

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463178

研究課題名(和文) 口腔バイオフィーム形成におけるバクテリオシン産生とABC膜輸送体の機能解析

研究課題名(英文) Relationship of *Streptococcus mutans* bacteriocin production with formation of biofilm

研究代表者

永山 佳代子 (Nagayama, Kayoko)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・招へい教員

研究者番号：80546979

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Streptococcus mutans は、他菌種に対して抗菌作用を持つバクテリオシンを産生し、生存する上で有利な環境を作り出す。本研究では、この菌の産生するバクテリオシンSmbAおよびNImAの機能について検討を行った。SmbA 欠失変異株のバクテリオシン産生能はNImA欠失変異株と比較して低く、バイオフィーム形成能はNImA欠失変異株の方が低かった。さらに、Streptococcus gordoniiの存在下では、S. mutansのバクテリオシン産生量およびバイオフィーム形成量に変化が認められた。以上のことからバクテリオシン産生能がバイオフィーム形成に深く関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus mutans, known as a primary causative agent of dental caries, produces bacteriocins that inhibit the growth of similar or closely related oral bacteria. The purpose of the present study was to examine the functions of 2 peptide bacteriocins, SmbA and NImA, as well as the correlation between production of bacteriocin and biofilm formation. The amount of bacteriocin produced by an SmbA-deficient mutant strain was lower as compared to that by an NImA-deficient mutant strain, while biofilm formation by NImA-deficient mutant strain was lower than that by the SmbA-deficient mutant strain. In addition, both bacteriocin production and biofilm formation were altered in the presence of Streptococcus gordonii. These results suggest that the presence of strains possessing bacteriocins, such as SmbA and NImA may be dominant in biofilm due to their effects on other oral streptococci. In addition, bacteriocins might have a role in competition with other oral streptococci.

研究分野：小児歯科学

キーワード：Streptococcus mutans バクテリオシン バイオフィーム う蝕 口腔内細菌

1. 研究開始当初の背景

グラム陽性細菌である *Streptococcus mutans* はう蝕の主要な病原細菌であり、歯面にバイオフィルムを形成することによりその病原性を発揮する。バイオフィルム中において非常に複雑な口腔細菌叢を構成する 600 種を超える細菌は、自己と同種の菌の生息密度を感知して、それに応じて物質の産生をコントロールするクオラムセンシングという機構を持ち合わせている。一方で、多くのグラム陽性細菌は、バクテリオシンという他の菌に対する抗菌物質を合成・排出し、生存環境下で自らが有利な環境を作り出す。そのため、バクテリオシンの産生は、クオラムセンシングに関連する遺伝子群が関与している可能性が示唆されているものの、詳細は明らかにされていない。しかしながら、このバクテリオシン産生能が口腔内のバイオフィルムにおいて *S. mutans* が優位性を保つことや、口腔内の細菌叢に影響を与えていることが考えられる。バクテリオシンのうち *S. mutans* が合成するものは特にミュータシンとして分類されているが、Oralgen Databases (<http://www.oralgen.lanl.gov/>) によると、このミュータシンは現在 37 種類が報告されている。これらは、その構造や病原性からミュータシン I、II、III、および IV の 4 種に分類されており、それぞれのミュータシンと *S. mutans* が齲蝕を引き起こす機序との関連性や、薬剤への応用に向けての研究がなされている。本研究では、バクテリオシン産生能とバイオフィルム形成の関連において、齲蝕発生の機序の一部を明らかにしたいと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*S. mutans* の産生するバクテリオシンの 1 つである SmbA と N1mA をターゲットとし、これらのバクテリオシンをコードする遺伝子の臨床分離株における保有率と齲蝕罹患率との関連を調べ、バクテリオシン産生能と齲蝕の発生について明らかにすることである。さらに、これらが明らかとなった場合、すでに報告されている SmbA や N1mA をコードする遺伝子の部分を増幅するプライマーを作製し、これを用いて患児から採取したプラーク中の *S. mutans* の

DNA を Polymerase Chain reaction (PCR) 法により SmbA や N1mA 遺伝子の有無が確認できる。これらの一連の作業をさらに簡易化するキットを作製することによって、乳幼児の集団歯科検診や、歯科医院において、簡便にう蝕のハイリスク患児をスクリーニングすることにより、その子どもに合った齲蝕予防のプロトコルを確立できる。このことから、齲蝕の予防につながることができると思われる。

