

平成 21 年 5 月 26 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19592204

研究課題名(和文) 象牙質齲蝕侵入細菌におけるクオラムセンシング機構の実態の解明

研究課題名(英文) Study of quorum-sensing system of invading bacteria in dentinal caries

研究代表者

尾崎 和美 (OZAKI KAZUMI)

徳島大学・大学院ヘルスケアサイエンス研究部・教授

研究者番号：90214121

研究成果の概要:細菌は増殖する過程で他の細菌同士との情報伝達に用いる化学物質を分泌し、その濃度を感知しながら、自身の特定物質の分泌を制御している。これをクオラムセンシングという。ヒトの歯、特に象牙質にできた齲蝕の中でひしめき合うように棲息する細菌のクオラムセンシング機構が、どのような因子で制御されているかを検索したところ、バイオフィルムの形成や糖の代謝に関わる遺伝子がこの機構に影響を及ぼすことが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：象牙質齲蝕，象牙細管，齲蝕原性細菌，バイオフィルム，クオラムセンシング

## 1. 研究開始当初の背景

*Streptococcus mutans* が持つ菌体外多糖合成能は、歯面におけるバイオフィルムの形成・定着ならびに酸の拡散抑制による歯質の脱灰促進を可能にし、また菌体内多糖合成能は、菌体内に取り込んだ糖を元にグリコーゲン様多糖を合成・貯蔵し、貧栄養環境下でこれを分解して持続的な酸の産生を可能にするため、齲蝕原性という観点から重要な因子と考えられている。近年、

明らかにされつつあるクオラムセンシング機構は、菌の濃度(密度)そのものを環境ストレスとして捉え、細菌が分泌する定数感知シグナル分子によって細菌自らが周囲の菌濃度を感知し、この分子が一定の濃度を超えると標的遺伝子(形質転換遺伝子)が活性化され、菌濃度をはじめとする種々の環境ストレスに適応するという概念であるが、象牙質齲蝕表層に定着したバイオフィルムの中あるいは象牙細管という極めて



狭小な空間に密な状態で閉じ込められた細菌において、クオラムセンシング機構がどのように作働しているのか、またこの機構が、齶蝕原性として重要な因子である菌体内外多糖の合成にどのような影響を及ぼしているのかについては不明な点が多い。バイオフィルムの主要構成成分である菌体外多糖（特に水溶性あるいは非水溶性グルカンの合成酵素（glucosyltransferase など）をはじめとする種々の菌体表層蛋白の発現に影響を与える serine protease “HtrA” が、クオラムセンシング機構の一部を制御する因子の一つである histidine kinase sensor “CiaH” によって制御されることが報告されていること、また菌体内多糖の合成に必須である糖（スクロース）の菌体内への輸送に重要な役割を果たすスクロースエンザイム II (EII<sup>scr</sup>) の存在が明らかとされていることなどから、これらの酵素の存否が *S. mutans* の齶蝕原性因子にいかなる影響を及ぼすのかを検討することは、象牙質齶蝕病巣に存在する細菌におけるクオラムセンシング機構を明らかにする一助となる。

## 2. 研究の目的

象牙質齶蝕病巣に棲息する細菌のクオラムセンシング機構を解明すべく *S. mutans* の齶蝕原性因子として重要な菌体内外多糖の合成に関与する酵素のうち、菌体表層に存在する HtrA および EII<sup>scr</sup> に着目し、以下の項目を目的に、実験を行った。

- (1) HtrA あるいは EII<sup>scr</sup> を code する遺伝子 (*htrA* gene あるいは *scrA* gene) をノックアウトした (すなわち HtrA および EII<sup>scr</sup> の酵素活性を不活化した) *S. mutans* 遺伝子改変株の作成
- (2) *S. mutans* 遺伝子改変株の増殖率および

