

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：15K20590

研究課題名(和文) S. mutansのバイオフィーム形成におけるストレス応答メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of stress response mechanism in biofilm formation of S. mutans.

研究代表者

八十川 友紀(松三友紀)(Yasokawa, Yuki)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：90732800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：齲蝕病原性細菌Streptococcus mutansの特徴の1つとして高い耐酸性を有している。これにより低pH下で生育可能となっている。耐酸性に関わるタンパクとして分子シャペロンDnaKが挙げられる。本研究では、DnaK過剰発現株とDnaK発現抑制株を作製し実験を行った。過剰発現株の耐酸性能は発現抑制株と比較して明らかに上昇しており、低pH下で強い菌体凝集が認められた。また、過剰発現株により形成されたバイオフィームでは、著明な凝集塊が認められ、厚みも上昇していた。以上の結果より、バイオフィーム構造に変化を及ぼし、バイオフィーム形成を制御する遺伝子の発現にも影響を与える可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus mutans, implicated as a primary causative agent of dental caries, shows acid tolerance as an important characteristic and is known to survive under acidic conditions, while the molecular chaperone DnaK has been suggested to be involved in its acid-tolerance mechanism. For this study, S. mutans strains with overexpression (DnaK-o) and suppressed expression (DnaK-s) of DnaK were constructed and examined. The acid tolerance of DnaK-o was obviously elevated as compared to the parental and DnaK-s strains. In addition, DnaK-o showed strong cell aggregation under acidic conditions. The structure of biofilms formed by DnaK-s was sparse as compared to biofilms formed by the other strains, while formed by DnaK-o had significantly greater height. These results suggest that DnaK expression by S. mutans may have effects on the structure of biofilm formed by the organism, indicating the importance of control of cell surface protein expression in regard to the biofilm formation.

研究分野：小児歯科学分野

キーワード：Streptococcus mutans バイオフィーム プロテオーム

1. 研究開始当初の背景

主要な齲蝕原性細菌である *Streptococcus mutans* の菌体表層には多くの病原性の高いタンパクが存在しており、それらの発現により口腔バイオフィームが形成して病原性を発揮することが知られている。これらの表層タンパクは、あらゆる環境に対応し発現し続けることにより、バイオフィーム形成能を保っていることが分かっている。他の口腔細菌種と比較した際に *S. mutans* の最大の特徴は、極めて高い耐酸性を有することで口腔内で優位性を保つことが可能となっている。*S. mutans* において、耐酸性を司る菌体表層タンパクが存在していることが示唆されている。

S. mutans の病原性はすでに表層タンパクであるグルカン合成酵素 (glucosyltransferase; GTF) およびグルカン結合タンパク (glucan-binding protein; Gbp) であることが知られている。GTF は GTFB、GTFC、GTFD の 3 種類が存在し、それぞれをコードする遺伝子が明らかにされている。Gbp は GbpA、GbpB、GbpC の 3 種類が存在し、それらをコードする遺伝子も報告されている。GbpA は菌体外分泌型であり、GTFB のグルカン結合ドメインに存在する繰り返し構造と相溶性が高く、特に *S. mutans* のバイオフィーム形成に深く関与していると考えられている。しかしながら、それらの発現制御メカニズムは未だ不明である。これまで、*S. mutans* のシグナル伝達システムの 1 つであるクオラムセンシングにおける表層タンパクの発現について検討を行った結果、遺伝子のリコンビネーションを起こす RecombinaseA (RecA) をコードし、クオラムセンシングに関連する遺伝子である *recA* の発現が上昇すると、GTF のリコンビネーションがある一定の割合で起こることを明らかとした (Inagaki et al., *Scientific World Journal*, 2013)。さらに、菌体遊離型である GbpA タンパクを人工的に欠失させると、*gtfB* 遺伝子の発現が誘導されることが分かった。また、*recA* と同様に耐酸性に関連する *dnaK* および *groEL* の発現も誘導された。これら 2 つの遺伝子は、シャペロンタンパク DnaK および GroEL をコードする遺伝子であり、ストレス応答タンパクであることが報告されている。これらのタンパクは、他のタンパクがダメージを受ける際に、修復する機能を持つ。GbpA タンパクが欠失した結果として菌がストレス状態となり、*dnaK* および *groEL* の発現が上昇し、ストレス応答の結果として、*gtfB* の発現が上昇し、表層タンパク GTF の発現に影響を与えたと考えられる。このことは、1 つのタンパクの欠失により、菌を取り巻く環境が変化したために、それを補うためのその他のタンパクの発現がストレス応答により、上昇したと考えられる。このストレス応答メカニズムにより、*S. mutans* は新たな構

