

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：32710

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659992

研究課題名(和文) 歯石形成機序に関する分子疫学的解析：患者唾液中の細菌とナノバクテリアの役割

研究課題名(英文) The molecular epidemiologic analysis of the mechanism of calculus formation: Role of the bacteria exist in saliva

研究代表者

山田 秀則 (YAMADA, HIDENORI)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：60240032

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：Corynebacterium matruchotiiはバイオフィルムの石灰化に重要な役割を果たしている。しかし、C. matruchotiiと歯石沈着の関連における疫学調査や臨床データが少ない。その理由は、C. matruchotiiの簡便な検出方法が存在しないためである。本研究では、C. matruchotiiの簡便な検出方法の確立を目指した。C. matruchotiiの分子疫学調査に利用できる比較的安価で特異的な抗原を抽出した。C. matruchotiiのカルシウム結合タンパク質は20種類存在し、そのタンパク質の多くは酸性タンパクであることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Corynebacterium matruchotii plays an important role in calcification of the biofilm. However, there are few epidemiological survey and clinical data in the association between C. matruchotii and calculus deposition. Because, a simple immunological detection method of C. matruchotii has not been developed. In this study, we aimed to find a specific antigen of C. matruchotii. The antigen will work for development of an immunological detection method. Twenty types of calcium-binding membrane proteins of C. matruchotii were isolated in this study. Those membrane proteins can be classified into acid proteins.

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：社会系歯学

キーワード：石灰化 口腔細菌 歯石 コリネバクテリウム グラム陽性桿菌 界面活性剤

1. 研究開始当初の背景

グラム陽性桿菌の一種である *Corynebacterium matruchotii* (*C. matruchotii*) は、バイオフィルムの核の形成において中心的な役割を果たしている。*C. matruchotii* は、菌体表面にリポタンパクを沈着させる。歯石の主成分であるハイドロキシアパタイトの核を成長させるとされている。しかし、*C. matruchotii* と歯石沈着や歯周病との関連における疫学調査や臨床データが極端に少ない。その理由は、*C. matruchotii* の簡便で特異的な検出方法が存在しないためである。現在のところ *C. matruchotii* の検出方法は 16S Ribosomal RNA のシークエンスしか方法がなく、臨床疫学調査で用いるには非現実的である。石灰化に関わる膜表面タンパク質を特異抗原として *C. matruchotii* の疫学調査に利用できる比較的安価な特異的な検出方法の基礎データを作製する必要がある。

2. 研究の目的

本研究課題では、*C. matruchotii* の簡便で特異性のある検出方法の確立を目指した。細菌を検出するための抗体作製には細胞内タンパク質ではなく、細胞表面の膜タンパクに対する抗体を作製する必要がある。その目的のために *C. matruchotii* から石灰化に関わる膜表面タンパク質を発見抽出することを目的とした。

3. 研究の方法

C. matruchotii を培養し、膜タンパクの抽出を行った。抽出には各種界面活性剤を使用し、SDS 電気泳動で結果の判定を行った。膜タンパク質のカルシウム結合能の観察にはカルシウムの定量の他に電子顕微鏡を用いた。

4. 研究成果

平成 23 年度においては、タンパク質の抽出方法を中心に検討を行った。膜タンパクの抽出には界面活性剤が必要であるが、多くの界

面活性剤は *C. matruchotii* と結合することにより沈殿を形成してしまいタンパク質の可溶化ができなかった。多くの界面活性剤をスクリーニングし膜タンパクの可溶化に成功した。平成 24 年度においてはタンパクの抽出方法を改良し、さらに効率よく膜タンパクの抽出方法を見出した。平成 25 年度では、抽出した膜タンパク質の成分分離を行い、カルシウムに結合するタンパク質の分離を行った。分離の結果 *C. matruchotii* から抽出したタンパク質は SDS 電気泳動の結果大きく 20 種類存在し、そのタンパク質の多くは酸性タンパクであることが明らかとなった。さらにこれらのタンパク質の石化化能を電子顕微鏡にて観察した結果、これらのタンパク質がハイドロオキシアパタイトと思われる結晶に強く結合していることが明らかとなった。

現在、鶴見大学附属病院で実施している 3DS 除菌外来で応用するとともに、今後さらにこの研究を進展させて、石灰化に関与するタンパクを様々な方法で分離の精度を向上させ、モノクローナル抗体の作製、疫学研究への利用へと展開してゆく予定である。

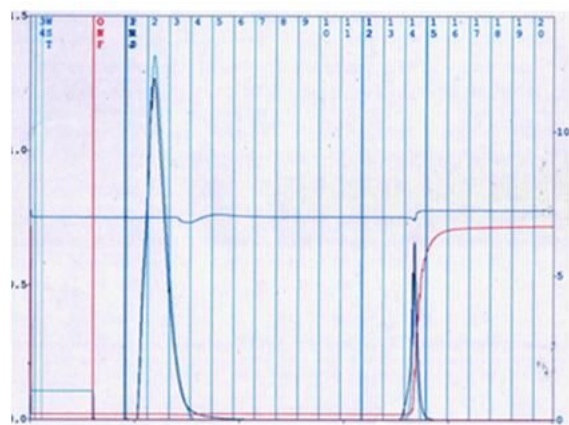


図1 *C. matruchotii* から抽出したタンパク質をカルシウム結合と非結合フラクションに分離したクロマトグラフィーチャート
ハイドロオキシアパタイトカラムを使用
溶出は 1 M K_2PO_4 (pH7.4)

