

平成 21 年 5 月 10 日現在

研究種目： 基盤研究（C）
研究期間： 2007 ～ 2008
課題番号： 19592408
研究課題名（和文） 耐酸性因子阻害剤による齲蝕細菌除菌療法の開発
研究課題名（英文） Development of *Streptococcus mutans* eradication therapy with the inhibitor for diacylglycerol kinase activity involved in aciduricity.
研究代表者
柴田 幸江（SHIBATA YUKIE）
九州大学・大学院歯学研究院・助教
研究者番号： 30274476

研究成果の概要：齲蝕細菌 *Streptococcus mutans* の耐酸性がジアシルグリセロールキナーゼ（DGK）のキナーゼ活性と密接に関わっていることが明らかになった。*S. mutans* 野生株と *dgk* 変異株を用いて動物実験を行ったところ、DGK の変異は平滑面齲蝕の発生を著しく低下させ、DGK が本菌のう蝕原性に重要な役割を果たしていることが確認された。加えて、Diacylglycerol kinase inhibitor II が本菌の耐酸性を阻害することが明らかとなり、齲蝕予防剤としての有効性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：齲蝕、*Streptococcus mutans*、ジアシルグリセロールキナーゼ、耐酸性

1. 研究開始当初の背景

近年、低年齢者の齲蝕は著しく減少しており、3歳児健康診査の統計結果においても、昭和60年に1人平均むし歯数2.9歯、有病者率56.2%であったものが、平成15年には1人平均むし歯数1.3歯、有病者率31.4%となっている。小児期における齲蝕予防対策は確実に成果を上げてきている。しかしながら一方で、人口の高齢化が進行

し、加齢や歯周疾患に起因する歯肉退縮に伴う根面齲蝕は増加傾向にあり、高齢者における歯の喪失要因のひとつとしてとりあげられている。歯周病治療の普及により高齢者の残存歯数が増加したことも根面齲蝕増加に拍車をかけており、根面齲蝕への対応が、今後の歯科医療の大きな課題となっている。

健康日本21の各論「歯の健康」においてもこれらのことが大きく取り上げられ、各ライフステージに応じた適切な齲蝕予防を推進することが国民の健康増進に不可欠であると唱われている。

2. 研究の目的

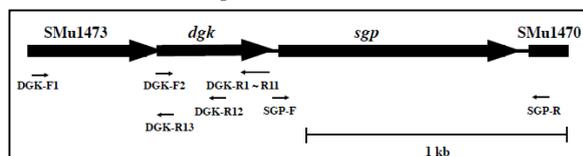
今回我々は齲蝕予防法開発のターゲットとして、齲蝕細菌の耐酸性能に着目した。歯面脱灰の段階で齲蝕細菌の耐酸性が重要な病原因子となることは周知の事実である。つまり、細菌が産生した酸によりデンタルプラーク中は強い酸性環境下となり、耐酸性を有しない細菌は生育不可能となる。耐酸性を有する齲蝕細菌はこういう環境下においても増殖し、酸を産生し続ける。これは歯面脱灰に必要な酸性環境を持続的に作り出す上で決定的な意味を持つ。耐酸性をもたない齲蝕細菌など存在せず、耐酸性はあらゆる齲蝕細菌の普遍的な病原因子なのである。

本研究の目的は齲蝕細菌の耐酸性因子阻害剤を開発し、自らが作り出した酸性環境下で生育できないように齲蝕細菌をコントロールすることである。我々はすでに、ミュータンス連鎖球菌においてジアシルグリセロールキナーゼ (DGK) をコードしていると考えられる遺伝子が、本菌の耐酸性に強く関与していることを明らかにしており、この遺伝子を欠失させた変異株が酸性環境下 (pH 5.5; 歯面の脱灰がおこる臨界 pH) で生育できないことを確認している。また、他の口腔細菌についてこの遺伝子の存在を調べたところ、ミュータンス連鎖球菌とともに代表的な齲蝕細菌である乳酸桿菌に相同性の高い遺伝子の存在が認められたのに対し、他の口腔細菌には相当する遺伝子は見当たらなかった。ミュータンス連鎖球菌と乳酸桿菌は齲蝕細菌として耐酸性という共通の性質をもつことを考えると、乳酸桿菌においても DGK が耐酸性に関与している可能性が高い。また、真核生物においては DGK 阻害剤が同定されており、細菌の DGK に対する阻害剤開発の可能性も非常に高いと考えられる。これらの点を考慮すると、従来の齲蝕予防法の弱点を克服し、齲蝕細菌全般を選択的に、かつ効果的に除菌できる齲蝕予防法の開発は十分に期待できる。