造のバイオフィームを形成することができると考えられる (Matsumi et al., *Molecular Oral Microbiology*, 2015)。

以上の研究結果から、DnaK および GroEL が *S. mutans* の酸耐性にとって重要な働きをもつことが示唆された。シャペロンタンパク DnaK および GroEL はシャペロンタンパクにおける GTF に対する作用は明らかとなったもののその他のタンパクについては不明である。さらに DnaK および GroEL のみで、すべての表層タンパクの発現に関連する遺伝子としては考えにくく、発現調節メカニズムは多岐にわたり多くの調節因子が機能していると考えられる。同種細菌間のシグナル伝達システムとして、グラム陽性細菌ではこの調整に 2 成分調整因子が関与し、*S. mutans* では *comABCDE* 遺伝子群が遺伝的形質転換としてこのシグナル伝達システムに関与していることが明らかとなっている。また、DnaK および GroEL の発現を促すシグナル受容体の存在が示唆されており、これまでに 2 成分調節因子システム (Two-component signal transduction system) における *comDE* 遺伝子に代表される ABC transporter および抗生物質輸送システムにおける bacteriocin immunity protein の存在が明らかとされているが、その他のシグナル受容体については未だ不明である。*S. mutans* のさまざまなストレスに対する応答メカニズムは、シグナルを感受する受容体とそれによって発現が誘導される様々なタンパクが存在しているため、極めて複雑なメカニズムとなっていることが推測される。

2. 研究の目的

齲蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* は、高い耐酸性を有しているため、口腔内の低い pH 環境の中でもバイオフィームを形成し続けることが可能である。その耐酸性には *S. mutans* の表層タンパクと低 pH を感知するシグナル受容体が機能していると考えられている。特に耐酸性は、*S. mutans* のシグナル伝達システムの中でも重要な因子であると思われるが、その詳細については不明な点が多い。本研究の目的は、*S. mutans* の耐酸性に関連する表層タンパクおよびそれらの発現を誘導するシグナル受容体を特定し、*S. mutans* の耐酸性誘導メカニズムについて解明するとともに、*S. mutans* のバイオフィーム形成における新たなシグナル伝達システムを確立することである。

3. 研究の方法

(1) DnaK 過剰発現株および発現抑制株の作製 *dnaK* 遺伝子の過剰発現株および発現抑制株の作製を行う。また、発現抑制株における相補株を作製できるように、プラスミドの作製は、シャトルベクターを用いて行う。*S. mutans* MT8148 株の DnaK を過剰発現株 DnaK-o、DnaK の発現抑制株 DnaK-s を作製

し、pDL278 を *S. mutans* MT8148 株に組み込んだ MT-pDL 株を作製し、コントロールとして実験に供試した。

(2) コロニー形態の比較

各変異株を 10 ml の Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地にて 37°C で 18 時間培養後、培養した菌液を spectinomycin 含有 Mitis-Salivarius (MS) 寒天培地にそれぞれ播種した。37°C で嫌氣的に 2 日間培養を行った後、実体顕微鏡を用いてコロニー形態を観察した。

(3) 耐産生能の測定

BHI 液体培地で一晚培養した供試菌を 10 ml の 0.3% Yeast Extract 含有 TH (THYE) 液体培地に播種し、18 時間培養した。この菌液 1 ml を新しい 9 ml の THYE 液体培地に播種し、濁度が波長 600 nm で 0.4~0.5 になるまで培養した。培養後、遠心して得られた菌体に pH 5.0 に調整した THYE 液体培地を 2 ml 加え、37°C で 2 時間培養した。培養後、その 100 μ l を pH 5.0 に調整した THYE 寒天培地に播種し、残りの 1 ml の菌液を pH 3.5 に調整した 9 ml の THYE 液体培地に播種した。pH 3.5 の液体培地を 37°C で 3 時間培養後、その 100 μ l を pH 3.5 に調整した寒天培地に播種した。これらの寒天培地を 37°C で 2 日間嫌氣的に培養し、寒天培地上のコロニー数を計測した。pH 5.0 の培地上のコロニー数に対する pH 3.5 の培地上のコロニー数の割合をその菌の耐酸性を示す指標として算出した。

