

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592181

研究課題名（和文） 臨床応用を目指した新規口腔バイオフィーム抑制薬の開発

研究課題名（英文） Development of novel drugs to control oral biofilms towards clinical application

研究代表者

加藤 裕久 (KATO HIROHISA)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：60152740

研究成果の概要（和文）：シイタケ抽出液はう蝕原細菌のバイオフィーム量を濃度依存的に阻害した。一方、細菌の浮遊細胞の成長には影響を与えなかった。このバイオフィーム形成活性は、シイタケの子実体の収穫直後より、収穫して数日経て産生されることが示唆された。また、シイタケ抽出液が *S. mutans* の水溶性グルカンの合成酵素の酵素活性を阻害することがわかった。これらの結果は、シイタケおよび関連キノコ由来分子をう蝕発生抑制効果薬として臨床応用できる可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：The Shiitake extracts inhibited the biofilm formation of *Streptococcus mutans* in dose dependent manner. By contrast, the extracts did not affect the growth of the planktonic bacterial cells. It was suggested that the effective components are produced in time dependent manner. In addition, it was elucidated that the enzymatic activity of *S. mutans* glycosyltransferases was inhibited by the Shiitake extracts. These results revealed the possibility that the effective materials from Shiitake and related species might be clinically available as drugs to reduce dental caries.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2008 年度 | 2,600,000 | 780,000 | 3,380,000 |
| 2009 年度 | 500,000 | 150,000 | 650,000 |
| 2010 年度 | 600,000 | 180,000 | 780,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：バイオフィーム、酵素、う蝕、歯周病

1. 研究開始当初の背景

Streptococcus mutans や *Streptococcus sobrinus* はう蝕を誘発する能力があり、う蝕の原因菌とされている。両連鎖球菌ともヒトに存在するが、特に *S. mutans* は口腔中に広く存在することが知られている。

一方、筆者らは、これらの細菌が口腔中に付着するための因子や、またバイオフィームを形成する因子の研究を続けている。これらの因子は病原性因子に属すと考えられている。これらの因子として、粘着性の付着物質のグルカン、それを産生するグルカン合成酵

素、細胞表面タンパク質で初期付着に関与する因子 AgI/II などが知られている。

う蝕原性に関係する付着因子グルカンは非水溶性 α グルカンであり、シイタケ抽出液中に α グルカナーゼ活性があることが共同研究者らにより報告されてきた。

一方、レンチナンはシイタケ由来の β グルカンであり免疫賦活薬として知られている。共同研究者らは健康食品開発にも参加しており、シイタケ由来物質による免疫作用、抗アレルギー作用、コレステロール値改善、血糖値改善、骨粗鬆症予防などにも興味を有し、その点でも筆者と共同の作業をしていた。免疫作用関係以外の方向として、う蝕原性細菌の抑制効果を調べることを考えるようになった。

歯周病の原因菌の一つと目される *Porphyromonas. gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* についても口腔内バイオフィームに影響する因子の研究を開始しており、この菌に対する抑制薬の可能性についても検討を始めている。

2. 研究の目的

バイオフィーム形成の基礎解析をし、その解析を通じて、新規口腔バイオフィームの抑制薬を開発することを目的とする。

バイオフィーム抑制に関係するいろいろな物質を調べ、また、効果のある抑制薬候補物質については、その抑制にいたるメカニズムの詳細な解析を行うこと、バイオフィーム形成との関わりを研究することも目的の一つである。

3. 研究の方法

零下 80 度に保存したシイタケを数日室温にもどし、種々のバッファー中零度でホモジナイズする。その後フィルターを通し粗抽出画分とする。

う蝕原性細菌を 96 穴プレート上、スクロース存在下、非存在下など種々の条件で生育した後、培養上清を捨て、洗浄後、プレートに付着した細菌層に種々の条件でシイタケ抽出液を添加し、そのバイオフィーム分解能を測定する。残存するバイオフィーム層をクリスタルバイオレットで染色し洗浄後、メタノールで脱色し、その液を比色計で測定し、バイオフィーム分解能を評価する。

また、共焦点レーザー顕微鏡によってバイオフィーム形成能を視覚的に確認している。

様々な条件下での菌体より mRNA を抽出し、PCR 法で病原性に関与する遺伝子群など、発現状態を定量的に解析している。

その他、 α グルカンを調整し粗抽出液中のグルカナーゼ活性を測定した。

4. 研究成果

シイタケから得た抽出液はデキストラナーゼ存在下で、濃度依存的に *Streptococcus mutans* や *S. sobrinus* のバイオフィーム形成 (0.5%スクロース存在下) を阻害することが判明した。

また、シイタケだけでなく他のキノコ類にも程度の差はあるが、類似の傾向がみられた。しかし、両連鎖球菌共に、有意に形成を阻害するという観点からはシイタケが優れていることがわかった。一方、シイタケ抽出液は、それらの細菌の浮遊細胞の成長には影響を与えなかった。

このバイオフィーム形成抑制活性は 65 度以上の加熱で失活することから、タンパク質性の因子であることが示唆された。また、シイタケ子実体を収穫直後のものより、5日室温放置したものから抽出したほうが、バイオフィーム形成をはるかに強く抑制することがわかった。臨床応用するには、収穫して数日経ったものからの方が効率的であると考えられた。

