

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792027

研究課題名(和文) ミュータンス連鎖球菌の糖輸送関連遺伝子がバイオフィーム形成に与える影響について

研究課題名(英文) The effects of gene associated with sucrose phosphotransferase system on biofilm formation of *Streptococcus mutans*

研究代表者

木村 智子 (KIMURA, Tomoko)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・助教

研究者番号：20581367

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：う蝕(虫歯)原因菌として知られる *Streptococcus mutans* の重要な病原因子である酸産生に深く関与する *scrA* 遺伝子とバイオフィーム形成との関係を検討するために、まず *scrA* 遺伝子と菌の初期付着との関係について ELISA 法にて解析を行った。その結果、*scrA* 遺伝子が菌の初期付着に影響を及ぼしていることが示された。また、バイオフィームの構成成分であるグルカンの合成量を測定し比較検討したところ、*scrA* 遺伝子がグルカン合成に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to investigate the involvement of *scrA* gene deeply related to the acidogenic activity in cariogenic bacterium in the initial adhesion and glucan synthesis by *Streptococcus mutans*. ELISA assay revealed that *scrA* gene had an effect on the initial adhesion. The measurement of glucan demonstrated that *scrA* gene involved in the synthesis of glucan, a component of biofilm.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：歯学 う蝕 細菌 遺伝子 バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

口腔常在菌の一つである *Streptococcus mutans* はう蝕原因菌として知られている。う蝕は口腔バイオフィーム感染症と考えられており、歯面に定着した細菌はスクロースを基質として非水溶性グルカンを合成し、バイオフィームを形成する。バイオフィームは強固に歯面に付着し、さらに細菌が産生する酸を貯留させるため、歯表面の持続的な pH の低下を招き、結果として、歯表面を脱灰し、う蝕を惹起する。

現在広く行われているう蝕予防方法、特にホームケア(セルフケア)として実践されている方法は、主に歯ブラシ等の口腔清掃用具によるバイオフィーム(プラーク)の機械的除去である。しかしながら、高齢社会を迎え、要介護高齢者をはじめとするセルフケアが困難な方々が増えつつある現在、従来とはコンセプトを異にする新たなバイオフィームの排除・抑制法を開発し、う蝕予防に応用することは、極めて重要であり、また急務である。

そこで、う蝕の原因菌である *S. mutans* のう蝕病原因子に関わる表現形質に直接アプローチし、その病原性を低下させる方法が存在すれば、う蝕予防あるいはう蝕治療に貢献できるのではないかとこの着想に至った。

具体的な着眼点として、*S. mutans* の重要なう蝕病原因子であるバイオフィーム形成ならびに酸の産生に必須であるスクロースの代謝機構に深く関与する酵素である E^{Scr} に着目した。E^{Scr} は、スクロース輸送機構の一つであるホスホエノールピルビン酸依存ホスホトランスフェラーゼ系(PEP-PTS)において、スクロースを菌体内へ取り込む際に必須な酵素であり、この酵素蛋白をコードする遺伝子が *scrA* である。*scrA* 遺伝子は、スクロース 6 - リン酸加水分解酵素をコードする *scrB* 遺伝子の上位の相補鎖上に存在し(J Bacteriol. 171, 263-271, 1989)、スクロースの存在下で発現が高まることが報告されている(FEMS Microbiol Lett. 63, 339-345, 1991)。

このような報告を元に、*scrA* 遺伝子改変株を作製し、バイオフィームの形態学的解析を行い、*scrA* 遺伝子改変株がつくるバイオフィームは親株のものとは形態学的に異なることを明らかにしてきた。しかし、*S. mutans* の重大なう蝕病原因子であるバイオフィームの形成に *scrA* 遺伝子がどのように関わっているかについては不明な点が多い。したがって、*scrA* 遺伝子とバイオフィーム形成の関係をさらに詳細に検討していくために、歯面への菌の初期付着およびグルカンの結合に関与するタンパク質の発現解析や、合成されたグルカンの量的分析を進めることとした。

