

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：81202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593118

研究課題名(和文)食品成分と龋蝕原性バイオフィーム及び グルカンの相互作用に関する研究

研究課題名(英文)Effects of food ingredients to cariogenic biofilms and alpha-glucans.

研究代表者

矢野 明 (Yano, Akira)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・生物資源研究部・主席研究員

研究者番号：50312286

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：グルカンは龋蝕の原因菌であるミュータンスレンサ球菌が歯面上にバイオフィームを形成する時に、強固な足場として機能していると考えられている。これを実証するため各種 グルカンの固定層上面にミュータンスレンサ球菌を培養したところバイオフィームを形成することが示され、GTFを発現する組換え大腸菌を用いることで、GTFがバイオフィーム形成因子の一つであることが示された。口腔常在菌のほとんどはグルカン固相表面上にバイオフィーム形成能を示さず、ミュータンスレンサ球菌とグルカンの特異的關係が示唆された。口腔常在真菌の一種、カンジダアルピカンスがグルカンの有無に関わらず、強固なバイオフィーム形成能を示した。

研究成果の概要(英文)：The alpha-glucans are thought to be an anchor molecule for formation of oral biofilms. We confirmed this hypothesis by in vitro culture using the glucan fixed culture plate. The alpha-1,3-glucan, alpha-1,6-glucan and alpha-1,3-1,6-glucan are independently prepared and fixed on the wells of 96-well plates. Streptococcus mutans was cultured on this plate by the sucrose free medium, and the biofilm formation was observed after O/N incubation. Interestingly, initial attachment of S. mutans on the glucan plate was weaker than on the saliva coating plate. The other oral Streptococci were also tested but biofilm formation were not observed as like as S. mutans. The function of GTFs to biofilm formation were investigated by E. coli transformants expressing GTFs. Those E. coli could form biofilms on the glucan fixed plate. During the research, we found that soluble alpha-glucan, dextran, could be used as biofilm decolonizing substrate.

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：バイオフィーム グルカン デキストラン

### 1. 研究開始当初の背景

齲蝕症の発症において、ミュータンスレンサ球菌の有する糖転移酵素 Gtfs による  $\alpha$  グルカンの形成と、 $\alpha$  グルカンを足場としたバイオフィーム形成が重要であると考えられている。しかし  $\alpha$  グルカンそのものが本当に足場として機能しているのか、さらに多数の口腔細菌、とくにアーリーコロナイザーとして知られる口腔レンサ球菌にとって、 $\alpha$  グルカンが足場として機能するかについては、解析されていなかった。

一方、我々はミュータンスレンサ球菌が数種の Gtfs により合成する菌体外多糖 ( $\alpha$ -1,3-1,6 グルカン) や、同 Gtf-B が産生する非水溶性グルカン ( $\alpha$ -1,3-グルカン) を多量に取得していた。ミュータンスレンサ球菌はスクロース存在下において容易に強固なバイオフィームを形成するが、スクロース非存在下においては、浮遊細胞の状態で増加することは知られていた。食品に含まれる Gtfs 阻害成分や、バイオフィーム形成阻害成分の多くは、ミュータンス菌によるグルカン産生を抑制し、浮遊細胞を増加させることが示唆されていた。

### 2. 研究の目的

バイオフィーム形成における足場としての  $\alpha$  グルカンの役割を明らかにするためには、実際に  $\alpha$  グルカンを用いて人工的な足場を形成し、そこにミュータンスレンサ球菌を培養し、付着・定着してバイオフィーム形成が実行されるかどうか、検証すれば良いと考えた。本研究事業での第1の目的は、 $\alpha$  グルカンを固定化した培養容器を活用した、ミュータンスレンサ球菌によるバイオフィーム形成能の検証である。

第2に、ミュータンスレンサ球菌以外の口腔細菌、特に歯面への付着能を有するレンサ球菌等の初期付着菌種が、ミュータンスレンサ球菌が産生する  $\alpha$  グルカンを足場とし得るのか、検証することを目的とする。

