

バイオフィーム形成阻害物質のスクリーニング. 1. 海藻有機溶媒抽出物質への適用

Construction of inhibitor detection screening system of the biofilm formation.1. Apply screening system to organic solvent extracts from seaweed.

日本歯科大学生命歯学部 柴田 潔

日本歯科大学附属病院 荒井 千明

Kiyoshi SHIBATA¹ and Chiaki ARAI²

¹Department of Chemistry, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Tokyo
1-9-20 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8159, Japan

²The Nippon Dental University Hospital, 2-3-16 Fujimi, Chiyoda-ku, Tokyo 102-8158, Japan

Abstract: Setup the screening system for detect the products that inhibit biofilm formation in oral. The hemolytic and the glucan production activities were evaluated by UV spectrometer.

Some crude extracts from seaweed showed obstructing generation of the glucan without obstruct growth of *Streptococcus sobrinus*.

Key words: seaweed, crude extract, inhibition, biofilm

(2016年11月30日 受理)

1 はじめに

う蝕（虫歯）の生成過程は、糖質等の多糖類やショ糖などの甘味料を含む食物を摂取すると、それらを原料にして *Streptococcus mutans* や *Streptococcus sobrinus* 等の口腔内細菌の産生する酵素により粘着性の多糖体（不溶性グルカン）がつくられることから始まる。グルカンが形成されると、歯牙の表面で他の口腔細菌とともにプラークと言われる塊を形成し、う蝕の発症や進行の要因となっている。多種類の口腔内細菌を含むプラークは、口腔内バイオフィームとも呼ばれ、含まれる多様な有害細菌により様々な病原性を示すことが明らかとなっており、う蝕の原因だけにとどまるものではないといった認識が一般の人々にも定着するものとなっている。また、近年の研究に

よれば、菌数の増加を関知し病原菌自らの生育に有利な環境に対応した個体変化（クォーラムセンシング: quorum sensing）が起こるなど興味深い挙動を示すことも知られ、集団での挙動や性質の変化が観察できるモデルとしても注目されている。^{1,2)}

バイオフィームを生成に関する知見も明らかになっており、*Streptococcus sobrinus* のグルカン合成酵素 (GTF) は、ショ糖からフルクトースを遊離すると共にグルコースを重合して粘着性を示す不溶性グルカンを生成することが知られている。この様な不溶性グルカン合成は、 α -1,6 結合を主鎖とする水溶性グルカンを合成する酵素 (GTF-S) と α -1,3 結合を主鎖とする不溶性グルカンを合成する酵素 (GTF-I) とにより複雑に混じり合うことなどにより、不溶性グルカンに粘着性が生まれること

表 1. 試料藻類種とその採取地・採取日

No.	和名	学名	採取地	採取日
3	ムチモ	<i>Cutleria cylindrica</i>	神奈川県横須賀市天神島	2003/11/28
7	ハイミル	<i>Codium lucasii</i>	神奈川県横須賀市天神島	2003/12/22
15	ヒジキ	<i>Sargassum fusiforme</i>	神奈川県横須賀市天神島	2004/2/19
39	ナラサモ	<i>Sargassum nigrifolium</i>	静岡県下田市白浜	2004/4/27
41	スジアオノリ	<i>Enteromorpha prolifera</i>	沖縄県奥武島	2004/5/13

※各海藻種に付した数字(No.)は、本学化学教室に保存中のサンプル整理番号に対応する。

が知られている。³⁾

本研究では、バイオフィーム生成菌は、通性嫌気性のグラム陽性菌であり直接生育を阻害する物質であれば多くの口腔内細菌に影響が出てしまうことが予想されることから、バイオフィーム生成酵素を選択的に阻害する作用を有する天然化合物の探索を目的としたスクリーニングシステムを検討した。すなわち、これまでに各地から採取した海藻より有機溶媒抽出によって得られた脂溶性粗物質 4)を用い、ヒツジ無菌脱繊維素全血より分離した赤血球の溶血活性を指標として、低い細胞毒性の抽出物質を選択した。次いで、バイオフィーム生成については、BHI (BRAIN HEART INFUSION) 培地にて *Streptococcus mutans* を培養し得られた粗酵素液を用い、フェノール硫酸法⁴⁾により各種海藻抽出物質のバイオフィーム生成抑制効果を生成するグルカン量によりを判定した。

