

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 9 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460121

研究課題名(和文)植物乳酸菌による口腔内バイオフィーム形成阻害の分子機構の解明

研究課題名(英文)Lb. reuteri BM53-1 inhibits the S. mutans biofilm formation through the alteration of gene expressions

研究代表者

野田 正文 (NODA, MASAFUMI)

広島大学・医歯薬保健学研究院(薬)・特任講師

研究者番号：40457289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マタタビから分離された乳酸菌Lactobacillus reuteri BM53-1は、その培養上清中に、虫歯の起原菌のひとつであるStreptococcus mutansによるバイオフィームの形成を阻害する物質を産生する。本研究では、定量PCR法により、本阻害物質がS. mutansの不溶性グルカン生合成酵素の遺伝子の発現バランスを乱すことで作用していることを明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：We previously isolated the plant-derived lactic acid bacterium (LAB) strain, designated BM53-1, from catmint (*Actinidia polygama*) and identified it as *Lactobacillus reuteri*. The one of the caries causative bacterium *Streptococcus mutans* forms biofilm, and the BM53-1 strain produces anti biofilm-forming activity compound in culture broth. In the present study, it was found that the anti biofilm compound alternates the gene expression balances of *gtf* genes, which are necessary to biofilm formation, by using the quantitative PCR method.

研究分野：分子微生物学

キーワード：プロバイオティクス 乳酸菌 S. mutans バイオフィーム

## 1. 研究開始当初の背景

虫歯(齲蝕)は、歯周病と同様に、「口腔細菌感染症」の1つである。虫歯の起因菌(虫歯菌)として知られる *Streptococcus* (*S.*) *mutans* や *S. sobrinus* は、食物に含まれるスクロースを基質として、口腔内に不溶性多糖( $\beta$ -グルカン)を産生する。この不溶性多糖に周囲の細菌が取り込まれてできた物質が、「バイオフィルム」である。バイオフィルムは、唾液による自浄作用や歯磨きなどでは取り除くことが難しいため、バイオフィルム内に生育している細菌が有機酸を分泌して、pHが局所的に低下することで、虫歯が発症する。

申請者は、文部科学省・都市エリア産学官連携促進事業(発展型)におけるプロジェクト研究(期間:平成20-22年度)の研究担当者として、生活習慣病の予防改善に有効な保健機能性製品の創出と、機能性分子を産生する植物乳酸菌の分離探索研究に携わってきた。樹立した植物乳酸菌ライブラリーに対するスクリーニングの結果として、マタタビから分離した乳酸菌株(BM53-1株)が、*S. mutans* および *S. sobrinus* の不溶性多糖の生成を阻害する物質を産生することを発見した。

*Lactobacillus* (*Lb.*) *reuteri* と同定されたBM53-1株におけるこれまでの研究から、本乳酸菌株の培養上清中に検出されるバイオフィルム形成阻害物質は、水溶性高分子であると推測された。また、粗精製した本阻害物質を添加して *S. mutans* および *S. sobrinus* を培養した場合には、菌体の凝集が抑制されたことから、これら虫歯菌の保有する不溶性多糖合成酵素(glucosyltransferase; GTF)の酵素活性が阻害されている可能性が考えられた。さらに、本阻害物質には両虫歯菌に対する殺菌作用もしくは発育阻害作用は認められなかった。

バイオフィルム形成を阻害する乳酸菌の報告例としては、歯面への虫歯菌の付着・凝集を阻害するもの、バクテリオシン(抗菌性ペプチド)や有機酸を産生することで、虫歯菌の発育を阻害するものが知られていた。しかしながら、形成済みのバイオフィルムを分解するものや、申請者が分離したBM53-1株のように、虫歯菌のGTFを阻害する物質の産生を介して、バイオフィルム形成を阻害する乳酸菌の存在は全く知られていなかった。

