

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21592669

研究課題名（和文）ドメインシャッフリングによるムタナーゼキメラ酵素の作製と
バイオフィルムの分解研究課題名（英文）Construction of mutanase chimeric enzyme by domain shuffling and
degradation of biofilm by the chimeric enzyme

研究代表者

今井 奨 (IMAI SUSUMU)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：80072958

研究成果の概要（和文）：う蝕原性細菌のミュータンスレンサ球菌はスクロースを基質としてバイオフィルム形成に強く関与する非水溶性グルカンを合成する。このグルカンの α 1,6-および α 1,3-グルコシド結合を効率的に分解できる酵素を創出するのが本研究の目的である。そのため、デキストラナーゼおよびムタナーゼ遺伝子をプラスミッドに組み込み、作製されたキメラ遺伝子を発現ベクターに組み込んで大腸菌に発現させた。産生されたデキストラナーゼ・ムタナーゼキメラ酵素の性質を調べたところ、本キメラ酵素はデキストランおよびムタンを効率よく分解することが分かった。今後は更に高機能のキメラ酵素の創出を目指す。

研究成果の概要（英文）：Cariogenic mutans streptococci produce water-insoluble glucan involving in biofilm formation from sucrose as a substrate. The purpose of this study was to construct chimeric enzyme composed of dextranase and mutanase that degrade α -1,6- and α -1,3-glucosidic bond, respectively. Dextranase gene and mutanase gene were cloned in plasmid and the chimeric gene was successfully constructed in the expression vector and the resulting enzyme hydrolyzed effectively dextran and mutan simultaneously. It is desired to improve the chimeric enzyme to highly functional one in the future.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,900,000 | 570,000 | 2,470,000 |
| 2010年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| 2011年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：バイオフィルム、ムタナーゼ、デキストラナーゼ、キメラ酵素、ドメインシャッフリング

1. 研究開始当初の背景

ストレプトコッカス ミュータンスは食物中のショ糖からグルコシルトランスフ

ェラーゼにより、高分子のグルカンを合成し、それが歯垢形成の開始に関与している。合成されるグルカンには水溶

性の結合を主体とするアルファ1,6グルカン(デキストラン)と不溶性のアルファ1,3グルカンを主体とするムタンがあるが、歯垢形成の開始には粘着性で不溶性のムタンの関与が大きいとされている。このことから、デキストランとムタンを同時に分解すれば歯垢形成を阻止できると共に齲蝕の誘発を抑えられることが期待できる。従ってムタンを分解できるムタナーゼの開発は、非常に重要であり、従来からムタナーゼあるいはムタナーゼ生産菌についての報告がなされている。しかし、安定性や分解力が不十分で実用化に至っていない。そこで、応用の可能性を広げるべく、強力な分解力を持つムタナーゼの開発が待たれている。

2. 研究の目的

(1) ドメインシャッフリングによる高機能キメラ酵素の創出

酵素遺伝子の一部をシャッフリング(置換)することにより、機能が向上したキメラ酵素を創出することが可能となりつつあるが、シャッフリング領域の特定方法、遺伝子上の任意の部位でのシャッフリング技術、キメラ酵素を超活性型酵素にするフォールディング技術等はいまだ試行錯誤の状態にある。このため本研究では、歯科医療で有用性の高いデキストラナーゼ、ムタナーゼおよびグルカン結合タンパク質(GBP)を対象として、酵素遺伝子の特定の領域(ドメイン)を互いの領域とシャッフリングさせる手法(ドメインシャッフリング)を実施するとともに、フォールディング手法を活用することにより、熱安定性や基質特異性を大幅に向上させた高機能キメラ酵素の創出をめざす。

(2) 高機能キメラ酵素の納豆菌における発現

次に、キメラ酵素遺伝子を納豆菌で発現させ、強力な分解酵素を発現させて、歯面バイオフィルムの分解を促進する「組換え納豆」の構築を目指す。本研究で得られたドメインシャッフリング技術は、医薬品の他、歯磨剤や洗口剤など歯科医療産業上重要な様々な酵素に適応する可能性があり、安定性の優れた種々のキメラ酵素を創出することが期待できる。

蛋白質(酵素)の進化の手法の一つはエキソンシャッフリング等の遺伝子の相同組換えに起因するものであり、蛋白質を構成するアミノ酸配列が大幅に変化するため、蛋白質の特性に極めて大きな変化をもたらす。本研究では①遺伝子シャッフリングにより新たな酵素(キメラ酵素)を創出し、既存酵素の特性を改良する技術の確立

