

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861597

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う蝕の発症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 development of dental caries by *Streptococcus mutans*

研究代表者

木村 智子 (KIMURA, Tomoko)

徳島大学・大学病院・助教

研究者番号：20581367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

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* 遺伝子とう蝕の発症との関係を検討するために、まず *scrA* 遺伝子改変株を用いて菌の歯面への付着に関与する菌体表面の疎水性を測定した。その結果、*scrA* 遺伝子は菌体表面の疎水性には影響を及ぼしていないことが示された。また、菌の象牙細管への侵入状態について検討したところ、*scrA* 遺伝子が菌の象牙細管への侵入に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the involvement of *scrA* gene deeply related to the acidogenic activity in cariogenic bacterium in the hydrophobicity and bacterial invasion into the dentinal tubules by *Streptococcus mutans*. As a result, *scrA* gene was shown to be not affect the hydrophobicity of the cell surface. The observation of the dentinal tubules demonstrated that *scrA* gene had an effect on the bacterial invasion into the dentinal tubules.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯学 う蝕 細菌 遺伝子

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ル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、バイオフィルムを形成する。バイオフィル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ルム(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ルムの排除・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いう着想に至った。

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ル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 E^{Scr} に着目した。E^{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)。

このような報告を元に、*scrA* 遺伝子改変株を作製し、バイオフィルム形成におけるグルカンの量的解析や関連遺伝子の発現解析を行い、*scrA* 遺伝子がグルカン合成に関与している可能性があることを明らかにしてきた。しかし、*S. mutans* の重大なう蝕病原因子である歯面への付着、また、う蝕の発症や進行に *scrA* 遺伝子がどのように関わっているかについては不明な点が多い。したがって、菌の歯面への付着および象牙細管への侵入過程における *scrA* 遺伝子の役割を検索するために形態学的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、バイオフィル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、*scrA* 遺伝子が菌の歯面への付着やう蝕の発症および進行に与える影響について明らかにする予定である。

具体的に、まず *scrA* 遺伝子が *S. mutans* の歯面への付着に関与する菌体表面の性質にどのような影響を与えているのかについて明らかにし、次に、*S. mutans* の象牙細管への侵入との関連性についても明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 菌体表面の疎水性の測定

疎水性の測定は、Rosenberg らの方法(Infect Immun 33, 29-33, 1981)に準じて行った。

まず、親株(*S. mutans* UA159 株)と *scrA* 遺伝子改変株を BHI 液体培地で培養し、定常期の菌を遠心にて集菌した。これをリン酸マグネシウム・尿酸(PUM)緩衝液にて洗浄し、その後 PUM 緩衝液を加えて吸光度を調製した。この菌液に、200 μ l のヘキサデカンを加えて攪拌し、5 分間静置した後の吸光度を測定した。疎水性は、ヘキサデカンを加える前後の吸光度の減少率で評価を行った。

(2) 象牙細管への菌の侵入状態の観察

人工象牙質う蝕モデルの作製

ウシ象牙質の象牙細管の幅径はヒト象牙質のそれと似ており、ヒト象牙質と代替できるといわれていることから、ウシ象牙質を用いて人工象牙質う蝕モデルを作製した。

凍結保存後、自然解凍したウシ前歯を解剖学的歯頸線付近で切断し、歯冠部の歯髄および軟組織を除去した後、マイクロカッターにより歯軸方向に垂直な約 500 μ m の厚さの象牙質板を作製した。これを注水下にて耐水研磨紙で研磨し、EDTA 溶液および滅菌水中で超音波洗浄後、滅菌水で 12 時間、室温で振盪させながら水洗した。

この象牙質板を EOG 滅菌した後、試験管中にワイヤーで懸垂して親株および *scrA* 遺伝子改変株の培養液中に浸漬し、液体培地を 2 日ごとに交換しながら 24 日間培養した。

試料の処理および観察

培養終了後、象牙質板試料を2%パラホルムアルデヒド-2.5%グルタルアルデヒド含有0.1Mカコジル酸緩衝液にて前固定した後、1.3%四酸化オスミウム酸溶液中で後固定した。次に上昇エタノール系列で脱水後、エポキシ樹脂に包埋して60℃で24時間加熱重合した。得られたブロックより、象牙細管が可及的に縦断されるような準薄切片を作製し、トルイジンブルーで染色した後、光学顕微鏡にて観察し撮影を行った。視野に認められる象牙細管数を計測し、総象牙細管数に対する菌の侵入が認められた象牙細管の割合を象牙細管侵入率として算出し、両菌株で比較検討を行った。