## 2. 研究の目的

申請者は、*Lb. reuteri* と同定したBM53-1株の培養液上清中に、黄色ブドウ球菌の産生する毒素TSST-1(Toxic Shock Syndrome Toxin-1)の発現を阻害する活性のあることも見出した。ちなみに、このTSST-1の産生は、*S. mutans* における不溶性多糖の産生と同様、クオラムセンシング(quorum sensing)と呼ばれる、細菌の密度を感知する機構によって制御される。従って、BM53-1株の産生するバイオフィルム形成阻害物質は、GTFの触媒機能を阻害することに加え、クオラムセン

シング機構を阻害することで、GTFの発現を抑制している可能性が考えられた。

本研究では、BM53-1株が産生するバイオフィルム形成阻害物質の生合成機構を解明し、その阻害メカニズムを明らかにするとともに、未だ報告のない形成済みのバイオフィルムを分解する乳酸菌株の分離・探索を実施することを目的として実験を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) バイオフィルム形成阻害活性の評価

本研究では、*S. mutans* としてMT8148R株を使用した。種々の条件下で *S. mutans* をポリエチレン製の96穴プレート内で培養し、ウェル底に形成されたバイオフィルム量を比較した。培養後のウェルを蒸留水で洗浄後、0.1(w/w)%クリスタルバイオレットを加え、形成されたバイオフィルムを染色した。染色液を取り除いた後に余分な染色液を水洗し、風乾した。各ウェルに95(v/v)%エタノールを加えて脱色し、その脱色液の吸光度( $A_{595}$ )を測定することによりバイオフィルム形成量を比較した。

### (2) バイオフィルム形成阻害物質の抽出

BM53-1株の培養上清のpHをHClによって2.0に調整した後、4℃で一晩静置した。生じた沈殿を遠心によって回収し、蒸留水に溶解させ、等量のクロロホルム:メタノール=2:1で3回抽出し、クロロホルム層を回収した。エバポレーターで有機溶媒を留去した後、任意の溶媒に溶解させ、preparative TLC法により、活性物質を含む画分を精製した。

### (3) トランスポゾンを用いた乳酸菌用ランダム変異導入ベクターの構築

以前構築した大腸菌-乳酸菌シャトルベクターpLES003-bをベースに、マルチクロニングサイトにTn10由来のトランスポザーゼを、そしてエリスロマイシン耐性遺伝子の両端にIS10 endをそれぞれ挿入し、ランダム変異用のベクターを構築した。また、構築済みのベクターに対し、plasmidの複製を担うRepタンパク質を温度感受性化させる変異(C914A=R44S)を導入した。

### (4) GTFの粗精製

*S. mutans* をBHI培地で37℃、48時間の静置培養を行った。遠心により回収した培養上清に対し、60%飽和濃度となるよう硫酸アンモニウムを加え、塩析により沈殿したタンパク質を遠心により回収した。得られた沈殿は適量の50mMリン酸Naバッファー(pH6.5)に溶解させ、限外濾過膜を用いてバッファー置換を行うとともにタンパク質を濃縮した。得られた画分を *S. mutans* 由来の粗精製GTFとして用いた。

### (5) GTF活性の評価

50mMリン酸Naバッファー(pH6.5)に粗

精製 GTF、0.5 (w/v) % のアジ化 Na、そして所定濃度のスクロースを添加したものを反応液とした。反応は 37 °C で行い、阻害物質の有無による水溶性グルカンおよび非水溶性グルカン生成量の違いを調べた。

反応液を沸騰水浴中で 5 分処理した後、遠心によって得られた上清を水溶性グルカンの定量用に、沈殿を後述の非水溶性グルカンの定量用にそれぞれ用いた。上清に 3 倍量の 100% エタノールを加えて混和した後、遠心して沈殿を回収した。得られた沈殿に 70% エタノールを加えて混和後、再び遠心することで沈殿物を洗浄した。この操作をもう一度行った後、沈殿を適量の 1 M NaOH 水溶液に溶解させ、フェノール硫酸法によりその糖濃度を測定した。

