

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2015

課題番号：23792416

研究課題名(和文) う蝕病原性細菌のバイオフィーム関連遺伝子と母子感染の研究

研究課題名(英文) Study on relations of the genes associate with biofilm formation and transmission from mothers to child in the major pathogen of human dental caries

研究代表者

茂木 瑞穂 (MOTEGI, MIZUHO)

東京医科歯科大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：60422474

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ミュータンス菌は、う蝕(虫歯)の主な原因菌であり、歯の表面にバイオフィーム(細菌の集合体、歯垢)を形成する。ミュータンス菌のバイオフィーム形成には様々な遺伝子が関与していると言われている。本研究では、SMU832, 833の遺伝子発現は、凝集やバイオフィーム形成の早い時期に影響を及ぼしていることが示唆された。また、デキストロースを含まないTSBにグルコースを添加した培地において、SMU832やSMU833欠損変異株のバイオフィーム形成には菌体外DNAが関与していることも示唆された。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus mutans is the primary etiological agent of human dental caries, and forms biofilm on the tooth surface. Many genes associate with biofilm formation of S. mutans. In this study, gene expressions of SMU832 and SMU833 might associate with aggregation and regulation of biofilm development in early exponential phase. The biofilm formation of the SMU832 and 833-deficient mutants in Tryptic Soy Broth without Dextrose containing glucose was dependent on extracellular DNA.

研究分野：小児歯科学

キーワード：バイオフィーム Streptococcus mutans 母子感染 齲蝕

1. 研究開始当初の背景

S. mutans は、齲蝕の主な原因菌であり、歯表面にバイオフィルムを形成する細菌である (Hamada et al., 1980)。*S. mutans* では、グルコシルトランスフェラーゼ (*gtf*) を菌体外に分泌し、ショ糖を基質として不溶性グルカンを合成する性質が特に重要視されてきた。この不溶性グルカンは粘着性があり、歯垢を形成するため、昔から *gtf* の研究が盛んに行われてきた。しかし、*gtf* のみで *S. mutans* の病原性を示すことは難しく、*gtf* を指標とした検査方法も確立しているわけではない。したがって、*gtf* 以外の病原性を調べることが必要であると我々は考えた。さらに、口腔内における *S. mutans* 数が多くても齲蝕にならない人もいることを考えると、歯垢を形成する細菌の質、歯垢の質を評価する必要があると考えた。また、*S. mutans* は乳歯萌出後に初めて口腔内より検出され (Berkowitz et al., 1975)、様々なメカニズムにより歯表面へと定着していくと考えられており、国内外において、*S. mutans* は乳幼児期に母親から子へ伝播することが多いと報告されている (Gronroos et al., 1998)。そこで、我々は *S. mutans* の病原性の指標として、バイオフィルム形成能とバイオフィルムの構造に着目し、母子感染との関連について研究することとした。

日本における *S. mutans* の伝播の研究は、広島における報告 (Kozai K, et al. 1999) があるが、大都市での報告がない。本研究において、大都市である横浜市の母子間 (174 組) での *S. mutans* の伝播について、現在、分子疫学分野では最も確実とされているパルスフィールドゲル電気泳動法を用いて調べたところ、45.5% の母子において遺伝子型が同じ *S. mutans* を保菌していることがわかった。またこの際、遺伝子型が異なる 17 種類の *S. mutans* を分離することができた。

S. mutans などのレンサ球菌は遺伝子を取り込み、変異が起こりやすく、性質の異なるバイオフィルムがそれぞれの口腔内で発生していることが考えられる。以前の研究において、デンタルバイオフィルムは生菌の層に囲まれた空洞や溝が存在することが報告されている (Auschill et al., 2001)。このようにバイオフィルムの内部構造は、表層構造とは異なり、多様性を示す可能性があるが、その内部構造の違いを定量化した報告はほとんどない。一見では異なりのないバイオフィルムであっても、内部の密度が濃く粘着力がより高く形成されていれば、口腔清掃だけでは容易に除去されにくいと考えられる。本研究において、前述した 17 種類の *S. mutans* について 96 穴プレートを用いた培地が静止している系にて、バイオフィルム形成能を解析したところ、各々のバイオフィルム形成能が異なることがわかった。またそのうち、バイオフィルム形成能が最も高い株と低い

株について、フローセルシステム (培地が流動している系) と共焦点レーザー顕微鏡を用いた画像解析を行ったところ、後者については内部に空洞が存在し、その構造の違いを定量化することができた。つまり、バイオフィルム形成能が高い程、バイオフィルム構造が蜜であることが示唆された。

