

機関番号：27102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20390537

研究課題名(和文) 細菌間シグナル伝達系阻害による口腔バイオフィルム形成阻害剤の開発

研究課題名(英文) The discovery of molecules that inhibit oral biofilm formation by inhibiting cell-to-cell communication

研究代表者 竹原直道 (TAKEHARA, TADAMICHI)

九州歯科大学・歯学部・名誉教授

研究者番号：00038879

研究成果の概要(和文)：既知のAI-2の構造を参考にして、その化学構造を改変した構造類似体の作製を行った。AI-2が4, 5-dihydroxy-2, 3-pentanedioneにホウ素分子が取り込まれたフラン系分子であることより、フラノン誘導体などのアナログを検索し、候補となるアナログを合成した。この際、候補となるアナログの遊離型はAI-2同様不安定であることが予想されるため、AI-2の場合、o-phenylenediamineと結合させ、安定化を図った。

このようにして作製されたアンタゴニストの活性阻害能について検討を加えた。海洋の発光細菌であり、AI-2のレポーター株である *Vibrio harveyi* はAI-2による発光の制御を行うため、*V. harveyi*の発光量を測定することによりAI-2の量を測定することが可能である。この菌株を用いて、合成したアナログのAI-2活性の阻害能を調べ、阻害活性を有するアナログとして有効であるかについてスクリーニングを行ったところ、いくつかのアナログが候補として挙げられた。

さらにそれらのアナログについてバイオフィルム形成阻害剤としての有効性を調べるため、う蝕細菌である *Streptococcus mutans* などの口腔細菌のバイオフィルム形成能を検討したところ、いくつかのアナログが、*S. mutans*をはじめとした様々なレンサ球菌のバイオフィルム形成を阻害することが明らかとなった。また、これらのアナログは解析した全てのレンサ球菌のバイオフィルム形成阻害に共通して有効である訳ではなかった。そのアナログと、バイオフィルム形成阻害に有効な菌種との間の関連はまだ明らかにされておらず、現在解析中である。さらに、バイオフィルム形成阻害機構を詳細に解析する目的で、バイオフィルムのマトリクス形成に重要な、グルコシルトランスフェラーゼの発現とアナログによるバイオフィルム形成阻害の関与についても現在解析を継続している。

このように、いくつかのアナログがバイオフィルム形成阻害作用を持つことが明らかとなったが、これらのアナログのバイオフィルム形成阻害における対象および作用機序は異なっていることがこれまでの研究から示唆されており、それぞれのアナログの作用機序について、今後解析を進めていくことが必要であることが判明した。

研究成果の概要(英文)：We initially produced several analogues by modifying the chemical structures of autoinducer-2 (AI-2). We examined the inhibitory activities of these analogues by examining the luminescence activities of *Vibrio harveyi*, a luminescent marine bacterium species. Of the analogues synthesized, we chose those

that inhibited the luminescence activities of *V. harveyi*. Using the selected analogues, we analyzed the inhibitory effects of these analogues on biofilm formation by oral streptococci, including *Streptococcus mutans*, a human cariogenic species. Some of the analogues inhibited biofilm formation by these bacteria, although some of the analogues that inhibited biofilm formation by *S. mutans* did not inhibit biofilm formation by other streptococci. We could not find a common inhibitor for all oral streptococci. Now we are analyzing the role of these analogues in the expression of *S. mutans* glucosyltransferase (GTF) genes and their function in biofilm formation by *S. mutans*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
平成 21 年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
平成 22 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	14,500,000	4,350,000	18,850,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 社会系歯学

キーワード：細菌間シグナル、クオラムセンシング、バイオフィーム、口腔細菌、阻害剤

### 1. 研究開始当初の背景

細菌がバイオフィームを形成する際、クオラムセンシング(quorum sensing: QS, 密度依存性調節あるいは同種細胞感知システム)とよばれるシステムにより細菌間の情報伝達が行われる。グラム陽性のヒト口腔細菌である *S. mutans* のバイオフィーム形成に関与する QS 系として、グラム陽性細菌のペプチド性のフェロモンによるシグナルを介した同種間情報伝達系とグラム陰性・陽性細菌の両方に広く見られるオートインデューサー 2 (autoinducer-2: AI-2) シグナルを介した、異種の細菌も含むと考えられている情報伝達系が報告されている。

### 2. 研究の目的

これまで、AI-2 の阻害剤を用いたバイオフィーム形成阻害剤は報告されていない。そこで、今回われわれは AI-2 シグナルをターゲットとして、AI-2 シグナルの阻害剤として構造類似体によるアンタゴニストを作製し、新しいバイオフィーム阻害剤の開発を行うことにした。

### 3. 研究の方法

- ① AI-2 の構造を参考にした構造類似体ライブラリの作製
- ② 主要な口腔細菌およびアナログを用いたバイオフィーム形成能の解析
- ③ バイオフィーム形成阻害に有効な AI-2