2 材料と方法

(1) 海藻の採取

本研究に用いた海藻類は、Table 1 に示したように、茨城県ひたちなか市平磯、千葉県館山市坂田、神奈川県横浜市金沢区野島公園、横須賀市天神島、静岡県下田市白浜、田牛、新潟県柏崎市鯨波、沖縄県奥武島の各地より採取し、淡水・気生藻を含んでいる。また、全ての海藻は潮間帯で採取した後、すみやかに - 25 °C において凍結保存したものをを用いた。使用した藻類は、次の5種 (ムチモ(3), ハイミル(7), ヒジキ(15), ナラサモ(39), スジアオノリ(41)) である。

(2) 評価試料の調整

採取地において凍結した海藻試料を解凍し、水洗によって付着物を除いた後、表面の水分を除き、葉片約 50 g を秤量した。これに蒸留水を 200ml 加えミキサーで粉碎し、さらに 10 分間超

音波破碎を行って海藻懸濁液を得た。次いで、当量のクロロホルムを加え 1 時間攪拌後、ゼオライトを濾過補助剤として用い濾過して固形物を除いた。通過液を分液ロートに移し水層を分離後、クロロホルム分画を無水硫酸ナトリウムにて脱水し、減圧下乾固して評価試料とする海藻粗抽出物を得た。⁵⁾ 葉片 50g からの粗抽出物の収量はそれぞれのムチモ(3)で 72.3mg, ハイミル(7)で 18.0mg, ヒジキ(15)で 65.6mg, ナラサモ(39)で 6.0mg, スジアオノリ(41)で 30.0mg である。

(3) 溶血活性の測定

1) ヒツジ無菌脱繊維素全血母液の調整

ヒツジ無菌脱繊維素全血(Sheep Whole Blood Defibrinated Sterile) 3ml に生理食塩水 3ml を加え攪拌し、遠心分離 (3000rpm, 3min) 後、駒込ペットで上澄を除去した。この操作を 3 回繰り返し、残渣部分を赤血球母液とした。赤血球母液の血球数は、 $315 \times 10^4/\mu\text{l}$ であった。

2) 紫外線吸収スペクトルによる溶血活性測定⁶⁾

評価試料 1mg を DMSO 1ml に溶解あるいは懸濁し、試料濃度 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の試料溶液を調整後、生理食塩水 600 μl を分注した遠心管に試料濃度 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の評価試料 200 μl を加え攪拌し試料濃度 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の試料溶液を調整した。同様に生理食塩水 600 μl を分注した遠心管に試料濃度 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の評価試料 200 μl を加え攪拌し試料濃度 62.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の試料溶液を調整した。以後どうように 4 倍希釈を行い、15.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の試料溶液をそれぞれ得た。直ちに、攪拌し 15 分間放置した後、遠心分離 (3000rpm, 30sec) し、上澄 3ml を石英セルに移し、541nm における吸光度を測定した。なお、試料の濁度補正の対照試料として赤血球母液の代わりに生理食塩水を用い、生理食塩水に赤血球母液を入れたものを自然溶血量として差し引いた。

表2. 試料藻類種と溶血活性

No.	和名	試料濃度	溶血活性 (%)				
			1000 μ g/ml	250 μ g/ml	62.5 μ g/ml	15.6 μ g/ml	3.9 μ g/ml
3	ムチモ		32	10	4	0	0
7	ハイミル		85	67	32	11	0
15	ヒジキ		23	12	0	0	0
39	ナラサモ		9	2	0	0	0
41	スジアオノリ		41	10	0	0	0

※各海藻種に付した数字(No.)は、本学化学教室に保存中のサンプル整理番号に対応する。

(分光光度計 UVmini-1240 島津製作所 541nm)

