

機関番号：81202
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21792165
 研究課題名（和文） 食用担子菌由来口腔バイオフィーム制御因子の解明
 研究課題名（英文） Study of oral biofilm inhibitors from edible mushroom
 研究代表者
 矢野 明（YANO AKIRA）
 財団法人岩手生物工学研究センター・生物資源研究部・主席研究員
 研究者番号：50312286

研究成果の概要（和文）：食用担子菌、特に「しいたけ」子実体のカサの部分の水溶性抽出物に、*Streptococcus mutans* のバイオフィーム形成阻害活性を確認した。その作用として、水溶性グルカン合成、グルカン合成遺伝子の発現、バイオフィーム関連シグナル遺伝子発現等が抑制されることを見いだした。特に、バイオフィーム形成の引き金の一つと考えられている *comC* 遺伝子の発現抑制が起きていることを見いだした。

研究成果の概要（英文）：We found the inhibitory effects of water-soluble extracts from edible mushroom, especially "*Lentinula edodes*", on sucrose-dependent biofilm formation by *Streptococcus mutans*. The extracts inhibit the water-soluble glucan synthesis by glucosyltransferase (GTF), expression of *gtf* genes and signaling genes related to the biofilm formation. We found the strong suppression of the quorum-sensing peptide gene, *comC*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：予防歯科学

1. 研究開始当初の背景

担子菌の細胞壁、特にシイタケの細胞壁には、多量の -1,3-グルカンが含まれている事が 1970 年代初期に報告されている。シイタケ等には グルカンを合成する能力があると同時に、このグルカンを含む細胞壁を分解、弛緩、変形させるための複数の因子を有すると考えられた。この グルカンは、齲蝕細菌として知られる *Streptococcus mutans* がバイオフィーム形成時にスクロースから合成する菌体外多糖の主要成分であるこ

とから、シイタケ等が有するグルカン関連因子が、*Streptococcus mutans* のバイオフィームに作用することが考えられた。

2. 研究の目的

我々は、シイタケをはじめとする食用担子菌から齲蝕の原因となるバイオフィーム形成を抑制、あるいは分解する成分を見だし、キノコ類の抽出物を新しい齲蝕予防素材として活用するための基盤研究を進めることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) シイタケをモデルとして、菌糸培養物、子実体軸、子実体傘、子実体収穫後の自己融解過程等について、水溶性抽出物を調整し、ミュータンスレンサ球菌のスクロース依存性のバイオフィーム形成阻害活性、分解活性を調べた。

(2) 一般的なクロマトグラフィーによる手法を用いて、バイオフィーム阻害因子の精製作業を実施した。また、近縁の担子菌ゲノム配列からバイオフィームに関連する事が予想される複数の遺伝子のクローニングを行った。

(3) バイオフィーム形成阻害作用について、抗菌活性、グルカン合成阻害活性、グルカン分解活性を検討し、バイオフィーム関連遺伝子の発現への影響について解析を行った。

4. 研究成果

(1) 菌糸培養物中にデキストラナーゼ様のバイオフィーム分解活性を認めたが、活性は強いものではなかった。子実体中にも一定の分解活性を認めた。

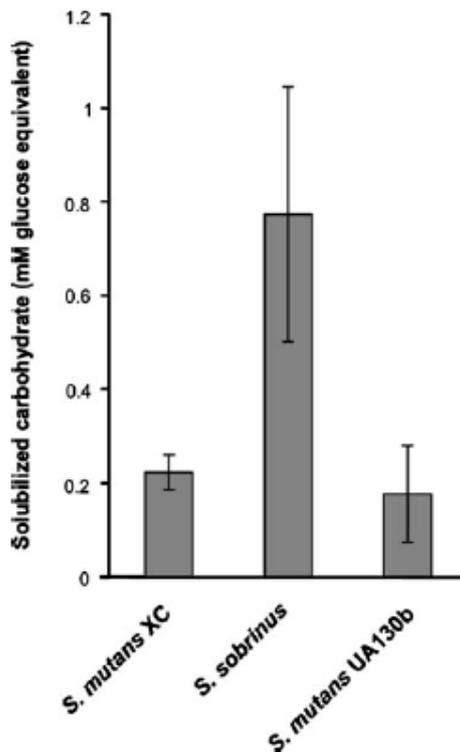


図 1. *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus*, *S. mutans*UA130b (gtfCD ftf 欠損株) の菌体外多糖を基質として、シイタケ子実体水抽出物の 70% 硫酸沈殿サンプルを粗タンパク質量として 200 μ g/ml を 37 $^{\circ}$ C, 2 時間反応させて生じた糖の量を測定。水溶性多糖が多いと考えられる *S. sobrinus* 由来菌体外多糖が良く分解された。

