

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463159

研究課題名(和文) ソブリヌス菌の遺伝子検査法の開発

研究課題名(英文) Development of a genetic test for *Streptococcus sobrinus*

研究代表者

金子 昇 (KANEKO, Noboru)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：00397126

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：代表的な齲蝕原性菌の1つである*Streptococcus sobrinus*は非常に高い非水溶性グルカン合成能を持つ。この能力はこの菌が齲蝕を誘発する上で特に重要である。今回、この菌の非水溶性グルカン合成酵素をコードするgtfl遺伝子に注目し、実際に口腔内から分離した*S. sobrinus*についてgtfl遺伝子の変異と非水溶性グルカン合成能との対応を検討した。その結果、gtfl遺伝子の3'末端側にあるデキストラン結合部位で比較的多くのミスセンス変異が見られ、またその中の1つの変異をもつ菌株で特に高い非水溶性グルカン合成能が認められた。

研究成果の概要(英文)：*Streptococcus sobrinus* possesses a high ability to produce water-insoluble glucan (WIG), that contributes to accumulation on tooth surface and subsequent dental caries. This bacterium produces Gtfl enzyme coded by gtfl gene that synthesizes WIG. We analyzed the association between WIG synthesis by clinical isolates of *S. sobrinus* and variation in the base sequence of gtfl gene. Relatively large numbers of missense mutations were observed in dextran-binding domain that is located in 3' end side of gtfl gene. We found that an isolate of *S. sobrinus* with one of the missense mutations in the dextran-binding domain showed particularly high WIG synthesis ability.

研究分野：予防歯科学

キーワード：歯学 ミュータンスレンサ球菌 齲蝕

1. 研究開始当初の背景

臨床の場において、*Streptococcus mutans* や *Streptococcus sobrinus* が口腔内にそれほど存在していないにもかかわらず、齲蝕が発症する児童に遭遇することがある。こうした児童においては、*S. mutans* や *S. sobrinus* の菌数は少ないが、存在しているこれらの菌株が、特に齲蝕を誘発する能力の高い菌株である可能性がある。我々はこの仮説に基づいて、まず *S. mutans* の臨床分離株について、強い齲蝕原性を持つ菌株かどうか判定する遺伝子検査法を開発した。この検査法は、*S. mutans* の非水溶性グルカン合成能と有意な関連を示している。

S. mutans や *S. sobrinus* のグルカンを合成する能力は、菌株によってばらつきが大きく、従って同じ *S. mutans* 同士または *S. sobrinus* 同士であっても、菌株により齲蝕原性に差があると言える。*S. sobrinus* はグルカン合成酵素として、非水溶性グルカンを合成する GtfI と水溶性グルカンを合成する 3 種類の酵素を持ち、このうち GtfI が、この菌の齲蝕原性を考える上で特に重要である。この GtfI 酵素をコードする *gtfI* 遺伝子は、ATCC33478 株や 6715 株等、いくつかの実験室株で塩基配列が決定されており、機能領域もある程度推定されている。特に重要なのが 442-450 アミノ酸残基の触媒部位 (catalytic domain) と、C 末端側 1/3 の A リピートと C リピートからなるデキストラン結合部位 (glucan-binding domain) であり、これらの部位における遺伝子の変異は、この酵素のグルカン合成能に大きく影響を与えていることが予想された。

2. 研究の目的

これまでに *S. mutans* における非水溶性グルカン合成能を判定する遺伝子検査法を開発したが、本研究においてはもう一つの齲蝕原性菌である *S. sobrinus* について、菌株毎の齲蝕原性を判定する遺伝子検査法を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

小学生を対象に歯科健診を行い、齲蝕経験歯数 DFT を記録した。また刺激唾液を採取し、これをミュータンスレンサ球菌の選択培地である MSB 培地に接種・培養することで、*S. mutans* および *S. sobrinus* 臨床分離株を得た。これらの菌株は、各種糖発酵能を確認することで、*S. mutans* および *S. sobrinus* であることを確認した。