水不溶性グルカンにおいては、まず上記最初の遠心により得られた沈殿を蒸留水に懸濁後、再び遠心することで沈殿物を洗浄した。この操作をもう一度行った後、沈殿を適量の 1 M NaOH 水溶液に溶解させ、同じくフェノール硫酸法によりその糖濃度を測定した。

#### (6) RNA 抽出および定量 RT-PCR

RNA の抽出は、NucleoSpin RNA キット (MACHEREY-NAGEL) を用いて、また逆転写反応は、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover キット (TOYOBO) を用いて、それぞれ添付のプロトコルに従って行った。定量 PCR の試薬には KAPA SYBR Fast qPCR キット (日本ジェネティクス) を使用し、DNA gyrase A 遺伝子 (*gyrA*) をリファレンス遺伝子とした相対発現量で解析を行った。なお、プライマーの設計は Primer3 プログラムを使用して行った。

### 4. 研究成果

#### (1) バイオフィーム形成阻害物質高産生条件の検討

一般的に乳酸菌の培養に用いられる MRS 培地では、培地成分中に界面活性剤の成分が含まれているため、バイオフィーム形成阻害物質の産生用培地としては相応しくないと考えた。そこで、機能性食品への応用可能性も視野に入れ、種々の野菜・果汁を培地として培養条件を検討した結果、人参汁に酒粕を添加した培地で静置培養することにより、

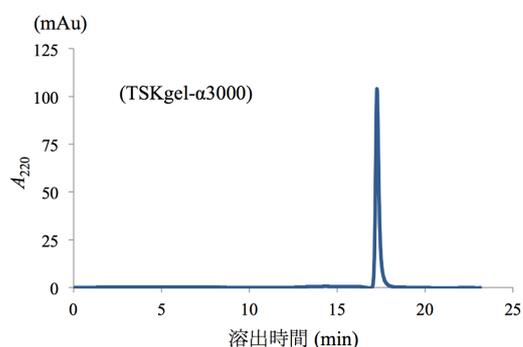


図 1. 精製した阻害物質の HPLC チャート。溶媒は 1/10×PBS、流速は 0.6 mL/min。

MRS 培地で培養した際よりも大幅なバイオフィーム形成阻害活性の上昇が認められた。合成培地ではなく、食用可能な培地での培養・産生条件を確立できたことは、実用化を考える上で非常に有意義であったといえる。また、人参汁や酒粕にはバイオフィーム形成阻害活性はみられず、他のいくつかの乳酸菌株で培養した際にも活性は認められなかったことから、この現象は BM53-1 株を培養した際に特異的なものであることも確認できた。

阻害物質に関しては、preparative TLC 法により、TSKgel-α3000 カラム (TOSOH) を使用した場合に単一ピークとなるまで精製を進めることができた (図 1)。しかし、精製サンプルを有機溶媒を用いて同じカラムにかけた場合、ピークが複数に分割されてしまう現象が確認されたため、単一物質としての精製は達成できていないと判断した。今回の結果から、水を溶媒とした場合、活性物質は複数の分子が重合した単一分子のような挙動をとっている可能性が示唆された。

#### (2) ランダム変異導入ベクターの構築

阻害物質の精製と並行し、生合成遺伝子クローニング法のひとつとして、トランスポゾンを用いた阻害物質非産生ミュータントの取得を試みるべく、ランダム変異導入用ベクターを構築した。導入後のベクター残存性を考慮し、当初は大腸菌でのみ増幅可能な plasmid として構築した (図 2A) が、乳酸菌株に導入した際、トランスポゾンのランダム

