研究者：布施　晴香（所属：昭和大学歯学部小児成育歯科学講座）

研究題目：小児口腔における歯周病原性細菌の伝播と定着にプラーク構成多糖が及ぼす影響の解明

目　的：

小児の歯周疾患は，主に不潔性の歯肉炎や萌出性の歯肉炎であり，骨破壊を伴う歯周炎は稀である。しかしながら，成人の歯周疾患をもたらす歯周病原性細菌は小児のプラーク中からも検出され，小児期に感染していることが報告されている。これらの細菌は，プラーク中から検出されることから，プラークから増殖のための栄養源を得ていると推測されるが，詳細は不明である。そこでまず我々は，口腔レンサ球菌や放線菌の一部の細菌がスクロースから産生する菌体外多糖の一種であるフルクタン（イヌリン・レバン）に着目し，歯周病原性グラム陰性菌の一つである *Prevotella* 属がフルクタン分解能をもつことを明らかにした。本研究では，慢性歯周炎，妊娠性歯肉炎などの原因菌であり，歯周病病変部の歯肉縁下プラークからだけでなく，健全な歯肉縁上プラークからも検出される *Prevotella intermedia* におけるフルクタンの利用および利用に関わる遺伝子群の解析を行った。また，歯周病原性細菌の口腔内への初期定着に，この多糖分解能が関わるのではないかと推測しているため，今後妊娠期・出産後の母親とその子供を対象として，歯周病原性細菌の口腔内への定着時期および初期定着における多糖分解酵素の関与を解明することを最終目標としている。

方　法：

(1) *P. intermedia* の増殖曲線

TPY 培地（糖を含まない最少培地）および 0.4％の糖（フルクトース，イヌリン，レバン）を添加した TPY 培地に菌を接種後，嫌気培養を行い，一定時間ごとに菌の濁度（OD_{600}）を測定した。

(2) *P. intermedia* のフルクタン分解酵素遺伝子（*fruA*）ホモログとその下流の塩基配列の決定

既知の *Bacteroides fragilis* のフルクタン分解酵素遺伝子（*fruA*）ホモログを *P. intermedia* 17 株のゲノムデータベースより検索した。その配列を元にインバース PCR を行い，*P. intermedia* ATCC25611 株の染色体 DNA 上の *fruA* およびその下流の塩基配列（*fruB*，*fruK*）を決定した。各タンパク質の局在は SOSUIgramN で検索した。

(3) RT-PCR による *fruA*，*fruB*，*fruK* のオペロン形成の検索

逆転写酵素（RT）により cDNA を合成し，*fruA*，*fruB* および *fruB*，*fruK* 間の各 intergenic region を増幅するように設計したプライマーを用いてオペロンの解析を行った。

(4) 組換え FruA の精製

P. intermedia ATCC25611 株の染色体 DNA を鋳型として *fruA* を PCR 増幅し，Nus，His タグ融合発現ベクター pET44c にクローニングし，組換え FruA を精製した。

(5) 多糖分解産物の定量

組換え FruA が多糖を分解産物として生じた還元糖量を Somogyi-Nelson 法で定量した。

(6) フルクタン分解様式の決定

組換え FruA が分解したフルクタン分解産物を薄層クロマトグラフィー上昇法（展開溶媒 ブタノール：エタノール：水＝5：3：2）で分離し分解様式を決定した。

(7) 組換え FruK の精製

P. intermedia ATCC25611 株の染色体 DNA を鋳型として *fruK* を PCR 増幅し，GST 融合発現ベクター pGEX6P-1 にクローニングし，組換え FruK を精製した。

(8) フルクトースのリン酸化能

組換え FruK と基質のフルクトース，およびリン酸基供与体の ATP を混合し，反応産物を薄層クロマトグラフィー上昇法（展開溶媒　ブタノール：エタノール：水＝5：3：2）で分離し，リン酸化能を評価した。

結果および考察：

FIG.1：*P. intermedia* は，糖を含まない培地に比べ，イヌリン，フルクトースを添加した培地のほうが優位に増殖した。

よって，*P. intermedia* は，フルクトースやイヌリンを増殖に利用することが可能であった。

FIG.2：塩基配列決定の結果，*fruA*（1818 bp）の下流には，*fruB*（1155 bp），*fruK*（882 bp）の 2 つの ORF が存在し（A），

RT-PCR の結果から，*fruA-fruB-fruK* はオペロンを形成していた（B）。また，ホモロジー検索の結果，

FruA：フルクタン分解酵素，FruB：糖トランスポーター，FruK：フルクトースリン酸化酵素と推測できた。

FIG.3：*fruA* は 1818 bp であり，606 アミノ酸残基からなる 68,940 Da のタンパク質をコードし，シグナルシーケンスをもつことから，細胞外に分泌されるタンパク質であると推測された。組換え FruA は，Mr 69 k であった（A）。