3. 研究の方法

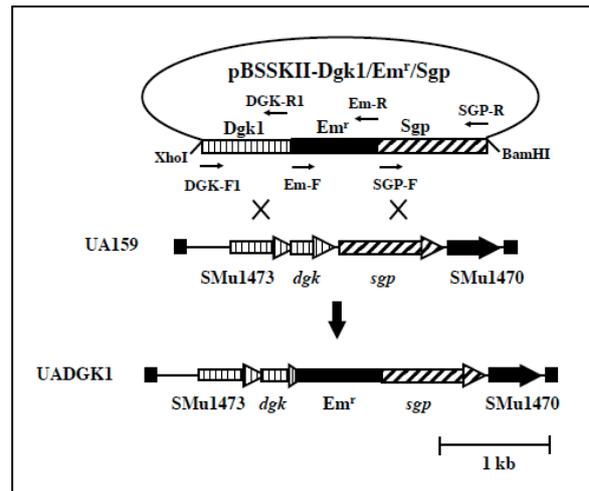
S. mutans の *dgk* 遺伝子の近傍領域と本研究で用いられたプライマーを図1に示した。

図1 *dgk* 遺伝子の近傍領域



S. mutans の変異株は図2に示すように、ダブルクロスオーバー法を用いて作製した。

図2 UADGK1の作製



構築した DGK 変異株で発現している DGK タンパクの C 末は図3に示されている通りである。

図3 DGK のアミノ酸シーケンス



S. mutans の DGK を大腸菌で発現させるために、DGK 活性を持たない大腸菌 RZ6 を用いた。発現ベクターは pQE80L を用いた。

S. mutans の生育は、マイクロプレートリーダーを用いて 550 nm における吸光度を測定した。ウエスタンブロット分析には一次抗体として抗 His-tag 抗体、二次抗体として抗マウス IgG 抗体を用いた。検出には化学発光検出システムを用いた。

キナーゼ活性は、基質として undecaprenol を用い、 $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 存在下で octyl glucoside mixed-micells 法により調べられた。産生された undecaprenyl phosphate はシリカゲル薄層クロマトグラフィー用プレートで分離された。放射線エネルギーの検出にはバイオイメージングアナライザーを用いた。

動物実験には Specific-pathogen-free rat を用いた。*S. mutans* UA159 野生株あるいは *dgk* 変異株 (UADGK1) が接種され、2%スクロースおよび 2%グルコースを含む飲料水と 40%スクロースを含む食餌が与えられた。

S. mutans の生育ならびに DGK 活性に対する阻害実験には、真核生物の DGK 活性阻害剤としてすでに同定されている Diacylglycerol kinase inhibitor I と Diacylglycerol kinase inhibitor II を用いた。

4. 研究成果

我々が以前にトランスポゾン Tn916 を用いて構築した *S. mutans* GS5 の耐酸性欠失株 (GS5Tn1) は DGK をコードする遺伝子にトランスポゾンが挿入しており、DGK タンパクの C 末端の 10 個のアミノ酸が Tn916 由来の 5 個のアミノ酸によって置換されているが明らかとなっている。そこで、DGK の C 末端から GS5Tn1 の DGK 変異部位まで、上流に向かって一つずつアミノ酸を削除した 10 種類の変異株(すべて Em^r 遺伝子を含む) と *dgk* 遺伝子のストップコドン直下に Em^r 遺伝子を挿入したコントロール株を作製し、耐酸性試験を行った。その結果、図 4 に示すように、すべての変異株は中性条件 (pH 7.45) で同様の増殖曲線を示した。一方、図 5 ならびに表 1 に示すように、酸性条件 (pH 5.5) では、DGK の C 末端から 3 個のアミノ酸を削除した時、耐酸性に変化が認められ、それ以降、アミノ酸を削除するにつれて耐酸性の低下が大きくなり、DGK の C 末端から 8 個のアミノ酸が削除された時、変異株は pH 5.5 で生育することができなかった。

