研 究 者：岡田　彩子（所属：鶴見大学歯学部探索歯学講座）

研究題目：活性酸素に影響を受ける Streptococcus mutans 菌体内蛋白質に対するプロテオーム解析

目　的：

活性酸素（Reactive Oxygen Species；ROS）は，歯科との関わりが深く，口腔ケアや治療に広く用いられている過酸化水素（H_2O_2），オゾン（Oz），次亜塩素酸ナトリウム，次亜塩素酸電解水などの殺菌因子として応用されている。殺菌機序は，強酸化力によるものと認知されているが，高化学反応性を持つため，詳細な解明には至っていないのが現状である。しかし，近年の実験技術の進歩により，直接的な酸化作用による殺菌だけでなく，様々な経路を介する間接的機構が存在することが示唆されており，機構を担っている蛋白質に関する研究も盛んに行われている。う蝕病原菌に対する ROS の殺菌機序に関しても，多くのタンパク質との関わりを持つことが予測され，これらの機能や制御因子の解明が期待される。したがって，本研究では，口腔ケアにおいて使用頻度の高い H_2O_2 及び初期う蝕予防が期待される Oz のう蝕病原菌 *Streptococcus mutans* 菌体内タンパク質に及ぼす影響に関し，網羅的にタンパク質を収集できる二次元電気泳動法（Two-dimensional gel electrophoresis；2-DE）を用いて，検討することを目的とした。

対象および方法：

ROS 群として，Oz（HealOzone, KaVo Dental, Germany）及び，30 % H_2O_2 を 1，2 及び 10 倍に希釈した溶液（HO-30，HO-15，HO-3）を準備し，対照群としてリン酸緩衝液（PBS）を用いた。*Streptococcus mutans* MT8148（*S. mutans*）を Brain Heart Infusion 液体培地で培養後，PBS 中で洗菌，さらに再懸濁した細菌懸濁液を準備した。次に遠心操作を行い，上澄みを除去後の菌塊に，H_2O_2 群及 PBS 群を室温下にて 60 秒間振動を加え，作用させた。Oz 群に関しては，上記の細菌懸濁液に 120 及び，240 秒作用させた（Oz-120，Oz-240）。次に LIVE/DEAD BacLight™ Bacterial Viability Kit（Invitrogen Detection Technologies, USA）を用いて染色後，蛍光顕微鏡観察による生死判定を行った。また，Mitis Salivarius 寒天培地に播種し，37 度 48 時間培養後に，コロニー数の計測（CFU/ml）を行った。ROS の *S. mutans* 菌体内タンパク質に及ぼす影響に関する検討には，上記同様に準備した菌体試料を，lysis buffer に溶解し，2-DE を行った。IPG strips（18 mm pH 4 -7 range）を用いて，等電点電気泳動（CoolPhoreStar IPG-IEF Type-P, Anatech, Japan）を行い，次に，12%ポリアクリルアミドゲル（2-DE gel）により，SDS-PAGE（CoolPhoreStar SDS-PAGE Dual-200, Anatech）を行った。その後，蛍光染色した 2-DE gel の画像撮影を高感度で行い，解析ソフト（Progenesis PG220, Nonlinear Dynamics, USA）を使用して，スポットのサイズやピークを解析した。次に HO-30 及び Oz-240 の 2-DE gel から，共通のスポットを選択し，FluoroPhoreStar 3000 を用いて切り出し，質量分析（Mascot Peptide Mass Fingerprinting；PMF）を行った。

結果および考察：

S. mutans に対する ROS の影響に関して，BacLight 染色による蛍光顕微鏡観察の結果，各試溶液群は，対照群と比較し，死菌数の割合が高く見られた。さらに，作用濃度が高くなるに伴い，死菌の割合が増加し，HO-30 及び Oz-240 では，生菌は観察されなかった。コロニー数計測の結果に関しても，PBS 群を除く全ての群において，検出限界以下であり，H_2O_2 及び Oz の *S. mutans* に対する殺菌効果を確認することができた。ROS の *S. mutans* 菌体内タンパク質に及ぼす影響に関しては，2-DE の結果，対照群である PBS を作用させた試料において，2-DE gel 上におよそ 450 のタンパク質スポットの検出が認められ，これと比較し，各群のスポット数は減少し，スポットの形態にも変化が見られた。各群ともに，濃度依存的にスポット数が減少し，HO-30 及び Oz-240 群に関しては，スポット数は 100 以下であった。また，H_2O_2 群は，Oz 群と類似したタンパク質の挙動を示し，*S. mutans* 菌体内タンパク質に及ぼすダメージに関して，共通の酸化経路が存在する可能性が示唆された。さらに，HO-30 及び Oz-240 群の 2-DE gel 上における pH5.5-6.5 間及び 37Mr に検出されたスポットを質量分析した結果，Gap（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase）であることが同定され，Gap が ROS による酸化ストレスに対し，抵抗性を示すことが示唆された。

以上より，H_2O_2 及び Oz による *S. mutans* 殺菌に際し，ROS は，*S. mutans* 菌体内タンパク質にダメージを及ぼすことが認められ，Gap は *S. mutans* の殺菌機序において鍵となるタンパク質であることがわかった。

成果発表：

学会

1）岡田彩子，マティン カイルール，花田信弘，田上順次．活性酸素に影響を受ける Streptococcus mutans 菌体内蛋白質に対する二次元電気泳動法による解析．第 132 回春季歯科保存学術大会，熊本，2010 年 6 月 4 日-5 日．

2）Okada A, Matin K, Hanada N and Tagami J. Change in 2-DE Spot-patterns of Cariogens on HClO Electrolyzed-water Treatment. IADR 88th General Session and Exhibition, Barcelona, Spain, July 14-17, 2010.

学術雑誌

1）マティン カイルール，岡田彩子，暁万里子，田上順次．電解機能水のう蝕病原菌およびバイオフィルムに対する効果；臨床応用の可能性 . 日本歯科理工学会誌 2011；30：17- 20.