

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24年 5月25日現在

機関番号：16101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890123

研究課題名（和文） ミュータンス連鎖球菌の糖輸送関連遺伝子が
バイオフィーム形成に与える影響について研究課題名（英文） The effects of gene associated with sucrose phosphotransferase system
on biofilm formation of *Streptococcus mutans*

研究代表者

木村 智子 (KIMURA TOMOKO)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：20581367

研究成果の概要（和文）： う蝕（虫歯）原因菌として知られる *Streptococcus mutans* の重要な病原因子である酸産生に深く関与する *scrA* 遺伝子とバイオフィーム形成との関係を、走査型電子顕微鏡を用いて解析した。その結果、*scrA* 遺伝子はバイオフィーム表層の構造に関与していることが示された。また、リアルタイム PCR 法による解析では、*scrA* 遺伝子はバイオフィームの構成成分であるグルカンの合成・分解に関与する遺伝子の発現に影響を与えていることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： The aim of this study was to investigate the relationship between *scrA* gene deeply related to the acidogenic activity in cariogenic bacterium, *Streptococcus mutans*, and biofilm formation. Scanning electron microscopic observation and real-time PCR analysis demonstrated that *scrA* gene affects the expression of various genes involved in the synthesis of glucan, a component of biofilm.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,150,000	645,000	2,795,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯学，う蝕，細菌，遺伝子，バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

口腔常在菌の一つである *Streptococcus mutans* はう蝕原因菌として知られている。う蝕は口腔バイオフィーム感染症と考えられており、歯面に定着した細菌はスクロースを基質として非水溶性グルカンを合成し、バイオフィームを形成する。バイオフィームは強固に歯面に付着し、さらに細菌が産生する酸を貯留させるため、歯表面の持続的な pH の低下を招き、結果として、歯表面を脱灰し、う蝕を惹起する。

現在広く行われているう蝕予防方法、特にホームケア（セルフケア）として実践されている方法は、主に歯ブラシ等の口腔清掃用具によるバイオフィーム（プラーク）の機械的除去である。しかしながら、高齢社会を迎え、要介護高齢者をはじめとするセルフケアが困難な方々が増えつつある現在、従来とはコンセプトを異にする新たなバイオフィームの排除・抑制法を開発し、う蝕予防に応用することは、極めて重要であり、また急務である。

そこで、う蝕の原因菌である *S. mutans* のう蝕病原因子に関わる表現形質に直接アプローチし、その病原性を低下させる方法が存在すれば、う蝕予防あるいはう蝕治療に貢献できるのではないかとこの着想に至った。

具体的な着眼点として、*S. mutans* の重要なう蝕病原因子であるバイオフィーム形成ならびに酸の産生に必須であるスクロースの代謝機構に深く関与する酵素である EII^{Scr} に着目した。EII^{Scr} は、スクロース輸送機構の一つであるホスホエノールピルビン酸依存ホストランスフェラーゼ系（PEP-PTS）において、スクロースを菌体内へ取り込む際に必須な酵素であり、この酵素蛋白をコードする遺伝子が *scrA* である。*scrA* 遺伝子は、スクロース 6-リン酸加水分解酵素をコードする *scrB* 遺伝子の上流の相補鎖上に存在し（J Bacteriol. 171, 263-271, 1989）、スクロースの存在下で発現が高まることが報告されている（FEMS Microbiol Lett. 63, 339-345, 1991）。また *scrA* 遺伝子の活性は、転写抑制因子である ScrR が *scrA* のプロモーター領域に結合することによって調節されているという報告がある（J Bacteriol. 185, 5791-5799, 2003）。

このような報告を元に、*scrA* 遺伝子改変株を作製し、アパタイトディスクなどへの菌の初期付着能について解明してきた。しかし、*S. mutans* のバイオフィーム形成という重大なう蝕病原因子とどのように関わっているかについては不明な点が多い。今後、より口腔内に近い環境での解析が必要であると考えられるため、*scrA* 遺伝子とバイオフィーム形成の関係をさらに詳細に検討していくために、形成されたバイオフィームの形態学的解析や関連遺伝子の発現量に関する解析

を進めることとした。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、*S. mutans* の主な病原因子である酸産生能に深く関わる *scrA* 遺伝子の役割を明らかにし、バイオフィーム形成をはじめとする他の病原因子との関連を解明していくことで、う蝕や歯髄炎の発症メカニズムを探り、従来の方法とは全く異なった新しいう蝕治療法、予防法を開発することである。

