築および多糖分解酵素分泌能の評価を行う。

3. 研究の方法

- (1) ムタナーゼ産生菌の検索およびその遺伝子のクローニングと性状解析

本研究では口腔細菌由来のムタナーゼ遺伝子をクローニングするために、口腔細菌の標準菌株が持つムタン分解活性を調べた。基質となるムタンは *S. mutans* がショ糖存在下で産生する菌体外多糖から調整し、寒天平板に混入させて使用した。ムタン分解活性はコロニー周囲のムタン分解によるハロー形成により判定した。ムタナーゼ遺伝子の検索には、既に報告されている *Paenibacillus* sp. の α 1,3-glucanase の配列をもとに、ゲノムデータベース (TIGR) 上で相同遺伝子を検索した。

- (2) プラスミド由来発現系を利用して多糖分解酵素を過剰産生する口腔常在菌株の構築および多糖分解酵素分泌能の評価

多糖分解酵素産生菌をプラスミド由来発現 (PLasmid-borne EXpression) (PLEX) 系を利用して構築した。本分泌系は最終的には、口腔内常在菌 *Streptococcus gordonii* での分泌を想定しているため、*Streptococcus* 属のシャトルベクター pVA838 に多糖分解酵素遺伝子を挿入し、次いで、構築したプラスミドを用いて *S. gordonii* を形質転換し、目的の酵素を過剰発現・分泌する系である。まず、シャトルプラスミド pVA838 から多糖分解酵素を合成及び分泌させるため、正の調節遺伝子 *rgg* と *gtf-G* のプロモーター (P-*gtf-G*) 及び分泌シグナル配列を利用し、その下流に多糖分解酵素遺伝子を組み込んだベクターを作製した。はじめに PLEX 系で多糖分解酵素分泌系を確立するために、ブルーデキストランを用いて活性が簡易に判定できるデキストラナーゼ遺伝子を組み込み、発現系の確立を目指した。850 アミノ酸からなるデキストラナーゼは、C 末端領域に LPXTG 配列を保有しているため、Sortase による LPXTG 配列の特異的切断を受け、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ため、分泌されないと考えられた。そこで、LPXTG 配列による分泌系への影響を調べるために、*rgg*, P-*gtf-G* の下流に LPXTG 配列を含んだプラスミド pVA838-*rgg*DexA(+) と LPXTG 配列を除去したプラスミド pVA838-*rgg*DexA(-) を構築した。これらのプラスミドを用いて *S. gordonii* を形質転換した。抗 DexA 抗体を用いた Western blot 法により、タンパク質の発現を確認し、ブルーデキストラン SDS-PAGE により分泌されたタンパク質の活性を確認した。

[デキストラナーゼ活性測定法: ブルーデキストランザイモグラフィ]

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 を含む緩衝液を用いて SDS を除去する。デキストラナーゼ活性が回復することで、ブルーデキストランが分解され、バンドが形成され、活性を容易に判定できる方法である。

4. 研究成果

- (1) ムタナーゼ産生菌の検索およびその遺伝子のクローニングと性状解析

口腔細菌由来のムタナーゼ遺伝子をクローニングするために、口腔細菌の標準菌株が持つムタン分解活性を調べた。ムタン分解活性はコロニー周囲のムタン分解によるハロー形成により判定した。その結果、*Prevotella*

melaninogenica がムタン分解能を有することが明らかになり、ムタナーゼ遺伝子の供与遺伝子として使用した。ムタナーゼ遺伝子の検索は、既に報告されている *Paenibacillus* sp. の α 1,3-glucanase の配列をもとに、*P. melaninogenica* ATCC25845 ゲノムデータベース(TIGR)上で相同遺伝子を検索した。その結果、ムタナーゼ遺伝子ホモログは 2904 bp で、推定分子量 105845.05 pI 5.57 のタンパク質をコードしていた。次に、本遺伝子の遺伝子産物のムタナーゼ活性を評価する目的で、pET44c ベクターに本遺伝子を組み込み、プラスミドを構築した(pET-mut)。このプラスミドを用いて *E. coli* を形質転換(pET-mut/*E. coli*)し、Nus His タグ融合タンパク質として発現させた。基質のムタンが分解された結果生じる還元糖を somogyi-nelson 法を用いて定量して活性を測定した結果、この形質転換体はムタナーゼ活性を有していた(図1)。

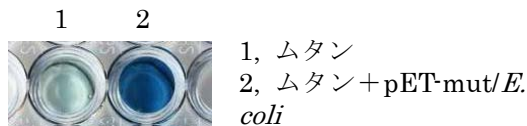


図1 ムタナーゼホモログのムタン分解活性

(2) プラスミド由来発現系を利用して多糖分解酵素を過剰産生する口腔常在菌株の構築および多糖分解酵素分泌能の評価

ヒトの齶蝕原性プラークバイオフィルムの主要構成多糖はデキストラン、ムタン、フルクタンである。このうち、デキストラナーゼの活性は、ブルーデキストランを基質に用いることで容易に活性を検出できることから、まず、ベクターにデキストラナーゼ遺伝子を組み込み、分泌系を確立することを目指した。*Streptococcus* 属のシャトルベクター pVA838 に positive regulator *rgg* に続けて *S. gordonii* *gtfG* のシグナルペプチドおよび分泌シグナルを導入し、その下流にデキストラナーゼ遺伝子の LPXTG 配列を含んだプラスミド pVA838-*rggDexA(+)* と LPXTG 配列を除去したプラスミド pVA838-*rggDexA(-)* を構築した。これらのプラスミドを用いて *S. gordonii* を形質転換し、得られた形質転換体を以下の実験に供した。

