

研究者：黒澤 美絵（所属：新潟大学大学院医歯学総合研究科 小児歯科学分野）

研究題目：DNA を基剤とした *Streptococcus mutans* に対する 新規抗菌剤の開発

目的：

齲蝕原生細菌である *Streptococcus mutans* が形成するバイオフィームは、同菌の生育や増殖の足場となり、齲蝕の発生に関与することが知られている。これまで *S. mutans* に対し、殺菌効果を示す物質は数多く報告されているが、長期の服用は菌交代現象を生じる可能性があるため、口腔常在細菌叢に影響を与えることなく *S. mutans* のバイオフィーム形成を阻害する物質の開発が望まれている。細菌遺伝子の翻訳領域上流には、ヒトとは異なる細菌特異的なリボソーム結合配列領域が存在し、同領域とリボソームの結合が細菌遺伝子の転写やタンパクの翻訳に必須となっている。そこで本研究では、*S. mutans* のバイオフィーム形成に関わる遺伝子におけるリボソーム結合配列領域の DNA 断片を独自に合成し細菌に滴下して分子競合させることで、DNA 断片が *S. mutans* バイオフィームの形成に及ぼす影響について検討した。

対象および方法：

1. 供試菌：日本人小児由来の *S. mutans* MT8148 株と、口腔常在細菌である *S. sobrinus* MT10186 株、*S. oralis* SK23 株、*S. mitis* ATCC903 株を実験に供した。
2. リボソーム結合配列領域の DNA 断片：Streptococci のリボソーム結合配列領域を有する DNA 断片 2 種類（RBS1, 2）を用いた。

表 1 実験に用いた合成 DNA 断片

	DNA 配列 (5'-3')	塩基数
RBS1	GGAGG	5
RBS2	AAGGAGG	7
RBS-control	ATCGT	5

3. バイオフィーム形成能：*S. mutans* と RBS1, 2 を 1% ショ糖含有 Brain Heart Infusion (BHI-S) 培地に添加し、37℃ で 24 時間培養した。バイオフィームを 1% クリスタルバイオレットにて染色し、30% 酢酸で溶出後、吸光度 (571 nm) を測定し、バイオフィーム形成量を数値化した。
4. バイオフィームの蛍光染色：*S. mutans* と DNA 断片を BHI-S 培地に添加し、37℃ で 24 時間培養した。その後、蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。
5. 細菌の増殖能：*S. mutans*、*S. sobrinus*、*S. oralis*、*S. mitis* と DNA 断片を BHI 培地に添加し、37℃ でそれぞれ培養した。浮遊細菌の濁度を吸光度測定装置 (620 nm) にて定量した。

結果および考察：

RBS1, 2において、*S. mutans* バイオフィルムの付着抑制がそれぞれ認められた。また、蛍光染色より RBS1, 2 の濃度依存的にバイオフィルムの厚みが減少することが明らかになった。さらに、RBS1, 2 は *S. mutans*、*S. sobrinus*、*S. oralis*、*S. mitis* の増殖に影響を与えないことが示された。

これらの結果より、Streptococci のリボソーム結合配列領域の DNA 断片は、口腔常在細菌叢に影響を与えることなく、バイオフィルムの形成を阻害することが明らかとなった。このことは、細菌遺伝子の転写およびタンパクの翻訳を阻害する新規メカニズムの抗菌剤開発の一助となることが期待される。

また、今後は、バイオフィルムの形成に関わる *S. mutans* 由来 surface protein antigen C (PAC) や glucosyltransferase (GTF) の遺伝子発現およびタンパク質発現を RT-PCR やウエスタンブロットングにて解析を行い、バイオフィルム形成を阻害するメカニズムを解析する予定である。

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

新潟歯学会誌にて発表予定。