と、②本技術の適用により得られたキメラ酵素を納豆菌に発現させることによるバイオフィルムの分解手法の開発の2つの目的で研究を行う。本研究では、ミュータンスレンサ球菌のバイオフィルムを分解する酵素(デキストラナーゼ、ムタナーゼ)、ならびにグルカンへの酵素の結合に必要なグルカン結合タンパク質(GBP)をドメインシャッフリングによる高機能キメラ酵素の創出の対象とした。酵素遺伝子の任意の領域を他の酵素遺伝子の領域とシャッフリングする手法を確立する。また、同時にキメラ酵素をフォールディングする技術を開発することにより、熱安定性や基質特異性を向上させた高機能キメラ酵素の創出を目指す。

3. 研究の方法

(1) ムタナーゼおよびデキストラナーゼ遺伝子のクローニング

S. mutans UA159 から DNA を抽出し、PCR により dextranase A (Dex A) および dextranase B (Dex B) 遺伝子を増幅した。これらの遺伝子を一旦 pUC plasmid にクローニングした後、発現ベクターである pQE vector (QIAGEN) にサブクローニングした。この pQE ベクターには His tag が付与されている。Dex A、Dex B それぞれを大腸菌にトランスフォーメーションを行い、IPTG で発現誘導を行うとともに His tag を利用して精製を行った。

次に、Dextranase 遺伝子にドメインシャッフリングにより結合させるためのムタナーゼ遺伝子を *Paenibacillus* の一種から、デキストラナーゼ遺伝子と同様の方法でクローニングした。IPTG で発現誘導を行うとともに His tag を利用して精製を行った。

(2) ムタナーゼ・デキストラナーゼキメラ遺伝子の作製

デキストラナーゼ A 遺伝子とムタナーゼ遺伝子を同一ベクター内で連結して Lac Z オペレーターの下流に組み込み、大腸菌に導入した。(図1)。

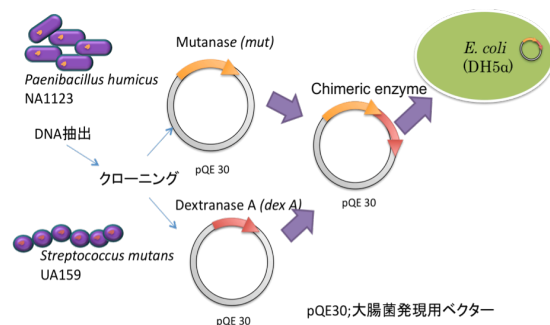


図1. デキストラナーゼとムタナーゼからなるキメラ遺伝子の作製方法

(3) キメラ酵素画分の調製方法

形質転換した大腸菌を振盪培養して増殖させた後 ($OD_{540} = 0.5 \sim 0.7$)、IPTG により遺伝情報発現誘導を 4~5 時間行った。遠心分離により上清と沈渣に分離し、沈渣をクラッシャーで機械的に破壊したのち、遠心分離した (上清を Lysate-1 とする)。この沈渣に Qproteome[®] Bacterial Protein Prep Kit (QIAGEN) を用い、タンパク質を可溶化させ遠心分離した (上清を Lysate-2 とする)。さらに、沈渣に Inclusion Body Solubilization Reagent を加え、封入体の破壊を行い遠心分離した (上清を Lysate-3 とする)。

(4) 酵素活性測定法

ムタナーゼ、デキストラナーゼおよび両酵素からなるキメラ酵素の活性を基質グルカンからの還元糖の遊離によって測定した。還元糖の定量には Somogyi-Nelson 法を用いた。650nm における吸光度を測定し、標準曲線からグルコース量に換算した。デキストラナーゼに対して 1% デキストラン (Dextran grade C)、ムタナーゼに対して 2% ムタンまたはカルボキシメチルムタンを基質とした。

4. 研究成果

(1) ムタナーゼおよびデキストラナーゼ遺伝子のクローニング
 $\alpha 1, 6$ -結合を分解するデキストラナーゼ A、デキストラナーゼ B および $\alpha 1, 3$ -結合を分解するムタナーゼの各遺伝子を PCR で増幅した。この遺伝子を pUC plasmid にクローニングした後、発現ベクターである pQE vector (QIAGEN) にサブクローニングした。この pQE ベクターには His tag が付与されている。Dex A、Dex B、ムタナーゼ遺伝子それぞれを大腸菌にトランスフォーメーションを行い、IPTG で発現誘導を行うとともに His tag によって精製後、ポリアクリルアミド電気泳動によりシングルバンドであることを確認した。

