

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23792506

研究課題名(和文) ミュータンス菌の遺伝子検査法の臨床応用

研究課題名(英文) Clinical application of genetic tests regarding cariogenicity of Streptococcus mutans

研究代表者

金子 昇 (Kaneko, Noboru)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：00397126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：Streptococcus mutansの齲蝕原性として、非水溶性グルカン合成能に注目し、小学生の刺激唾液から分離したS. mutans株について、非水溶性グルカンを合成するgtfB遺伝子の塩基配列を決定した。この塩基配列と非水溶性グルカン合成能との関連性を検討したところ、GtfB酵素のC末端側に存在する直列反復単位中、33番目のアミノ酸がGlyからSerに置換するような変異を持ったS. mutans株において非水溶性グルカン合成能が有意に上昇し、またフッ化物洗口を実施している小学校児童において、この変異が1年間の齲蝕の増加に有意に関連していることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：An important virulence factor of S. mutans is a glucosyltransferase synthesizing water-insoluble glucan (WIG) from sucrose. We performed sequencing of the gtfB gene of S. mutans isolates derived from primary school students. GtfB coded by gtfB gene possess two functional domain. The carboxyl-terminal portion of GtfB is called the glucan binding domain and is coded by the direct repeating units. The results of this study indicated that the substitution of 33rd amino acid Gly to Ser in the repeating unit is associated with WIG synthesis by S. mutans. And we revealed that the p.G33S substitution is associated with caries development in 1 year in the students using a fluoride mouth rinse.

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：歯学 Streptococcus mutans 齲蝕原性

1. 研究開始当初の背景

Streptococcus mutans は齲蝕の主な原因菌であるが、この菌が口腔内にそれほど存在していないにもかかわらず、齲蝕が発症する児童に遭遇することがある。こうした児童においては、*S. mutans* の菌数は少ないが、存在する *S. mutans* 株が、特に齲蝕を誘発する能力の高い菌株である可能性がある。

S. mutans は非水溶性グルカンを合成して歯面に固着する能力を持っており、これは *S. mutans* の齲蝕原性を考える上で非常に重要な性質である。*S. mutans* はグルカン合成酵素として GtfB, GtfC, GtfD を持っており、このうち GtfB は非水溶性グルカンを合成する酵素であるため *S. mutans* の齲蝕原性を考える上で特に重要な酵素である。

非水溶性グルカン合成酵素 GtfB が機能する上で重要な領域はこれまでにある程度特定されている。Chia らは、GtfB の 409-427 および 446-454 アミノ酸残基が触媒部位 (catalytic domain) であることを報告している。また、Giffard らは GtfB の C 末端の 3.5 個の繰り返し配列 (direct repeating unit) がデキストラン結合部位 (glucan-binding domain) でありグルカン合成に重要な領域であることを、さらに Abo らは、*S. sobrinus* の GtfI についてはあるが、C 末端の繰り返し配列が、グルカン合成に必須の領域であることを報告している。

我々はこれまでに *S. mutans* 臨床分離株について、GtfB をコードする遺伝子である *gtfB* の塩基配列を比較し、3'末端側の通常 3.5 回の直列反復回数が 2.5 回または 4.5 回に変異している菌株が存在すること、また反復回数が 2.5 回に変異している *S. mutans* 株は通常の 3.5 回の反復回数の菌株に比べ、非水溶性グルカン合成能が有意に低下していることを見いだした。

またこの反復配列の上流と下流の保存領域を PCR プライマーとして用いることで、PCR 反応により容易に反復回数を判定できる検査法をこれまでに開発した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまでに発見した *gtfB* の 3'末端付近における直列反復配列の反復回数だけでなく、他の非水溶性グルカン合成能と関連するような変異を検索し、実際の齲蝕活動性試験に使用できるような検査法を開発することである。

3. 研究の方法

小学生を対象に歯科健診を行い、齲蝕経験歯数 DFT を記録した。また刺激唾液を採取し、これをミュータンスレンサ球菌の選択培地である MSB 培地に接種・培養することで、*S. mutans* 臨床分離株を得た。これらの菌株は、各種糖発酵能を確認することで、*S. mutans* であることを確認した。

(1) 非水溶性グルカン合成能の測定

得られた *S. mutans* 臨床分離株について、Brain Heart Infusion (BHI) 培地で継代培養を行った後、Sucrose を 1% 添加した Heart Infusion (HI) 培地に菌液を 20 μ l 接種し、16 時間、試験管を 45° の角度にして傾斜培養した。その後、試験管を vortex mixer で 10 秒間攪拌し、この操作を行ってもガラス試験管壁から剥離せずに残った基質を、粘着性の非水溶性グルカンと見なした。この非水溶性グルカンをフェノール硫酸法を用いて定量した後、HI 培地 1 ml 当たりの重量として算出、これを *S. mutans* 菌株のグルカン合成能とした。