図 4 中性条件下における *dgk* 変異株の増殖曲線

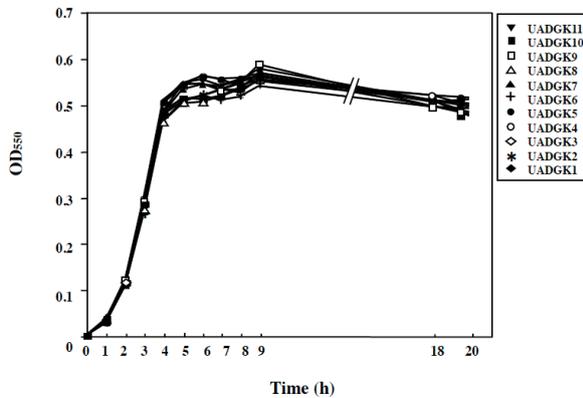


図 5 酸性条件下における *dgk* 変異株の増殖曲線

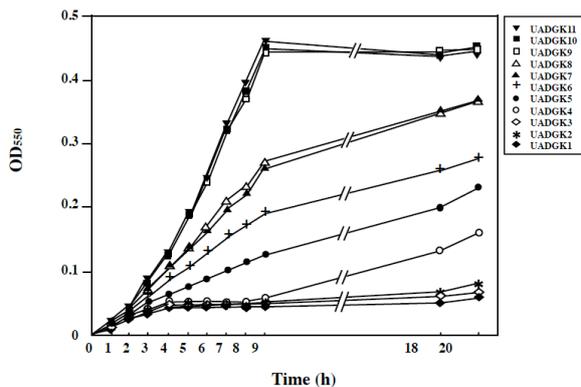
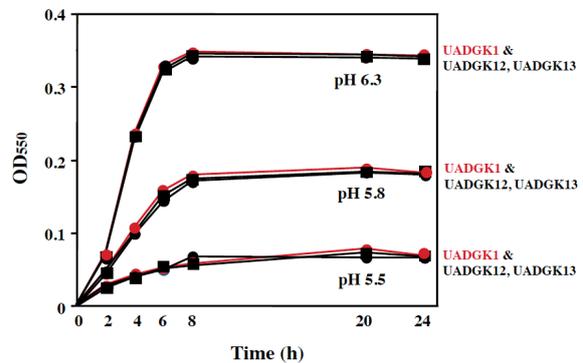


表 1 中性および酸性条件下における *dgk* 変異株のダブリングタイム

Strain	Doubling time (min) in:	
	BHI pH 7.45	BHI pH 5.5
UADGK11	57.8 ± 4.4	132.3 ± 12.9
UADGK10	58.2 ± 6.4	131.2 ± 11.7
UADGK9	61.2 ± 5.8	133.6 ± 11.7
UADGK8	61.6 ± 1.8	177.6 ± 19.0
UADGK7	55.5 ± 3.4	202.5 ± 24.4*
UADGK6	57.5 ± 2.5	248.9 ± 32.2†
UADGK5	55.3 ± 5.4	271.3 ± 34.6‡
UADGK4	55.1 ± 6.0	> 1000§
UADGK3	53.8 ± 3.7	> 1000§
UADGK2	58.4 ± 6.7	> 1000§
UADGK1	57.0 ± 6.1	> 1000§

次に、UADGK1 よりも N 末に向かってアミノ酸を削り込んだ時、さらに耐酸性を失うのかが調べるために、DGK の C 末 3 分の 1 の領域が欠如している変異株 UADGK12 ならびに DGK の N 末 8 個のアミノ酸しか存在しない変異株 UADGK13 を作製した。UADGK1、12、13 を用いて、pH5.5、5.8、6.3 で耐酸性試験を行ったところ、図 6 に示すように、pH5.5、pH5.8 および pH6.3 において 3 者の生育に大きな違いは認められなかった。

