

令和元年6月12日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05550

研究課題名(和文) バイオフィーム感染症におけるABCトランスポーターの役割の探索と齲蝕予防への応用

研究課題名(英文) ABC transporter function in biofilm formation and its application for dental caries prevention

研究代表者

仲野 道代(松本道代)(NAKANO, Michiyo)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30359848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、グルタミンABCトランスポーター(GlnP) 欠失変異株(GlnP)を作製し、バイオフィームを形成させたところ、親株と比較して明らかに構造が変化していた。また、GlnPでは膜流動性が変化し、耐酸性も著しく低下していた。さらに、シグナル伝達システムに関連する遺伝子のうちComCを欠失させた変異株では、GlnPおよびGlnPとオペロンを形成しているPIIプロテインの発現は顕著に低下していた。以上のことより、ABCトランスポーターは物資の膜輸送の機能を有しバイオフィーム形成におけるシグナル伝達システムに強く関与し、バイオフィーム形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ABCトランスポーターはバイオフィーム形成能に関係するだけでなく、その構造にも影響を及ぼすことはシグナル伝達システムによってこれらのタンパクの発現が制御されている可能性を示している。さらに、S. mutansの代表的なシグナル伝達システムである2成分調節因子システムにおけるcomC 欠失変異株において、これらのタンパクをコードする遺伝子の発現の低下が認められたことはこれを裏付ける結果となっている。これらの結果は、ABCトランスポーターが膜輸送の機能を有すると同時に、バイオフィーム形成におけるシグナル伝達システムに関連しており、その形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus mutans possesses a large number of transporters with import/export functions, including the PII protein family that is widely distributed among bacterial species. We constructed and examined a glutamine ABC transporter (GlnP) deficient mutant strain. Biofilm formed by GlnP-deficient mutant strain was remarkably different as compared to that produced by the parental strain. GlnP-deficient mutant strain also showed a reduced number of imported molecules and lower acid tolerance ability. The S. mutans signaling system is mediated by the competence-stimulating peptide (CSP), whose precursor is encoded by the comC gene. We analyzed nrgA gene expression regulation by CSP and found that GlnP and PII protein gene expressions were decreased in comC-deficient mutant strains. Together, these results suggest that GlnP is associated with the S. mutans substrate transport and signaling system, and involved in biofilm formation.

研究分野：小児歯科学

キーワード：ABCトランスポーター 口腔内細菌 バイオフィーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯科の二大疾患である齲蝕と歯周病は、それぞれに関連する口腔細菌によってバイオフィルムが形成されることに起因する「バイオフィルム感染症」であると考えられている。形成されたバイオフィルム中の菌は抗生物質に対する抵抗力が高いことが知られている。そのため、従来の抗菌物質では菌の根本的な除去が不可能であり、常に機械的除去を繰り返すことが必要となる。そこで、バイオフィルムの根本的な破壊を目指すためには、細胞膜を通過させる抗菌物質の開発を行い、バイオフィルムの構造を変化させることが重要な第一歩となることが考えられる。ABC トランスポーターは、*Streptococcus mutans* および *Porphyromonas gingivalis* の細胞膜上に数十種類存在しており、バイオフィルム形成における様々なシグナルに対する受容体あるいは物質の膜輸送のために機能するタンパクとして働いている。そのため、口腔バイオフィルム形成に関与するだけでなく抗生物質の取り込みと排出にも関与し、バイオフィルム構成細菌の抗生物質耐性獲得に関連している可能性が考えられている。そのため、膜タンパクをターゲットとする抗菌物質を開発することがダイレクトにバイオフィルムの破壊へとつなげることができる可能性が想起される。このことから、本研究を立案するに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、バイオフィルム形成に関連するシグナル伝達システム中における ABC トランスポーターの役割を明らかにするとともに ABC トランスポーターの働きが遺伝的にどのように制御されているのかについて解析することである。さらに基質認識、ATP の加水分解による機能制御、および生理的機能を明らかにすることにより、バイオフィルム形成の制御法を確立する上で必要な薬剤の開発につなげることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ABC トランスポーター遺伝子のスクリーニング

S. mutans の全遺伝子配列より推定される ABC トランスポーターと調節遺伝子のスクリーニングを行い、グルタミン膜輸送体と推定される遺伝子 *SMu0732 (glnP)* および *SMu0731* (PII プロテイン遺伝子) を抽出した。

(2) *glnP* の欠失変異株および相補株の作製

S. mutans MT 8148 株の *glnP* (Accession Number:1028188) の全配列をもとにオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、PCR 法により増幅した。精製した DNA 断片を pGEMT Vector に組み込み、プラスミドを作製した。さらに、エリスロマイシン耐性遺伝子カセットを *glnP* の中央付近に挿入したプラスミドを作成した。*glnP* 挿入変異株は、*S. mutans* 8148 株に 1 本鎖に処理した上記プラスミドを形質転換することにより GlnP を得た。同様に、大腸菌およびレンサ球菌で増殖可能なシャトルベクターを用いて *glnP* を GlnP に形質導入することにより、相補株 comp- GlnP を得た。