・DexA 抗体を用いた Western blot 法によるタンパク質の発現解析

ベクターに組み込んだデキストラナーゼの発現解析を行う目的で、wild-type の *S. gordonii*, pVA838-*rggDexA(-)* で形質転換した菌株 *DexA(-)* 株および pVA838-*rggDexA(+)* で形質転換した菌株 *DexA(+)* 株の菌体画分および培養上清画分を SDS-PAGE に供した。一次抗体に DexA 抗

体、二次抗体にアルカリフォスファターゼ標識抗体を用いて検出した(図2)。矢印でデキストラナーゼを示す。

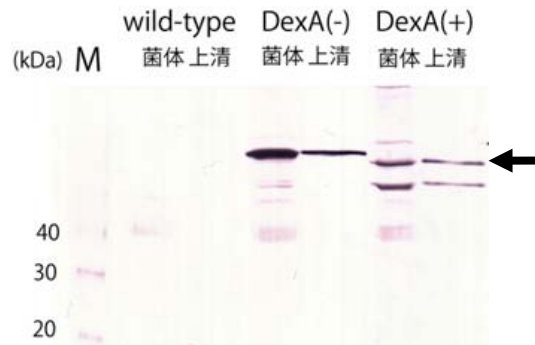


図2 DexA 抗体を用いた Western blot

この結果から、*DexA(-)* 株、*DexA(+)* 株ともに細胞外にデキストラナーゼを発現していることが確認できた。*DexA(-)* 株と *DexA(+)* 株のデキストラナーゼの発現量を比較すると、LPXTG 配列を除去した *DexA(-)* 株の発現量が多く、多糖分解酵素過剰発現株の構築系では、LPXTG 配列の除去が有効であることが示唆された。

・デキストラン分解活性の評価

DexA(-)、*DexA(+)* 株の菌体画分および培養上清画分をブルーデキストランゼイモグラフィーに供し、デキストラン分解活性を確認した(図3)。

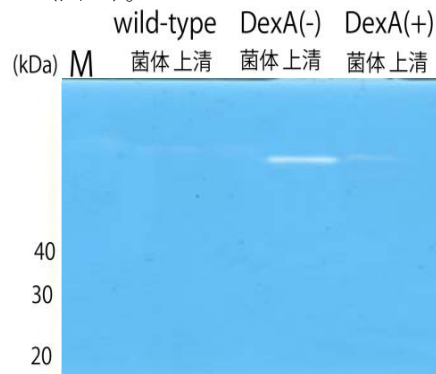


図3 ブルーデキストランゼイモグラフィー
この結果から、*DexA(-)* 株で分泌型のデキストラン分解活性を有していることが確認できた。

これらの結果より、*gtfG* のシグナルペプチドが *S. gordonii* での多糖分解酵素過剰発現株の構築系で有効であることが確認でき、ベクターに組み込む遺伝子は LPXTG 配列を除去することで、細胞外へ効率よく分泌されることが示された。今後、ムタナーゼ遺伝子およびフルクタナーゼ遺伝子を本発現ベクターに組み込み、*S. gordonii* 多糖分解酵素発現株を作製し、本形質転換株のバイオフィルム形成阻害効果を評価する。

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 Nishio J, Taniguchi M, Higashi J, Takahashi M, Ando T, Hasegawa T, Igarashi T
Rapiddetection and identification of *Streptococcus ratti* by a species-specific PCR method
Anaerobe, 査読有, 18(1)44-47, 2012
DOI: 10.1016/j.anaerobe.2011.09.001.
- ② Takahashi M, Igarashi T
Molecular Analysis of the Nuclease Anchored to the Cell Wall of *Streptococcus gordonii*
Dental Medicine Research, 査読有, 30(3)219-227, 2010

[学会発表] (計5件)

- ① Arimoto T, Taniguchi M, Takahashi M, Igarashi T
Branched-chain Amino Acids Utilization by *Streptococcus mutans*
第58回国際歯科研究学会日本部会, 2010年11月21日, 北九州
- ② Shimada E, Kataoka H, Takahashi M, Yamamoto M, Igarashi T
TLR2-dependent inflammatory response by *Actinomyces viscosus* is attenuated by naringenin
第96回アメリカ歯周病学会共催日本歯周病学会2010年大会, 2010年10月30日, ハワイ
- ③ 布施晴香, 深町はるか, 高橋真和, 井上美津子, 五十嵐武
Prevotella intermedia のフルクタン代謝関連遺伝子群の解析, 第52回歯科基礎医学会, 2010年9月20日, 東京
- ④ 島田絵里, 片岡嗣雄, 高橋真和, 山本松男, 五十嵐武
Actinomyces viscosus のリポタンパク質はTLR2を介した炎症応答を誘導する
第30回昭和歯学会総会, 2010年7月3日, 東京
- ⑤ Shimada E, Kataoka H, Takahashi M, Yamamoto M, Igarashi T
Naringenin Suppresses the Inflammatory Response Induced by *Staphylococcus aureus*
110th American society for microbiology general meeting, 2010年3月23日, サンディエゴ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 真和 (TAKAHASHI MASAKAZU)

昭和大学・歯学部・兼任講師

研究者番号: 40420921