(4) バイオフィルム生成酵素 (グルカン生成酵素 GTase) 抑制

1) バイオフィルム生成酵素 (GTase) 粗酵素液の調製

凍結乾燥保存された *S.sobrinus* を、BHI (Brain Heart Infusion) 寒天培地で、37°C、5%CO₂ の条件下、24 時間、静置嫌気培養した後、発生したコロニーを全て BHI 液体培地 10ml に懸濁し、同一の条件で培養した。次いで、BHI 液体培地 190ml にシード培養液 10ml を入れ、同一条件で 48 時間引き続き培養を行なった。次いで、ゼオライト層を通過させた後、培養液を遠心分離 (10,000 x g, 4°C, 15 分) して菌体を除去した。更に、限外ろ過ディスク (MW 30,000) を用いて、通過液をバイオフィルム生成酵素 (GTase) 粗酵素液とした。これを -20°C にて凍結保存し必要量を解凍し以後の測定に用いた。

2) バイオフィルム生成抑制の測定

0.1mol-リン酸緩衝液 (pH6.8) 2.0ml にバイオフィルム生成酵素 (GTase) の基質となる 1.0%-スクロース溶液 1.0ml を加え、次いで各海藻抽出物質を最終濃度 1000 μ g/ml、500 μ g/ml、250 μ g/ml、125 μ g/ml、62.5 μ g/ml となるよう DMSO 懸濁液 0.5ml を加え攪拌後、粗酵素液 0.5ml を加え全量 4ml としたものを 37°C にて 24 時間放置した。

海藻抽出物質の DMSO 懸濁液は、各海藻より得られた抽出物質 4mg を DMSO 1ml に溶解後、倍々希釈法により各段階の海藻抽出物濃度の懸濁液を得ている。また、スクロースの最終濃度 250 μ g/ml となっている。

24 時間反応後、反応液を 5 分間煮沸し遠心分離 (2000 x g, rt, 20 分間) を行った。沈殿物を蒸留水で 2 度洗浄し、不溶性のバイオフィルム構成物質とした。更に、上清は、4ml のエタノー

ルを加え攪拌放置を繰り返した後、一晩静置した後に、遠心分離 (2000 x g, rt, 20 分間) を行い沈殿物が得られた。これを可溶性グルカン部分とした。

グルカンの定量は、フェノール硫酸法を用いて行なった。水溶性グルカンおよび不溶性のバイオフィルム構成物質の沈殿物に 1mol NaOH 4ml を加え良く溶解した後、0.5ml を分取した。これに 5%フェノール水溶液 0.5ml を加え、次いで濃硫酸 2.5ml を加えた。攪拌し 10 分間放置した後に、常温の水浴でさらに冷却し 490nm で吸光度を測定し、グルコース標準線より不溶性グルカンおよび水溶性グルカンの総量を生成グルカン量とし求めた。

(分光光度計 UVmini-1240 島津製作所 490nm)

3 結果と考察

海藻 50g より得られた粗抽出物の収量が、それぞれムチモ(3)で 72.3mg, ハイミル(7)で 18.0mg, ヒジキ(15)で 65.6mg, ナラサモ(39)で 6.0mg, スジアオノリ(41)で 30.0mg であるため、各種海藻より得られた粗抽出物の羊赤血球を指標とした殺細胞作用の評価は、海藻の評価でなく粗抽出物での評価とし、1000 μ g/ml より 4 倍希釈法で希釈後、各濃度での溶血量を三木らの方法により 490nm における検量線より求め、蒸留水での溶血量を 100%、生理食塩水での自然溶血量を 0%と補正し各濃度の溶血量をパーセントで表 2 に示した。バイオフィルム生成抑制の測定でも 1000 μ g/ml より希釈を行っているため、これを考慮すると、ハイミル(7)では 1000 μ g/ml において 85%、250 μ g/ml において 67%と高い溶血活性を示した。これは、ハイミル(7)が抗菌活性を示したことと一致している。