近年、細胞内遺伝子変遷については、研究がさかんである。内部構造の異なるバイオフィルムの形成時における遺伝子発現の変遷を解明できれば、口腔内で *S. mutans* がどのように環境変化にตอบสนองして定着しているのかがわかるであろう。DNA マイクロアレイは、遺伝子発現の変化を全体的に観察するのに適している。例えば、DNA マイクロアレイを用いた *Pseudomonas aeruginosa* のバイオフィルム研究において、浮遊菌と比べてバイオフィルムを形成した状態の菌では検討した全遺伝子の約 1% にしか変化が認められなかったと報告している (Whiteley et al., 2001)。近年、様々な菌において、DNA マイクロアレイを用いた研究が行われているが、*S. mutans* についてはまだ報告されていなかったが、本研究では、DNA マイクロアレイを用いて *S. mutans* のバイオフィルムの調節に関わる 74 遺伝子をスクリーニングできた。さらに、この 74 遺伝子の中でも、微生物間情報伝達系クオラムセンシング (細胞密度依存的遺伝子発現制御系) (Li et al., 2002) に関連する 45 遺伝子に焦点を当て、バイオフィルム形成能が異なる 17 種類の *S. mutans* 臨床分離株において、これら遺伝子がどのように分布しているかを調べたところ、SMU832, 833, 1909, 1912, 1506 に関しては、母と一致しない子供の *S. mutans* からは 100% に近い値で検出されているため、子が母親以外の者から *S. mutans* を獲得する際に関与していることが示唆された。また、SMU832, 833 の遺伝子欠損株を作製し、バイオフィルム形成能を調べたところ、形成能が高くなることが示唆された。

2. 研究の目的

従来から調べられていたグルコシルトランスフェラーゼ (*gtf*) ではなく、*S. mutans* の病原性の指標として、バイオフィルムの質を評価するために、バイオフィルム形成能やバイオフィルムの構造に着目し、*S. mutans* の母子感染との関連について研究を行う。具体的には、DNA マイクロアレイを用いて我々が現在までに解析してきた *S. mutans* のバイオフィルム調節やクオラムセンシング (QS) に関わる遺伝子が母子間の伝播・定着にどのように影響を及ぼしているのかについて研究を行うことを目的とする。

以上のように我々は、*S. mutans* の初期獲得におけるバイオフィルム形成やクオラムセンシングと母子伝播の関係について、継続して研究を行ってきている。DNA マイクロア

レイを用いて解析された *S. mutans* のバイオフィルムの調節に関わる遺伝子や QS システムに関わる遺伝子が母子間の伝播・定着にどのように影響を及ぼしているのか、また *S. mutans* はバイオフィルム形成能が高いほど子供へ伝播する確率が本当に高くなるのか、などの *S. mutans* の感染メカニズムが解明できたならば、齲蝕発症を根本的に予防することができる。本研究において、*S. mutans* のバイオフィルム形成や QS システムに関連する有力な遺伝子を解明することは、将来的に齲蝕治療や予防の診断用 DNA チップ作製時の基礎的なデータの礎にもなりえる。また、QS システムは原核生物などに見られる情報伝達系で高等動物には見られないシステムのため、遺伝子発現以前の部分を制御する次世代の抗生物質の足がかりとなり、細菌が人間に害を与える特定の部分だけを制御することが可能と考えられる。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子欠損株の作製

我々の前研究より、母子間で遺伝子型 (PFGE パターン) が一致せず子のみより分離された臨床分離株 *S. mutans* 6 株が、ほとんど保有していた遺伝子 SMU832, 833 の欠損変異株を作製した。(親株は *S. mutans* UA159 株)

(2) 凝集

親株と SMU832, 833 の欠損変異株をデキストロースを含まない Tryptic Soy Broth (以下、TSB) に 0.25% sucrose を添加した培地、0.5M glucose を添加した培地、0.5M fructose を添加した培地において、一晚 37 で培養した。培養後、グラム染色を行い凝集の状態を観察した。

(3) バイオフィルム形成

各々の培地が入った 96 穴プレートに各細菌懸濁液を入れ、37 , CO₂ 下にて 6 時間培養した後、滅菌蒸留水にて浮遊菌を洗浄した。形成されたバイオフィルムをサフラニン溶液にて染色し、吸光度 (490nm) を測定することにより定量化した。

(4) バイオフィルム形成における DNase の影響

96 穴プレートに各々の細菌懸濁液と DNase (50U/ml) を入れ、37 , CO₂ 下にて 6 時間培養し、バイオフィルムを形成させた。培養後は、上述(3)と同様に評価した。

