様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成　21 年　5 月　13 日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2007～2008
課題番号：19791573
研究課題名（和文）　口腔バイオフィルム中における *S. mutans* 表層タンパクの機能解析

研究課題名（英文）　Functional analysis of *S. mutans* surface proteins in biofilm formation

研究代表者　藤田　一世（FUJITA KAZUYO）
大阪大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号：00437386

研究成果の概要：
Streptococcus mutans は、最も重要なう蝕病原性細菌であり、その菌体の表層には様々な重要なタンパクが存在している。菌体表層にはグルカン合成酵素 (Glucosyltransferase: GTF)、高分子タンパク抗原 (PAc)、およびグルカン結合タンパク (Gbp) が存在している。GTF においては、これまで GTFB、 GTFC、および GTFD の３種が、グルカン結合タンパク (Gbp) は、GbpA、GbpB、GbpC、および GbpD の４種が報告されている。本研究ではこれらの欠失変異株を作製し、それぞれのう蝕原性における強度を比較検討し、さらにそれぞれのタンパクにおけるバイオフィルム形成における役割について検討を行った。その結果、GTFB が最も強いう蝕原性を示すことが明らかとなった。さらに、バイオフィルムの構築にはすべての表層タンパクがその密度および形などの構造に深く関与していることが示された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2007 年度	2,300,000	0	2,300,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,300,000	300,000	3,600,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学
キーワード：*Streptococcus mutans*、表層タンパク、グルカン結合タンパク、分子生物学

１．研究開始当初の背景

う蝕の主要な病原細菌である *Streptococcus mutans* の菌体表層にはグルカン合成酵素 (Glucosyltransferase: GTF)、高分子タンパク抗原 (PAc)、およびグルカン結合タンパク (Gbp) が存在している。Gbp にはこれまでの

ところ４種類が報告され、それぞれ GbpA、GbpB、 GbpC、および GbpD と呼ばれている。これらのタンパクをコードする遺伝子がそれぞれクローニングされ、その遺伝子配列は明らかにされている。GbpA。は分子量が約 58kDa の分泌型タンパクであり、このタンパクのＣ末端側 3/4 はGTF の一つである GTFB のＣ末端側に存在する繰り返し構造と相同性が高く、バイオフィルムの形成に関与することが報告されている。GbpC タンパクはデキストラン凝集に必要なタンパクであり、分子量 58kDa の菌体結合型のタンパクであり、歯面への初期付着に需要な役割を演じる PAc のＣ末端側のアラニン繰り返し構造領域と約 30% の相同性を持つことが示されている。以上のことより、これらの表層タンパクは、口腔内におけるバイオフィルムの形成において重要な働きを持ち、また、それらが複雑に関連していることが示唆される。

２．研究の目的

これまでに、これらの表層タンパクの相互作用について GbpC と GTF のひとつである GTFD の合成する水溶性グルカンと特異的に結合することによりスクロース依存性付着において重要な役割を果たしていることが明らかにされている。また、GbpA および GbpC の欠失変異株を用いて行った動物実験において、野生株と比較してう蝕の発生が有意に減少することが明らかとされている。このように最近では、GTF と Gbp の相互関係について様々な報告がされているため、口腔内のバイオフィルムにおいて、これらの表層タンパクがどのように関わり、形成するのかを明らかにする。

３．研究の方法

1. *S. mutans* MT8148 とその GTF 欠失変異株および Gbp 欠失変異株のバイオフィルム形成能

バイオフィルム中での GTF と Gbp の役割を明らかにするため、それぞれの欠失変異株を用いて、これらのタンパクの活性を調べるとともに、バイオフィルム形成における役割を調べた。

①GTF 活性能

それぞれの欠失変異株を Todd-Hewitt (TH) 液体培地に播種し、波長 600 が 1.0 になるまで培養後、遠心により菌体と上清を分離し、それぞれ、グルコースをアイソトープによりラベルしたものと反応させ、シンチレーションカウンターによりその放射活性を測定することにより、GTF の活性を決定した。