このような最終目標を前提に、本研究では *scrA* 遺伝子がバイオフィーム形成に与える影響について明らかにする。具体的に、まず *scrA* 遺伝子とバイオフィームの形態の関連性を明らかにし、次に、バイオフィーム形成に関与する遺伝子の発現にどのような影響を与えているのかについても明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 走査型電子顕微鏡（SEM）によるバイオフィーム表層の観察

ウシ前歯において歯髄および軟組織を除去した歯根部象牙質を用いて、末延の方法（四国歯誌. 18, 161-176, 2005）に準じて、マイクロカッターにより歯軸方向にほぼ平行な約 500 μm の厚さの象牙質板を作製した。これを一定の大きさにトリミングし、研磨、EOG 滅菌を行った。この象牙質板を 5% スクロース含有の対数増殖期の親株（UA159 株）および *scrA* 遺伝子改変株の懸濁液に投入して 37°C にて 48 時間嫌気培養することによって、象牙質板上にバイオフィームを形成させた。この試料をリン酸緩衝液と四酸化オスミウム酸溶液を用いて固定後、脱水を行い、SEM（JEOL-JSM5300; 日本電子）を用いてバイオフィーム表層を観察し、両菌株で比較して検討した。

(2) リアルタイム PCR 法によるバイオフィーム関連遺伝子の発現解析

バイオフィームの構成成分であるグルカンの合成に関与する *gtfB*、*gtfC* および *gtfD* 遺伝子と、グルカン分解に関与する *dexA* 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法にて測定した。

まず、BHI 液体培地のみで培養した親株および *scrA* 遺伝子改変株の対数増殖期および定常期の菌、および 5% スクロース含有 BHI 液体培地で培養した定常期の菌を回収し、TRIzol MaxTM Bacterial RNA Isolation Kit

(Invitrogen) と RNeasy spin column (QIAGEN) を使用して total RNA を抽出した。次に、DNase 処理を行い、Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit (Roche) を用いて逆転写反応を行った。得られたサンプルで、LightCycler (Roche) を使用して Real-time PCR 法による遺伝子発現量の測定を行った。試薬として、LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBRgreen I (Roche) を用いた。また、内部 control として 16s rRNA 遺伝子の発現量を測定し、各遺伝子の相対定量を行った。使用したプライマーの配列およびアニーリング温度を表 1 に示した。

表 1 Real-time PCR で使用したプライマー

Primer	Sequence	Length of amplicon(bp)	Annealing temperature (°C)
gtfB-2s	5'-CAGCTGCAACTATTCAAGCA-3'	293	54
gtfB-2a	5'-GAATTCGTAACCGCCGATAG-3'		
gtfC-2s'	5'-CGACTGGTAAATTTGTCCT-3'	363	50
gtfC-2a'	5'-CAGCATCTGTACTATAGACCT-3'		
gtfD-2s	5'-CAGGTGCCTTAACGGCACT-3'	350	54
gtfD-2a	5'-GGTTTGTGACAGCAAGTTGA-3'		
dexA-2s	5'-GCTATTGCGGTTGAGGATGA-3'	234	54
dexA-2a	5'-ATGGCTCCACCAATCCAAG-3'		
scrA-real-2s	5'-TCCAAAATGGTACTGGTCATGG-3'	159	59
scrA-real-2a	5'-TAATACCAAGAAGCGTGACAC-3'		
htrA-real-2s	5'-AGTTGGAGAACGCAATC-3'	164	56
htrA-real-2a	5'-GGTTAATAGTCTGCTGTG-3'		
16s-3s	5'-CCAGGGTATCTAATCCTGTTC-3'	166	55
16s-3a	5'-TCTGGAAACTGTCTGACTTG-3'		

なお、徳島大学遺伝子組換え実験安全管理委員会主催による安全取扱講習会を受講し、法令および学内規則を遵守する旨の誓約書を提出しており、本研究内容に関しても安全管理委員会の承認のもと実施した。