付着率の測定

- (3) *S. mutans* 遺伝子改変株の非水溶性ならびに水溶性グルカンの合成量の測定

## 3. 研究の方法

(1) HtrA および EII<sup>scr</sup> を code する遺伝子 (*htrA* gene ならびに *scrA* gene) をノックアウトした *S. mutans* 遺伝子改変株の作成

*S. mutans* UA159 株の染色体 DNA を鋳型として、PCR にて *htrA* あるいは *scrA* 遺伝子をクローニング後、制限酵素を用いて切断したこれらの遺伝子の内部に  $\Omega$  Em<sup>r</sup> カセット (エリスロマイシン (Em) 耐性遺伝子の両側に  $\Omega$  fragment の配列を備えたカセット) を挿入したプラスミドを作製した。次に、制限酵素により切断して得られた fragment (*htrA*:: $\Omega$  Em<sup>r</sup> あるいは *scrA*:: $\Omega$  Em<sup>r</sup>) を *S. mutans* UA159 株の染色体上の各遺伝子との間で相同組み換えを起こさせることにより、Em<sup>r</sup> 遺伝子挿入型の (すなわち HtrA あるいは EII<sup>scr</sup> の酵素活性を不活化した) *htrA* あるいは *scrA* 遺伝子改変株を作製した (図 1)。

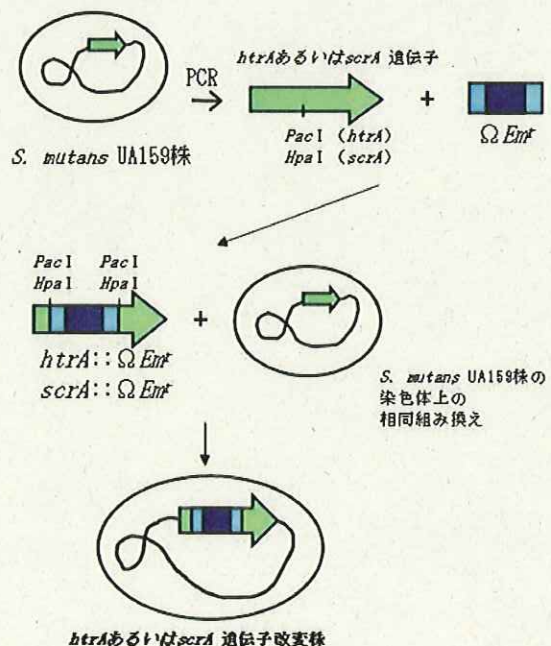


図 1. *S. mutans htrA* および *scrA* 遺伝子改変株の作製



(2) *S. mutans* 遺伝子改変株の増殖率ならびに付着率の測定

① *S. mutans* 遺伝子改変株の増殖率の測定

親株ならびに各遺伝子改変株を BHI あるいは 10 μg/ml の Em を含む BHI にて培養し、経時的に生菌数の測定および OD<sub>595</sub> の測定を行い、増殖能を測定した。

② *S. mutans* 遺伝子改変株の試験管への

付着率の測定

親株および遺伝子改変株の試験管への付着率を、スクロースを用いて測定した。すなわち、親株および改変株の対数増殖期の菌を遠心操作 (6,000×g, 20 分間) にて集菌後、カリウム・リン酸緩衝液 (pH6.8 ; 以下 KPB と略す) にて OD<sub>600</sub> が 0.6 になるように菌液を調製した。試験管に調製した菌液を 2 ml と 5% スクロース 2 ml を混合し、水平から 30 度に傾けて 37°C で 18 時間反応させた。反応終了後、試験管を静かに回転させ、付着していない菌体を含んだ溶液を第二の試験管へ移した。菌体が付着している第一の試験管に KPB 3 ml を加え、第二、第三の試験管ともに超音波処理して均一な浮遊液とし、OD<sub>550</sub> を測定した。付着率は第一の試験管の OD<sub>550</sub> / (第一 + 第二 + 第三の試験管の OD<sub>550</sub>) × 100 で計算した。