### アナログの決定

- ④ アナログのバイオフィーム形成に関する遺伝子への影響

### 4. 研究成果

アナログについてバイオフィーム形成阻害剤としての有効性を調べるため、口腔細菌である *Streptococcus mutans* などの口腔細菌のバイオフィーム形成能を検討したところ、いくつかのアナログが、*S. mutans* をはじめとした様々なレンサ球菌のバイオフィーム形成を阻害することが明らかとなった。また、これらのアナログは解析した全てのレンサ球菌のバイオフィーム形成阻害に共通して有効である訳ではなかった。そのアナログと、バイオフィーム形成阻害に有効な菌種との間の関連はまだ明らかにされておらず、現在解析中である。さらに、バイオフィーム形成阻害機構を詳細に解析する目的で、バイオフィームのマトリクス形成に重要な、グルコシルトランスフェラーゼの発現とアナログによるバイオフィーム形成阻害の関与についても現在解析を継続している。

### 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 5 件)

Takahashi, Y., Yoshida, A., Nagata, E., Hoshino, T., Oho, T., Awano, S., Takehara, T. and Ansai, T.: *Streptococcus anginosus* L-cysteine desulfhydrase gene expression is associated with abscess formation in BALB/c mice. *Molecular Oral Microbiol.* 26 : 221-227, 2011.

Masakiyo, Y., Yoshida, A., Takahashi, Y., Shintani, Y., Awano, S., Ansai, T., Sawayama, S., Shimakita, T. and Takehara, T.: Rapid LED-based fluorescence microscopy distinguishes between live and dead bacteria in oral clinical samples. *Biomed Res.* 31: 21-26, 2010.

Masakiyo, Y., Yoshida, A., Shintani, Y., Takahashi, Y., Ansai, T. and Takehara, T.: The identification of genes specific to *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* using genomic subtractive hybridization. *Anaerobe* 16: 265-269, 2010.

Yoshida, A., Yoshimura, M., Ohara, N., Yoshimura, S., Nagashima, S., Takehara, T., Nakayama, K.: Hydrogen sulfide production from cysteine and homocysteine by periodontal and oral bacteria. *J Periodontol.* 80:1845-1851, 2009.

Tachibana-Ono, M., Yoshida, A., Kataoka, S., Ansai, T., Shintani, Y., Takahashi, Y., Toyoshima, K. and Takehara, T.: Identification of the genes associated with a virulent strain of *Porphyromonas gingivalis* using the subtractive hybridization technique. *Oral Microbiol. Immunol.* 23:84-87, 2008.

[学会発表] (計 17 件)

高橋優介、吉田明弘、新谷泰之、粟野秀慈、安細敏弘 : マウス膿瘍形成における *Streptococcus anginosus*  $\beta$ -CS liase 遺伝子の発現解析. 第 70 回九州歯科学会総会(北九州) (2010) (九州歯会誌 64 : 139, 2010) .

正清義朗、吉田明弘、高橋優介、安細敏弘 : *Streptococcus mutans* の生菌と死菌/損傷菌を区別した定量検出法の開発. 第 59 回日本口腔衛生学会・総会(新潟) 2010 年 10 月 7-8 日.

高橋優介、吉田明弘、粟野秀慈、安細敏弘 : 生菌・死菌を区別した根管細菌の定量検出法の開発. 第 59 回日本口腔衛生学会・総会(新潟) 2010 年 10 月 7-8 日.

Yoshida, A., Takahashi, Y., Nagata, E., Hoshino, T., Oho, T., Awano, S. and Ansai, T.: *Streptococcus anginosus*  $\beta$ -CS lyase gene expression and experimental abscess formation.

第 88 回 IADR (July 14-17, 2010, Centre Convencions Internacional Barcelona).

吉田明弘 生菌と死菌/損傷菌を区別した定量的口腔細菌検出法の開発.

第 82 回日本細菌学会総会 (平成 21 年 3 月 12 日、13 日、14 日 名古屋国際会議場).

Takahashi, Y., Yoshida, A., Shintani, Y., Masakiyo, Y., Awano, S., Ansai, T. and Takehara, T.: Quantitative analysis of *Streptococcus anginosus* *lcd* gene expression in the tongue coat. ISBOR 2009 (Germany).

Shintani, Y., Yoshida, A., Takahashi, Y., Masakiyo, Y., Awano, S., Ansai, T. and Takehara, T.: *Porphyromonas gingivalis* *mgI* gene expression in the tongue coat. ISBOR 2009 (Germany).

高橋優介、吉田明弘、正清義明、安細敏弘、粟野秀慈、新谷泰之、竹原直道 : 蛍光染色フイルタ法を用いた根管細菌の迅速定量. 第 31 回日本口腔衛生学会九州地方会総会(九州歯科大学講堂) (2009).

