

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K19265

研究課題名(和文) S. mutansの口腔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 oral 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・医歯薬学域・助教

研究者番号：90732800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000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おり、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が示唆されている。本研究では、DnaK過剰発現株と発現抑制株を作製し実験を行った。過剰発現株は、低pH下で強い菌体凝集を認め、バイオフィーム形成では著明な凝集塊を認め、厚みが上昇した。また、DnaKの発現はバイオフィーム形成を制御する遺伝子gtfB、gbpA、gbpCの発現にも影響を与えていた。以上の結果より、バイオフィーム形成におけるストレス応答メカニズムにおいてDnaKが重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小児歯科臨床において、齲蝕罹患率の低下が認識されているが、齲蝕罹患率は二極化が進んでおり、未だに重症齲蝕を呈する小児も少なくない。主要な齲蝕病原性細菌であるS. 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され病原性を発揮することが知られている。口腔バイオフィーム形成に関与するタンパクを検討することで齲蝕の抑制につながると考えている。

研究成果の概要(英文)：An important characteristic of Streptococcus mutans, implicated as a primary causative agent of dental caries, is acid tolerance, while the bacterium is also known to survive under acidic conditions, with the molecular chaperone DnaK suggested to be involved in its acid-tolerance mechanism. In this study, S. mutans strains with overexpression (DnaK-o) and suppressed expression (DnaK-s) of the chaperone were constructed and examinations showed strong cell aggregation by the DnaK-o strain under acidic conditions. In addition, the structure of biofilms formed by the DnaK-s strain was sparse as compared to that of those formed by the DnaK-o strain, and those formed by the latter also had significantly greater height. Furthermore, findings regarding DnaK expression indicated the importance of control of cell surface protein expression in regard to biofilm formation. Together, these results suggest that DnaK has an important role related to stress response in biofilm formation by S. mutans.

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

齧蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* の菌体表層には多くの病原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ルムが形成され、病原性を発揮することが知られている。*S. mutans* は、独自のシグナル伝達システムを有しており、環境の変化をシグナルとして、様々なタンパクの発現が誘導され、あらゆる環境に対応し生育し続けることが可能となり、バイオフィルムを形成し続ける。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の一つである *recA* の発現が上昇すると、菌体表層タンパクの一つであるグルカン合成酵素 (Glucosyltransferases:GTF) の3種類のうち、GTFB および GTFC がある一定の割合でリコンビネーションを起こすことを明らかとした (Inagaki et al., *Scientific World Journal*, 2013)。一方で、このシステムの中では、いずれか1つの表層タンパクをターゲットにし、その活性を抑制しても、それに対して他のタンパクが補足するような形で発現が上昇するため、バイオフィルム形成を抑制することは困難であることが示されている。齧蝕に関する研究は、これまで *S. mutans* の表層タンパクの研究に着目し行なわれてきたが、これらのことにより、各病原性表層タンパクの機能が明らかとなった今でも、*S. mutans* の感染予防法が確立されてはいない。また、齧蝕ワクチンとして GTF、高分子タンパク抗原  $\alpha$ 、あるいはグルカン結合タンパク B を抗原として、免疫誘導を行うワクチンの研究が長年行われていたが実用化には至っていない。齧蝕予防におけるバイオフィルム形成の抑制には、菌体表層タンパクをターゲットとする免疫応答システムを考えることよりも、これまでと違うアプローチが必要であると考えられる。表層タンパクの発現はシグナル伝達システムでコントロールされている可能性が高いが、どのようなタンパクがこれらの機能を持つかは明らかとなっていない。*S. mutans* が極めて高い耐酸性を持つことで、口腔内で優位性を保つことが可能となっていることは、他の口腔内細菌に見られない重要な特徴である。*S. mutans* において、シグナル伝達システム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。

これまで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 をコードする *gtfB* 遺伝子の発現が誘導されることが分かった。さらに、*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ル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。*S. mutans* のさまざまなストレスに対する応答メカニズムは、シグナルを感じ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

齧蝕原性細菌 *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ル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* のバイオフィル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った。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、*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) 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 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、15mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>、35 mM NaCl、0.2% Casamino acids、100 μM MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (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 MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O] 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 μl 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。

## (3) 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 μl 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 μl および、10 mM Dithiothreitol (DTT) 20 μl 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<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) 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) 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 μl の UltraPure™ Diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水に懸濁し、Lysing Matrix B<sup>R</sup> に菌液を移し、TRI Reagent を 900 μl 添加した後、FastPrep<sup>R</sup> 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 μl の chloroform を混和させた後、水層中の全 RNA を 300 μl 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 μl の DEPC 処理水に懸濁した。全 RNA 3 μg に RNase-free DNase を加え、37 °C で 30 分間処理した後、Random primers<sup>R</sup> および SuperScript<sup>R</sup> 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*、*gpbA*、*gpbB*、*gpbC*、*comC* および *luxS* の発現を SYBR green<sup>R</sup> 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。

## (5) *comC* 欠失変異株の *dnaK* 発現の比較

シグナル伝達遺伝子である *comC* を欠失した変異株を作製し、各株における *dnaK* の発現を SYBR green<sup>R</sup> を用いた RT-PCR 法により調べ、比較した。

## (6) GroEL 発現抑制株の作製

*groEL* 遺伝子の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* GS5 株の GroEL の発現抑制株 GroEL-s を作製し、実験に供試する。

## 4. 研究成果

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。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。また、シグナル伝達遺伝子である *comC* および *luxS* の発現を検討したところ、*comC* の発現は DnaK-o 株で抑制され、DnaK-s 株で増加していた。そこで、*comC* 欠失変異株を用いて、*dnaK* の発現を比較したところ、*dnaK* の発現の増加を認めた。一方で、*luxS* の発現は DnaK-o 株および DnaK-s 株の両方で変化しなかった。これらのことより、*dnaK* の発現は *comC* を中心とするシグナル伝達系に関与し、さらに *comC* と *dnaK* は相互に影響を与えている可能性が示唆された。今後、新たな分子シャペロンを同定することで、口腔バイオフィルム形成におけるシグナル伝達システムの解明につながると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 吉田衣里, 松三友紀, 森川優子, 仲周平, 高島由紀子, 仲野道代
2. 発表標題 Streptococcus mutans における DnaK の表層タンパク発現への影響と役割
3. 学会等名 第 58 回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------