

## 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 6 月 15 日現在

機関番号：32710  
 研究種目：研究活動スタート支援  
 研究期間：2010 ～ 2011  
 課題番号：22890210  
 研究課題名（和文） ドメインシャッフリングによるフルクタナーゼキメラ酵素の作製とバイオフィルムの分解  
 研究課題名（英文） Degradation of biofilm by fructanase chimeric enzyme  
 研究代表者  
 角田衣理加（KAKUTA ERIKA）  
 鶴見大学・歯学部・学部助手  
 研究者番号：30585469

## 研究成果の概要（和文）：

デキストラナーゼとフルクタナーゼのキメラ酵素の開発は、う蝕予防に貢献できる可能性がある。 *S. mutans* UA159 株からデキストラナーゼ A (*dexA*) 遺伝子とフルクタナーゼ (*fruA*, *fruB*) 遺伝子をそれぞれクローニングし、得られた酵素をデキストランおよびフルクタンと反応させ、それぞれの基質が分解したことを Somogyi-Nelson 法により確認した。本研究により開発した酵素を用いて、バイオフィルムを分解できる可能性が示唆された。

## 研究成果の概要（英文）：

The purposes of this study were to construct chimeric enzyme of dextranase and fructanase, and to degrade the biofilm effectively. The dextranase gene and fructanase gene from *S. mutans* UA159 were cloned and connected in same plasmid vector. These enzymes were expressed in *Escherichia coli*. The function of enzyme was investigated by Somogyi-Nelson method using dextran and fructan as substrates. The enzyme degraded dextran and fructan. These results suggested that these enzymes are useful tool for the degradation 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	1,090,000	327,000	1,417,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,290,000	687,000	2,977,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会系歯学

キーワード：歯学、酵素、細菌、遺伝子、バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景  
う蝕は *Mutans Streptococci*

(*Streptococcus mutans* (*S. mutans*),  
*Streptococcus sobrinus* (*S. sobrinus*)) を

主体とする口腔細菌によって起こるものであり、*S. mutans*が歯面に付着、定着、増殖の過程が継続することがう蝕発生の必要条件である。まず、唾液中に存在する糖タンパク質が歯面のエナメル質に吸着し、ペリクルを形成し、ペリクルを介して

*Streptococcus sanguinis*菌群 (*S. sanguinis*) と *Acinomyces viscosus*

(*A. viscosus*) は歯面に付着し、初期の歯垢形成に関与する。*S. sanguinis*菌群の1つである *Streptococcus gordonii* (*S. gordonii*) と *A. viscosus*は、食物中のショ糖

からフルクトシルトランスフェラーゼ

(FTF) により合成されたフルクタン依存性付着を起こす。一方、*S. gordonii*と *S.*

*mutans*および *S. sobrinus*は食物中のショ糖からグルコシルトランスフェラーゼ

(GTF) により合成されたグルカン依存性付着を起こすことが報告されている。

歯垢の除去方法には、歯ブラシや歯間ブラシなどを用いてブラッシングを行う機械的清掃に加え、化学的清掃法である歯磨剤や洗口剤を用いて行うのが一般的である。歯磨剤や洗口剤には、う蝕予防を目的として種々の薬効成分が添加され、その予防効果についての研究がなされており、現在市販されている歯磨剤や洗口剤には、プラーク細菌に対して直接的に作用する殺菌剤が主体となっている。

## 2. 研究の目的

歯面に付着した歯垢は、ブラッシングによってかなり除去できるが、歯肉辺縁や歯の隣接面は除去しきれずに残りやすい。デキストラナーゼは、菌体外多糖体であるデキストランの $\alpha$ -1, 6結合を切断し、歯垢の成長を抑制することが知られており、歯垢抑制について有用であるという報告があ

ることから、殺菌効果と別のメカニズムでう蝕予防に有用であり、商品化されている。一方、フルクタナーゼについては、フルクタナーゼ自身がう蝕発生要因にならないという報告があるのみで、う蝕予防に言及した報告はない。前述の通り、フルクタンも初期歯垢形成に関与していることから、細菌付着要因であるデキストランとフルクタンを同時に分解できる高機能キメラ酵素を創出することによって、デキストランとフルクタンを同時に分解することは、デキストラナーゼ単独よりもさらに優れたバイオフィーム分解能が期待でき、歯垢形成の阻止と共に、より効果的なう蝕予防に非常に有意義と考えた。

## 3. 研究の方法

### 1) ドメインシャッフリングによる高機能キメラ酵素の創出

酵素遺伝子の機能ドメインをシャッフリング(置換)することにより、キメラ酵素を創出する可能性があり、酵素の機能向上が期待できる。本研究では、ドメインシャッフリングによる歯科医療に役立つ高機能キメラ酵素を創出する。本研究で得られたドメインシャッフリング技術は、医薬品の他、歯磨剤や洗口剤など歯科医療産業上重要な様々な酵素に適応できる可能性があり、安定性の優れた種々のキメラ酵素を創出することが期待できると考えられる。蛋白質(酵素)の進化は遺伝子の相同組換えに起因するものであり、蛋白質を構成するアミノ酸配列が大幅に変化するため、蛋白質の特性に極めて大きな変化をもたらす。本研究では、酵素遺伝子の任意の領域を他の酵素遺伝子の領域とシャッフリングする手法を確立し、同時にキメラ酵素をフォールディングする技術を開発することにより、遺伝