(4) 酸性状態における凝集能の測定

各変異株を TH 液体培地で 37°C、18 時間培養し、遠心分離で菌体を回収した。sucrose 添加、非添加リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; 137 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄) を添加し、波長 600 nm が 0.2 になるまで調整し、37°C で培養した。培養開始後、1.5 時間、6 時間、10 時間後の凝集の状態を観察した。凝集が開始し始めた時点を±、強い凝集が認められた場合を+として評価した。

(5) バイオフィーム構造の観察

供試菌を TH 液体培地で 37°C、18 時間培養後、遠心分離により菌体を回収した。10 mM の Hexide iodide で菌体を染色し、0.5% sucrose 含有化学合成培地 [CDM; 58 mM K₂HPO₄, 15mM KH₂PO₄, 10 mM (NH₄)₂ SO₄, 35 mM NaCl, 0.2% Casamino acids, 100 mM MnCl₂·4H₂O (pH7.4), 20 mM Nicotinic acid, 50 mM Pyridoxine HCl, 5 mM Pantothenic acid, 0.5 mM Riboflavin, 0.15 mM Thiamine HCl, 0.015 mM D-biotin, 50 mM L-glutamic acid, 12.5 mM L-arginine HCl, 16.25 mM L-cysteine HCl, 1.25 mM L-tryptophan, 1 M MgSO₄·7H₂O] にて、波長 600 nm におけ

る濁度が 0.1 となるよう調整し生菌試料とした。これらの菌液をポリスチレン製 8 穴 Lab-Tek チャンバースライドシステムに 200 μ l ずつ播種し、37°C で 24 時間培養した。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 LSM780 (Version 4.2) にて観察した。形成されたバイオフィームの厚さは ImageJ (Version 10.2) により数値化し評価した。これらは、バイオフィーム 1 画像につき各 3 箇所を無作為に抽出して行った。

(6) リアルタイム PCR による定量的遺伝子解析

各変異株を TH 液体培地で 37°C、18 時間培養後、新鮮な同液体培地に継代し、濁度が吸光度 600 nm で 0.7 になるまで培養した。培養物を 4°C で 5,000 rpm、15 分間遠心し、菌体を回収した。得られた菌体を 300 μ l の UltraPure™ Diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水に懸濁し、Lysing Matrix B® に菌液を移し、TRI Reagent を 900 μ l 添加した後、FastPrep® を用いて菌体を破碎した。破碎菌体を含む懸濁液を遠心し、500 μ l の chloroform を混和させた後、水層中の全 RNA を 300 μ l の 2-propanol を用いて沈殿させた。その後、得られた沈殿を 75% ethanol にて洗浄し、乾燥後、20 μ l の DEPC 処理水に懸濁した。全 RNA 3 μ g に RNase-free DNase I を加え、37°C で 30 分間処理した後、Random primers® および SuperScriptIII® を用いて cDNA を合成した。作製した cDNA を鋳型として、各株における *dnaK*, *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*, *gbpA*, *gbpB*, *gbpC* の発現を SYBR green® を用いた Real-time Reverse transcription-PCR (RT-PCR) 法により調べた。遺伝子増幅反応ならびに蛍光強度の測定には StepOnePlus™ を使用した。Real-time RT-PCR の条件は添付の指示書に従い設定した。各遺伝子の増幅には、プライマーを用いた。また、目的遺伝子の発現量は、16S rRNA を内部標準として補正した。

(7) 活性染色による GTF 発現量の分析

供試菌を BHI 液体培地で 37°C、18 時間培養後、TH 液体培地に継代し、培養液の濁度が波長 600 nm で 1.0 になるまで培養した。培養液を、3,000 rpm、4°C で 10 分間遠心し、菌体を回収した。得られた菌体を PBS 100 ml で懸濁し、Gel loading buffer [1 M Tris (pH 6.8), 10% Sodium Dodecyl sulfate (SDS), 0.2% Bromophenol blue, 5% Glycerol] 100 ml および、10 mM Dithiothreitol (DTT) 20 ml を加えて 10 分間加熱し、SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)) 用試料とした。SDS-PAGE は Mini-PROTEAN Tetra System を用いて、室温で 200 V 定電圧で行った。分子量測定マーカーとして、