Paenibacillus 由来の $\alpha 1, 3$ -結合分解酵素ムタナーゼの遺伝子の塩基配列を決定した結果、分子量約 11.5 万のムタナーゼをコードしていることが示唆された。Dex A、Dex B、ムタナーゼ遺伝子を導入した形質転換大腸菌を培養し、菌体を遠心分離により集菌した。破碎機にて菌体を分解したのち、遠心分離上清を集め、素酵素標品として各酵素活性を測定した。

その結果、dextranase A およびムタナーゼの活性は明らかに確認できた。しかし、dextranase B の活性は確認できなかった。

(2) ムタナーゼ・デキストラナーゼキメラ遺伝子の作製

同一ベクター内で連結したムタナーゼ・デキストラナーゼ A キメラ遺伝子を PCR で増幅してポリアクリルアミド電気泳動を行ったところ、7,743bp の産物が確認された (図 2)。

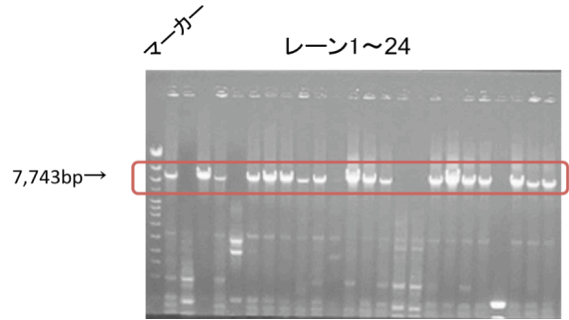
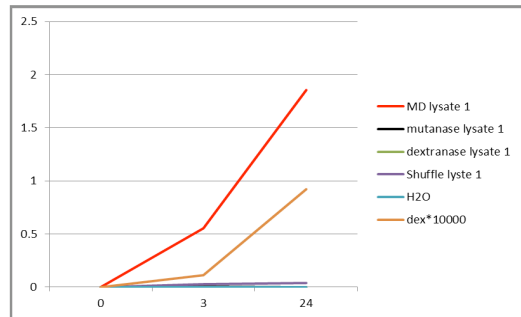


図 2. キメラ遺伝子の電気泳動パターン

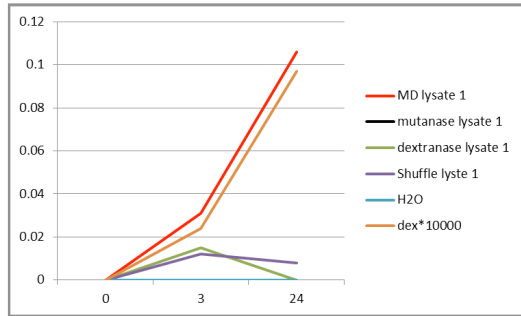
(3) キメラ酵素の活性測定

デキストラナーゼ、ムタナーゼ、ムタナーゼ・デキストラナーゼキメラ酵素画分の酵素活性をデキストラン、ムタン、カルボキシメチルを基質として測定した結果、ムタナーゼ・デキストラナーゼキメラ酵素はいずれの基質も分解することが分かった (図 3 a, b, c)。

(a) デキストラン



(b) ムタン



(c) カルボキシメチルムタン

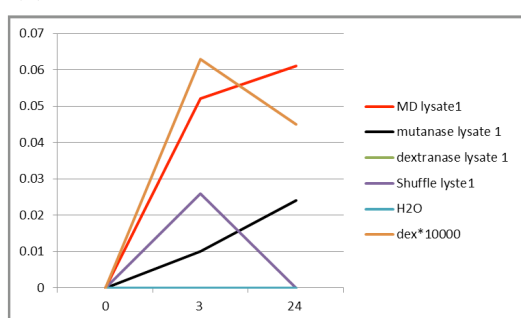


図 3. デキストラン、ムタン、カルボキシメチルムタンに対するキメラ酵素の作用

| | |
|-----------------------|------------------|
| 凡例 | |
| — MD lysate 1 | キメラ酵素画分 |
| — mutanase lysate 1 | ムタナーゼ画分 |
| — dextranase lysate 1 | デキストラナーゼ画分 |
| — Shuffle lysate 1 | ベクターのみ画分 |
| — H ₂ O | H ₂ O |
| — dex*10000 | 市販デキストラナーゼ |

ムタナーゼ・デキストラナーゼキメラ酵素はデキストラン、ムタンを効率よく分解できることがわかった。キメラ酵素のデキストラナーゼ活性の至適 pH は 5 をピークに 4 ~ 5.5、ムタナーゼのそれは pH 4 ~ 6.5 の広いピークであった。キメラ化したことでムタナーゼ活性、デキストラナーゼ活性を消失することなく、両酵素の性質を保つことが確認できた。今回作製したキメラ酵素を基本にして更に効率よくバイオフィルムを分解できる新しい酵素を創出できる可能性が示唆された。今後は機能ドメインのシャッフリングにより更に高機能のキメラ酵素の創出を目指したい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Okamoto M, Imai S, Nomura Y, Hanada N, et al., *Streptococcus troglodytae* sp. nov., from the Chimpanzee Oral Cavity. Int J Sys Evol Microbiol., 査読有, 2012, in press.
- ② Nomura Y, Ishikawa M, Nakamura Y, Hanada N, et al, Human periodontal ligament fibroblasts are the optimal cell source for induced pluripotent stem cells. Histochem Cell Biol. 査読有, 2012.
- ③ Yoshihara A, Watanabe R, Hanada N, Miyazaki H, A longitudinal study of the relationship between diet intake and dental caries and periodontal disease in elderly Japanese subjects, Gerodontology, 査読有, 2009, 130-136.
- ④ Tamaki Y, Nomura Y, Katsumura S, Okada A, Yamada H, Tsuge S, Kadoma Y, Hanada N, Construction of a dental caries prediction model by data mining, J Oral Sci., 査読有, 2009, 61-68.

[学会発表] (計 22 件)

- ① 大塚 良子, 今井 奨, 花田信弘他、ムタナーゼとデキストラナーゼからなるキメラ酵素作製とその性状、日本歯科保存学会、2012、沖縄。
- ② Okamoto M, Imai S, Hanada N,

Streptococcus mutans-like microorganism isolated from the chympanzee oral cavity,

- 第 85 回 日本細菌学会総会、2012、長崎。
- ③ 花田 信弘、野村義明、今井 奨他、唾液検査の標準化に関する検討、第 61 回日本口腔衛生学会・総会、2012、横須賀。
 - ④ 宮之原真由、今井 奨、野村義明、花田信弘他、人類進化モデル (チンパンジー) の歯垢より単離したレンサ球菌の性状について、第 61 回日本口腔衛生学会・総会、2012、横須賀。
 - ⑤ 角田衣理加、今井 奨、野村義明、花田信弘他、ムタナーゼとデキストラナーゼ両遺伝子の連結によるバイオフィルムの分解、第 53 回歯科基礎医学会、2011、岐阜。
 - ⑥ 宮之原真由、今井 奨、野村義明、花田信弘他、チンパンジー口腔由来のレンサ球菌の性状に関する研究、第 60 回日本口腔衛生学会・総会、2011、松戸。
 - ⑦ 野村義明、石川美沙緒、今井 奨、花田信弘他、iPS 細胞の安全性に関する検討、第 60 回日本口腔衛生学会・総会、2011、松戸。
 - ⑧ Hanada N., Tada A., Takeuchi H., Imai S., Nomura Y. et al, The invader assay: An alternative tool for quantifying periodontopathic bacteria, 88th General session and exhibition of the International Association for Dental Research, Barcelona, Spain, 2010.
 - ⑨ Momoi Y., Saito W., Ogawa T., Ikawa T., Nomura Y., Imai S., Hanada N., Miyabe, Y. et al, Oral status of chimpanzees in primate research institute Kyoto University, Japanese Association for Dental research, 58th annual meeting, Kitakyushu, Japan, 2010.
 - ⑩ 小川 匠, 井川知子, 齋藤 渉, 今井 奨, 野村義明, 花田信弘他、チンパンジーの口腔内および顎顔面領域の定期検診ならびに歯科処置について、鶴見大学歯学会第 72 回例会、2010、横浜市。
 - ⑪ 宮之原真由, 今井 奨, 齋藤 渉, 岡本公彰, 野村義明, 花田信弘他、チンパンジー歯垢より単離したレンサ球菌の性状に関する研究、鶴見大学歯学会第 72 回例会、2010、横浜市。
 - ⑫ 今井 奨、特定保健用食品と口腔保健歯科領域の新たな評価系について、国際歯科研究学会日本部会シンポジウム、2009、横浜市。

[図書] (計 2 件)

- ① 今井 奨 (共著)、機能性食品の作用と安全性百科、丸善株式会社、2012、印刷中

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今井 奨 (IMAI SUSUMU)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：80072958

(2) 研究分担者

花田 信弘 (HANADA NOBUHIRO)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：70180918

野村 義明 (NOMURA YOSHIAKI)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：90350587

(3) 連携研究者

なし