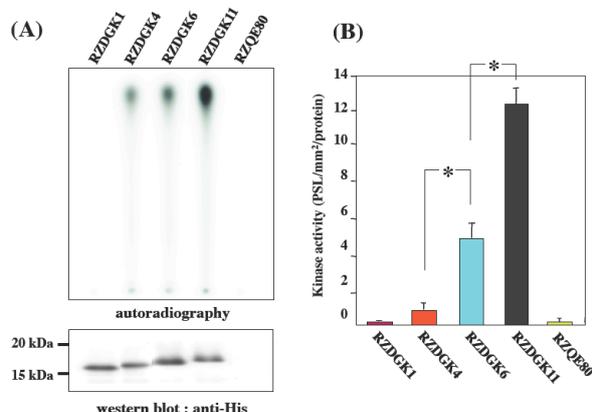
図 6 酸性条件下における UADGK1、12、13 の増殖曲線



次に、耐酸性の消失が DGK のキナーゼ活性の消失に起因しているかどうかを明らかにするために、種々の変異型 DGK タンパクを大腸菌で発現させ、undecaprenol を基質として活性測定を行った。図 7 の A の上の図は産生されたリン脂質の薄層クロマトグラフィーの展開パターン、下の図は反応に供した DGK タンパクのウエスタンブロット分析の結果を示す。B は薄層クロマトグラフィーとウエスタンブロット分析

の結果を基に、キナーゼ活性を定量化したものである。RZDGK1ではC末から10個アミノ酸を削除したDGKが発現しており、そして、RZDGK4ではC末から7個アミノ酸を、RZDGK6ではC末から5個アミノ酸を削除したDGKが発現している。RZDGK11ではフルサイズのDGKが発現しており、RZQE80は発現ベクターpQE80Lのみが導入された大腸菌である。C末からアミノ酸を削除するにつれて、キナーゼ活性の低下が認められ、C末から10個のアミノ酸を削除したDGKにはキナーゼ活性は認められなかった。つまり、pH 5.5で生育できなかった変異株において発現しているDGKはキナーゼ活性を完全に消失していることがわかった。この実験では精製タンパクではなく、形質転換した大腸菌を用いているので、コントロールとしてRZQE80のキナーゼ活性を測定したところ、undecaprenolを基質にした時、活性は認められなかった。以上の結果は耐酸性の結果と一致しており、DGKのキナーゼ活性と*S. mutans*の耐酸性との間に密接な関係があることが明らかになった。

図7 DGKタンパクのC末領域がキナーゼ活性におよぼす影響



さらに、DGKのC末のアミノ酸の変異が*S. mutans*のなかで*dgk*遺伝子の発現量に影響を与えているかどうかを調べるために、リアルタイムPCRを行った。UADGK1とUADGK11における*dgk*遺伝子の発現レベルを調べたところ、表2に示すように、両者の間に差はなかった。このことより、C末のアミノ酸の削除は直接、DGKのキナーゼ活性の低下を招いていることが確認された。

表2 UADGK1とUADGK11における*dgk*遺伝子の発現

	<i>dgk</i> 遺伝子の発現レベル (UADGK11に対する割合)
UADGK1	1.0 ± 0.18
UADGK11	1.0

次に、DGKの変異が*S. mutans*の齶蝕原性に及ぼす影響について調べるために、動物実験をスイスのチューリッヒ大学の共同実験者に依頼した。その結果を表3に示す。プラークの広がり、裂溝ならびに平滑面における齶蝕の発生、トータルバクテリア量、*S. mutans*量について調べたところ、プラークの広がり、裂溝齶蝕については野生株群と変異株群との間に差は認められなかった。しかしながら、両者とも、コントロール群よりも低い値を示した。本実験ではプラークの重量を測定したのではなく、広がりのみを見ているので、*S. mutans*のグルコシルトランスフェラーゼの存在がタイトなプラークの形成という結果になり、このような差が生じているのかもしれない。