Precision Plus Protein Dual Color standards を用いた。泳動後、50% methanol、5% acetic acid、2.5g/l Coomassie Brilliant Blue R250 で 30 分染色した後、5% methanol、7% acetic acid で一晩脱色し、バンドを視覚化した。

SDS-PAGE 後、ゲルをリン酸緩衝液 (10 mM NaH_2PO_4 、10 mM Na_2HPO_4) 中にて室温で 30 分間振盪させた後、この溶液に 3% sucrose と 0.5% TritonX-100 を混和させた溶液で、37 °C で 18 時間振盪した。12.5 % Trichloroacetic acid にて 37°C で 15 分間振盪し、蒸留水で 3 分間洗浄を行った後、Periodic acetic acid solution (1% Orthoperiodic acid、3% Acetic acid) 中にて 37°C で 30 分間振盪した。蒸留水で 6 回洗浄を行い、ゲル上に存在する GTFB および GTFC により生成されたグルカンを 0.4% Pararosaniline Base 染色液にて 30 分間染色した。0.5% Sodium disulfite で 3 回洗浄後、さらに蒸留水で洗浄を行った。染色されたグルカンの面積を ImageJ により数値化することにより相対量として表した。

4. 研究成果

S. mutans は、pH の低下が急激であると十分な適応能力が発揮できず発育できないが、徐々に pH が低下した場合は厳しい酸性環境でも発育することが可能であることが報告されている。そこで耐酸性実験において、pH 5.0 で 2 時間暴露させた後に pH 3.5 の厳しい酸性下に暴露させたところ、DnaK-o 株が MT-pDL 株と比較して有意に耐酸性能が上昇し、DnaK-s 株が有意に減少していた。このことから、DnaK が *S. mutans* における緩和な酸性環境による暴露によって獲得される耐酸性に関与していることが示唆された。

GTFB をコードする *gtfB* を欠失させた株では *S. mutans* のラフ型のコロニー形態がスムーズ型に変化することから、コロニー形態には GTFB が産生する非水溶性グルカンの量が関与しているとの報告がある。今回、MT-pDL 株や DnaK-s 株では親株である MT8148 株とほぼ変化が認められなかったのに対し、DnaK-o 株におけるコロニー形態は分葉化しラフな形態をしていたことから、DnaK は GTF の発現に関与している可能性が示唆された。また、バイオフィーム構造において、MT-pDL 株と比較して DnaK-o 株では著明な凝集塊が認められた。そこで GTF の発現と酵素活性を SDS-PAGE を用いた分析により調べたところ、DnaK-o 株の GTF のバンドが MT-pDL 株のバンドと比較してより濃く太く出現していることから、DnaK-o 株の GTF 酵素活性が上昇していることが示された。さらに凝集試験では、培養開始 1.5 時間後では DnaK-o 株の凝集が開始し、10 時間培養後では DnaK-o 株に強い凝集を認めた。この結果より、DnaK は菌

の凝集に関与する Gbp の発現にも関与している可能性が示唆された。そこで、各変異株における GTF と Gbp の各遺伝子の発現を調べたところ、MT-pDL 株と比較して DnaK-o 株における *gtfB*、*gbpA*、*gbpC* の発現の増加が認められた。

外環境の pH が低下すると *S. mutans* はタンパクのシグナル分子を菌体外に分泌して、自らの耐酸性能を誘導する可能性がある。また、過去の研究において、*S. mutans* MT8148 株において GbpA を欠失させると、MT8148 株と比較してストレス応答タンパクである DnaK、GroEL の発現が上昇していたとの報告がある。今回の研究により、DnaK が GTF や Gbp の発現にも関与していることが示唆された。しかし、DnaK の GTF や Gbp といった表層タンパクを制御している機序については明らかとなっていない。口腔内のバイオフィームはシグナル伝達システムであるクオラムセンシングのもとで形成され、表層タンパクの発現には多くの調節因子が口腔内の環境変化に併せて機能していると考えられる。そのため、DnaK の発現に影響を与えるシグナル遺伝子を明らかとすることも含め、今後さらなる検討が必要である。

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)

[学会発表] (計 1 件)

① 吉田衣里、松三友紀、高島由紀子、仲野道代、*Streptococcus mutans* における分子シャペロン DnaK の役割、日本小児歯科学会、2017 年 5 月 25・26 日、西日本総合展示場新館 AIM、福岡県小倉市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

八十川 友紀 (YASOKAWA, Yuki)
岡山大学病院 小児歯科 助教
研究者番号：90732800

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()