これらのことからシイタケ及び関連するキノコ類からの抽出液が口腔細菌のバイオフィーム形成抑制薬として発展しうる可能性があると考えられた。

その後の解析により、同抽出液が *S. mutans* の水溶性グルカン合成酵素活性を阻害すること、さらに、*S. mutans* において同酵素の遺伝子発現が抑えられていることが判明した。また、この菌の初期付着に関与する細胞表面タンパク質である AgI/II の発現、グルカンへの付着に重要なグルカン結合タンパク質など、バイオフィーム形成に必要な遺伝子群の発現が抑制されていることが示唆された。

その他の遺伝子発現には影響しないものが多く、浮遊細胞の増殖には影響しない。現在、解析を継続中である。

また、歯周病の病原性があるとされる *P. gingivalis*, *F. nucleatum* の研究ではインドールの影響を調べた。インドールは、酵素トリプトファナーゼにより、トリプトファンから合成される。これらの菌より、トリプトファナーゼ遺伝子を単離し、その酵素活性、遺伝子制御の様子、その他、インドールのバイオフィームへの影響を解析した。

その結果、インドールが、特に *F. nucleatum* のバイオフィーム形成を促進するなど大きく影響することがわかった。インドールは酵素トリプトファナーゼによりトリプトファンから合成されるためトリプトファナーゼの遺伝子単離、その転写制御を詳細に調べた。また組換えタンパク質を用い、その酵素活性を検討し、Km 値、Kcat 値を測定した。

インドールやトリプトファンは同菌のバイオフィーム形成を促進すること、インドー

ルは菌間での情報伝達に係わる分子で、色々な遺伝子の発現制御にかかわることが示唆された。

インドールは悪臭の原因物質の一つであり、口臭の対策としても考慮すべき物質である。また、歯周病患者の口腔ではインドール産生が高いことが知られている。本研究で口腔細菌のバイオフィーム形成にも影響しうることが示唆された。これらは今後他の歯周病の原因菌においても調査する必要があると思われ、これらの菌の制御にもつながる可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

1. A. Yano, S. Kikuchi, Y. Yamashita, Y. Sakamoto, Y. Nakagawa, Y. Yoshida : The inhibitory effects of mushroom extracts on sucrose-dependent oral biofilm formation. *App. Microbiol. Biotechnol.* 86 :615-623 (2010), 査読あり.
2. Y. Yoshida, S. Ito, M. Kamo, Y. Kezuka, H. Tamura, K. Kunimatu and H. Kato : Production of hydrogen sulfide by two enzymes associated with biosynthesis of homocysteine and lanthionine in *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586. *Microbiol.* 156 : 2260-2269 (2010), 査読あり
3. T. Sasaki-Imamura, A. Yano and Y. Yoshida : Production of indole from L-tryptophan and the effects of these compounds on biofilm formation by *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586. *Appl. Environ. Microbiol.* 76 : 4260-4268 (2010), 査読あり.
4. Y. Kezuka, Y. Yoshida and T. Nonaka : Crystallization and preliminary X-ray analysis of β C-S lyases from two oral streptococci. *Acta. Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* F65:874-877 (2009), 査読あり.

[学会発表] (計 10 件)

1. K. Suwabe, Y. Yoshida, D. Sasaki, F. Yoshimura, K. Kunimatsu : Identification and characterization of novel enzymes associated with hydrogen sulfide production in

Fusobacterium nucleatum. 50th General Session and 1st International Congress of the KAP, Nov. Seoul (2010)

2. 今村隆子、吉田康夫、加藤裕久 : *Prevotella intermedia* ATCC 25611 におけるインドール産生能の解明. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会、2010 年 9 月 (東京)
3. T. Sasaki-Imamura, Y. Yoshida, A. Yano, and H. Kato : Production of indole that increases biofilm formation of *Fusobacterium nucleatum*. 88th General Session & Exhibition of the IADR, June. Barcelona (2010)
4. 伊東俊太郎、吉田康夫、須和部京介、國松和司 : カテキンによる揮発性硫化物の抑制効果. 第 53 回春季日本歯周病学会学術大会、2010 年 5 月 (盛岡)
5. 須和部京介、吉田康夫、伊東俊太郎、田村晴希、國松和司、加藤裕久 : *Fusobacterium nucleatum* においてシステイン合成酵素は硫化水素産生に関与する. 第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月 (横浜)
6. 佐々木隆子、吉田康夫、田村晴希、加藤裕久 : *Fusobacterium nucleatum* のインドール産生能の解明. 第 51 回歯科基礎医学会学術大会、2009 年 9 月 (新潟)
7. 伊東俊太郎、吉田康夫、田村晴希、須和部京介、國松和司、加藤裕久 : *Fusobacterium nucleatum* における 2 つの硫化水素産生酵素. 第 51 回歯科基礎医学会学術大会、2009 年 9 月 (新潟)
8. S. Ito, Y. Yoshida, T. Sasaki, K. Kunimatu, H. Kato : Molybdenum ion inhibits the production of volatile sulfur compounds. 87th General Session & Exhibition of the IADR, Apr. Miami, Fla. (2009)

[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]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 裕久 (KATO HIROHISA)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号：60152740

(2) 研究分担者

吉田 康夫 (YOSHIDA YASUO)
愛知学院大学・歯学部・准教授
研究者番号：10315096

(3) 連携研究者

なし