裂溝齶蝕については野生株群 10.8 unit、変異株群 9.3 unit と変異株群において若干の減少は認められるが、有意差はなかった。

表3 UA159野生株と*dgk*変異株の齶蝕原性

Treatment	Plaque extent (Δ)	Initial dental fissures (ΔΔ)	Advanced dental fissures (ΔΔ)	Smooth-surface caries (ΔΔΔ)	Total bacteria CFU (10 ⁷)	Total streptococci CFU (10 ⁷)	Total <i>S. mutans</i> CFU (10 ⁷)
water control	2.8 ± 0.63†, §	9.5 ± 1.72†	6.6 ± 2.80†, §	0.5 ± 0.97†	4.4 ± 2.36†	2.7 ± 2.26†	ND†, §
UA159 (wt)	1.1 ± 0.32†	11.5 ± 1.27†	10.8 ± 1.62†	9.5 ± 6.55†, ‡	7.9 ± 3.21†	7.4 ± 2.79†, ‡	4.0 ± 2.11†, ‡
UADGK1 (Δ <i>dgk</i>)	1.5 ± 0.53§	10.6 ± 0.84	9.3 ± 1.2§	2.5 ± 2.68‡	6.4 ± 2.40	4.4 ± 2.53‡	2.3 ± 1.20‡, §

ND, Not determined.

†Significant difference between water control and UA159 (wt), $p < 0.05$.

‡Significant difference between UA159 (wt) and UADGK1 (*dgk*), $p < 0.05$.

§Significant difference between UADGK1 (*dgk*) and water control, $p < 0.05$.

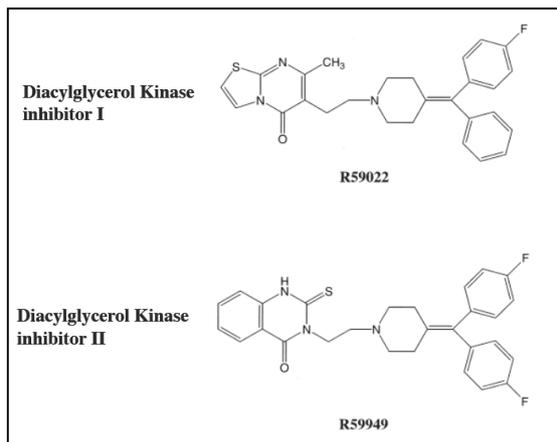
それに対して、平滑面齶蝕の発生は、野生株群で 9.5 unit、変異株群で 2.5 unit と、*dgk* 変異株群では野生株群に比べて、平滑面齶蝕が著しく減少していることがわかった。

また、*S. mutans* 量について、野生株群に比べて変異株群の方が少ない値を示した。酸性条件下での生育能の低下が原因と考えられるが、平滑面齶蝕の発生が減少しているのに裂溝齶蝕の発生に差が無いことを考慮すると、付着能が低下している可能性も考えられる。

今回行われた動物実験は、コントロール群においても、6.6 unit とかなりの裂溝齶蝕の発生が認められ、*S. mutans* による裂溝齶蝕の発生を正確に評価することは難しいと考えられる。しかしながら、DGK の変異が、*S. mutans* による平滑面齶蝕の発生を劇的に減少させていることは明らかとなり、DGK の変異が齶蝕原性にも強く影響していることが確認された。

以上の結果から、DGK のキナーゼ活性に対する阻害剤が齶蝕予防剤として有効であることを示唆された。そこで、本研究の最終目的である齶蝕細菌の耐酸性因子阻害剤の開発を目指した。真核生物の DGK 活性に対してはすでに Diacylglycerol kinase inhibitor I と II が阻害剤として知られており、II は I のアナログで、I よりも阻害効果の強いことが確認されている (図 8)。

図 8 DGK 阻害剤



これら 2 つの阻害剤を用いて、*S. mutans* の耐酸性に与える影響ならびに DGK のキナーゼ活性に対する阻害効果を調べた (図 9、10)。生育阻害については、pH 5.5 では I も II も生育阻害効果を示さなかった。培地の pH を下げていくにつれて、I の添加は若干の生育阻害をもたらしたが、有意差はなかった。これに対して、II の添加は著しく *S. mutans* の生育を阻害し、pH 5.3 では 50% 以上の阻害効果が認められた。