組換え FruA は，フルクタン（イヌリン，レバン）を特異的に分解した（B）。

フルクタンを基質とした場合，フルクトース（単糖）を遊離した（C）。

よって，FruA は，exo 型のフルクタン分解酵素であることがわかった。

FIG.4：*fruK* は 882 bp であり，294 アミノ酸残基からなる 31,980 Da のタンパク質をコードし，細胞質内に局在するタンパク質であると推測された。組換え FruK は，Mr 36 k であった（A）。

組換え FruK は，フルクトースからフルクトース 6 リン酸を産生した（B）。

よって，FruK は，フルクトースリン酸化酵素であることがわかった。

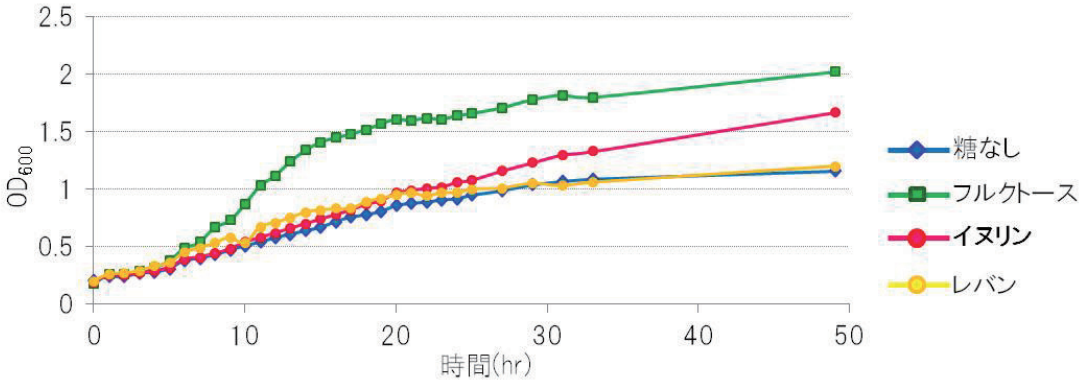


FIG.1　*P. intermedia* の増殖曲線

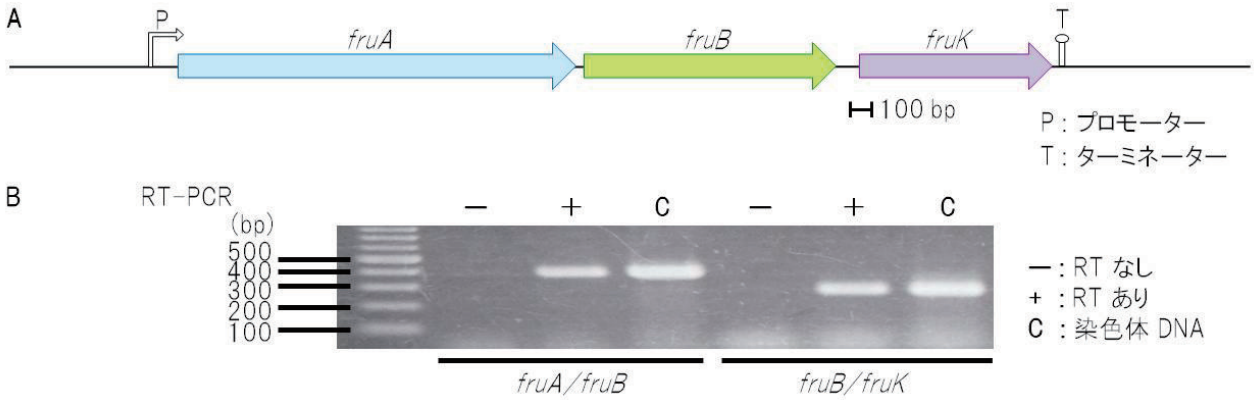
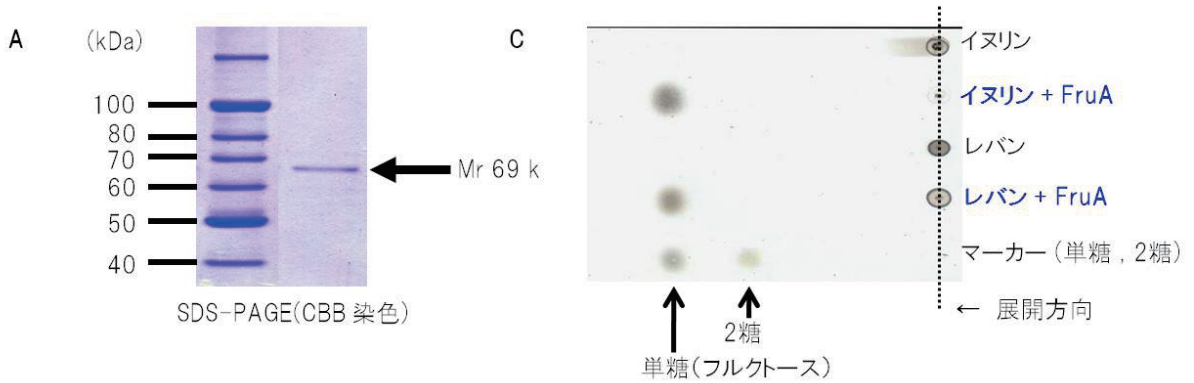