一方、食品成分のうちグルカンを含むバイオフィーム形成を阻害するものを探索し、新たなバイオフィーム形成抑制素材の発見や、バイオフィーム抑制法の開発をもう一つの目的とした。その際、これまで考えられてきた、Gtf 阻害によるグルカン合成の抑制が、バイオフィーム形成の抑制に直結するか、検証を行うことを試みた。さらに、グルカン固相上においても高いバイオフィーム形成能を有する口腔真菌について、その抑制素材や抑制法の検討を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) グルカン固定相の作製

本研究ではグルカンを 96-well plate の well 底面に固定し、ミュータンスレンサ球菌をはじめとする口腔微生物のバイオフィーム形成能を検討することとした。グルカンとして、ミュータンスレンサ球菌が産生する

$\alpha$ -1,3-1,6-グルカン、GtfC と GtfD を欠損し GtfB のみを発現する変異株に産生させた  $\alpha$ -1,3-グルカン、および市販の  $\alpha$ -1,6-グルカン (デキストラン) を使用した。

それぞれのグルカンをアルカリ条件で可溶化し、緩衝液にて希釈系列を作製、ELISA 用 plate に固定を行った。固定乾燥後にコンカナバリン A をプローブとして、固定されたグルカン量を ELISA 法にて定量し、一定量以上 Well 底面に固定されたことを確認した。また、より簡便なグルカン層の形成法として、Gtfs を含む細胞表層タンパク質抽出物をスクロースとともに 96-well plate に添加して、一晚インキュベートすることでグルカン層を形成させ、より安定なグルカン固相の作製を実現した。

#### (2) グルカン固相への付着及びバイオフィーム形成能の評価

グルカン固相に対する初期付着能について、ミュータンスレンサ球菌及びその他の口腔微生物を人工唾液にて懸濁し、30 min グルカン固相上でインキュベートした。浮遊細胞を PBS で洗浄後、付着した菌を染色し評価した。比較対照として、唾液コート plate を用いた。グルカン固相上のバイオフィーム形成については、スクロースを含まない培地で培養することで検討を行った。培養後 PBS で洗浄し、形成されたバイオフィームを染色し顕微鏡下で観察、または色素量の定量により評価した。

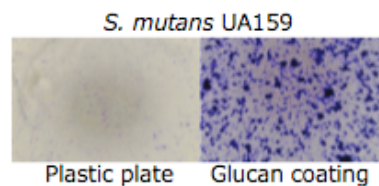
#### (3) その他

各種微生物の増殖、バイオフィーム形成、菌糸形成実験等については、常法に従い実施した。また、各種食品成分の作用についても、常法に従って評価を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) グルカン固相と口腔微生物の相互作用

グルカン固相を作製し、人工唾液にて懸濁した *S. mutans* を 30 分室温でグルカン固相上でインキュベートしたところ、顕著な付着は見られなかった。そこで、スクロースなしの培地を用いて一晚培養したところ、バイオフィーム様の増殖が確認された (図)。バイオフィーム様の細菌塊の形成は、主に非水溶性グルカン固相にみられた。



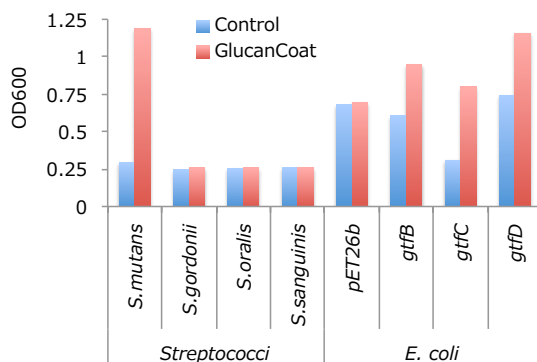
図：グルカン固相上の *S. mutans* の増殖  
水溶性  $\alpha$  グルカン (デキストラン) 固相では、菌の付着までは確認できたが、バイオフィーム様の細菌増殖に伴い、デキストランの消化が観察され、最終的に固相がはがれることで評価が困難となってしまった。