4. 研究成果

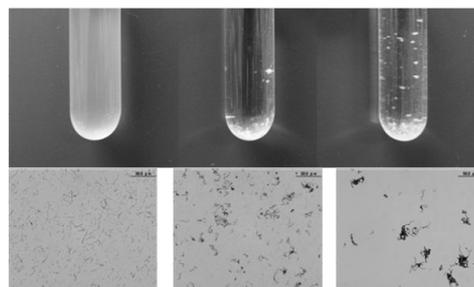
(1) 様々な培地における凝集の状態

0.25% sucrose を添加した TSB 培地、0.5M glucose を添加した TSB 培地、0.5M fructose を添加した TSB 培地の全てにおいて、遺伝子欠損株は親株より高い凝集能が観察された。特に、0.5M fructose を添加した培地におい

て、顕著であった。

《TSB with 0.5M fructose》

UA159 SMU832 SMU833
(Wild type) mutant mutant

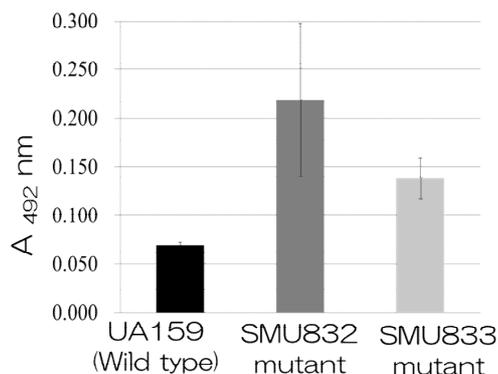


A: 各細菌懸濁液を over night させた試験管
B: グラム染色

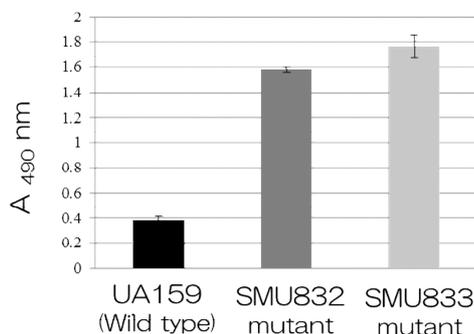
(2) バイオフィルム形成

0.25% sucrose を添加した TSB 培地、0.5M glucose を添加した TSB 培地において 6 時間培養した際、親株より遺伝子欠損株の方がバイオフィルム形成能は高かった。また、0.5M fructose を添加した TSB 培地では、いずれにおいてもバイオフィルムはほとんど形成されなかった。このことより、SMU832 と SMU833 の遺伝子発現は、バイオフィルム形成の早い時期において、凝集やバイオフィルムの成長に関与している可能性が示唆された。

TSB with 0.25% sucrose

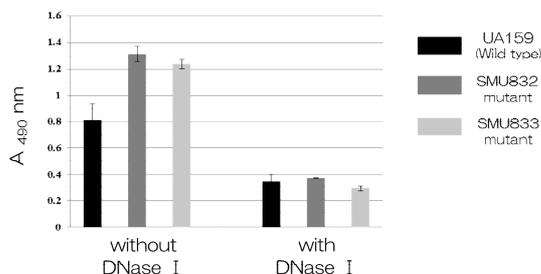


TSB with 0.5M glucose



(3) バイオフィーム形成における DNase の影響

0.5M glucose を添加した TSB 培地において、DNase は明らかに遺伝子欠損株のバイオフィーム形成を阻害していた。このことより、SMU832, 833 遺伝子欠損株のバイオフィーム形成には、菌体外 DNA が関与していることが示唆された。



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)

〔学会発表〕(計1件)

(1) M Motegi, H Yonezawa, H Senpuku. Roles of Genes to Aggregation and Biofilm Formation in the *Streptococcus mutans*. EUROBIOFILMS 2013.09.09 Belgium

〔図書〕(計2件)

(1) 山崎要一、香西克之、早崎治明、行田克則、弘岡秀明、飯田博子、渡辺一騎、児玉実穂、高木裕三、恒石美登里、藤木省三、伊藤中、茂木瑞穂 他：小児歯科・デンタルホーム YEARBOOK 2016 今、あるべき小児歯科臨床を探る、クインテッセンス出版株式会社、2016、p106-111

(2) 茂木瑞穂：特集 妊産婦医療へ 小児歯科医の関わり 周産・女性診療科外来で行う妊産婦教室～東京医科歯科大学での取り組み～. 小児歯科臨床、東京臨床出版、2014、19(1)、p49-53

〔その他〕

(1) 宮新美智世、茂木瑞穂：子どものむし歯予防、NHK Eテレ まいにちスクスク、2015年11月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

茂木 瑞穂 (MOTEGI MIZUHO)
東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教
研究者番号：60422474

(2) 連携研究者

高木 裕三 (TAKAGI YUZO)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：30124697

泉福 英信 (SENPUKU HIDENOBU)

国立感染症研究所・細菌第一部・室長

研究者番号：20250186

米澤 英雄 (YONEZAWA HIDEO)

杏林大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：60453528