(1) 非水溶性グルカン合成能の測定

得られた *S. sobrinus* 臨床分離株について、Brain Heart Infusion (BHI) 培地で継代培養を行った後、Sucrose を 1% 添加した Heart Infusion (HI) 培地に菌液を 20 μ l 接種し、試験管を 45° の角度にして 16 時間、傾斜培養した。その後、試験管を vortex mixer で 10 秒間攪拌し、この操作を行ってもガラス試験管壁から剥離せずに残った基質を、粘着性の非水溶性グルカンと見なした。この非水溶性グルカン量を、フェノール硫酸法を用いて定量した後、HI 培地 1 ml 当たりの重量を算出、これを *S. sobrinus* 菌株のグルカン合成能とした。

(2) *gtfI* 遺伝子塩基配列の決定

小学生児童の刺激唾液から分離した *S. mutans* 臨床分離株について、BHI 培地で培養後、DNeasy Tissue Kit (QIAGEN) を用いてゲノム DNA を抽出した。これをテンプレートとして、*gtfI* 遺伝子上流と下流の保存領域をプライマーとした PCR を行い、全ての *S. sobrinus* 株の *gtfI* 遺伝子を得た。さらにこれをテンプレートとし、また、*gtfI* 遺伝子内の複数の保存領域をプライマーとしてシーケンシングを行い、得られた塩基配列を再構成することで、全ての *S. sobrinus* 株について、*gtfI* 遺伝子全体の塩基配列を決定した。

シーケンシング反応は、マクロジェンジャパンにて行われた。

4. 研究成果

小学生児童の刺激唾液から分離した *S. sobrinus* は全部で 46 株であった。これら全

ての菌株について、非水溶性グルカン合成能を測定した。その結果、*S. sobrinus* 臨床分離株の非水溶性グルカン合成能の平均 \pm SD は、 $197 \pm 113 \mu\text{g/ml}$ broth であった。また、最もグルカン合成能が高かった菌株は $503 \mu\text{g/ml}$ broth、最も低かった菌株は $43.2 \mu\text{g/ml}$ broth と、約 10 倍の開きが見られ、菌株によって非水溶性グルカン合成能はばらつきが大きいと言えた (図 1)。

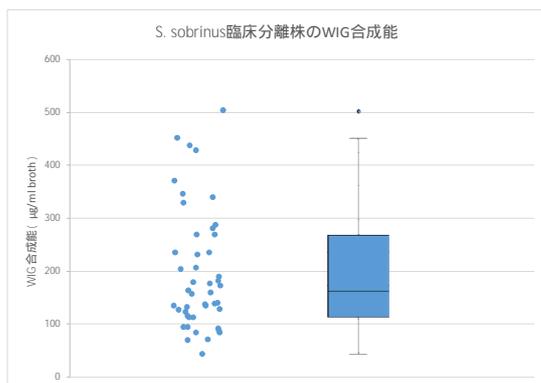


図 1. *S. sobrinus* 臨床分離株の WIG 合成能

臨床分離した 46 株の *S. sobrinus* 株それぞれについて、*gtfI* 遺伝子全体の塩基配列を決定した。*gtfI* 遺伝子中、非水溶性グルカン合成能に特に影響を及ぼす領域としては、

(1) Shine-Dalgarno 配列

開始コドン上流に存在するリボソーム結合部位

(2) Signal peptide

1-114 bp に存在する、タンパク質合成後の細胞質内輸送に関わる領域

(3) Catalytic domain

1324-1350 bp に存在するスクロースを分解し、グルコシル基転位を触媒する領域

(4) Glucan-binding domain

3277-4713 bp に存在するデキストラン結合領域

が考えられたため、特にこれらの領域について菌株間の変異の有無を探索した。

上記の領域中、Shine-Dalgarno 配列と Catalytic domain については保存性が非常に高く、46 株中で変異を認めた株は 1 株も存在しなかった。また、Signal peptide についても保存性が高く、46 株中で変異を認めたのは 1 株のみであった。この 1 株では Signal

peptide 領域中、アミノ酸配列の置換を生じるとようなミスセンス変異が p.Val5Glu と p.Leu19Ile の 2 箇所認められた。この変異株の非水溶性グルカン合成能は $190 \mu\text{g/ml}$ broth であり、他の菌株とほぼ同レベルであったことから、この変異は *S. sobrinus* の齧蝕原性を考える上で特に重要でないことが示唆された。