(2) 塩基配列の決定

小学生児童の刺激唾液から分離した *S. mutans* 臨床分離株について、BHI 培地で培養後、DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) を用いて Genome DNA を抽出した。これを template として、*gtfB* 遺伝子上流と下流の保存領域をプライマーとした PCR を行い、全ての *S. mutans* 株の *gtfB* 遺伝子を得た。これを template とし、また、*gtfB* 遺伝子内の複数の保存領域をプライマーとしてシーケンシングを行い、得られた塩基配列を再構成することで、全ての *S. mutans* 株について、*gtfB* 遺伝子全体の塩基配列を決定した。シーケンシング反応は、マクロジェンジャパンにて行われた。

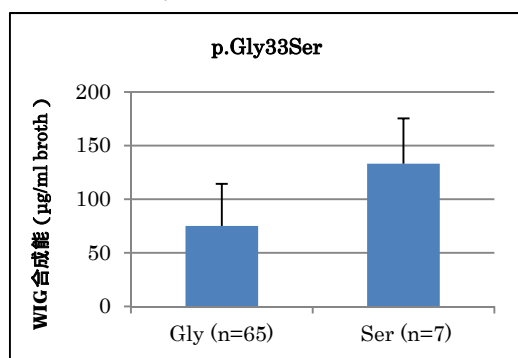
1 年後、再び歯科健診を行い、1 年間の齲蝕増加歯数 dDFT を算出した。

4. 研究成果

小学生児童から臨床分離した *S. mutans* 株について、非水溶性グルカン合成能の測定を行った。また、以前の研究で分離した *S. mutans* 株について、非水溶性グルカン合成酵素をコードしている *gtfB* 遺伝子の塩基配列を決定し、遺伝子の株間に見られる変異と非水溶性グルカン合成能の関係について検討を行った。

以前、*gtfB* 遺伝子中の catalytic domain をコードする領域における変異を解析したが、アミノ酸を置換するようなミスセンス変異は見つからなかった。今回、さらに *S. mutans* 株を増やして解析を行ったが、やはりこの部位は保存性が非常に高く、全ての株でアミノ酸配列は共通であった。

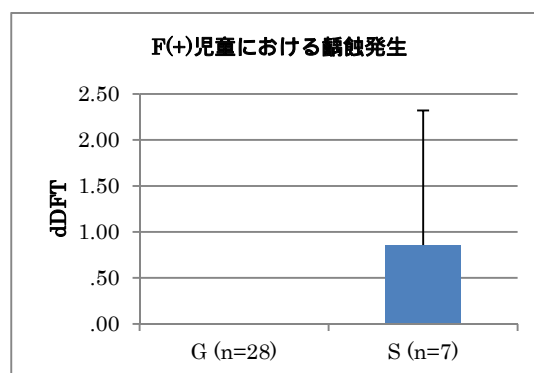
また以前、*gtfB* 遺伝子の 3'末端側における direct repeat で、菌株によって通常 3.5 回の繰り返し回数に変化が見られ、特に 2.5 回に減少している菌株で非水溶性グルカン合成能が低下していることを報告した。今回の分析で新たに、direct repeat を構成している反復単位中、33 番目のアミノ酸である Gly を Ser に置換するような変異を持つ菌株で、非水溶性グルカン合成能が上昇していることを発見した ($133.0 \pm 42.2 \mu\text{g/ml}$ broth vs. $75.1 \pm 39.1 \mu\text{g/ml}$ broth; $p=0.002$; Mann-Whitney's U test)。



また、小学生児童の保有している *S. mutans* 株の非水溶性グルカン合成能と 1 年間のう蝕増加歯数との関連性について検討

を行った。その結果、フッ化物洗口を行っていない児童集団では、*S. mutans* の保有の有無と齲蝕の罹患・増加と関連性が比較的認められるのに対し、フッ化物洗口を行い齲蝕の発生が減少している児童集団では、*S. mutans* の保有の有無と齲蝕増加歯数との関連性は低下しており、むしろ保有している *S. mutans* 株の非水溶性グルカン合成能の強弱の方が、1 年後のう蝕増加と強い関連性を示すことが明らかになった。