4. 研究成果

(1) 走査型電子顕微鏡 (SEM) によるバイオフィーム表層の観察

親株および *scrA* 遺伝子改変株が象牙質板上に形成したバイオフィーム表層の SEM 像を図 1 に示した。

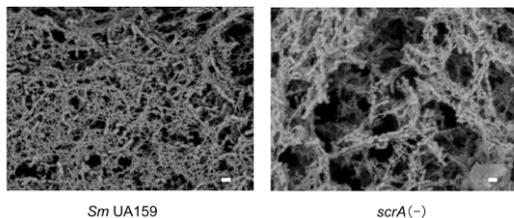


図 1 親株 (*Sm UA159*) および *scrA* 遺伝子改変株がウシ象牙質板上に形成したバイオフィーム表層の SEM 像。ウシ象牙質板を親株および改変株の懸濁液に 48 時間浸漬し、形成されたバイオフィームの表層を SEM で観察した。右下の白いバーは 10 μm を示す。

親株では、グリコカリックス様構造が密で細かな網状を呈したのに対し、*scrA* 遺伝子改変株のそれは粗であった。

この結果より、*scrA* 遺伝子がバイオフィーム表層の構造に関与していることが示唆された。

(2) リアルタイム PCR 法によるバイオフィーム関連遺伝子の発現解析

バイオフィームの構成成分であるグルカンの合成に関与する *gtfB*、*gtfC* および *gtfD* 遺伝子と、グルカン分解に関与する *dexA* 遺伝子の発現量を測定し、比較検討した。

対数増殖期の *scrA* 遺伝子改変株の mRNA 発現量を親株と比較したところ、*gtfB* 遺伝子は親株の約 54%、*gtfD* 遺伝子は親株の約 36% まで減少した (図 2 A)。定常期の改変株においては *gtfB*、*gtfC* 遺伝子の発現量が大きく減少し、親株の約 15~25% となり、*gtfD* 遺伝子においても約 61% まで減少した (図 2 B)。また、5% スクロース存在下で培養した定常期の菌において、*dexA* 遺伝子の発現量が約 16% に減少した (図 2 C)。

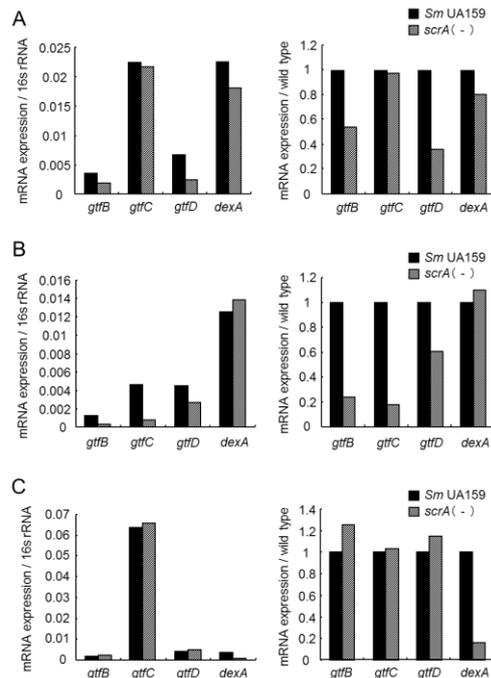


図 2 *scrA* 遺伝子改変株における

gtfB、*gtfC*、*gtfD*、*dexA* mRNA 発現量の比較

親株 (*Sm UA159*) および *scrA* 改変株を BHI 液体培地で培養した対数増殖期の菌 (A)、BHI 液体培地で培養した定常期の菌 (B)、5% スクロース含有 BHI 液体培地で培養した定常期の菌 (C) における、グルカン合成に関与する *gtfB*、*gtfC* および *gtfD* 遺伝子、グルカン分解に関与する *dexA* 遺伝子の発現量を Real-time PCR 法にて測定した。左に 16s rRNA でノーマライズして相対定量を行ったグラフを、右に親株の発現量を 1 として改変株の発現量を比較したグラフを示した。

この結果より, *scrA* 遺伝子がグルカンの合成に関与している可能性が示唆された。

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1件)

①SHINGO SHIBATA, TOSHIYUKI SUGE, TOMOKO KIMURA, KUNIO ISHIKAWA, & TAKASHI MATSUO, Antibacterial activity of ammonium hexafluorosilicate solution with antimicrobial agents for the prevention of dentin caries , American Journal of Dentistry, 査読有, 25, 2012, p.31-34

[学会発表] (計1件)

①H. YUMOTO, T. TOMINAGA, K. HIRAO, T. KIMURA, and T. MATSUO , Inactivation and Bactericidal Activity against Oral Bacteria of Electro-Magnetic Wave, IADR , 2010.7.15, Exhibit Hall (スペイン)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 智子 (KIMURA TOMOKO)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：20581367