

## 鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

### 内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍) 大塚良子(東京都)  
博士の専攻分野 博士(歯学)  
学位記番号 甲第435号  
学位授与年月日 平成27年3月13日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
研究科専攻 鶴見大学大学院歯学研究科  
(博士課程) 歯学専攻  
学位論文題目 Application of chimeric glucanase comprising mutanase and dextranase for prevention of dental biofilm formation  
(ムタナーゼとデキストラナーゼからなるキメラグルカナーゼによるバイオフィーム形成予防効果)  
Microbiology and Immunology doi:10.1111/1348-0421.12214 2014年11月19日発行  
論文審査委員 主査 教授 鶴本明久  
副査 教授 花田信弘 副査 教授 桃井保子

### 内容の要旨

#### 【緒言】

う蝕はデンタルバイオフィームとして知られる微生物群の代謝活性に由来し、ミュータンスレンサ球菌などの産生する酸が、歯質の脱灰を引き起こしたものとされる。また、ミュータンスレンサ球菌の持つグルカン合成酵素(GTFs)はスクロースを基質として、 $\alpha$ -1, 3-および $\alpha$ -1, 6-グルコシド結合を有する粘着性の強い非水溶性グルカン(WIG)を生成する。このWIGは歯面上に微生物の蓄積を促進し、う蝕病原性の強いバイオフィーム形成因子となる。したがって、ムタナーゼ( $\alpha$ -1, 3-グルカナーゼ)やデキストラナーゼ( $\alpha$ -1, 6-グルカナーゼ)といったグルカン分解酵素は、う蝕発症予防、進行抑制に有用であることが期待される。これまでに、ムタナーゼとデキストラナーゼの遺伝子組換えキメラグルカナーゼの構築についての報告はない。本研究の目的は、ムタナーゼとデキストラナーゼからなる二官能性キメラグルカナーゼを構築すること、ならびにバイオフィームの形成阻害作用と分解促進作用に対するキメラグルカナーゼの効果を検討することである。

#### 【材料と方法】

キメラ遺伝子の構築とタンパク質の発現および精製

*Paenibacillus humicus* NA1123由来 *mut* 遺伝子(AB489092;Genbank), *Streptococcus mutans* ATCC25175由来 *dexA* 遺伝子(HQ711852;Genbank)をそれぞれムタナーゼおよびデキストラナーゼの鋳型DNAとした。キメラ遺伝子は *mut* 遺伝子のC末端領域と *dexA* 遺伝子のN末端領域を融合することにより構築し、発現ベクターに組み込んで大腸菌に発現させた。IPTGにより発現誘導させたタンパク質は、His-tagを用いて部分精製を行ない、5~20%の濃度勾配ゲルを用いてSDS-PAGEを行なった。

デキストラナーゼの活性染色およびムタナーゼの single diffusion assay

0.5% blue dextran 含有ゲルを用いてデキストラナーゼ標本の SDS-PAGE を行なった。電気泳動後のゲルを 0.5% Triton X-100 含有リン酸緩衝液(pH 6.0)で37℃1時間振盪した。

ムタナーゼの single diffusion assay は、1%ムタン含有ゲルを用いて行った。ゲル上にサンプルを含浸させたディスクを静置し、37℃で3日間反応させた。

酵素活性

ムタナーゼ活性は *Streptococcus downei* MFe28 由来の GTF-I を用いてスクロースから合成したムタン( $\alpha$ -1, 3-グルカン)

を基質とし、デキストラナーゼ活性は市販デキストランを基質とし反応液を 37°C で 1 時間反応させた。その後、基質から遊離した還元糖の量を Somogyi-Nelson 法で定量し、標準曲線からグルコース量に換算した。ムタナーゼあるいはデキストラナーゼ活性単位 (U) は、1 分間に 1  $\mu$  mol のグルコースを遊離する酵素量と定義した。

バイオフィーム形成阻害作用について

バイオフィーム形成に対するグルカナーゼの効果は、ガラス管壁に形成されたバイオフィーム量で検討した。1% スクロース、*Streptococcus sobrinus* 6715 由来 GTFs (4.6 U) からなる反応液 (pH 6.0) はグルカナーゼを添加し、45° の傾斜をつけ 37°C で 48 時間反応させた。大腸菌由来の SUMOstarprotein をコントロールとして使用した。