Yoshida, A., Awano, S., Ansai, T., Masakiyo, Y., Teratani, G., Soh, I., Hamasaki, T. and Takehara, T.: The prevalence of periodontopathic bacteria in patients with chronic kidney disease. The 9th World Congress on Preventive Dentistry, Phuket, Thailand, September 7-10, 2009.

吉田明弘 : 口腔細菌のクオラムセンシングとバイオフィーム形成. シンポジウム「バイオフィーム研究の最前線 : 制御を目指して」. 第 61 回日本生物工学会大会. (名古屋大学) 名古屋. 2009 年 9 月 23 日、24 日、25 日.

高橋優介、吉田明弘、正清義明、安細敏弘、粟野秀慈、新谷泰之、竹原直道 : 蛍光染色フイルタ法を用いた根管細菌の迅速定量. 第 31 回日本口腔衛生学会九州地方会総会(九州歯科大学講堂) (2009).

吉田明弘 : う蝕細菌のクオラムセンシング. シンポジウム「細菌の生存戦略をめぐるあらたな展開」.

第 82 回日本生化学会大会. (2009 年 10 月 21 日、22 日、23 日、24 日 神戸ポートアイランド・神戸.)

吉田明弘、安細敏弘 :

*Streptococcus gordonii* と共培養時における *Streptococcus mutans* バイオフィルムでの遺伝子発現

第 81 回日本細菌学会総会. (国立京都国際会館) 京都. 2008 年 3 月 24 日、25 日、26 日.

Yoshida, A., Kuramitsu, H.K. and Takehara, T.:

Transcriptional Profiling of *Streptococcus mutans* Biofilms Co-cultured with *Streptococcus gordonii*.

86th General Session & Exhibition of the IADR, Metro Toronto Convention Centre, ON, Canada, July 2-5, 2008

吉田明弘、安細敏弘 :

*Streptococcus gordonii* 存在下における *Streptococcus mutans* バイオフィルムでの遺伝子発現

第 50 回歯科基礎医学会学術大会・総会.(TOC 有明コンベンションホール) 東京. 2008 年 9 月 23 日、24 日、25 日

新谷泰之、吉田明弘、高橋優介、正清義朗、栗野秀慈、安細敏弘、竹原直道 :

舌苔における口臭関連遺伝子の発現解析

第 57 回日本口腔衛生学会総会. (大宮ソニックスシティ) 埼玉. 2008 年 10 月 2 日、3 日、4 日

正清義朗、吉田明弘、安細敏弘、新谷泰之、高橋優介、竹原直道 :

蛍光染色フィルタ法を用いた口腔細菌の迅速定量

第 57 回日本口腔衛生学会総会. (大宮ソニックスシティ) 埼玉. 2008 年 10 月 2 日、3 日、4 日

[図書] (計 5 件)

栗野秀慈、吉田明弘、邵 仁浩、安細敏弘 :  
必修 臨床研修歯科医ハンドブック (平成 22 年度版)、医歯薬出版、東京、2010.

竹原直道 :

衛生学・公衆衛生学.宮武光吉,渡邊達夫ほか編、医歯薬出版,東京,2008.

第 17 章 高齢者保健 (p.211-p.216).

中山二郎、吉田明弘 :

2. グラム陰性細菌のクオラムセンシングとバイオフィルムの関係を利用した抗菌剤の

可能性 (p.264-p.277).

『バイオフィルムの基礎と制御』

第 2 編 応用編 1 形成防止、除去技術、第 2 章 バイオフィルム形成防止具体事例、第 4 節 バイオフィルム形成阻害剤  
株式会社エヌ・ティー・エス、東京、2008.

竹原直道 :

第 IV 部 基礎編, 第 9 章 う蝕の歴史. (231 p -236 p)

田上順次ら編: う蝕学—チェアサイドの予防と回復のプログラム—.

永末書店, 京都,2008.

栗野秀慈、吉田明弘 :

今日からはじめる! 口腔乾燥症の臨床—この主訴にこのアプローチ—

安細敏弘、柿木保明 編集、医歯薬出版、東京、2008 年

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

<http://www.kenkoyobou.net/college/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹原 直道 (TAKEHARA, TADAMICHI)

九州歯科大学・歯学部・教授

研究者番号:00038879

(2) 研究分担者

吉田 明弘 (YOSHIDA, AKIHIRO)

九州歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号:20364151

安細 敏弘(ANSAI, TOSHIHIRO)  
九州歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号:2036415180244789

粟野 秀慈(AWANO, SHUJI)  
九州歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号:20301442

邵 仁浩(SOH, INHO)  
九州歯科大学・歯学部・助教  
研究者番号:10285463

(3)連携研究者  
( )

研究者番号: