

研究者：高島由紀子（所属：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科小児歯科学分野）

## 研究題目：プラーク構成細菌や唾液成分の高分子結合ドメインをターゲットとした新規齲蝕抑制法の開発

### 目的：

う蝕の主要な病原細菌である *Streptococcus mutans* の菌体表層には、グルカン合成酵素（Glucosyltransferase；GTF）、高分子タンパク抗原（PAC）、グルカン結合タンパク（Gbp）等のタンパク構成成分が存在する。これらのタンパクの作用が複雑に絡み合って機能することによりバイオフィルムを形成することがすでに明らかとなっている。しかし、GTF の作用によりスクロースから合成されたグルカンが菌体表層の Gbp と結合し、バイオフィルムの形成に寄与するメカニズムについては不明な点が多い。さらにこれまで報告され遺伝子配列も決定されている4種類（GbpA, GbpB, GbpC, および GbpD）の Gbp のうち、GbpC はう蝕原性と最も強い関連性を有し、その遺伝子配列より高分子タンパク抗原（PAC）との相同性が高いことが明らかにされているものの、グルカン結合部位の特定は未だなされていない。*S. mutans* は数株において全ゲノムが既に明らかとなっており、データベース上でその情報を入手することが可能である。これまで、アミノ酸配列より断片タンパクを作製することによりそのタンパクの機能の解析を行ってきたが、現在ではバイオインフォマティクス的手法により、図1に示すように、DNA 配列からタンパクの高次構造を推測することが可能である。そこで、GbpC の遺伝子配列からのその3次構造と機能ドメインを推定することにより、グルカン結合領域の解析を行ってきた。その領域に対する抗体を作製することで、相似している領域を持つ他のプラーク構成細菌や唾液成分の菌面への付着、およびプラークの形成を阻害する可能性が考えられた。本研究では、機能領域に対する抗体を齲蝕抑制物質として応用できるよう開発していきたいと考えている。そのために、本研究を通じてこのバイオインフォマティクス的手法の有効性を示し、口腔内における複合バイオフィルム形成のメカニズムを明確にしていきたいと考えている。

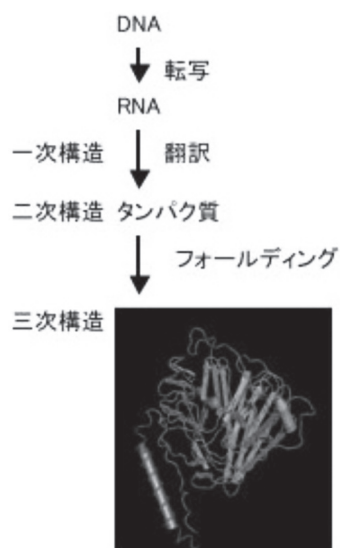


図1 DNA から高次構造まで

## 材料および方法：

### (1) GbpC タンパクの推定グルカン結合領域の決定

GbpC タンパクの推定グルカン結合領域を決定するために、遺伝子配列から立体構造を構築した。さらに既知の結合性タンパクの配列との相同性検索を行い、立体構造と比較して分子が結合すると推測される配列のスクリーニングを行い、5か所の領域を抽出した。図2のように抽出された5か所のグルカン結合領域を欠失させた *gbpC* をシャトルベクターに挿入しプラスミドを作製した。それぞれのプラスミドをすでに *gbpC* を欠失させている変異株に形質導入することにより、部分的に5か所のアミノ酸配列が欠落した *gbpC* を発現する5種類の変異株を作製した。作製した変異株を用いて、デキストラン結合能の測定を行ったところ、中央のアミノ酸配列 DPTKTIF の欠失変異株で有意な低下が認められた。さらに、欠失した部位のリコンビナント GbpC 断片タンパクを作製しドットプロットアッセイを行ったところ、中央部付近の領域を含む断片の値が有意に高くなった。以上の結果から、GbpC タンパクのグルカン結合領域は全遺伝子配列の中央部付近のアミノ酸配列 DPTKTIF であることが示唆された。

### (2) 推定された結合ドメインに対する抗体の作製

ニュージーランドホワイト種の healthy ウサギに、結合ドメインの合成ペプチドを背部に筋注して免疫を行い、1週間後に耳介静脈より採血し血清を得た。これを抗体 anti-DPT とし、抗体価を ELISA 法およびウェスタンブロッティングによって確認を行った。