一方、3' 末端側の約 1/3 を占める glucan-binding domain では比較的多くの変異が認められた。glucan-binding domain は A1 ~ A6 の A リピートと C1 ~ C5 の C リピートからなるが、そのうちミスセンス変異が認められたのは、A1, A4, A5, A6 および C3, C5 であった。これらのミスセンス変異によるアミノ酸の置換は、それぞれ

p.Lys1098Asn / Gln

p.Thr1108Asn

p.Asn1110Lys

p.Ala1112Ser

p.Gly1305Asp

p.Lys1328Gln

p.Tyr1422Cys

p.Glu1425Lys

p.Glu1528Lys

p.Lys1554Gln

p.Ile1555Val

であり、各変異に注目した時の野生株と変異株の非水溶性グルカン合成能は、図 2 ~ 12 の通りであった。例えば p.Lys1098Asn / Gln では野生株 36 株の非水溶性グルカン合成能が $207 \pm 120 \mu\text{g/ml}$ broth、Lys から Asn に置換した変異株 9 株では $158 \pm 84 \mu\text{g/ml}$ broth、Lys から Gln に置換した変異株 1 株では $190 \mu\text{g/ml}$ broth であり、野生株と変異株の非水溶性グルカン合成能に統計学的有意差は認められなかった (図 2)。同様に全ての変異について、野生株と変異株との間で非水溶性グルカン合成能に統計学的有意差は認められなかったが、うち、p.Lys1554Gln については野生株の非水溶性グルカン合成能が平均 $191 \mu\text{g/ml}$ broth であったのに対し変異株は $451 \mu\text{g/ml}$ broth と、特に高い非水溶性グルカン合成能を示していた (図 11)。