2. 研究の目的

本研究の最終的な目的は、*S. mutans* の主な病原因子である酸産生能に深く関わる *scrA* 遺伝子の役割を明らかにし、バイオフィーム形成をはじめとする他の病原因子との関連を解明していくことで、う蝕や歯髄炎の発症メカニズムを探り、従来の方法とは全く異なった新しいう蝕治療法、予防法の開発をすることである。

このような最終目標を前提に、*scrA* 遺伝子がバイオフィーム形成に与える影響について明らかにする。具体的に、まず *scrA* 遺伝子が菌の付着に関与するタンパク質の発現にどのような影響を与えているのかについて明らかにし、次に、グルカン合成との関連性についても明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) 法による PAc の発現解析

S. mutans の菌体表層に存在し、菌が歯面へ付着するのに重要な役割を担うタンパク質 PAc の発現量を、ELISA 法にて測定した。

まず、親株と *scrA* 遺伝子改変株を BHI 液体培地で培養し、対数増殖期の菌を 96 穴プレートに固着させ牛血清アルブミン溶液にてブロッキングした後に、一次抗体として抗 PAc モノクローナル抗体(徳島大学 Eleanor J. Fernandez 博士より恵与予定)を添加して反応させた。その後、二次抗体として HRP マウス抗 IgG 抗体を反応させた後、TMB Peroxidase EIA Substrate Kit (Bio-Rad) を用いて発色させ、波長 450 nm での吸光度を測定した。

(2) 非水溶性および水溶性グルカン合成量の解析

ウシ象牙質板試料の調製およびグルカン合成

ウシ前歯において歯髄および軟組織を除去した歯根部象牙質を用いて、未延の方法(四国歯誌. 18, 161-176, 2005)に準じて、マイクロカッター(マルトー社)により歯軸方向にほぼ平行な約 500 μm の厚さの象牙質板を作製し、これを一定の大きさにトリミングした。

作製した象牙質板を UA159 株および *scrA* 遺伝子改変株の懸濁液に投入して 37 °C にて 48 時間嫌気培養し、象牙質板上にバイオフィームを形成させた。なお、スクロース存在下と非存在下のグルカンの合成量を比較するために、両株ともにスクロースを添加しない懸濁液と 5 % スクロース含有の懸濁液を用

いた。

グルカン合成量の測定

培養後、プレートより象牙質板を取り出し、象牙質板へ付着した非水溶性グルカン、培養液中の非水溶性グルカンと水溶性グルカンに分離した。それぞれを 0.5 N NaOH で溶解させ、遠心後に得られた上清を用いて、フェノール硫酸法にて吸光度の測定を行った。

一方、濃度を規定したグルコース溶液 (0 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml, 150 µg/ml) を用いて、同様にフェノール硫酸法により吸光度を測定して標準曲線を作成した。この標準曲線を用いて、実験で得られた吸光度をグルカン濃度に換算し、各々のグルカン合成量を両菌株と比較検討した。また、スクロースを添加する場合と添加しない場合のグルカン合成量を比較検討した。

なお、徳島大学遺伝子組換え実験安全管理委員会主催の安全取扱講習会を受講し、法令および学内規則を遵守する旨の誓約書を提出しており、本研究内容についても安全管理委員会の承認のもと実施した。

4. 研究成果

(1) ELISA 法による PAc の発現解析

S. mutans の菌体表層に存在し、歯面付着に重要な役割を担う PAc の発現量を、*scrA* 遺伝子改変株および親株を用いて測定したところ、*scrA* 遺伝子改変株では、親株と比較して PAc の発現が有意に低下した (図 1)。

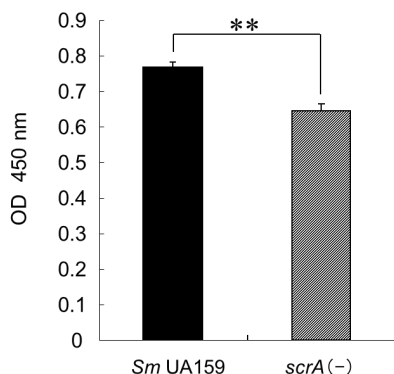


図1 PAc発現量の比較
親株 (Sm UA159) および改変株の対数増殖期の菌の PAc 発現量を、抗 PAc モノクローナル抗体を用いて ELISA 法によって測定した。
** $p < 0.01$; 親株と比較して有意差を認めた。