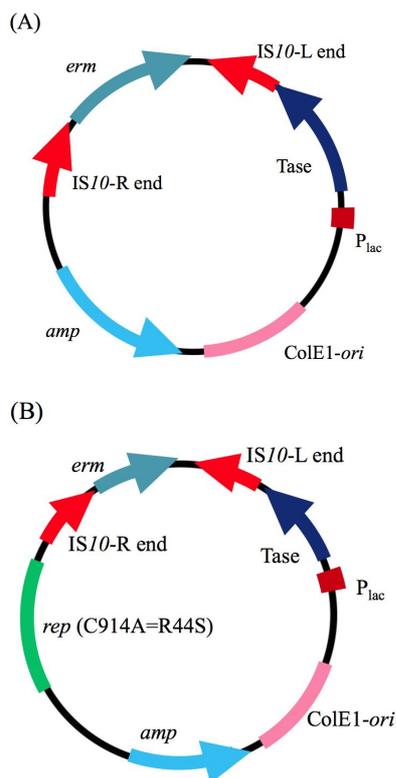


図 2. 構築したランダム変異導入ベクター。

(A)、乳酸菌で複製不可能なもの; (B)、乳酸菌での複製に必要な *rep* 遺伝子を導入 (温度感受性変異含む)。

転移性は確認されたものの、その変異導入効率はおよそ 0.06% であり、ランダムスクリーニングには不向きであると考えられた。導入効率向上の為、乳酸菌体内で保持されるよう *rep* 遺伝子を追加すると共に、導入後の脱落の為、温度感受性の変異を導入したのも構築した結果 (図 2B)、BM53-1 株中での保持を確認することができた。

変異導入株のスクリーニングは今後の課題であるが、阻害物質の精製と共に引き続き取り組むと共に、構築した本ベクターは他の機能性分子産生性乳酸菌株へも導入し、寄与遺伝子の同定に活用する予定である。

### (3) GTF に対する阻害効果の検証

*S. mutans* においてバイオフィルムの形成に関与している 3 つの GTF (*GtfB*, *GtfC*, および *GtfD*) に関し、大腸菌における発現ベクターを構築したが、リコンビナントタンパク質における解析に先立ち、*S. mutans* の培養上清より粗精製した GTF に対する活性阻害評価をまず観察することとした。始めにスクロースを基質とした場合における、粗精製 GTF による水溶性・非水溶性グルカンの産生について検討した結果、活性の基質濃度、反応時間、そして酵素濃度への依存性が見られ、用いた反応系が解析に使用できることが確認できた。

この反応系を用い、限外濾過膜により濃縮した BM53-1 株の培養上清の添加が、GTF 活性にどのような影響を与えるか調査した (図

3)。その結果、粗精製 GTF を含まない反応系でも、BM53-1 株培養上清サンプルを 3.0 (v/v) % 添加した場合には非水溶性グルカンの産生が見られたことから (図 3B 最下段)、BM53-1 株の培養上清中には、非水溶性グルカンの量を増大させる酵素が含まれていることが示唆された。そこで、この酵素によるバイオフィルム形成阻害活性への影響を確認するため、硫酸沈殿によって BM53-1 株培養上清より粗精製した酵素画分を用いてアッセイを行ったが、バイオフィルム形成を抑制することはなかった。

一方で、BM53-1 株培養上清を proteinase K で処理した後もバイオフィルム形成抑制効果は認められたことから、従来観察されていた作用は、存在が示唆された非水溶性グルカン合成酵素によるものではないと考えられた。事実、阻害物質精製の過程で有機溶媒により抽出される画分に活性が認められていることも、タンパク質性のものではないことを支持するものである。

### (4) 乳酸菌との共培養時における *S. mutans* の挙動の違い

ヒドロキシアパタイトペレットを用い、その表面にバイオフィルムを形成させる系の構築を試みたが、唾液タンパク質の有無に関わらず、再現性のあるアッセイ系が構築できなかったため、従来の細胞培養用 96 穴プレートを使用してのアッセイ法で検証することとした。

ところで、本研究の実施期間中、本学歯学部との共同研究成果として、特定の種の乳酸菌の存在と齲蝕との間の相関関係について報告している (発表論文として記載の )。そこで、口腔内細菌の存在がバイオフィルム形成に影響を与えるか否か調査すべく、実際に齲蝕を有する乳幼児口腔内より単離された乳酸菌株を用いて評価を行った。アッセイの結果、ある *Lb. salivarius* の分離株 (55-3R 株) を *S. mutans* と共培養させた場合に、バイオフィルム形成量が増大されることが見出された (図 4A)。また、BM53-1 株の場合と同様に人參汁に酒粕を添加した培地で 55-3R 株を培養した場合、培養上清中にバイオフィルム形成促進効果が認められたことから (図 4B)、この効果は 55-3R 株が産生する分子によるものであることが示唆された。

### (5) 阻害物質添加時の *S. mutans* における各遺伝子の転写状況の変化

BM53-1 株培養上清添加時に認められた *S. mutans* におけるバイオフィルム形成量の変化が、どのような遺伝子発現の変化を伴っているのか、3 つの GTF 遺伝子 (*gtfB*, *gtfC*, および *gtfD*) の発現量の変化について、定量 RT-PCR 法を用いて確認を行った (図 5)。その結果、培養初期段階から変化が見られ、*gtfB* および *gtfC* の発現は阻害物質の存在によって 2-4 倍上昇する一方で、*gtfD* の発現には顕

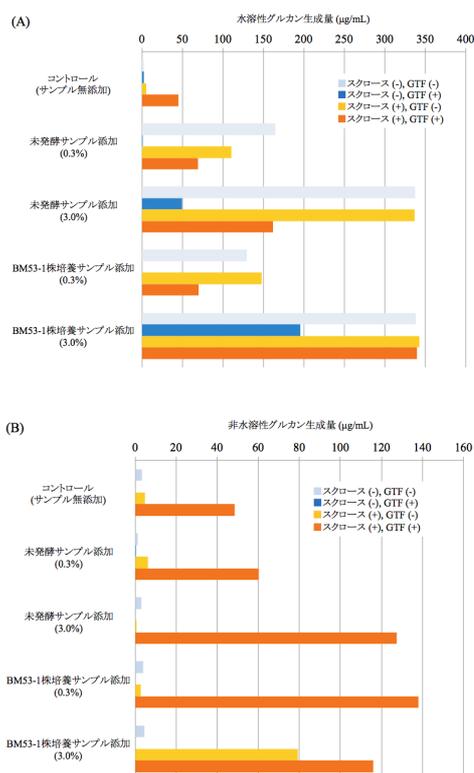


図 3. 粗精製 GTF によるグルカン合成系に対する BM53-1 培養上清添加の影響。

(A), 水溶性グルカン生成量の変化; (B), 非水溶性グルカン生成量の変化。

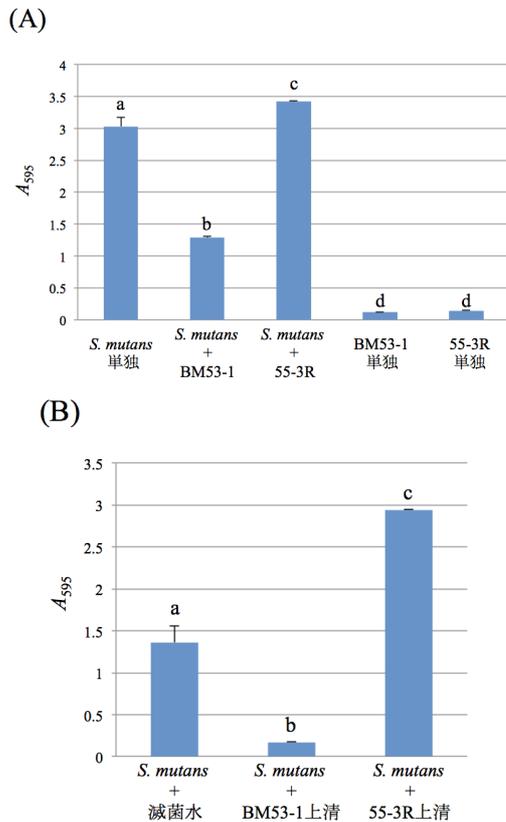


図 4. 各乳酸菌株の *S. mutans* によるバイオフィーム形成に及ぼす影響。

(A), 共培養させた場合の影響; (B), 培養上清を添加して培養した場合の影響。図中のアルファベットは Tukey 法による検定結果 (mean±S.E.,  $P < 0.05$ )。