図 9 UA159 の増殖に対する Diacylglycerol kinase inhibitor I の影響

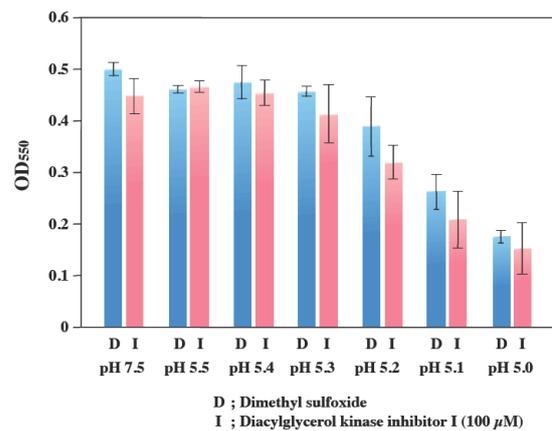
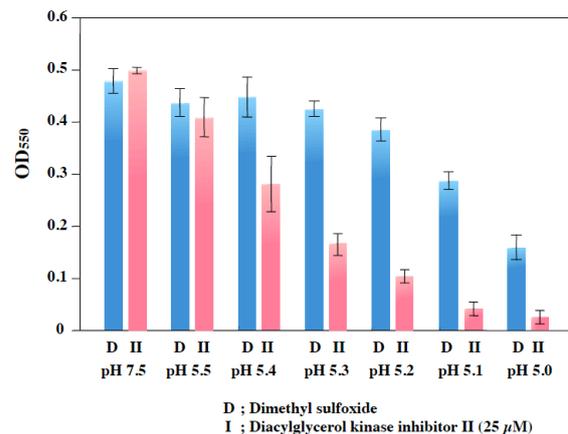
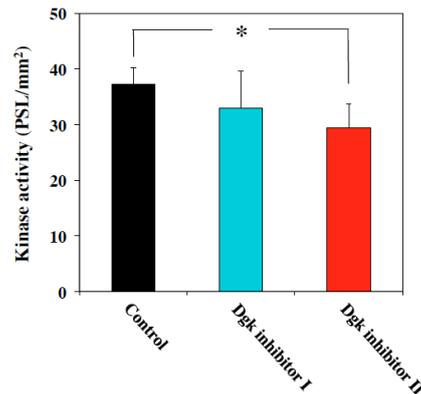


図 10 UA159 の増殖に対する Diacylglycerol kinase inhibitor II の影響



一方、DGK の活性に対しては中性条件ではともに阻害効果を示さなかったが、pH を少し下げると (pH 6.4)、inhibitor II の方に 20% 程度の活性阻害が認められた (図 11)。この結果は *S. mutans* の耐酸性への影響と一致しており、Diacylglycerol kinase inhibitor II の齶蝕予防剤としての有用性が示唆された。

図 11 キナーゼ活性に対する DGK 阻害剤の影響 (pH6.4)



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 2 件)

1. Shibata Y., van der Ploeg JR, Kozuki T, Shirai Y, Saito N, Kawada-Matsuo M, Takeshita T, and Yamashita Y. 2009. Kinase activity of the *dgk* gene product is involved in the virulence of *Streptococcus mutans*. *Microbiology* 155:557-565. 査読有り

2. Kawada-Matsuo M, Shibata Y., and Yamashita Y. 2009. Role of two component signaling response regulators in acid tolerance of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol. Immunol.* 24:173-176. 査読有り

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Shibata Y., Kawada M., Kozuki T., Shirai Y., Saito N., Yamashita Y.: The enzyme activity of the *dgk* gene product is essential for acid tolerance of *Streptococcus mutans*. XVII Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, June 2008, Porto Heli, Greece.

2. 柴田幸江、山下喜久: *Streptococcus mutans* Dgkホモローグの病原性における役割. 第82回日本細菌学会総会. 2009年3月、名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 幸江 (SHIBATA YUKIE)
九州大学・大学院歯学研究院・助教
研究者番号：30274476

(2) 研究分担者

山下 喜久 (YAMASHITA YOSHIHISA)
九州大学・大学院歯学研究院・教授
研究者番号：20192403

(3) 連携研究者

なし