(3) バイオフィルム形成能

MT8148、GlnP および comp- GlnP 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 のヘキシジウムイオジン 5 μ l で菌体を染色し、0.5% スクロース含有化学合成培地にて、菌液を波長 OD600 が 0.1 となるよう調整し生菌試料とした。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、24 時間培養した。形成されたバイオフィルムを共焦点走査型レーザー顕微鏡にて観察した。

(4) 膜流動性試験

MT8148、GlnP および comp- GlnP を Todd Hewitt (TH) 液体培地で培養後、対数増殖期初期まで培養した。5,000 rpm、4、10 分間の遠心で菌体を回収後、3 ml の塩化ナトリウムリン酸緩衝液 (10 mM NaCl-50 mM NaPB; pH7) に懸濁し、再び遠心し菌体を回収した。菌体は、塩化ナトリウムリン酸緩衝液に懸濁後、波長 600 nm で 0.2 になるように調整し、蛍光プローブ N-Phenyl-1-naphthylamine 溶液を 5 μ g/ml、10 μ g/ml になるように添加し、遮光して室温で 30 分反応させた。反応後 3,000 rpm、4 で 5 分間遠心し、塩化ナトリウムリン酸緩衝液で 2 回洗浄し、500 μ l の同緩衝液にて再懸濁後、96 穴蛍光測定用プレートにて 100 μ l ずつ分注し、蛍光偏光度を蛍光分光光度計を用いて、励起光 355 nm / 蛍光 460 nm で測定した。

(5) 耐酸性能の測定

MT8148、GlnP および comp- GlnP を 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 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 pH3.5 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 で 3 時間培養後、その 100 μ l を pH3.5 に調整した寒天培地に播種した。これらの寒天培地を 37 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。

(6) シグナル伝達システム関連遺伝子 *comC* 欠失変異株における *glnP* および PII プロテイン遺

伝子の発現

comC 欠失変異株を TH 液体培地で対数増殖期まで培養後、全 RNA を回収し、Reverse Transcription-PCR (RT-PCR) により cDNA を得た。得られた cDNA をテンプレートとし、*glnP* および PII プロテイン遺伝子に対する特定のプライマーを用いて PCR 法を行い発現量を調べた。目的遺伝子の発現量は、*S. mutans* 16S rRNA を内部標準物質として補正した。

4. 研究成果

- (1) バイオフィルムの構造：ABC 膜輸送体ファミリーである抗生物質排出に関係する膜輸送体やアンモニウム膜輸送体は、*S. mutans* のバイオフィルム形成能と密接に関係することが知られている。そこで ABC 膜輸送体の 1 つである *glnP* が *S. mutans* のバイオフィルム形成能との関係を明らかにするため、共焦点レーザー顕微鏡にて、MT8148、*GlnP* および *comp-GlnP* のバイオフィルム微細構造を比較検討した。MT8148 および *comp-GlnP* のバイオフィルム構造に違いはなく、均一なバイオフィルムの構造が確認された。一方で *GlnP* の構造は疎であることが明らかとなった。さらに、バイオフィルムの構造強度を確認するために、超音波細胞破碎装置による確認を行った。超音波処理後に回収した菌体のコロニーをカウントしたところ、有意に GEMR 株のコロニーが減少していることが確認された。これらの結果より、*glnP* 発現はバイオフィルム形成能や構造強度に関係がすることが示唆された。
- (2) 膜流動性：*glnP* は ABC 膜輸送体のファミリーであり、グルタミンの膜輸送に関係していることが知られている。そこで *S. mutans* におけるグルタミンの膜輸送との関連性を確認するため、蛍光プローブによる細胞膜輸送の解析を行った。NPN は、各種の膜輸送タンパクを通過する際、脂質二重層の間に吸着する性質をもっており、この吸着量は膜輸送体の働きのレベルを反映する。NPN が吸着すると、その蛍光プローブが菌体内に残存し、蛍光偏光度が大きいほど、膜輸送タンパクの働きが活発であることを意味する。蛍光プローブの濃度依存的に、*GlnP* の蛍光偏光度は有意に低下した。このことから、*glnP* がグルタミンの取り込みに関与する可能性が高いことが示唆された。
- (3) 耐酸性能：各変異株の耐酸性能は、MT8148 は 1.2%、*GlnP* は 0.7%、*comp-GlnP* は 1.9%であった。MT8148 と比較すると *GlnP* は有意に耐酸性能が低下し ($P < 0.001$)、*comp-GlnP* は MT8148 とほぼ変わらなかった。
- (4) *comC* 欠失変異株における *glnP* および PII プロテイン遺伝子の発現：*comC* 欠失変異株における *glnP* および PII プロテイン遺伝子の発現は有意に減少していた。以上のことより、ABC トランスポーターはバイオフィルム形成能に関係するだけでなく、その構造にも影響を及ぼすことはシグナル伝達システムによってこれらのタンパクの発現は制御されている可能性を示している。さらに、*S. mutans* の代表的なシグナル伝達システムである 2 成分調節因子システムにおける *comC* 欠失変異株において、これらのタンパクをコードする遺伝子の発現の低下が認められたことはこれを裏付ける結果となっている。これらの結果は、ABC トランスポーターが膜輸送の機能を有すると同時に、バイオフィルム形成におけるシグナル伝達システムに関連しており、その形成に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。今後は、ABC トランスポーターと様々な口腔内細菌との関連性を調べることにより、より詳細なバイオフィルム形成メカニズムを明らかにすることができると考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- [Matsumoto-Nakano M](#), Role of *Streptococcus mutans* surface proteins for biofilm formation, Japanese Dental Science Review, 54, 22-29, 2018, DOI: 10.1016/j.jdsr.2017.08.002. (査読有)
- [Inaba H](#), Nomura R, Kato Y, Takeuchi H, Amano A, Asai F, Nakano K, Lamont RJ, [Matsumoto-Nakano M](#). Adhesion and invasion of gingival epithelial cells by *Porphyromonas gulae*, PLoS One, 2018, DOI: 10.1371/journal.pone.0213309. (査読有)
- Lapirattanakul J, [Takashima Y](#), Tantivitayakul P, Maudcheingka T, Leelataweewud P, Nakano K, [Matsumoto-Nakano M](#). Cariogenic properties of *Streptococcus mutans* clinical isolates with sortase defects. Archives of Oral Biology, DOI: 10.1016/j.archoralbio.2017.04.018. (査読有)
- Nomura R, Yoneyama R, Naka S, Otsugu M, Ogaya Y, Hatakeyama R, Morita Y, Maruo J, [Matsumoto-Nakano M](#), Yamada O, Nakano K. The *in vivo* inhibition of oral biofilm accumulation and *Streptococcus mutans* by ceramic water, Caries Research, 51, 58-67, 2017, DOI: 10.1159/000452343. (査読有)
- [Inaba H](#), Tagashira M, Kanda T, Murakami Y, Amano A, [Matsumoto-Nakano M](#). Apple- and Hop-polyphenols inhibit *Porphyromonas gingivalis*-mediated precursor of matrix metalloproteinase-9 activation and invasion of oral squamous cell carcinoma cells. Journal of Periodontology, 87, 1103-11, DOI: 10.1902/jop.2016.160047. (査読有)