②スクロース依存性平滑面付着能

それぞれの欠失変異株を Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地で 18 時間培養後、その 15 ml を 1%スクロース含有 BHI 液体培地 3 ml に播種し、37℃で 18 時間水平面から 30° に傾けて培養した。培養後、試験管壁に付着した菌体量を全菌体に対する付着菌体の量を百分率で表し、増殖菌体のスクロース依存性平滑面付着能とした。

③増殖速度

BHI 液体培地で一晩培養した供試菌を Yeast Extract (THYE) 液体培地に播種した。この菌の増殖を波長 550 nm の吸光度として、1 時間毎に経時的に測定した。波長 550 nm での吸光度が 0.2 から 0.6 までの対数増殖期において、波長 550 nm が 2 倍となるのに要する時間をダブリングタイムとし、算出した。

④バイオフィルム測定能

それぞれの欠失変異株を 1/100 量になるように TH 液体培地に播種し、それぞれ 96 穴マルチタイタープレートに各ウェルに 100 μl ずつ分注した。嫌気下、37℃で 48 時間培養した後、上清を取り除き、1%クリスタルバイ

オレット溶液を各ウェルに 25μl 添加した。室温で 15 分静置後、蒸留水で 6 回洗浄し、乾燥させる。95%エタノールで固定後、乾燥させ、マイクロプレートリーダーにより波長 570nm での吸光度を測定し、バイオフィルム形成能とした。

2. GTF および Gbp 遺伝子の調節遺伝子の解析

各欠失株を二次元電気泳動により、発現タンパクの解析を行う。画像解析により、親株と比較して、発現量の違う調節遺伝子のスクリーニングを行う。得られた調節遺伝子の欠失変異株を作成し、GTF および Gbp の発現状況および活性を測定することにより、GTF および Gbp の発現調節遺伝子であることを決定する。

3. 共焦点レーザー顕微鏡による各 GTF あるいは Gbp 欠失変異株により形成されるバイオフィルムの構造の比較

あらかじめ丸型カバーガラスを挿入した 24 穴マルチウェルプレートの各ウェル中に各欠失変異株を播種し、バイオフィルムお形成を行った。培養後、カバーガラスの洗浄を行い、LIVE/DEAD kit を用いて、カルセイン AM でバイオフィルム中の生存菌体を、エチジウムホモダイマー1 により死菌体を染色した。染色後、洗浄し、4%グルタールアルデヒドにより、固定した。固定後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、それぞれの菌によるバイオフィルムの構造を調べた。

４．研究成果

分子生物学的手法を用いて、親株 MT8148 株より各 GTF および各 Gbp を欠失させた変異株を作製した。それらを用いて菌の増殖作用を調べたところ、GbpB 欠失変異株で最もダブリングタイムの遅延が認められた。しかしながら、スクロース依存性平滑面付着能においては GTFB, GbpA, および GbpC 欠失変異株では低下が認められたものの、GTFC 欠失変異株においてはあまり変化が認められなかった。また、GTFD 欠失変異株では、密度に変化はなかったものの、明らかに構造が変化していた。また、GTF 活性を各 Gbp 欠失変異株で調べたところ、GbpA および GbpB を欠失させた株では、GTFB の活性に変化は認められなかったが、GbpC を欠失させた場合では、GTFB および GTFD の活性は顕著に低下していた。さらに GbpA を欠失させた株においては、GTFD の活性が上昇していた。これらのことから、Gbp の発現状態により、GTF の発現変化していることから、これらの表層タンパクは相互に関係を持ちながら、バイオフィルムの形成を行っていくことが示唆された。