なお、徳島大学遺伝子組換え実験安全管理委員会主催の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) 菌体表面の疎水性の測定

試験管壁への *S. mutans* の付着に関与していると考えられる因子の一つである菌体表面の疎水性を測定したところ、*scrA* 遺伝子改変株は親株と同程度の疎水性を示した(図1)。

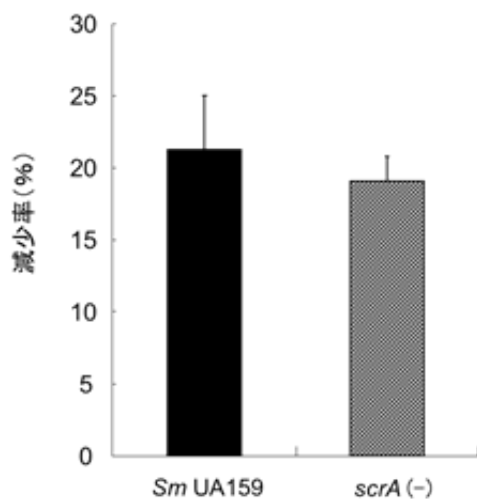


図1. 菌体表面の疎水性の比較

親株 (*Sm UA159*) および改変株の定常期の菌を用いて疎水性を測定した。

疎水性は、ヘキサデカンを加える前後の吸光度の減少率で評価した。

この結果より、*scrA* 遺伝子は、付着に関与する菌体表層の構造および性状のなかで表面の疎水性には影響を及ぼしていないことが示唆された。

(2) 象牙細管への菌の侵入状態の観察

親株および *scrA* 遺伝子改変株を用いた人工象牙質モデルを作製し、光学顕微鏡を用いて象牙細管内の *S. mutans* の観察を行った(図2)。

scrA 遺伝子改変株の象牙細管侵入率は、親株の0.44倍となり、有意に低下した(図3)。

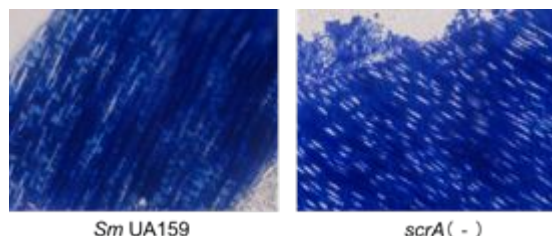


図2. 親株 (*Sm UA159*) および *scrA* 遺伝子改変株が侵入した象牙細管の光学顕微鏡像

象牙質板試料を親株および改変株に浸漬して人工象牙質モデルを作製し、その準薄切片をトルイジンブルー染色して象牙細管内への菌の侵入形態について観察した。

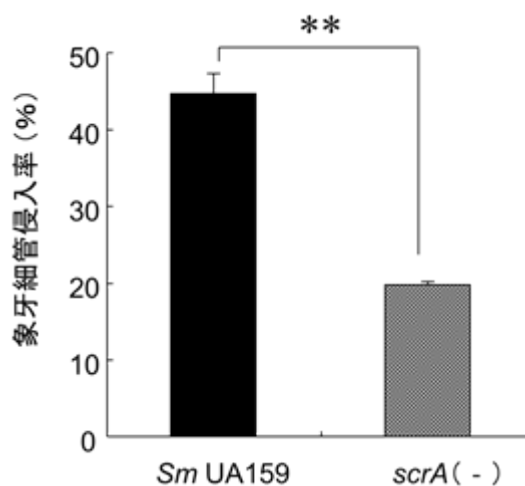


図3. 親株 (*Sm UA159*) および *scrA* 遺伝子改変株の象牙細管侵入率の比較

光学顕微鏡を用いて観察された視野において象牙細管数を計測し、総象牙細管数に対する菌の侵入が認められた象牙細管数の割合を象牙細管侵入率として算出した。

** $p < 0.01$; 親株と比較して有意差を認めた。

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)

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