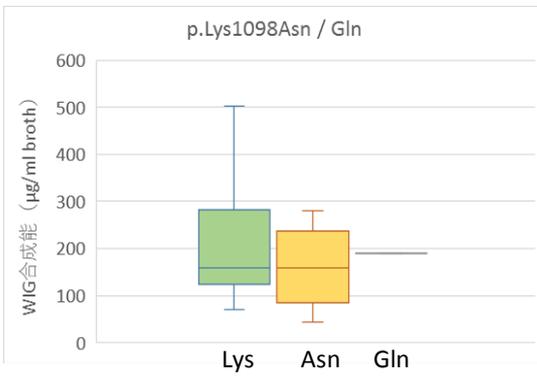


図 2. p.Lys1098Asn/Gln 各株の WIG 合成能

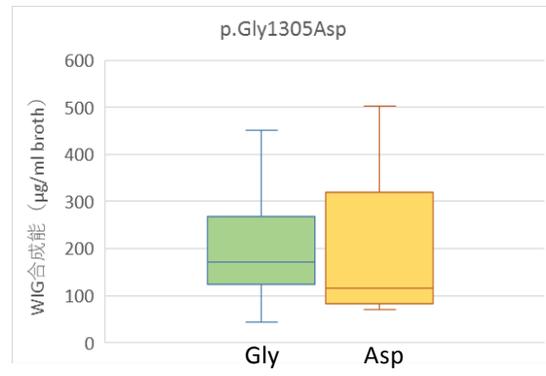


図 6. p.Gly1305Asp 各株の WIG 合成能

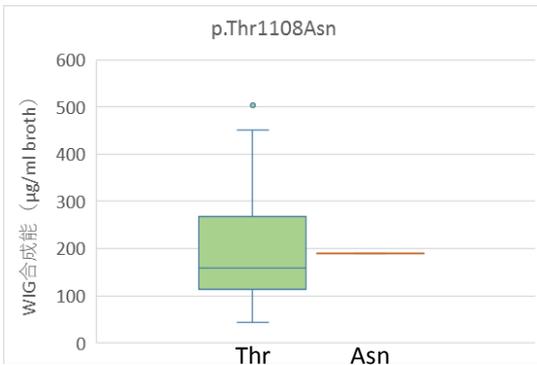


図 3. p. Thr1108Asn 各株の WIG 合成能

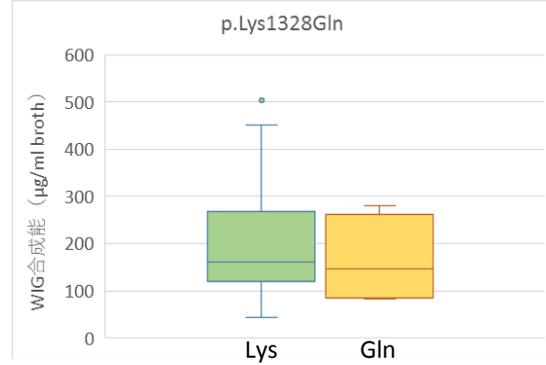


図 7. p.Lys1328Gln 各株の WIG 合成能

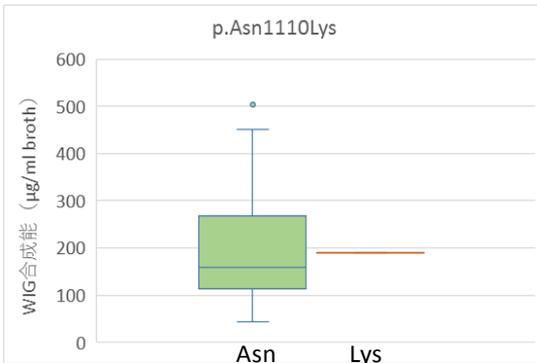


図 4. p.Asn1110Lys 各株の WIG 合成能

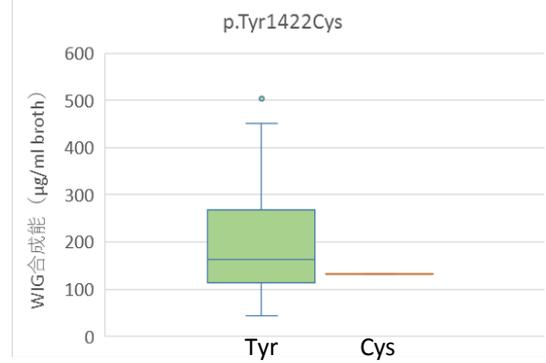


図 8. p.Tyr1422Cys 各株の WIG 合成能

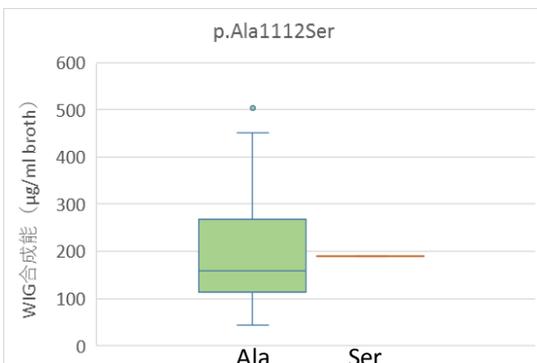


図 5. p.Ala1112Ser 各株の WIG 合成能

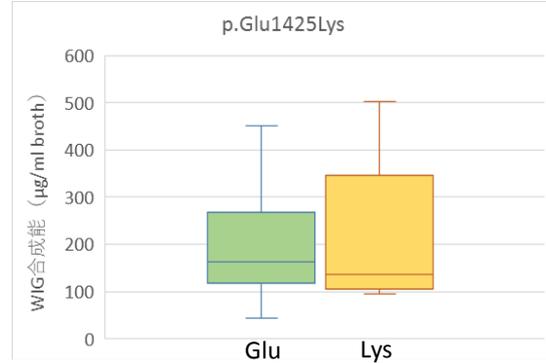


図 9. p.Glu1425Lys 各株の WIG 合成能

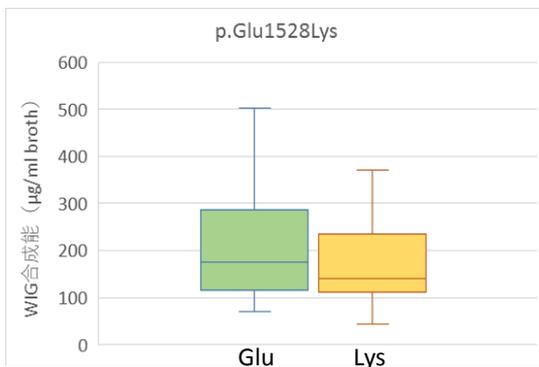


図 10. p.Glu1528Lys 各株の WIG 合成能

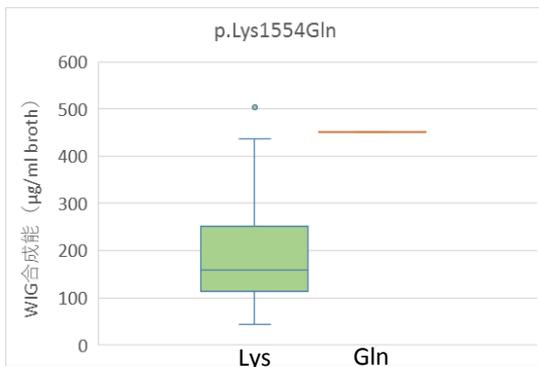


図 11. p.Lys1554Gln 各株の WIG 合成能

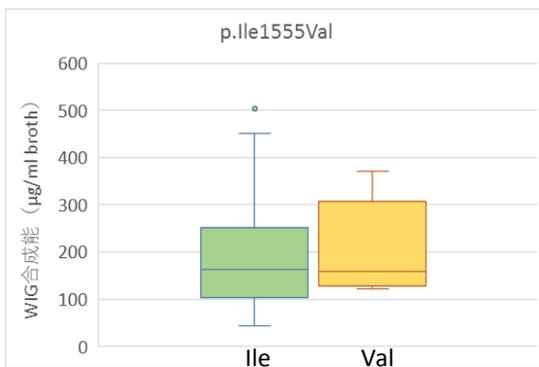


図 12. p.Ile1555Val 各株の WIG 合成能

以上より、*S. sobrinus* の *gtfI* 遺伝子中、Shine-Dalgarno 配列や signal peptide、Catalytic domain をコードする領域は非常に保存性が高く、ミスセンス変異はほとんど見られなかったが、*gtfI* 遺伝子の 3'末端側 1/3 を占める glucan-binding domain にはミスセンス変異が比較的多く認められた。そのうち p.Lys1554Gln については、野生株に比べ変異株で高い非水溶性グルカン合成能を示していた。ただこの変異株は全体の中で少数であり、統計学的な検討は行えなかった。

本研究により、*gtfI* 遺伝子中の glucan-binding domain における変異が *S.*

sobrinus 株のグルカン合成能の高低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)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