また GtfB C 末端側の direct repeat を構成している反復単位中、33 番目のアミノ酸である Gly を Ser に置換するような *gtfB* の変異の有無と齲蝕の発生との関連性を検討した。すなわち、フッ化物洗口実施小学校児童 (F(+)) 児童 44 名とフッ化物洗口未実施小学校児童 (F(-)) 児童 55 名の計 99 名 (8 ~ 10 歳) を対象として、口腔内に保有する *S. mutans* 株 *gtfB* の direct repeat における塩基配列を決定し、上記変異の有無と 1 年間の齲蝕増加歯数との関連性を検討した。その結果、99 名の児童中、*S. mutans* を保有していたのは F(+)) 児童で 35 名 (79.5%)、F(-)) 児童で 49 名 (89.1%) であり、更に保有する *S. mutans* が p.G33S 株である児童は F(+)) 児童で 7 名 (20.0%)、F(-)) 児童で 3 名 (6.1%) であった。*S. mutans* 保有児童について、p.G33S 株保有者と非 p.G33S 株保有者の dDFT を比較すると、F(+)) 児童ではそれぞれ 0.86 ± 1.46 vs. 0.00 ± 0.00 ($p=0.0053$)、F(-)) 児童ではそれぞれ 0.33 ± 0.58 vs. 0.80 ± 1.34 ($p=0.748$) であり、特に F(+)) 児童において、p.G33S 株保有児童は非 p.G33S 株保有児童に比べ、1 年間の齲蝕増加歯数が有意に多かった。



以上の結果から、特にフッ化物洗口実施児童において、口腔内に存在している *S. mutans* が p.G33S 株であることは、齲蝕の増加と関連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)

[雑誌論文](計 3 件)

Umetsu H, Kaneko N, Yoshihara A, Sakuma S, Hanada N, Miyazaki H: Association between glucan synthesis by *Streptococcus mutans* and caries incidence in schoolchildren receiving a fluoride mouth rinse. Oral Health Prev Dent, 10(2): 161-166, 2012. 査読あり

Iwasaki M, Taylor GW, Manz MC, Kaneko N, Imai S, Yoshihara A, Miyazaki H: Serum antibody to *Porphyromonas gingivalis* in chronic kidney disease. J Dent Res, 91(9): 828-833, 2012. 査読あり

Ito K, Funayama S, Katsura K, Kaneko N, Nohno K, Saito M, Yamada A, Sumida Y, Inoue M: Moistened techniques considered for patients' comfort and operators' ease in dental treatment. Int J Oral-Medical Sci, 11(2): 85-89, 2012. 査読あり

[学会発表](計 5 件)

金子 昇, 濃野 要, 葭原明弘, 花田信弘, 宮崎秀夫: *Streptococcus mutans* の GtfB 酵素 C 末端側におけるアミノ酸配列と齲蝕との関連性, 第 63 回日本口腔衛生学会総会, 熊本市, 2014 年 5 月 29-31 日, 日本口腔衛生学会雑誌, 64(2), 207, 2014.

Ito K, Takamatsu K, Nohno K, Yamada A, Funayama S, Katsura K, Kaneko N,

Hatakeyama A, Ogawa M, Inoue M: Factors associated with vaginal dryness; comparison with multiple regions. The 5th Scientific Meeting of the Asia Pacific Menopause Federation, Tokyo (Japan), 2013 年 10 月 18-19 日.

伊藤加代子, 船山さおり, 勝良剛詞, 金子 昇, 濃野 要, 山田亜紀, 井上 誠: 口腔乾燥症診断シート導入の試み, 第 23 回日本口腔内科学会 第 26 回日本口腔診断学会 合同学術大会, 東京, 2013 年 9 月 13-14 日, 日本口腔診断学会総会プログラム・抄録集, 125, 2013.

勝良剛詞, 伊藤加代子, 濃野 要, 船山さおり, 金子 昇, 山田亜紀, 林 孝文: ドライマウス診断における pulse Doppler ultrasonography の可能性, 第 23 回日本口腔内科学会 第 26 回日本口腔診断学会 合同学術大会, 東京, 2013 年 9 月 13-14 日, 日本口腔診断学会総会プログラム・抄録集, 134, 2013.

伊藤加代子, 濃野 要, 船山さおり, 金子 昇, 山田亜紀, 畠山 文, 佐々木綾子, 井上 誠: 男性におけるドライシンドローム有訴率に関する検討, 日本老年歯科医学会 第 24 回学術大会, 大阪市, 2013 年 6 月 4-6 日, 老年歯科医学, 28(2): 225, 2013.

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金子 昇 (KANEKO NOBORU)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号：00397126

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：