FIG.2　*P. intermedia* ATCC25611 株の *fruA* およびその下流の ORF の遺伝子座



B

基質			相対活性 (%)
フルクタン	イヌリン	[Fru(β2,1)]n	100 *
	レバン	[Fru(β2,6)]n	15.4
グルカン	デキストラン	[Glc(α1,6)]n	1.3
	ムタン	[Glc(α1,3)]n	<0.1

＊：イヌリンを分解したときに産生される還元糖量を100 とする

FIG.3　組換え FruA の精製・基質特異性・基質分解様式

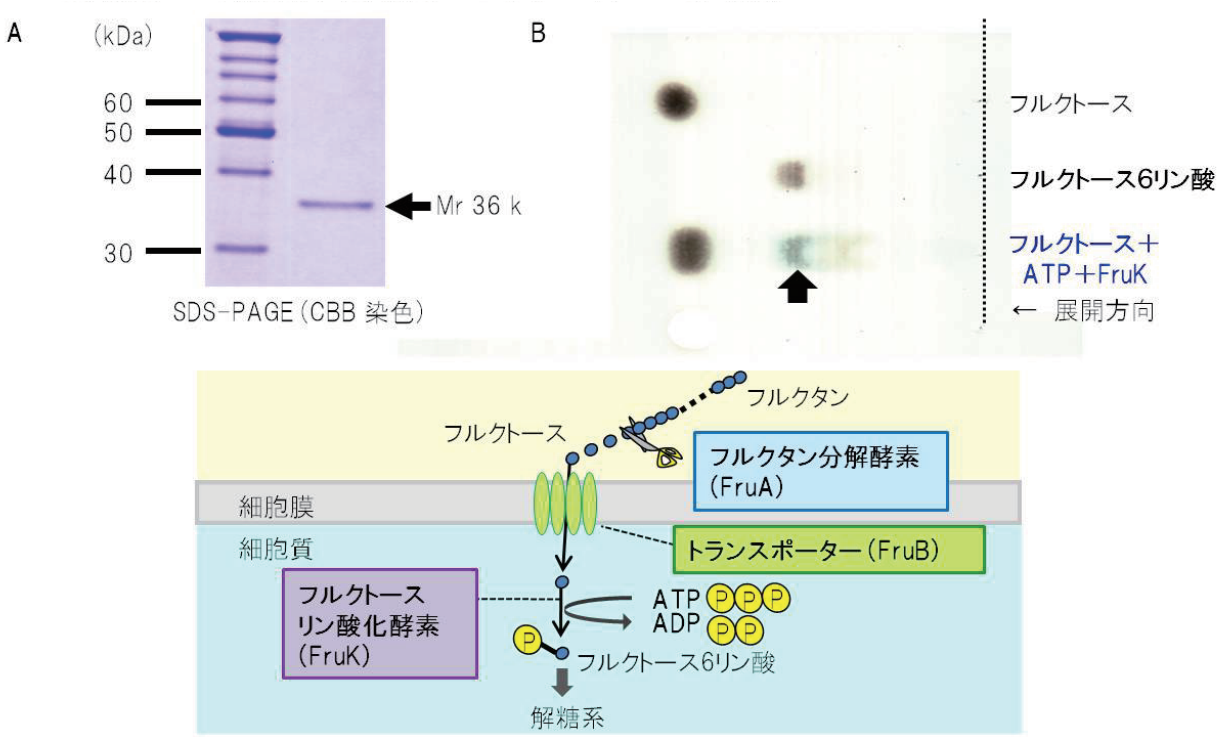


FIG.4　組換え FruK の精製および組換え FruK によるフルクトースのリン酸化

まとめ：

Prevotella 属を含む歯肉縁下に生息するグラム陰性菌の多くは，タンパク質分解酵素をもち，タンパク質分解産物を栄養源にしているが，今回 *P. intermedia* において，歯肉縁上プラーク中に多く存在するフルクタン（イヌリン）も増殖に利用可能な栄養源であり，その際，多糖体であるフルクタン（イヌリン）を FruA でフルクトースに分解後，FruB（糖トランスポーター）で菌体内に取り込み，FruK でリン酸化するということを初めて明らかにした。

成果発表：

第 49 回日本小児歯科学会　ポスター発表（H23. 11/28, 29）