久保田健彦, 富田尊志, 濃野 要, 阿部大輔, 清水太郎, 杉田典子, 金子 昇, 根津 新, 川島昭浩, 坪井 洋, 佐々木一, 吉江弘正: ホエイペプチド配合免疫調整流動食経口摂取が歯周炎患者における歯肉溝滲出液の炎症性サイトカインに与える影響. 日本歯科保存学雑誌, 58(2): 109-116, 2015. 査読あり

濃野 要, 山賀孝之, 金子 昇, 宮崎秀夫: パパイン含有ゲル併用舌清掃による舌苔除去効果. 口腔衛生会誌, 66(1): 9-14, 2016. 査読あり

Iwasaki M, Minagawa K, Sato M, Kaneko N, Imai S, Yoshihara A, Miyazaki H: Serum antibody to *Porphyromonas gingivalis* in metabolic syndrome among an older Japanese population. Gerodontology, 33(2): 193-200, 2016. 査読あり

〔学会発表〕(計 4 件)

金子 昇, 濃野 要, 葭原明弘, 花田信弘, 宮崎秀夫: *Streptococcus mutans* の GtfB 酵素 C 末端側におけるアミノ酸配列とう蝕との関連性, 第 63 回日本口腔衛生学会・総会, 熊本県熊本市, 2014 年 5 月 29-31 日, 口腔衛生会誌, 64(2): 207, 2014.

皆川久美子, 葭原明弘, 金子 昇, 林 悠子, 藤山友紀, 宮崎秀夫: 乳幼児健診に併設し歯科衛生士が実施する個別指導による歯科保健行動の変容, 第 63 回日本口腔衛生学会・総会, 熊本県熊本市, 2014 年 5 月 29-31 日, 口腔衛生会誌, 64(2): 245, 2014.

濃野 要, 山賀孝之, 金子 昇, 宮崎秀夫: 舌清掃におけるパパイン含有ゲル併用の有効性, 第 64 回口腔衛生学会・総会, 茨城県つくば市, 2015 年 5 月 27-29 日, 口腔衛生会誌, 65(2): 225, 2015.

金子 昇, 濃野 要, 山賀孝之, 葭原明弘, 花田信弘, 宮崎秀夫: *Streptococcus sobrinus* 臨床分離株の *gtfI* 遺伝子における多様性の検討, 第 65 回日本口腔衛生学会・総会, 東京都文京区, 2016 年 5 月 27-29 日, 口腔衛生会誌, 66(1): 284, 2016.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

金子 昇 (KANEKO, Noboru)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：00397126