子シャッフリングによる新たなキメラ酵素を創出し、熱安定性や基質特異性を向上させるといった既存酵素の特性を改良する技術の確立を目指す。

## 2) 高機能キメラ酵素の発現

キメラ酵素遺伝子を遺伝子組み換えが承認されている大腸菌で発現させ、強力な分解酵素を発現させて、歯面バイオフィルムの分解を促進する。本研究では、ミュータンスレンサ球菌のバイオフィルムを分解する酵素（デキストラナーゼ、フルクタナーゼ）を用いる。

## 4. 研究成果

*S. mutans* (UA159) のデキストラナーゼ遺伝子のクローニングは、*S. mutans* の遺伝子を抽出した後に、精製し、PCR を行ってデキストラナーゼ遺伝子を増幅し、切出し、精製を行った。次に、精製したデキストラナーゼ遺伝子 A, B を大腸菌ベクター(pUC118 もしくは pUC119)に組み込んだ。pUC118, pUC119 にクローニングしたデキストラナーゼ遺伝子 A, B をそれぞれ IPTG を用いて、発現誘導させた。デキストラナーゼを基質として、Somogyi-Nelson 法にて、発現させたデキストラナーゼ遺伝子 A の酵素活性を調べた (図 3)。その結果、デキストラナーゼ遺伝子 A を pUC118 に組み込んだものが細胞沈渣、細胞質液、培養上清、で活性が認められた。*S. mutans* のフルクタナーゼ遺伝子は、デキストラナーゼ遺伝子と同様に A, B があり、フルクタナーゼ遺伝子のクローニングを行い (図 1, 2)、Somogyi-Nelson 法にて酵素活性を検証した (図 4)。今後さらにドメインシャッフリング技術を用いて、酵素改良を進める。

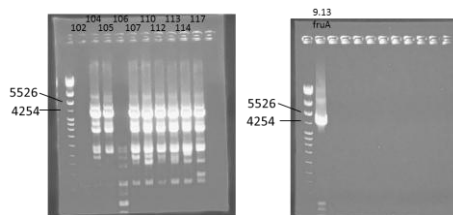


図 1: fruA クローニング

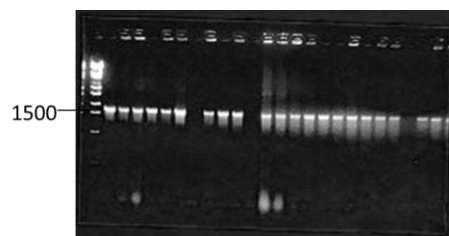


図 2: fruB クローニング

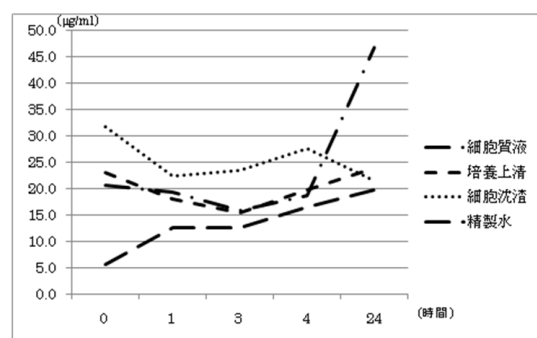


図 3: デキストラナーゼ酵素分析結果

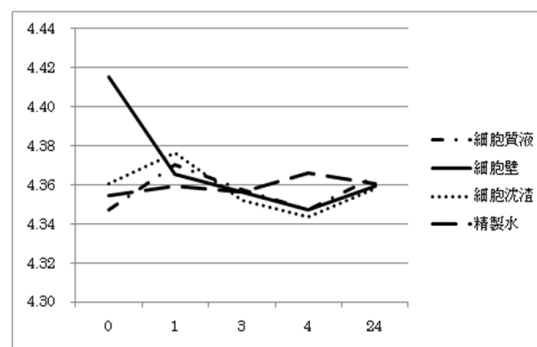


図 4: フルクタナーゼ酵素分析結果

## 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)

① Erika Kakuta, Akira Ida, Hiromi Nomura, *et al.*, Oral conditions that affect salivary biomarkers -Preliminary survey by self-administrated questionnaire-, 日本口腔衛生学会雑誌、査読有、62 巻、2012、印刷中

〔学会発表〕(計3件)

- ①角田衣理加、野村義明、村田貴俊他、ムタナーゼとデキストラナーゼ両遺伝子の連結によるバイオフィルムの分解、第53回歯科基礎医学会学術大会・総会、2011年10月1日、長良川国際会議場(岐阜県)
- ②角田衣理加、野村義明、大島朋子他、歯周病スクリーニングにおける唾液検査と問診項目の関連性に関する予備的検討、第60回日本口腔衛生学会・総会、2011年10月9日、日本大学松戸歯学部(千葉県)
- ③角田衣理加、大島朋子、前田伸子他、アロマセラピーの歯科応用への模索、第14回日本アロマセラピー学会・学術総会(教育講演)、2011年11月12日、日本科学未来館(東京都)

〔図書〕(計1件)

- ①武内博朗、小林和子、角田衣理加、デンタルダイヤモンド社、歯科発ヘルシーライフプロモーション監修 花田信弘 編著 武内博朗  
1章10-2:Sun protection/UV careを誤解していませんか?、155ページ(4ページ)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

角田衣理加 (KAKUTA ERIKA)  
鶴見大学・歯学部・学部助手  
研究者番号：30585469

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし