

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670874

研究課題名(和文) リコンビナーゼAを用いたリプレースメントセラピーによる新規齲蝕抑制法の開発

研究課題名(英文) Development of substrate with recombinase A to prevent dental caries

研究代表者

仲野 道代(松本道代)(NAKANO, MICHIO)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：30359848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Streptococcus mutans は、表層に存在するグルカン合成素 (glucosyltransferase; GTF) から、粘着性のグルカンを合成し、グルカンを介し歯面に強固に付着する。これらGTFをコードするgtfBC遺伝子が RecombinaseA (RecA)の過剰発現によってリコンビネーションを生じることが明らかとなったため、本研究では、はじめにリコンビナントRecAを作製し、リコンビネーション株を人工的に作製した。さらにrRecAがGTFのプロモーター部分に結合することを明らかとした。本研究の結果は、rRecAを用いた齲蝕抑制物質の開発が可能であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus mutans produces glucosyltransferases (GTFs), with recombinase A (RecA) is required for homologous recombination. Previously, we isolated several *S. mutans* strains with a smooth colony morphology, which also demonstrated characteristics thought to be derived from GTFBC fusion. As for their biological characteristics, biofilm formation was reduced as compared to strains with no fusion. In this study, we artificially produced GTFBC fusion strains by adding recombinant RecA (rRecA), which showed low cariogenic properties. Also, gel-shift assay results indicated that rRecA may bind to the promoter sequences of gtfB and C, encoding GTFB and C. However, gtfB expression was increased when the rRecA was added to growing cells. We speculate that RecA has two functions with gtf genes, though further investigation is needed. RecA may have important roles in gtf expression related to biofilm formation, which may lead to development of a substrate to prevent dental caries.

研究分野：医歯薬学

キーワード：齲蝕 バイオフィーム リコンビナーゼ グルコシルトランスフェラーゼ Streptococcus mutans

1. 研究開始当初の背景

Streptococcus mutans は、口腔内のバイオフィルム形成において重要な菌であり、表層に存在するグルカン合成酵素 (Glucosyltransferase: GTF) から、粘着性グルカンを合成する。一方、RecA は遺伝子のリコンビネーションを起こすタンパクとして報告されていたが、過剰な RecA を培養液中に添加した場合、コロニー形態が通常のラフ型からスムーズ型に変化したものが出現する頻度が高くなることが明らかとなった。この現象は、GTFB と GTFC をコードする遺伝子がリコンビネーションを生じることに起因することが分かった。GTFB と GTFC は、非常に相同性の高い遺伝子であり、相同性が極めて高い部位において RecA タンパクによる相同組み換えが生じたと推測された。さらに、これらのリコンビネーションした菌において、GTF 活性が劇的に減少することも明らかとなった。これまで齲蝕の発生を抑制する方法は、菌体表層タンパクによる齲蝕免疫の研究が長年行われているが、実用化に至ってはいない。また、これらの方法は、表層タンパクの活性を阻害することを目標としているが、粘膜免疫による抗体の産生が可能とはなっていない。そのため、RecA タンパクによって構築した *S. mutans* の GTF 活性抑制株を用いたリプレイスメントセラピーという新たな齲蝕抑制法の確立を考えるにいたった。

2. 研究の目的

(1) RecA の *gtfB* 遺伝子および *gtfC* 遺伝子におけるリコンビネーションの発生メカニズムを明らかにする。はじめに、*gtf* 遺伝子のリコンビネーション部位および RecA 結合部位を特定する。

(2) そのメカニズムを応用し、新たな齲蝕抑制法として、RecA タンパクの口腔内投与により、GTF 活性の低い *S. mutans* 株を人工的に作製し、口腔内に定着させるというリプレイスメントセラピーの応用について検討することである。

3. 研究の方法

(1) *gtf* 遺伝子への RecA タンパクの結合ドメインの決定

gtfB および *gtfC* 遺伝子断片の作製: *gtfB* および *gtfC* 遺伝子はすでに全アミノ酸配列が確定しており、既知の配列より、これら2つの遺伝子の相同性の高い部分を抽出し、DNA断片を Polymerase Chain Reaction (PCR)法により作製する。

リコンビナント RecA の発現と精製: *recA* 遺伝子の開始コドンから終止コドンまでを、制限酵素 BamHI と PstI の認識配列を付加したプライマーを用いて PCR 法にて増幅させて後、この PCR 産物をタンパク発現用ベクター pET42a (+) の挿入し、プラスミド pSI03 を作製する。pSI03 をタンパク発現用大腸菌 *Escherichia coli*

BL21 (DE3) 株に形質転換し、Luria-Bertani 液体培地で震盪培養し、遠心分離を行う。得られた菌体を超音波で破砕し、遠心分離後、上清を GST 融合タンパク質精製用アフィニティーゲルを用いてリコンビナント RecA タンパクを精製する。

ゲルシフトアッセイによる *gtf* 遺伝子と RecA の結合の検討: *gtfB* および *gtfC* 遺伝子の各プロモーター領域を PCR 法にて増幅し、フラグメントを作製し、このフラグメントをジゴキシゲニンでラベルし、プローブを作製する。このラベルされたプローブと精製したリコンビナント RecA タンパクとを混和し SDS-PAGE を行い、エレクトロブロットングを行った後、メンブレンを 120 で 30 分間クロスリンクし、化学発光検出を行う。

(2) リコンビナント RecA タンパクの過剰投与によるリコンビネーション発生率の検討: 得られたリコンビナント RecA タンパクを培養液中に添加し、*S. mutans* 株を培養後、Mitis-Salivarius 寒天培地に播種し、コロニー形態を観察し、スムーズ型の出現頻度を決定する。

(3) mRNA 発現量の測定

S. mutans MT8148 株とスムーズ型を呈する菌株の mRNA の抽出: 供試菌を波長 600 nm が 0.7 になるように Todd Hewitt 液体培地にて培養後、遠心により菌体を回収する。菌体は diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水で懸濁し、Trizol を添加した後、菌体破砕器を用いて破砕後、遠心し、上清中の mRNA をイソプロピルアルコールを用いて沈殿させる。ペレットを乾燥させ、DEPC 処理水に懸濁し、濃度を測定する。さらに DNA の混入を防ぐために DNase 処理を行う。

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) による cDNA の定量: 記で抽出した mRNA を鋳型として、逆転写酵素により cDNA を合成する。その cDNA を鋳型として、ターゲット遺伝子の発現を定量する。

(4) スムーズ型を呈する菌株バイオフィルム形性能の検討

マイクロタイタープレートを用いて液体培地で供試菌を 2 日間、嫌気下で培養後、クリスタルバイオレットで染色し、マイクロプレートリーダーにより吸光度を測定することにより評価する。

4. 研究成果

gtfB と *gtfC* 遺伝子の各プロモーター領域を PCR 法にて増幅し、このフラグメントをジゴキシゲニンでラベルし、プローブを作製した。一方、タンパク発現用ベクター pET42a (+) を用いて GST 融合リコンビナント RecA タンパクを作製した。クマシー染色によりその大きさを確認したところ、約 75 kDa であった。これらを用いてゲルシフトアッセイにより、DNA-タンパク間の結合を検討した。リコンビナント RecA タンパクの濃度を調整し、プローブと反応させた後、電気泳動を行った。

rRecA の濃度が高くなるにつれ電気泳動での移動距離は短くなったため、これら2つが結合していることが明らかとなった。これらの反応は、GTFBおよびGTFCともにプロモーター領域で認められた。この結果は、GTFBおよびGTFCのプロモーター領域にrRecAが結合し、リコンビネーションを起こすことを示している。

さらにリコンビナントRecAを液体培地中に添加し、RecAが過剰に存在する状態で菌を培養すると、無添加の場合は、ほとんど出現しないのと比較してスムーズ型のコロニーの出現頻度が顕著に高くなった。RecAの過剰状態により、人工的にgtfBとgtfCのリコンビネーションを起こすことが可能となった。さらにこの状態でリコンビネーションを起こした菌株は、リコンビネーションを起こしていない菌株と比較して酵素活性が低下し、バイオフィーム形成能が極めて低かった。しかしながら、過剰のRecAが存在した場合、リコンビネーションを起こしていない菌株において、gtfBおよびgtfCの発現の上昇が認められた。以上の結果から、RecAは、gtfB、gtfC遺伝子への結合はその結合ドメインの違いにより、gtfB、gtfC遺伝子のリコンビネーションと発現促進の2つの作用を持つ可能性が示唆された。そのため、今後はこれらの2つの結合ドメインを特定することが必要と思われる。