この結果より、*scrA* 遺伝子が PAc の発現に影響を及ぼし、初期付着に関与している可能性が示唆された。

(2) グルカン合成量の解析

scrA 遺伝子がグルカン合成にどのように関与しているかを解析するため、親株および *scrA* 遺伝子改変株を BHI 液体培地と 5% スクロース含有 BHI 液体培地の 2 種類の培地で培養し、各種グルカン合成量を測定した。

培養上清中の非水溶性グルカンと水溶性グルカン合成量を比較したところ、BHI のみで培養した場合では親株と *scrA* 遺伝子改変株の間に有意な差は認められなかった。一方、5% スクロースを添加した培地で培養した *scrA* 遺伝子改変株のグルカン合成量は親株の合成量に比べて有意に低い値を示した (図 2 A, B)。また、象牙質板に付着した非水溶性グルカン合成量も同様に、スクロース存在下で *scrA* 遺伝子改変株は親株に比べて有意に低い値となった (図 2 C)。

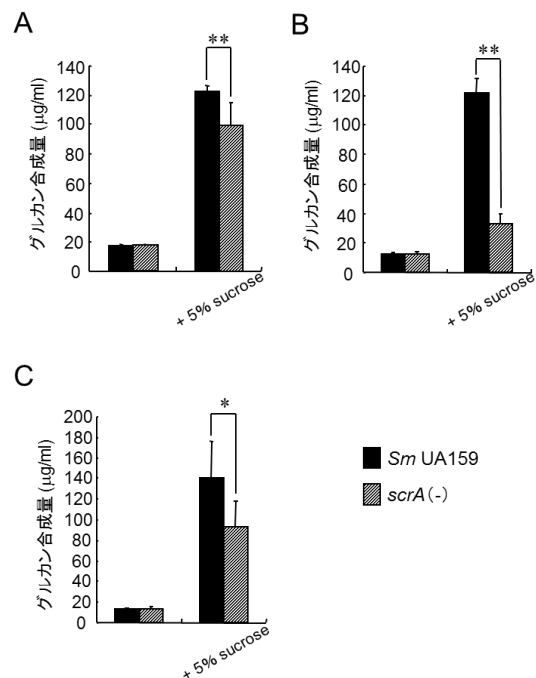


図2 グルカン合成量の比較
BHI液体培地と5%スクロース含有BHI液体培地で培養した親株 (Sm UA159) および *scrA* 遺伝子改変株のグルカン合成量を、フェノール硫酸法にて測定した。
A: 培養上清中の非水溶性グルカン合成量の比較
B: 培養上清中の水溶性グルカン合成量の比較
C: 象牙質板に付着した非水溶性グルカン合成量の比較
* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; 親株と比較して有意差を認めた。

この結果より、*scrA* 遺伝子がグルカンの合成に関与している可能性が示唆された。

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)

[学会発表] (計 1 件)

木村智子, 尾崎和美, 湯本浩通, 村上圭史, 菅原千恵子, 篠原千尋, 武川恵美, 三宅洋一

郎，松尾敬志，河野文昭，*Streptococcus mutans*の病原性における *scrA* 遺伝子の役割，第6回日本総合歯科学会総会・学術大会，2013年11月17日，昭和大学旗の台キャンパス（東京都）

6．研究組織

(1)研究代表者

木村 智子 (KIMURA Tomoko)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号：20581367