(3) *S. mutans* 遺伝子改変株の非水溶性および水溶性グルカンの合成量の測定 (図 2)

① ウシ象牙質試料 (ウシ歯切片) の調製

および培養

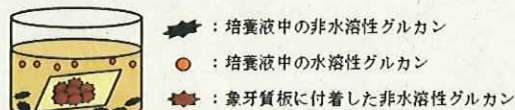
ウシ歯の歯根部より歯軸方向に平行となる厚さ約 500 μm の象牙質試料を、低速切断機を用いて作成後、3×7 mm にトリミングし、注水下にて順次目の細かい研磨紙に交換しつつ、厚さ 300 μm の厚さまで手研磨した。次に、この試料を超音波洗浄 (17% EDTA 水溶液中、4 分間および滅菌水中、10 分間) ならびに水洗 (滅菌水中、振盪) 後、48 穴プレートへ 1 枚ずつ約 20° に傾斜させて入れ EOG 滅

菌後、図 2 に記す 5通りの培地を各プレートに 600 μl および対数増殖期の親株あるいは *scrA* 遺伝子改変株を 100 μl 加えて 37°C にて 48 時間培養した。

○培養条件 (使用培地)

- A : BHI
- B : BHI + 5% sucrose
- C : Trypticase Soy Broth without Dextrose (D(-)TSB) + 0.25% glucose
- D : D(-)TSB + 0.47% sucrose
- E : D(-)TSB + 2.35% sucrose

○ウシ象牙質試料 (ウシ歯切片) の培養



○培養後の処理

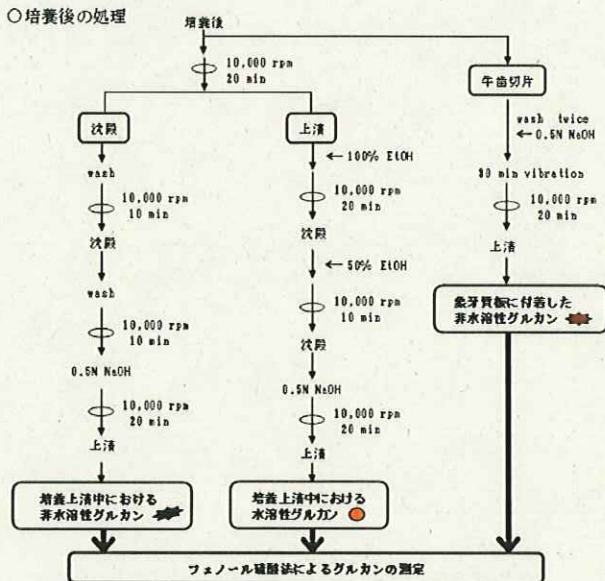


図 2. *S. mutans* 遺伝子改変株の不溶性ならびに水溶性グルカンの合成量の測定

② 非水溶性ならびに水溶性グルカンの合成量の測定

各培地での培養を終えた各プレートより、培地と象牙質試料を別々に処理し、培地からは非水溶性および水溶性グルカンを、また象牙質試料表面の非水溶性グルカンを、各々 0.5N NaOH で溶解させた。そして各試料を遠心後、上清をフェノール硫酸法にてグルカンの測定を行った。すなわち、合成グルカンを 0.5N NaOH 500 μl にて溶解後、グルカン溶液 30 μl に 10% フェノール水溶液を 30 μl 添加、その後、濃硫酸を 100 μl 添加し、波長 490 nm の吸光度を測定した。得られた吸