Plastic well 表面にも、一定量の菌の付着が観察されるが、ほとんどは浮遊細胞として増殖しており、バッファーによって容易に洗い流される。一方  $\alpha$ -1,3-1,6-グルカンコートした well では、浮遊細胞がほとんどみられず、グルカン固相上に明らかな *S. mutans* の菌塊の増加が確認された。菌塊はバイオフィーム形成過程に形成されるマイクロコロニーの一種と考えられた。

一方、他の口腔細菌として、*S. gordonii*, *S. oralis*, *S. sanguinis*, *Candida albicans* をグルカン固相上で培養したところ、上記 3 種のレンサ球菌は plastic 表面への付着との差がみられなかったが、*C. albicans* はグルカン固相上での増加が観察された。従って、*C. albicans* はグルカン固相への付着およびグルカン固相上での増殖能があると推定された。

## (2) グルカン固相付着因子の解析

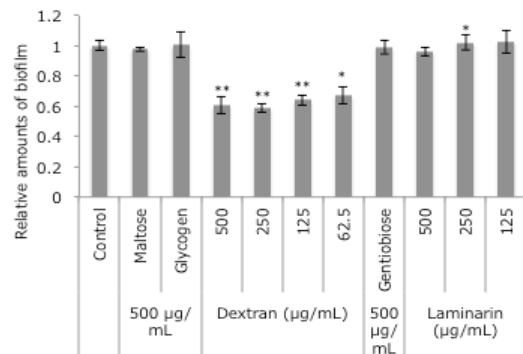
ミュータンスレンサ球菌は、グルカン固相に対して強い定着能を示した。その要因について検討を行った。グルカン合成酵素として、Gtfs が知られており Gtfs そのものがグルカンへ上への付着因子として機能する可能性も示されていた。そこで、Gtfs 欠損株を用いてグルカン固相への定着を検討した。その結果、GtfB 単独でもある程度の定着能を示したが、Gtfs をすべて有する野生株よりも、定着能が低下していた。大腸菌を用いた定着実験を行ったところ、GtfB, GtfC, GtfD それぞれの発現株において、ベクターコントロール株に比較してグルカン固相への定着菌数が増加することが明らかとなった。以上の結果から、グルカン固相への付着および定着には、Gtfs のみで十分であることが示唆された。また、グルカンが存在しない場合には、ミュータンスレンサ球菌の付着が著しく減少するため、グルカンとミュータンスレンサ球菌との結合を阻害する成分は、バイオフィーム形成抑制に有望である可能性が示唆された。ここで得られた結果は、Gtfs のグルカンへの付着や定着への寄与が強いことを示唆するが、Gtfs 以外の因子の存在を否定する訳ではなく、他の様々な結合因子が関与する可能性もある。



## (3) 食品中糖質の作用

Gtfs によるグルカン合成効率向上のため、0.1%程度のデキストランの添加を検討していた。その際、興味深い現象を見いだした。文献情報と同様に、グルカン合成はデキストランの添加により顕著に増加した。一方、スクロース依存的バイオフィーム形成はデキストラン添加により減弱していた。同じ多糖であるラミナリン ( $\beta$ 1,3-グルカン) も、強いグルカン合成阻害活性を示すが、バイオフィーム形成は顕著な阻害作用を見せなかった。このことは従来考えられてきたように、Gtfs によるグルカン合成阻害が必ずしもバイオフィーム合成阻害に直結することが無いことを示したものである。