3. 研究の方法

1) *smbA* および *n1mA* 遺伝子の保有率

大阪大学歯学部附属病院小児歯科および岡山大学病院小児歯科を受診中で本研究に同意の得られた患児のう蝕部位および健全部位からプラークを採取し、通法を用いて DNA を抽出し分析を行った。これらの DNA をテンプレートとし、*smbA* および *n1mA* 遺伝子を特異的に増幅するプライマーを設計し、PCR 法を行うことにより、*smbA* および *n1mA* 遺伝子の有無を調べ、そのパターンを割合を検討した。臨床分離株の SmbA および N1mA 遺伝子の有無のは、SmbA 発現遺伝子および N1mA 発現遺伝子を両方保有する菌株の群、SmbA 発現遺伝子は保有するが N1mA 発現遺伝子は保有しない菌株の群、SmbA 発現遺伝子は保有しないが N1mA 発現遺伝子は保有する菌株の群、SmbA 発現遺伝子および N1mA 発現遺伝子を両方保有しない菌株の群の 4 群に群分けし、以下の実験を行った。

2) バクテリオシン産生能

各群の臨床分離株におけるミュータシン産生能を検討した。各群の臨床分離株を生育させコロニーを形成させたプレート上に、*S. mutans* のバクテリオシンにより生育を阻止される菌 (Rp66) を軟寒天に播種したものを添加し、37°C で 24 時間培養した。培養後、Rp66 株の発育の阻害される範囲 (阻止円) を

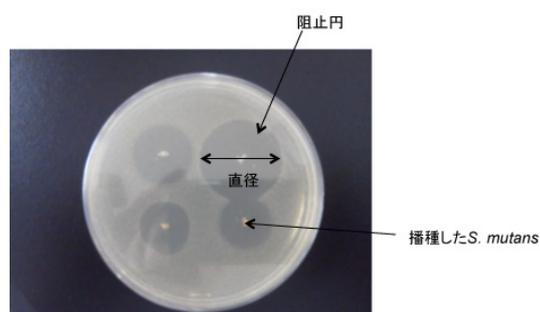


図1. バクテリオシン産生能

各群間で比較した。図1に示すような阻止円の直径を計測することによってバクテリオシン産生能を決定した。

3) バイオフィーム形成能

SmbA および N1mA 遺伝子の有無がバイオフィーム形成能に与える影響を検討した。各群の供試菌を Todd-Hewitt (TH) 培地にて培養し、その菌液を 1/100 量で新しい TH 培地に播種し懸濁した後、マイクロタイタープレートに分注し、37°C で 24 時間培養した。浮遊菌を除去した後、ウェルの底面に形成されたバイオフィームをクリスタルバイオレットにて染色し、滅菌蒸留水にて過剰な染料を除去した。洗浄後、95%エタノールにてバイオフィームを固定し乾燥後、滅菌蒸留水を添加し、吸光度を波長 550 nm で測定し、群間におけるバイオフィーム形成量の比較検討を行った。また、口腔内で共存する菌のモデルとして、*Streptococcus gordonii* Challis 株をマイクロタイタープレートにフィルターを介して共存させて培養し、同様の実験を行った。供試菌として、日本人小児口腔由来の *S. mutans* GS5 株および同株から作製した SmbA 欠失変異株 (Δ SmbA)、N1mA 欠失変異株 (Δ N1mA) を用いた。供試菌を Todd-Hewitt (TH) 液体培地にて培養し、その菌液 1/100 量をコンパニオンプレートに播種し、底面に 0.4 mm のメンブレンが存在するセルカルチャーインサートに

Streptococcus gordonii Challis 株を播種したものを上記のコンパニオンプレートに挿入し、それぞれの菌の産生物が透過する状態で、37°C で 1 日間嫌氣的に培養した。その後、コンパニオンプレート上に形成されたバイオフィームをクリスタルバイオレットにて染色し、滅菌蒸留水にて洗浄後、95% エタノールにて固定、100 μ l の滅菌蒸留水を添加し懸濁後、吸光度 550 nm で測定した。

4. 研究成果

本研究では、大阪大学歯学部附属病院小児歯科を受診中の患児よりプラークを採取し、抽出した *S. mutans* の DNA を用いて、主要なバクテリオシン SmbA および N1mA の産生遺伝子 (*smbA* および *n1mA*) の保有パターンを調べた。大阪大学歯学部附属病院小児歯科を受診された患児 20 人の齶蝕部位お