本研究の成果は、*S. mutans*のGTFを変化させることを目的とした従来の齲蝕免疫や抗菌物質の開発などとは違った齲蝕の抑制法の確立に貴重な知見であると思われる。この抑制法が確立された場合、口腔内細菌叢の変化などがなく、抗菌物質を用いた際の菌交代現象が起きる可能性がないことも利点として挙げられ、新たな齲蝕抑制方法として有効であると考えられる。

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4件)

Matsumi Y, Fujita K, Takashima Y, Yanagida K, Morikawa Y, Matsumoto-Nakano M. Contribution of glucan-binding protein A to firm and stable biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Mol Oral Microbiol* 査読有 30(3):217-26, 2015. doi: 10.1111/omi.12085.

Ardin AC, Fujita K, Nagayama K, Takashima Y, Nomura R, Nakano K, Ooshima T, Matsumoto-Nakano M. Identification and Functional Analysis of an Ammonium Transporter in *Streptococcus mutans*. *PLoS One* 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0107569. 2014.

Nagayama K, Fujita K, Takashima Y, Ardin AC, Ooshima T, Matsumoto-Nakano

M. Role of ABC transporter proteins in stress responses of *Streptococcus mutans*. *Oral Health Dent Manag* 査読有 13, 359-365, 2014.

〔学会発表〕(計9件)

松三友紀、稲垣暁子、藤田一世、仲野道代 *Streptococcus mutans* のプロテオーム解析による表層タンパク発現メカニズムの検討 第51回日本小児歯科学会大会 2013年5月23日~5月24日 長良川国際会議場 岐阜.

永山佳代子、仲野道代、Arifah Chieko Ardin、藤田一世、仲野和彦 *Streptococcus mutans* におけるバクテリオシン産生能とバイオフィーム形成能の関連 第51回日本小児歯科学会大会 2013年5月23日~5月24日 長良川国際会議場, 岐阜.

Matsumi Y, Fujita K, Takashima Y, Matsumoto-Nakano M. Deficiency in Glucan-binding protein A of *Streptococcus mutans* alters gene expression related to biofilm formation. 24rd Congress of International Association of Pediatric Dentistry, 12-15, June, 2013, Seoul, the Republic of Korea.

Fujita K, Takashima Y, Matsumoto-Nakano M. Biofilm formation by *Lactobacillus* species in combination with *Streptococcus mutans* MT8148. 24rd Congress of International Association of Pediatric Dentistry, 2013 6 12-15 Seoul, the Republic of Korea.

柳田可奈子、藤田一世、永山佳代子、仲野道代 *Streptococcus mutans* 形態決定遺伝子と齲蝕病原性との関連について 第51回小児歯科学会大会 2013年5月23日~5月24日 長良川国際会議場, 岐阜.

Matsumi Y, Fujita K, Takashima Y, Matsumoto-Nakano M. Effects of surface proteins deficiency on biofilm formation by *Streptococcus mutans*. 9th Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia 22-24, Aug, 2014, Singapore, Republic of Singapore.

松三友紀、Arifah Chieko Ardin、高島由紀子、藤田一世、仲野道代 *Streptococcus mutans* のバイオフィーム形成における菌体間結合力に及ぼす因子の検討 第52回日本小児歯科学会大会 2014年5月16日~5月17日 品川, 東京

Takashima Y, Fujita K, Matsumoto-Nakano M. Function of dextran-binding domain encoding peptide in *Streptococcus mutans*. 92nd General Session and Exhibition of International of Dental Research 25-28, Jun, 2014, Cape Town, South Africa.

森川優子、高島由紀子、藤田一世、仲野道代 *Streptococcus mutans* のグルカン合成酵素におけるリコンビネーション発生メカ

ニズムの検討 第 33 回日本小児歯科学会中
四国地方会 2014 年 11 月 3 日 松山 愛媛 .

〔図書〕(計 1 件)

仲野道代 他、オーラルヘルスケア機能性
食品の開発と応用-アンチエイジングを目指
した口腔ケアを中心に-Oral Health Care
and Anti-aging-Development and
Application of Functional Food- シーエム
シー出版、2013 : 138-144.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

仲野 道代 (NAKANO, Michiyo)
岡山大学大学院・医歯薬学総合研究科・
教授
研究者番号 : 30359848