[学会発表] (計 9 件)

Matsumoto-Nakano M, Yoshida E, Matsumi Y, Takashima Y, Role of molecular chaperon DnaK in *Streptococcus mutans* biofilm formation. 96th General session & Exhibition of the IADR, 2018
吉田衣里, 松三友紀, 森川優子, 仲周平, 高島由紀子, 仲野道代, *Streptococcus mutans* のバイオフィーム形成における DnaK の影響と役割, 第 56 回日本小児歯科学会, 2018 年
Yoshida E, Takashima Y, Matsumoto-Nakano M, Contribution of DnaK expression to biological functions in *Streptococcus mutans*, 95th General session & Exhibition of the IADR, 2017
Morimoto S, Takashima Y, Matsumoto-Nakano M, Interaction between *Lactobacillus* strains and *Streptococcus mutans* strains for biofilm formation, 95th General session & Exhibition of the IADR, 2017
吉田衣里, 松三由紀, 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, 第 55 回日本小児歯科学会, 2017 年
Takashima Y, Morikawa Y, Fujita K, Matsumoto-Nakano M, Glucan-binding domain in GbpC of *Streptococcus mutans* contributes to binding to type I collagen, 94th General session & exhibition of the IADR, 2016
Lapirattanakul J, Fujita K, Takashima Y, Nakano K, Matsumoto-Nakano M, Biofilm formation by *Streptococcus mutans* clinical isolates with sortase defect, 94th General session & exhibition of the IADR, 2016
Yoshida E, Matsumi Y, Fujita K, Matsumoto-Nakano M, Effects of molecular chaperon DnaK on biofilm formation by *Streptococcus mutans*. 10th Conference of Pediatric Dentistry Association of Asia, 2016
Morikawa Y, Takashima Y, Fujita K, Matsumoto-Nakano M, Functional analysis of role of glutamine metabolism-related gene in biofilm formation by *Streptococcus mutans*. 10th Conference of Pediatric Dentistry Association of Asia, 2016

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：稲葉 裕明
ローマ字氏名：(INABA, Hiroyuki)
所属研究機関名：岡山大学
部局名：医歯薬学総合研究科
職名：准教授
研究者番号(8桁)：70359850

(2)研究分担者

研究分担者氏名：平野 慶子
ローマ字氏名：(HIRANO, Keiko)
所属研究機関名：岡山大学
部局名：大学病院
職名：助教
研究者番号(8桁)：50335618

(3)研究分担者

研究分担者氏名：高島 由紀子
ローマ字氏名：(TAKASHIMA, Yukiko)
所属研究機関名：岡山大学
部局名：歯学部
職名：博士研究員
研究者番号(8桁)：30589768

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。