バイオフィームの分画と定量

形成されたバイオフィームは 4 画分 (Firm-adherent WIG, Loose-adherent WIG, Non-adherent WIG, WSG) に分画した。それぞれの画分の全糖量を、フェノール硫酸法を用いて定量した。

バイオフィーム分解促進作用について

前述の方法で予め形成させたバイオフィームの Whole adherent (Loose + Firm) WIG および Firm-adherent WIG を基質とした。これにキメラグルカナーゼを含む反応液 (pH 5.0) を調製し、3, 6, 12, 24, 48, 120 時間 37°C で反応させた。付着 WIG から遊離された糖は、還元糖を Somogyi-Nelson 法で、全糖量をフェノール硫酸法で測定した。120 時間後、ガラス管壁に残留したバイオフィームを、0.5 N NaOH に溶解し、フェノール硫酸法で全糖量を測定した。

統計分析

コントロールに対するバイオフィーム量は Student's *t*-test を用いて分析した ( $\alpha = 0.05$ )。

## 【結 果】

酵素タンパク質の発現および精製

キメラ *mut-dexA* 遺伝子を含む pE-SUMOstar プラスミドについて T7 ユニバーサルプライマーを用いた PCR で遺伝子の連結を確認した。発現タンパク質は、5 ~ 20% の SDS-PAGE によりデキストラナーゼ 106.8 kDa、ムタナーゼ 131.3 kDa およびキメラグルカナーゼ 191.3 kDa に主要なバンドとして観察された。デキストラナーゼ活性染色では、デキストラナーゼ活性を示す白いバンドを検出した。デキストラナーゼは 106.8 kDa といくつかのバンドを示し、キメラグルカナーゼは、191.3 kDa および約 82.0 kDa の明瞭なバンドを示した。ムタナーゼの single diffusion assay では、ムタナーゼとキメラグルカナーゼで clear zone が観察された。ムタナーゼの全活性は 2.8 U、デキストラナーゼのそれは 2.1 U であった。キメラグルカナーゼのムタナーゼ活性は 1.9 U、デキストラナーゼ活性は 0.9 U で、両酵素あわせて 2.8 U の活性を有した。デキストラナーゼの至適 pH は 4.0 ~ 5.5、ムタナーゼのそれは 4.0 ~ 6.5 を示した。

バイオフィーム形成阻害作用

バイオフィーム形成時にキメラグルカナーゼを 0.28, 0.7, 1.4, 2.8 U と増加させると、コントロールに比較して、WIG の総量は、75.3, 64.4, 33.2, 8.5% と有意に減少した。Loose-adherent および Firm-adherent WIG 画分は 71.9, 42.8, 16.5, 1.6% と用量依存的に有意に減少した。

また、デキストラナーゼ (0.45 U)、ムタナーゼ (0.95 U)、キメラグルカナーゼと同等の酵素活性を有するデキストラナーゼ (0.45 U) とムタナーゼ (0.95 U) の混合物、およびキメラグルカナーゼ (1.4 U) はコントロールと比較した場合、WIG の総量は 103.7, 86.5, 66.1, 51.2% であった。Loose-adherent および Firm-adherent WIG 画分は 81.5, 35.0, 30.2, 7.3% に減少した。キメラグルカナーゼは単独のグルカナーゼ、または、デキストラナーゼとムタナーゼの混合物に比較して有意にバイオフィーム量を減少させた。

バイオフィーム分解促進作用

キメラグルカナーゼの作用によりバイオフィームから分解された還元糖量、全糖量は、時間の経過とともに増加した。120 時間後にガラス管壁に残留したバイオフィーム量はコントロールに比べ 65.3% に減少した。

## 【考 察】

本研究で用いた *mut* 遺伝子は他の微生物由来のムタナーゼに比較して、ヒトへの適用に安全と考えられる納豆から分離された *P. humicus* NA1123 由来であり、*dex* 遺伝子は endo 型デキストラナーゼ活性を示す *S. mutans* ATCC 25175 由来である。

キメラタンパク質は想定分子量 (225.6 kDa) より小さく、SDS-PAGE 上で 190 kDa を示したが、キメラタンパク質はムタンおよびデキストランの分解活性を有することが確認された。キメラグルカナーゼのムタナーゼおよびデキストラナーゼ

の至適 pH は、ムタナーゼおよびデキストラナーゼと同等であったので、キメラグルカナーゼは両酵素の性質を保っていると思われる。

WIG の  $\alpha$ -1, 3-グルコシド結合と  $\alpha$ -1, 6-グルコシド結合の分解は、歯表面へのバイオフィーム阻害に有効であることが示唆された。バイオフィーム形成においてキメラグルカナーゼが Loose-adherent と Firm-adherent WIG 量を減少させたことは、付着性のバイオフィームを非付着性のバイオフィームへ変換できることを示している。本研究では、キメラグルカナーゼのバイオフィーム形成阻害活性がムタナーゼおよびデキストラナーゼの混合物と比較して、4.1 倍強かった。この理由は明確ではないが、キメラグルカナーゼの基質衝突頻度の方が高いためと考えられる。

バイオフィームの分解に対し、キメラグルカナーゼが急速にバイオフィームを分解することは困難だったが、長時間キメラグルカナーゼを作用させることで分解されてくるグルカン量が有意に増加することが確認された。ガラス管壁に残留したバイオフィーム量もまた明らかに減少した。フェノール硫酸法で検出される分解生成物量は、Somogyi-Nelson 法で検出されるその 4.4 倍であり、キメラグルカナーゼが WIG をおよそ 4~5 種類のオリゴ糖に分解することを示唆している。

#### 【結 論】

キメラグルカナーゼはムタナーゼ活性とデキストラナーゼ活性を有し、効果的なバイオフィームの形成阻害作用と分解促進作用を示し、う蝕発症予防、進行抑制に貢献できる可能性を示唆した。

#### 審査の結果の要旨

ミュータンスレンサ球菌が合成する  $\alpha$ -1, 3- および  $\alpha$ -1, 6-グルコシド結合を有する非水溶性グルカンで構成されるデンタルバイオフィームはう蝕をはじめとする歯科疾患の原因となる。したがってグルカン分解酵素は化学的プラークコントロールの手段として歯科疾患の予防に有効である。そこで本研究では、ムタナーゼとデキストラナーゼの 2 種類のグルカナーゼからなるキメラグルカナーゼを遺伝子組換えによって作製し、バイオフィームの形成阻害作用、バイオフィームの分解促進作用について評価、検討した。

ムタナーゼについては *Paenibacillus humicus* NA1123 由来 *mut* 遺伝子、デキストラナーゼは *Streptococcus mutans* ATCC 25175 由来 *dexA* 遺伝子を鋳型 DNA とし、*mut* 遺伝子の C 末端領域と *dexA* 遺伝子の N 末端領域を融合することによりキメラ遺伝子を構築した。発現誘導させたタンパク質は部分精製し、SDS-PAGE によって分析した。酵素活性についてはムタナーゼ、デキストラナーゼ活性単位を定義し、キメラグルカナーゼの両酵素について測定した。次に、バイオフィーム形成阻害については、1%スクロース、*Streptococcus sobrinus* 6715 由来 GTFs からなる反応液にグルカナーゼを添加し、ガラス管壁に形成されたバイオフィーム量で検討した。バイオフィーム分解促進作用については、予め形成させたバイオフィームにキメラグルカナーゼを含む反応液を調製し、経時的に 37°C で反応させ定量した。

その結果、ムタンおよびデキストランの分解活性を有するキメラタンパク質を発現、精製することができた。また、キメラグルカナーゼのムタナーゼ、デキストラナーゼはそれぞれの至適 pH と同等であったことから両酵素の性質を持つと考察した。バイオフィームの形成阻害については、キメラグルカナーゼはムタナーゼとデキストラナーゼの混合物と比較して 4.1 倍の形成阻害活性を示した。バイオフィームの分解作用についても、残留したバイオフィームは時間とともに有意に減少し、120 時間後にはコントロールと比較して 65.3% に減少した。

以上、本研究は遺伝子組換えによってムタナーゼ、デキストラナーゼの両方の性質を持つキメラグルカナーゼの作製を実現したものである。しかも、このキメラグルカナーゼはムタナーゼ、デキストラナーゼ単独、あるいは混合物よりも優れたバイオフィーム形成阻害作用を示した。このグルカナーゼは新たな化学的プラークコントロールの手段を発展させるものであり、歯科疾患の予防においてもきわめて臨床的価値の高いものと考えられる。

よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。