著な変化は見られなかった。

続いて、クオラムセンシング系に關する遺伝子群として、多くのグラム陽性菌において二成分制御系のシグナル分子として機能している AI-2 の生合成遺伝子である *luxS*、ミュータンス菌におけるクオラムセンシング調節遺伝子群として知られていた *comA-E* 系、そして、最近新たに見出された XIP と呼ばれるシグナルペプチドを介したクオラムセンシング系 (*comS-R* 系) を構成する *comR*, *S*, *X* を対象として調査した (図 6)。しかしながら、いずれの遺伝子においても阻害物質の有無による大きな変化は見られなかった。更に、バイオフィーム形成時に *S. mutans* とグルカンとの接着に寄与していると推測されている二つのグルカン結合タンパク質をコードする遺伝子 (*gfpB* および *gfpC*) の発現についても調査を行ったが、こちら大きな違い

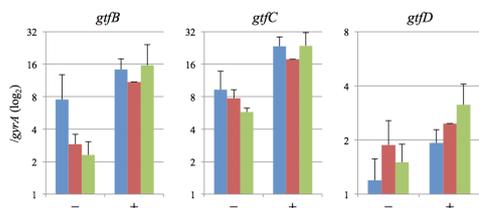


図 5. BM53-1 株培養上清を添加して培養した際の *S. mutans* における *gfp* 遺伝子群の経時的な発現変化。

(-), 未培養人參汁添加時; (+), BM53-1 株培養上清添加時。 (mean ± S.E.)

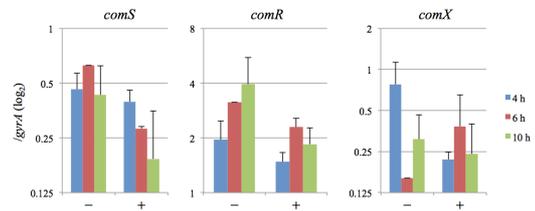


図 6. BM53-1 株培養上清を添加して培養した際の *S. mutans* における *comS-R* 系遺伝子群の経時的な発現変化。

(-), 未培養人參汁添加時; (+), BM53-1 株培養上清添加時。 (mean ± S.E.)

は認められなかった (data not shown)。

*S. mutans* のバイオフィーム形成時における 3 つの GTF の機能としては、まず GtfC が非水溶性グルカンを合成するが、水溶性グルカンを合成できる GtfD の存在下でそれは粘着性グルカンとなり、菌体が歯面へ付着する基礎部分を形成する。そこに GtfB により大量の不溶性グルカンを産生しながら菌体同士が重合することで、周囲の細菌を巻き込んだバイオフィームが形成されると考えられている。今回の結果では、*gfpB* および *gfpC* の発現は全体的に上昇しているものの、粘着性グルカンの形成に不可欠となる *gfpD* の発現は変化がなかった。また、阻害物質が添加された場合には、バイオフィームの形成は認められないが、*S. mutans* による不溶性グルカン自体の合成は為されており、培養後の菌体の凝集は認められる。しかし、その凝集は水流によって容易に離散するものであり、遺伝子発現の変化と合わせると、*gfpB* および *gfpC* の発現上昇によって形成された不溶性グルカンは、*gfpD* の発現上昇を伴わないために粘着性に乏しく、結果としてバイオフィームの形態をとることができない、と考えることができる。

阻害物質の添加がどのような作用メカニズムによって各 *gfp* 遺伝子発現の変化を引き起こすのかについては未だ不明のままであるが、既存のクオラムセンシング関連遺伝子の解析結果からは、これらの経路に大きな変化は認められず、他の因子が関与している可能性が示唆された。