まず、はじめにバイオフィルムの形成量をクリスタルバイオレット染色法を用いて調べた。形成量においては GTFB を欠失させた場合において他の菌と比較して最も顕著な低下が認められた。さらに共焦点レーザー顕微鏡を用いて、バイオフィルムの構造を調べたところ、GTFB および GbpC 欠失変異株では菌の凝集が認められなかった。また、GbpB 欠失変異株においては構造にあまり変化は認められなかったものの、密度は明らかに減少していた。さらに GTFD 欠失変異株では明らかに構造が変化していた。GbpA 欠失変異株では、構造にやや変化が認められた。以上の結果は、非水溶性グルカン合成酵素である GTFB の欠失およびデキストラン凝集能を有する GbpC の欠失は、バイオフィルムの形成における密度に最も深く関与していること、また、水溶性グルカン合成酵素であり、菌体遊離型である GTFD および菌体遊離型のグルカン結合タンパク GbpA がバイオフィルムの構造の維持に重要であ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　6 件）

① Matsumoto-Nakano M, Tsuji M, Inagaki S, Fujita K, Nagayama K, Nomura R, Ooshima T. Contribution of cell surface protein antigen PAc of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* in press.

② Inagaki S, Matsumoto-Nakano M, Fujita K, Nagayama K, Funao J, Ooshima T. Effects of recombinase A deficiency on biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 24, 104-108, 2009.

③ Miyamoto E, Nakano K, Fujita K, Nomura R, Okawa R, Matsumoto M, Ooshima T. Bacterial profiles of oral streptococcal and periodontal bacterial species in saliva specimens from Japanese subjects. *Arch Oral Biol*. 54, 374-379, 2009.

④ Nakano K, Miyamoto E, Tamura K, Nemoto H, Fujita K, Nomura R, Ooshima T. Distribution of 10 periodontal bacterial species in children and adolescents over a 7-years period. *Oral Dis*. 14, 658-664, 2008.

⑤ Fujita K, Matsumoto-Nakano M, Inagaki S, Ooshima T. Biological function of glucan-binding protein B of *Streptococcus mutans*. Oral *Microbiol Immunol*. 22, 289-292, 2007.

⑥ Matsumoto-Nakano M, Fujita K, Ooshima T. Comparison of glucan-binding proteins in cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol*. 22, 30-35, 2007.

〔学会発表〕（計 6 件）

① 永山佳世子，松本道代，藤田 一世，大嶋 隆 *Streptococcus mutans* のストレス環境下における ATP 結合タンパクの機能解析 第 27 回日本小児歯科学会近畿地方会大会，2008. 10. 19, 大阪.

② Fujita K, Matsumoto-Nakano M, Ooshima T. GbpB expression in oral isolates of *Streptococcus mutans*. 86th International Association of Dental Research, 2008. 7. 2, Toronto, Canada.

③ 藤田一世，松本道代，大嶋 隆 *Streptococcus mutans* のバイオフィルム形成における遺伝子修復機能について 第 46 回日本小児歯科学会大会，2008. 6. 12, さいたま.

④ 永山佳世子，松本道代，藤田 一世，大嶋 隆 *Streptococcus mutans* の抗生物質耐性における ATP 結合タンパクの機能解析 第 46 回日本小児歯科学会大会，2008. 6. 12, さいたま.

⑤ 藤田 一世，松本道代，稲垣暁子，大嶋隆 *Streptococcus mutans* の表層タンパク発現のメカニズム 第 26 回 日本小児歯科学会近畿地方大会、2007, 10, 21, 尼崎.

⑥ Fujita K, Matsumoto-Nakano M, Inagaki S, Taniguchi N, Ooshima T. Cariogenic properties of glucan-binding proteins in *Streptococcus mutans*. 21st Congress of International Association of Pediatric Dentistry, 2007. 6. 14, Hong Kong, China.

６．研究組織

(1)研究代表者

藤田　一世（FUJITA KAZUYO）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：00437386

(2)研究分担者

(3)連携研究者