しかしながら、子実体サンプル間で多糖分解活性のばらつきが大きく、活性を誘導する適切な条件は見いだす事ができなかった。

一方で、子実体傘の水溶性抽出物中には、デキストラナーゼと協同して働く、強いバイオフィーム形成阻害活性が認められた。

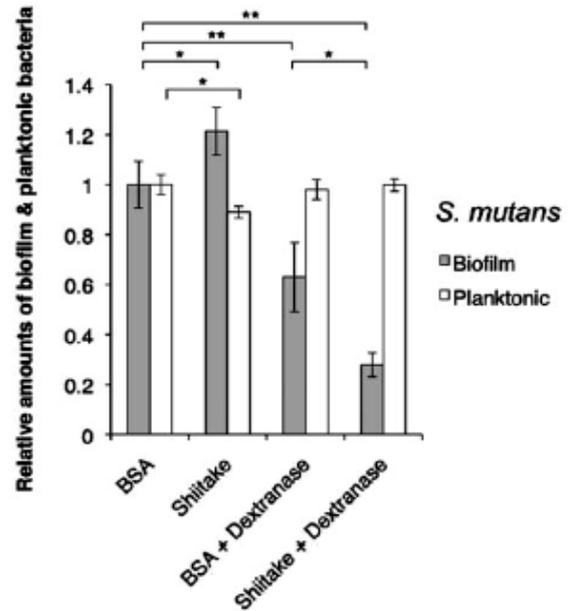


図 2. 図 1 と同じシイタケサンプル単独、又はデキストラナーゼと同時に *S. mutans* の培養液に加え、0.5%スクロース存在下でバイオフィーム形成を行った。シイタケサンプル単独ではバイオフィーム形成が阻害されなかったが、デキストラナーゼ存在下では強いバイオフィーム形成阻害が起きた。浮遊細菌の増殖には影響がなかった。

子実体柄には同様のバイオフィーム形成阻害活性が認められず、傘のみに活性が認められた。阻害活性は 65 $^{\circ}$ C, 10 min の熱処理によって失活した。

50kDa 以下の分子に活性が認められないこと、硫酸沈殿処理により回収可能なことなどから、子実体傘に存在するタンパク質がバイオフィーム形成を阻害していると考えられた。

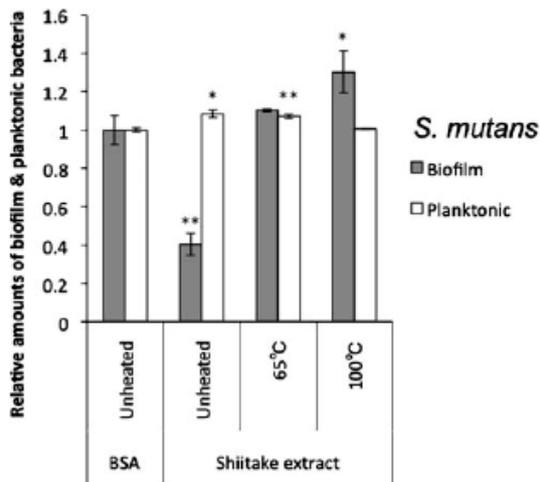


図 3. 図 1 と同じシイタケサンプルを使用してバイオフィーム形成阻害実験を行った。活性は 65 又は 100 ,10min の熱処理により消失した。

(2) 上記タンパク質因子について、精製作業を実施した。これまでの実験から、グルカナーゼの一種が目的タンパク質と考えられたが、精製過程において、*S. mutans* の菌体外多糖を基質とする、明確な活性は認められなかった。

そこで、バイオフィームの形成阻害活性を指標として精製を進めたところ、工程が進むにつれ比活性が減弱することがわかった。おそらく、複数の因子の複合的な作用によりバイオフィーム形成が阻害されていると考えられる。

一方で、ゲノム情報が公開されている担子菌や麹菌、酵母など真核微生物のアミノ酸配列情報を元に、シイタケ cDNA ライブラリーより グルカナーゼ様のタンパク質をコードしている遺伝子を複数クローニングした。これらを麹菌を宿主として発現させたが、グルカナーゼ活性は認められなかった。