光度は濃度を規定したグルコース溶液を基に作製した標準曲線を用いてグルカンの濃度に換算した。

#### 4. 研究成果

##### (1) *S. mutans* 遺伝子改変株の増殖率について (図3)

*S. mutans* UA159 株 (親株) と比較した場合, *scrA* あるいは *htrA* 遺伝子改変株の増殖能は低下する傾向を示した。

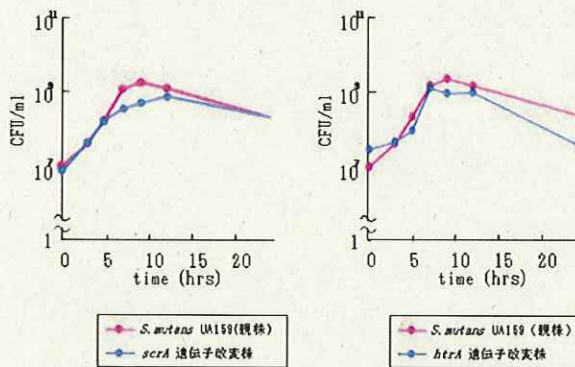


図3. *S. mutans* 遺伝子改変株の増殖率

##### (2) *S. mutans* 遺伝子改変株の試験管への付着率について (図4)

*S. mutans* UA159 株 (親株) と比較した場合, *scrA* あるいは *htrA* 遺伝子改変株の増殖能は, 低下する傾向を示した。

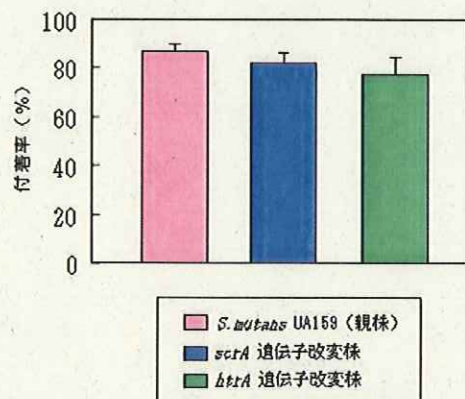


図4. *S. mutans* 遺伝子改変株の試験管への付着率

##### (3) *S. mutans* 遺伝子改変株の非水溶性および水溶性グルカンの合成量について (図5)

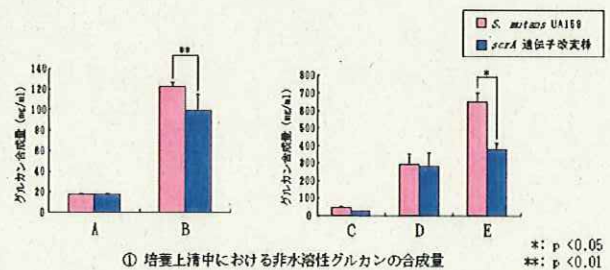
###### ① 培養上清中における非水溶性グルカン

よび水溶性グルカン合成量は, スクロースを添加せずに BHI のみで培養をおこなった場合 (培養条件 A), 親株と *scrA* 遺伝子改変株の合成量に有意な差は認められなかった。また, 0.25%グルコースまたはグルコースと同 mol 濃度に調整したスクロース含有の D(-)TSB にて培養した場合 (培養条件 C, D) も同様の結果が得られた。

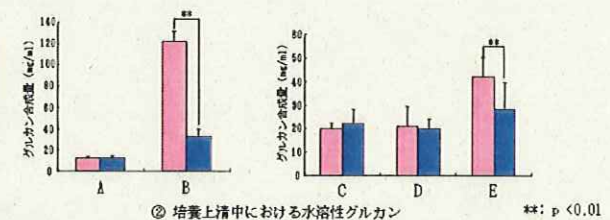
② 一方, スクロースを添加した BHI で培養した場合 (培養条件 B) を比較すると, *scrA* 遺伝子改変株は親株に比べて有意に低い値を示した。また, 5 倍量のスクロースを添加した D(-)TSB (培養条件 E) でも有意に差が認められた。