よび健全部位からプラークを採取し調べた結果、*n1mA* は多くの菌株で検出されたが、*smbA* の検出率は低かった。さらに、*n1mA* と比較して *smbA* の方が齶蝕部位から分離された菌株より検出された割合が高かったことに加え、*smbA* を保有する株でバクテリオシン産生能は有意に高かったこと、バイオフィーム形成能は高い傾向にあったことから、*smbA* を保有することが齶蝕原性に大きく影響している可能性が示された。また、供試菌として、日本人小児口腔由来の *S. mutans* GS5 株および同株から作製した SmbA 欠失変異株 (Δ SmbA)、N1mA (Δ N1mA) 欠失変異株を用い、また、口腔内で共存する菌のモデルとして *Streptococcus gordonii* Challis を用いてバイオフィーム形成の比較の実験を行ったところ、 Δ N1mA 株は、GS5、 Δ SmbA 株と比較し、有為にバイオフィーム形成能が低く、GS5 および Δ SmbA 株においては、*S. gordonii* Challis との共存で有意にバイオフィーム形成能が低下した (図2)。

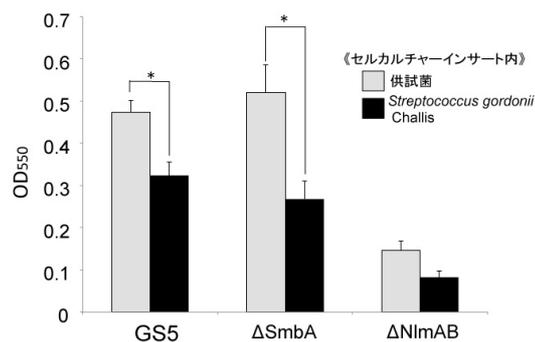


図2. バイオフィーム形成能 (* $P < 0.05$)

以上の結果から、バクテリオシン産生遺伝子 N1mA がバイオフィーム形成に大きく関与しており、また、*S. gordonii* 等の他菌種が存在した場合、*S. mutans* によるバイオフィーム形成はバクテリオシンの産生能によって変化することが明らかとなった。また、同様の供試菌を用いてバクテリオシン産生の比較をしたところ、 Δ SmbA が他の菌と比較してバクテリオシン産生能は最も低く、*S. gordonii* と共存した時のバイオフィーム形成量の減少率が最も低かったことから、*S. mutans* は他菌種と拮抗しながらバイオフィームを形成し、そのバクテリオシン産生能がバイオフィーム形成に深く関与していることが示唆された。今回の実験により、*S. mutans* の他菌種との共存状態においてバク

テリオシンを産生することにより他菌種との優位性を持ち、バイオフィルムを形成することにより、う蝕の発生に寄与する機序の一部を解明できた。

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2件)

1. Nagayama K, Fujita K, Takashima Y, Ardin AC, Ooshima T, Matsumoto-Nakano M. Role of ABC transporter proteins in stress responses of *Streptococcus mutans*. *Oral Health Dent Manag* 査読有 13, 359-365, 2014.
2. Ardin AC, Fujita K, Nagayama K, Takashima Y, Nomura R, Nakano K, Ooshima T, Matsumoto-Nakano M. Identification and functional analysis of an ammonium transporter in *Streptococcus mutans*. *PLoS One* 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0107569. 2014.

[学会発表] (計5件)

1. 永山佳代子、森本節代、藤田一世、仲野和彦、仲野道代 *Streptococcus mutans* におけるバクテリオシン産生とバイオフィルム形成の関連 日本小児歯科学会第34回近畿地方会 大阪国際交流センター (大阪府大阪市) 2015年10月25日
2. 永山佳代子、黒田景子、高島由紀子、仲野和彦、藤田一世、仲野道代 *Streptococcus mutans* の産生する抗菌物質バクテリオシンのバイオフィルム形成における役割 日本小児歯科学会第33回中四国地方会 松山市総合コミュニケーションセンター (愛媛県松山市) 2014年11月2日
3. K.Nagayama, A.C.Ardin, K.Fujita, M.Matsumoto-Nakano Analysis of bacteriocin production by *Streptococcus mutans* clinical isolates 第2回国際歯科研究学会 (IADR) アジア太平洋地域学術大会 (APR) バンコク (タイ) 2013年8月21日~24日

4. 永山佳代子、仲野道代、Arifah Chieko Ardin、藤田一世、仲野和彦 *Streptococcus mutans* におけるバクテリオシン産生能とバイオフィルム形成の関連 第51回日本小児歯科学会大会 長良川国際会議場 (岐阜県岐阜市) 2013年5月23日~5月24日
5. 柳田可奈子、藤田一世、永山佳代子、仲野道代 *Streptococcus mutans* 形態決定遺伝子と齲蝕病原性との関連について 第51回日本小児歯科学会大会 長良川国際会議場 (岐阜県岐阜市) 2013年5月23日~5月24日

[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]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永山 佳代子 (NAGAYAMA Kayoko)
大阪大学大学院歯学研究科・招へい教員
研究者番号: 80546979

(2) 研究分担者

仲野 道代 (NAKANO Michiyo)
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 30359848