そこで、シイタケ以外の食用担子菌数種を材料に、バイオフィーム形成阻害活性を調べた。

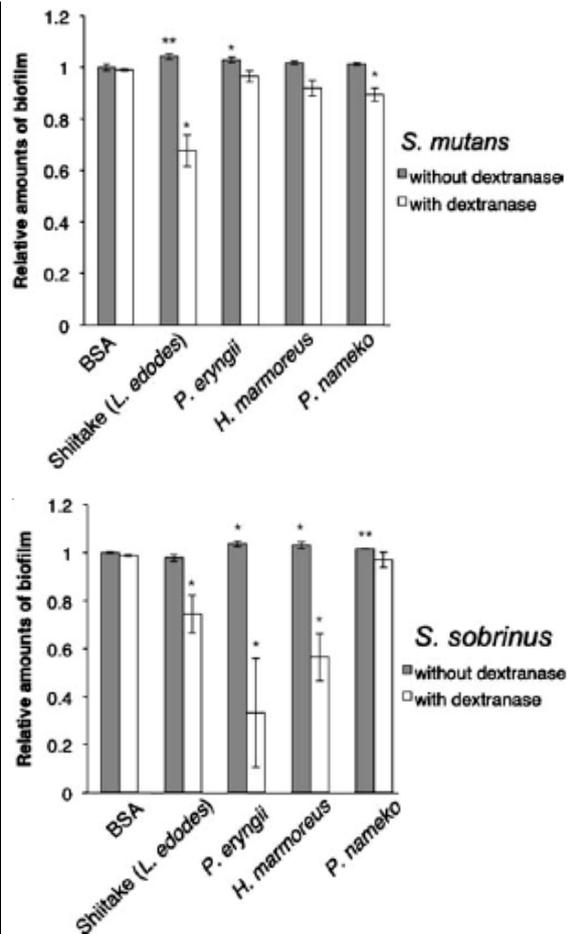


図 4. シイタケ、エリンギ、ブナシメジ、ナメコの子実体抽出物の、*S. mutans* および *S. sobrinus* のバイオフィーム形成阻害活性を測定した。シイタケ抽出液は *S. mutans* のバイオフィーム形成阻害活性がみられたものの、他のキノコ抽出物中には有意な活性が認められなかった。*S. sobrinus* のバイオフィーム形成阻害はエリンギ、ブナシメジなどのキノコ抽出物にも活性が確認できた。

(3) 子実体抽出物に *S. mutans*, *S. sobrinus* に対する抗菌活性は認められなかった。そこで、バイオフィーム形成阻害作用の一つとして知られる、グルカン合成酵素の阻害活性を調べた。その結果、主に水溶性グルカンの合成活性が強く阻害されていることが明らかとなった。

さらに、バイオフィーム中のグルカン合成酵素遺伝子、グルカン結合遺伝子等の発現を real-time quantitative PCR 法にて調べたところ、合成酵素、結合因子等が一樣に発現抑制されていることが判明した。RNA レベルでは、バイオフィームシグナルの伝達因子として知られる *vicRK* 等の二成分系遺伝子の発現、さらにクオラムセンシングシグナルの一つ、*comC* の発現も抑制されていることが判明した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Yano A, Kikuchi S, Yamashita Y, Sakamoto Y, Nakagawa Y, Yoshida Y. The inhibitory effects of mushroom extracts on sucrose-dependent oral biofilm formation. Appl Microbiol Biotechnol, 査読有り, (2010) 86:615-623.

[学会発表](計4件)

矢野 明、菊地明香、斎藤絵里奈、金野尚武、坂本裕一「担子菌抽出成分の口腔バイオフィルム形成阻害効果」日本農芸化学会大会 2010 (東京)

Yano A, Yoshida Y, Kikuchi S, Sakamoto Y, Nakagawa Y, Kato H. The inhibitory effects of mushroom extracts on oral biofilm formation. 87th General Session & Exhibition of the International Association for Dental Research. Miami, Florida (2009).

Yano A, Kikuchi S, Yoshida Y. The water-soluble mushroom extracts perturb the biofilm formation. 58th Annual Meeting, Japanese association for Dental Research, Kitakyushu (2010).

矢野 明、菊地明香、山田秀俊「シイタケ抽出成分によるムータンスレンサ球菌のバイオフィルム形成阻害機構の解析」日本農芸化学会 2011 年度大会、京都 (2011).

6. 研究組織

(1)研究代表者

矢野 明 (YANO AKIRA)
財団法人岩手生物工学研究センター・生物資源研究部・主席研究員
研究者番号：50302286