また、今回の研究においては、形成されたバイオフィームを破壊する特徴をもつ乳酸菌株を分離することはできなかったものの、*S. mutans* の形成するバイオフィーム形成を促進する乳酸菌 55-3R 株を見出すことができた。55-3R 株の培養上清の添加によってその促進効果がみられることから、その作用は培養上清中に分泌される何らかの物質を介して生じていることが考えられる。この促進物質がどのような化合物なのか、またどのような作用機序で効果を発揮しているのかについてはまだ明らかになっていないが、BM53-1 株との対比研究を進めることにより、虫歯予防に効果的な口腔内プロバイオティクスの創出に結びつけることができるものと考えている。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計2件)

Noda M., Miyuchi R, Danshiitoodol N, Higashikawa F, Kumagai T, Matoba Y, and Sugiyama M. Characterization and mutational analysis of a novel two-polypeptide bacteriocin produced by a Citrus iyo-derived *Lactobacillus brevis* 174A. (2015) *Biol. Pharm. Bull.* **38**: 1902-1909. (査読有り)

Shimada A, Noda M., Matoba Y, Kumagai T, Kozai K, and Sugiyama M. Oral lactic acid bacteria that are concerned with the occurrence and/or progression of dental caries in Japanese preschool children. (2015) *Biosci. Microbiota Food Health.* **34**: 29-36. (査読有り)

### 〔学会発表〕(計7件)

野田正文, Narandalai Danshiitsoodol, 的場康幸, 熊谷孝則, 東川史子, 杉山政則: 植物乳酸菌 *Lactobacillus brevis* 174A の産生する二成分バクテリオシンの特性ならびに産生制御機構の解析. 第54回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 高知, 2015年10月31日~11月1日

野田正文, 宮内瑠美, Narandalai Danshiitsoodol, 的場康幸, 熊谷孝則, 東川史子, 杉山政則: *Lactobacillus brevis* 174A の産生する二成分バクテリオシンの特徴とその発現制御機構. 日本乳酸菌学会 2015年度大会, 市川, 2015年7月11日~12日

岡慶人, 熊谷孝則, 井手日奈子, 野田正文, 的場康幸, 杉山政則: 乳酸菌と大腸菌間で複製する温度感受性シャトルベクターの構築. 日本乳酸菌学会 2015年度大会, 市川, 2015年7月11日~12日

野田正文, 的場康幸, 熊谷孝則, 東川史子, 杉山政則: 変異体を用いた伊予柑由来乳酸菌 174A 株が産生する二成分バクテリオシンの特性解析. 日本乳酸菌学会 2014年度大会, 広島, 2014年7月17日~18日

野田正文, 町田千帆, 島田歩, 的場康幸, 熊谷孝則, 杉山政則: 齧蝕原性細菌によるバイオフィルム形成を阻害する植物乳酸菌. 第52回日本薬学会・日本薬剤師会・日本病院薬剤師会 中国四国支部学術大会, 松山, 2013年10月26~27日

野田正文, 的場康幸, 熊谷孝則, 杉山政則: 植物由来乳酸菌 *Lactobacillus brevis* 174A が産生する二成分バクテリオシンの特性. 第16回 日本臨床腸内微生物学会総会・学術集会, 広島, 2013年8月31日

野田正文, 島田歩, 大黒彩加, 的場康幸, 熊谷孝則, 香西克之, 杉山政則: 乳幼児口腔内より分離された *Lactobacillus* 属乳酸菌の耐酸性と齧蝕との相関性. 日本乳酸菌学会 2013年度大会, 札幌, 2013年7月9日~10日

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

野田正文 (NODA Masafumi)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・特任講師

研究者番号: 40457289

### (2)研究分担者

杉山政則 (SUGIYAMA Masanori)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・教授

研究者番号: 30106801