③ 象牙質に付着した非水溶性グルカン合成量も, スクロースを添加した条件下では, *scrA* 遺伝子改変株は親株に比べ, 有意に低い値を示した。

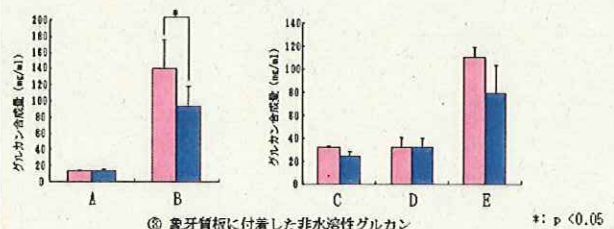
④ 培養条件 A と B を比較すると, スクロース存在下でグルカン合成量は増加していた。



① 培養上清中における非水溶性グルカンの合成量



② 培養上清中における水溶性グルカン



③ 象牙質に付着した非水溶性グルカン

※ 図中A~E: 図2培養条件のA~E

図5. *S. mutans* 遺伝子改変株の不溶性ならびに水溶性グルカンの合成量について



以上の結果より, *scrA* あるいは *htrA* 遺伝子が, *S. mutans* のスクロース代謝や歯面への初期付着あるいはバイオフィルム形成において重要な役割を担っていることが示唆された。

本研究結果は, 齲蝕原性細菌である *S. mutans* の齲蝕病巣におけるクオラムセンシング機構の一部を解明できたという意味で極めて有意義であり, これらの遺伝子を創薬ターゲットとした新規抗菌システムの開発の可能性を導き出せるものと考えられる。

#### 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 7 件)

①Hosokawa I., Hosokawa Y., Ozaki K., Yumoto H., Nakae H., Matsuo T. : Proinflammatory effects of muramyl dipeptide on human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*, *in press*.

査読有

②Hosokawa Y., Hosokawa I., Ozaki K., Nakae H., Matsuo T. : Human gingival fibroblasts express functional chemokine receptor CXCR6. *Clin Exp Immunol*, 156, 413-418, 2009, 査読有

③Hosokawa Y., Hosokawa I., Ozaki K., Nakae H., Matsuo T. : Cytokines differentially regulate CXCL10 production by IFN- $\gamma$  or TNF- $\alpha$  stimulated-human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*, 44, 225-231, 2009, 査読有

④Hosokawa Y., Hosokawa I., Ozaki K., Nakae H., Matsuo T. : CC-Chemokine Ligand 17 in periodontal diseases : expression in diseased tissues and production by human gingival fibroblasts. *J Periodontal Res*, 43, 471-477, 2008, 査読有

⑤Hosokawa I., Hosokawa Y., Ozaki K., Nakae

H., Matsuo T. : Adrenomedullin suppresses tumor necrosis factor alpha-induced CXCL10 production by human gingival fibroblasts. *Clin Exp Immunol*, 152, 568-575, 2008, 査読有

⑥中西正, 尾崎和美, 松尾敬志 : 象牙質-歯髄境界部における侵入細菌の局在性に関する免疫組織学的研究. *日本歯科保存学雑誌*, 51, 63-71, 2008, 査読有

⑦Hosokawa Y., Hosokawa I., Ozaki K., Nakae H., Matsuo T. : CXCL10 chemokine ligand 16 in periodontal diseases: expression in diseased tissues and production by cytokine-stimulated human gingival fibroblasts. *Clin Exp Immunol*, 149, 146-154, 2007, 査読有

[学会発表] (計 14 件)

①細川育子, Adrenomedullin はヒト歯肉線維芽細胞の CXCL10 産生を抑制する, 第 56 回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会, 2008 年 11 月 29 日, 愛知県, 愛知学院大学歯学部

②細川義隆, ヒト歯肉線維芽細胞は機能的に CXCL6 を発現している, 第 129 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2008 年 11 月 6 日, 富山県, 富山国際会議場

③細川育子, Toll-like Receptor Ligands 刺激が誘導する単球の CCL20 産生に及ぼす Adrenomedullin の影響, 第 129 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2008 年 11 月 6 日, 富山県, 富山国際会議場