デキストランによって、多量のグルカンが合成されたとしても、グルカンと歯面、あるいはグルカンと菌体を結合させる因子が適度に存在しなければ、バイオフィームの増加は達成されない。さらに、水溶性の高いデキストランがミュータンスレンサ球菌と直接結合した時には、非水溶性の性質を持つバイオフィームからの離脱を促す効果を持つものと考えられる。また、外部から水溶性デキストランを多量に添加したとき、バイオフィーム上のミュータンスレンサ球菌の一部を、水溶性デキストランが奪い、培養液中に浮遊させる効果も期待できる。一方、ラミナリンは Gtfs を強力に阻害し、グルカン合成量を減少させるが、ラミナリン自身が非水溶性のグルカンとして、バイオフィーム中に取り込まれる可能性もあり、齶蝕予防成分にはなり得ないことが示された。



## (4) カンジダを抑制する食品についての検討

研究の過程において、口腔の常在真菌の一つ、*Candida albicans* がグルカン固相に対して付着能を示すことが示された。カンジダは高齢化の深化に伴い、臨床上的問題が拡大しつつある真菌である。そこで、カンジダの付着能に着目して研究を進めた。

カンジダの病原因子として付着因子 *Als3*, *HWP1* 等が知られている。これらは菌糸の細胞壁特異的に発現し、グルカン固相への定着にも重要であると考えられた。そこで、菌糸形成阻害活性を指標として、食品成分の評価を実施した。

まず、強い抗真菌活性が知られているマナ

マコについて、その抽出物の活性をみたところ (mg/ml) 以下の濃度で殺菌作用を示すことを確認した。マナマコは食経験が豊富で、食べやすい形状に加工することにより、口腔内への大量投与等も十分可能であった。そこで、マナマコについては *in vitro* での基礎的性質について本事業にて解析を実施し、最終的にヒト臨床試験への展開を図った。

同様に、様々な化合物が報告されている水産物‘マボヤ’に菌糸抑制作用を見いだした。活性成分の分画を進めたところ、脂溶性の強い画分に高い菌糸阻害活性を認めた。油分に富む画分の HPLC 分離を試みたが、活性が分散し、個々の有効成分精製までは至らなかった。活性画分には EPA 等の脂肪酸が多量に存在したことから文献調査を行い、不飽和脂肪酸に抗真菌活性が報告されていることが明らかとなった。脂肪酸は安全性が高く、その他の口腔細菌やバイオフィーム等への効果も期待されるが、その作用機序については不明点が多い。安全で臨床応用が可能な食品成分候補として、今後作用機序の解明を実施することを計画している。

#### 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 3 件)

Yano A, Kikuchi S, Takahashi T, Keiko K, Yoshida Y. Inhibitory effects of the phenolic fraction from the pomace of *Vitis coignetiae* on biofilm formation by *Streptococcus mutans*. Archives of Oral Biology 57:711-719, 2012. 査読あり  
doi:10.1016/j.archoralbio.2012.01.001

Yano A, Konno N, Imai S, Kato H. Inhibitory effects of polysaccharides on the cariogenic activities of *Streptococcus mutans*. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry. 76:2313-2316, 2012. 査読あり  
doi:10.1271/bbb.120464

Yano A, Abe A, Aizawa F, Yamada H, Minami K, Matsui M, Kishi M. The Effect of Eating Sea Cucumber Jelly on *Candida* Load in the Oral Cavity of Elderly Individuals in a Nursing Home. Marine Drugs 11: 4993-5007, 2013. 査読あり  
Doi:10.3390/md11124993

[学会発表] (計 2 件)

Yano A, Takahashi T, Kikuchi S, Kohama K, Yoshida Y. Proanthocyanidin Fraction of Japanese Grape Inhibits Biofilmformation of *Streptococcus mutans*. International Association for Dental Research, General

Session and Exhibition, May 20-22, 2012  
Iguaqu Falls, Brazil.

矢野明、阿部晶子、相澤文恵、南健太郎、松井美樹、岸光男、マナマコ加工食品摂取による要介護高齢者の口腔カンジダの抑制  
第 33 回日本歯科薬物療法学会  
2013 年 6 月 14-16 日東京医科歯科大学

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特になし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢野 明 (YANO, Akira)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・生物資源研究部・主席研究員

研究者番号：50312286