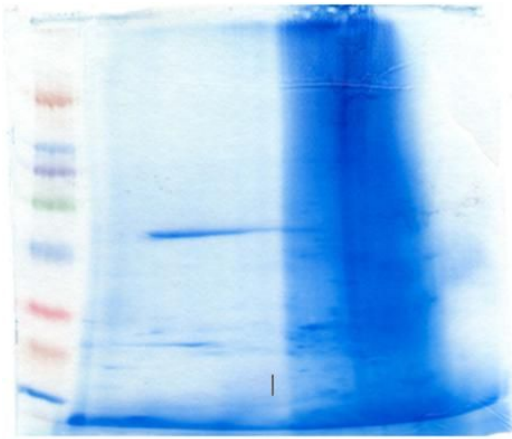


図 2 *C. matrucotii* からの抽出タンパクの 2次元電気泳動像
 低分子を中心に酸性、塩基性のタンパクが広く分布している。図の左よりが塩基性タンパク質、右よりが酸性タンパク質

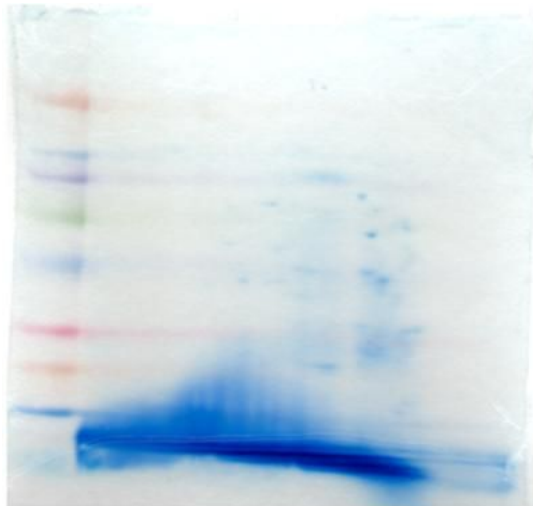


図 3 *C. matrucotii* からの抽出タンパクからカルシウム結合フラクションに分離したタンパク質の 2次元電気泳動像
 図 2 と同様に図の左よりが塩基性タンパク質、右よりが酸性タンパク質
 スポットの多くは右よりに分布しており酸性タンパク質が多いことがわかる。

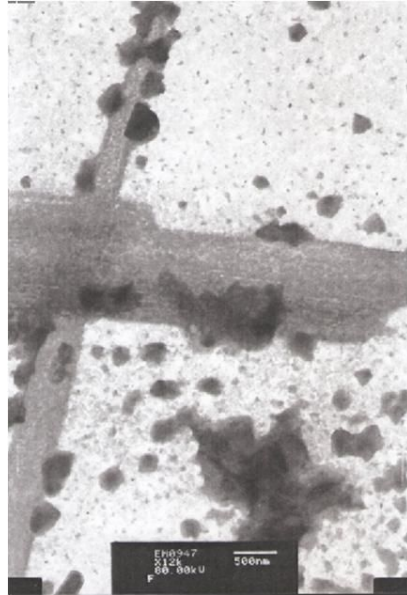


図 4 *C. matrucotii* からの抽出タンパクからカルシウム結合フラクションに分離したタンパク質による石灰化像の電子顕微鏡による観察
 結晶構造は大きくタンパク質が結晶に付着しているのがわかる。

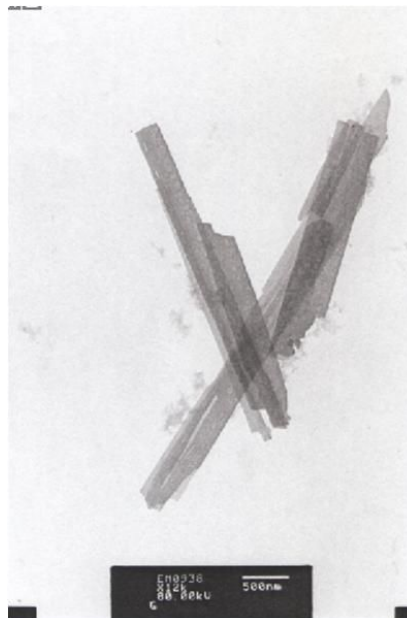


図 5 *C. matrucotii* からの抽出タンパクからカルシウム非結合フラクションに分離したタンパク質による石灰化像の電子顕微鏡による観察
 図 4 と比較して結晶構造は小さくタンパク質が結晶にほとんど付着していないのがわかる。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

角田 衣理加、山田 秀則、岡田 彩子、
宮之原 真由、阿保 備子、村田 貴俊、
武内 博朗、野村 義明、花田 信弘。全
身的な健康から歯科を考える“予防医科”
としての概念の歯科へ『3DS 除菌外来の試
み』(第1報)

第63回日本口腔衛生学。2014年05月
29日～31日。熊本市民会館(熊本県)

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 秀則 (YAMADA, HIDENORI)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：60240032

(2)研究分担者

花田 信弘 (HANADA, NOBUHIRO)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：70180916

野村 義明 (NOMURA, YOSHIAKI)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：90350587

今井 奨 (IMAI, SUSUMU)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：80072958