④細川義隆, カテキンは Oncostatin M が誘導するヒト歯肉線維芽細胞の CXCL10 および接着分子発現を抑制する, 第 51 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2008 年 10 月 19 日, 三重県, 四日市市文化会館

⑤細川育子, ヒト歯肉線維芽細胞における TLR4 ligand が誘導する CXCL10 産生に及ぼ



す Adrenomedullin の影響, 第 51 回秋季日本歯周病学会学術大会, 2008 年 10 月 19 日, 三重県, 四日市市文化会館

- ⑥ Hosokawa Y., Th17 Cytokines Enhance CCL20 Production by Human Gingival Fibroblasts., 86th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, 2008 年 7 月 5 日, Toronto, Canada
- ⑦ Hosokawa I., Pro-inflammatory Roles of NOD2 in Human Gingival Fibroblasts., 86th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research, 2008 年 7 月 5 日, Toronto, Canada
- ⑧ 細川義隆, Flagellin がヒト歯肉線維芽細胞のサイトカイン産生および接着分子発現に与える影響, 第 128 回日本歯科保存学会春季学術大会, 2008 年 6 月 6 日, 新潟県, 朱鷺メッセ
- ⑨ 細川育子, Toll-like Receptor Ligands 刺激が誘導する単球の IL-1beta 産生に及ぼす Adrenomedullin の影響, 第 128 回日本歯科保存学会春季学術大会, 2008 年 6 月 5 日, 新潟県, 朱鷺メッセ
- ⑩ 細川育子, Adrenomedullin がヒト歯肉線維芽細胞の Toll-like Receptor Ligands 誘導サイトカイン産生に与える影響, 第 51 回春季日本歯周病学会学術大会, 2008 年 4 月 25 日, 埼玉県, 大宮ソニックシティ
- ⑪ 細川義隆, Toll-like receptor ligands がヒト歯肉線維芽細胞の CXCL10 産生に与える影響, 第 51 回春季日本歯周病学会学術大会, 2008 年 4 月 25 日, 埼玉県, 大宮ソニックシティ
- ⑫ 木村智子, Streptococcus mutans の病原性におけるスクロース輸送系遺伝子の役割について, 第 81 回日本細菌学会総会, 2008 年 3 月 24 日, 京都府, 国立京都国際

会館

- ⑬ 細川育子, Adrenomedullin がヒト歯肉線維芽細胞のサイトカイン産生に与える影響の解析, 第 127 回日本歯科保存学会秋季学術大会, 2007 年 11 月 8 日, 岡山県, 岡山コンベンションセンター
- ⑭ 木村智子, Streptococcus mutans の病原性におけるスクロース輸送系遺伝子の役割について, 第 126 回日本歯科保存学会春季学術大会, 2007 年 6 月 7 日, 埼玉県, 大宮ソニックシティ

〔図書〕(計 2 件)

- ① 大学検査科学専攻微生物学教員懇談会編, 近代出版, メディカルサイエンス微生物検査学, 2008, 374 頁(分担:311p-321p)
- ② 田上順次, 花田信弘, 桃井保子編集, 永末書店, う蝕学 -チェアサイドの予防と回復のプログラム-, 2008, 255 頁(分担:69p-79p)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

尾崎 和美 (OZAKI KAZUMI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授  
研究者番号: 90214121

### (2) 研究分担者

中江 英明 (NAKAE HIDEAKI)  
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・准教授  
研究者番号: 30227730

菅 俊行 (SUGE TOSHIYUKI)  
徳島大学・医学部・歯学部附属病院・講師  
研究者番号: 60243713

高橋 加奈子 (TAKAHASHI KANAKO)  
徳島大学・医学部・歯学部附属病院・助教  
研究者番号: 80403715

### (3) 連携研究者

なし