### (3) バイオフィーム形成能

*S. mutans* MT8148 株を SYTO<sup>®</sup> 9 緑色蛍光核酸染色により蛍光染色を行い、菌液を調整した。この菌液に作製した anti-DPT および Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 で標識されたデキストランを加えて懸濁し、チェンバースライドプレートに播種し、嫌気下で培養した。形成されたバイオフィームを共焦点走査型レーザー顕微鏡にて観察し、バイオフィームの構造の変化を検討した。

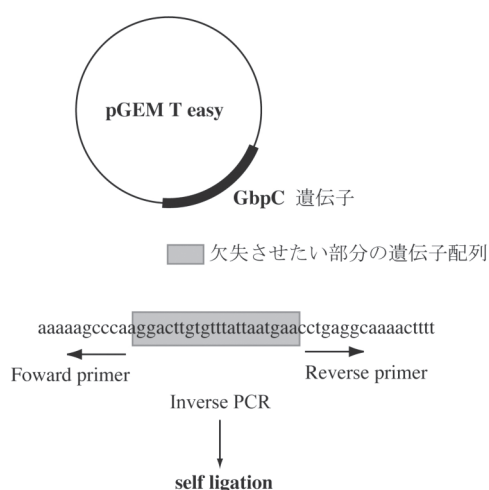


図2 特定領域欠失プラスミドの作製方法

結果および考察：アミノ酸配列 DPTKTIF に対する抗体は、図3のように GbpC の同領域に結合することによりバイオフィーム形成能を抑制することが示された。一方で、唾液タンパクには様々な種類があり、抗体との関係について GST 融合タンパク質精製用アフィニティーゲルを用いたクロマトグラフィーを用いて現在条件を検討しながら実験を行っている。今後はさらにバイオフィーム形成における抗体の作用について検討を行う予定である。

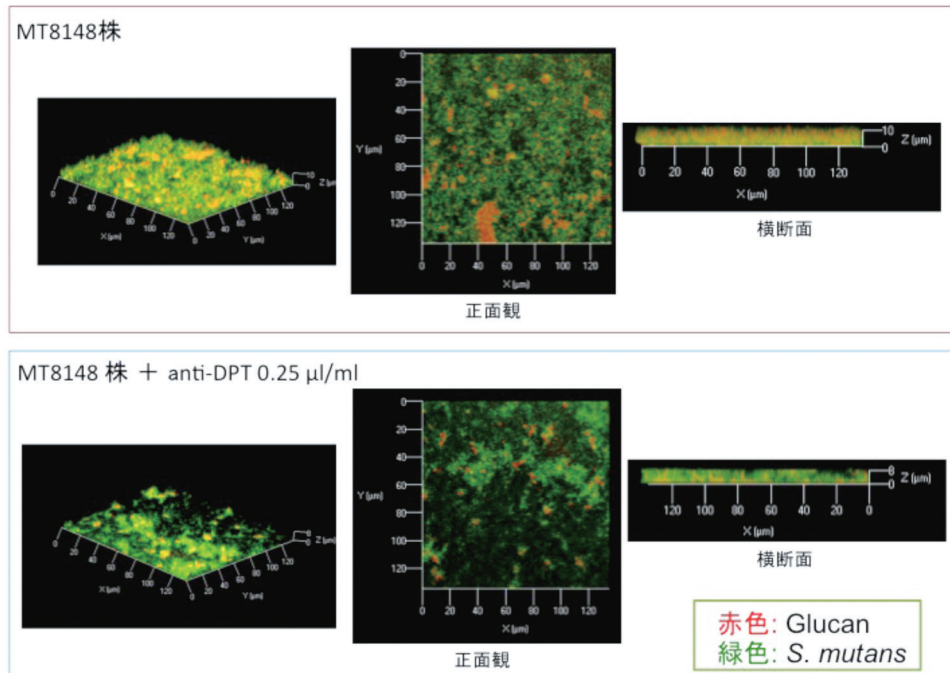


図3 抗体 anti-DPT を作用させた際のバイオフィーム形成能の比較

#### 成果発表：

- ①発表論文：Takashima Y, Fujita K, Ardin AC, Nagayama K, Nomura R, Nakano K, Matsumoto-Nakano M : Characterization of the dextran-binding domain in the glucan-binding protein C of *Streptococcus mutans*. *Journal of Applied Microbiology* 119 : 1148-1157, 2015.
- ②学会発表：「*Streptococcus mutans* のバイオフィーム形成におけるグルカン結合領域の役割」  
第53回日本小児歯科学会学術大会，広島国際会議場，2015年5月21-22日
- ③学会発表：「Role of glucan-binding domain of GbpC in biofilm formation by *Streptococcus mutans*」  
The 25th Congress of the International Association of Pediatric Dentistry,  
Glasgow, UK, July 1-4, 2015