表 3. 評価試料の不溶性および可溶性グルカン生成量

評価試料	藻類量 ($\mu\text{g/ml}$)	不溶性グルカン生成量(mg)				可溶性グルカン生成量(mg)			
		1000	500	250	125	1000	500	250	125
3 ムチモ	褐藻	10.6	12.9	12.9	13.3	2.9	3.4	3.8	3.8
7 ハイミル	緑藻	2.6	4.3	6.5	9.3	0.8	1.7	2.3	3.6
15 ヒジキ	褐藻	8.7	11.4	12.2	12.9	2.2	2.8	3.6	3.8
39 ナラサモ	褐藻	10.3	11.0	12.6	13.3	2.8	3.2	3.6	3.7
41 スジアオノリ	緑藻	9.5	12.1	12.6	12.8	2.6	3.4	3.7	3.7
control	—	13.5	13.5	13.5	13.5	3.7	3.7	3.7	3.7

一方、ムチモ(3)、ヒジキ(15)、ナラサモ(39)、スジアオノリ(41)は、1000 $\mu\text{g/ml}$ においてスジアオノリ(41)が、41%を示したものの250 $\mu\text{g/ml}$ において10%と低下しそれ以下の濃度では、溶血活性を示していない。

グルカンの生成量については、不溶性グルカン及び可溶性グルカンのいずれでも海藻抽出物質を添加したものは、生成量の減少がみられた。ムチモ(3)、とナラサモ(39)では同一の傾向を示し、抽出物質濃度500 $\mu\text{g/ml}$ 以下では作用が見られず、1000 $\mu\text{g/ml}$ でのみ僅かな活性がみられた。

これとは別に、ヒジキ(15)とスジアオノリ(41)では、抽出物の濃度が上昇するのに従い、直線関係では無いものの不溶性グルカンと可溶性グルカンの現象が顕著にみられた。すなわち、ヒジキ(15)では、海藻試料を加えていないコントロールで不溶性グルカンの生成量13.5mgであったが、1000 $\mu\text{g/ml}$ で8.7mg、また、可溶性グルカンの生成量もコントロールで3.7mgであったものが1000 $\mu\text{g/ml}$ で2.2mgと顕著に生成の阻害がみられた。スジアオノリ(41)でも同様の平衡であるが、前述の溶血作用が弱いヒジキ(15)が目的のバイオフィーム生成酵素阻害効果を有する可能性が示された。

一方、ハイミル(7)は、溶血作用が高いことから菌体事態にダメージを与えグルカン合成を減少させていることは明らかであり、今回のスクリーニングシステムで、除けることが検証された。

可溶性グルカン量が想定より低く、分離操作におけるロスによるものなのか再度の検討が必要であることも明らかになった。

今後、バイオフィーム生成酵素の精製を行い酵素反応の阻害を明確に判定できるようにしたい。

謝 辞

海藻の採取および種同定について助言下さいました東京海洋大学海洋科学部海洋環境学科藻類学研究室の田中次郎教授に御礼申し上げます。本研究を行うにあたり、傘孝之教授ならびに南雲保教授には、多大なるご配慮を賜りました。

文 献

- 1) Nakayama, J., Y. Cao, T. Horii, S. Sakuda, A. Akkermans, W. M. de Vos, and H. Nagasawa. : Gelatinase biosynthesis-activating pheromone peptide lactone that mediates a quorum sensing in *Enterococcus faecalis*. *Mol. Microbiol.* **41**: 145-15. 2001.
- 2) 中山二郎：日和見感染腸球菌におけるクォーラムセンシング. *化学と生物* **40** : 406-412. 2002
- 3) 小西 法文：*Streptococcus sobrinus* 不溶性グルカン合成酵素の構造と機能. *岡山歯学会雑誌*. **13** : 195-207. 1994
- 4) 北村 進一, 中屋 慎：糖の定量法 *生物工学* :**90** 790-793. 2012
- 5) 柴田潔 薩摩林貞美 田中次郎：海藻由来の生理活性物質の探索 I. 分離精製方法および抗菌活性：日本歯科大学紀要、一般教育系、29: 117-124. 2000.
- 6) Miki, M., Tamai, H., Mino, M., Yamamoto, Y., and Niki, E. Free-radical chain oxidation of rat red blood cells by molecular oxygen and its inhibition by α -Tocopherol, *Arch.Biochem. Biophys.* **258**: 373-380. 1987