

機関番号：14401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592399

研究課題名 (和文) 口腔バイオフィームにおけるミュータンスレンサ球菌のシグナル伝達システムの解析

研究課題名 (英文) Analysis of mutans streptococci signal transduction system in biofilm formation

研究代表者

仲野 道代 (NAKANO MICHIO)

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：30359848

研究成果の概要 (和文)：う蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* によるバイオフィーム形成は、クオラムセンシングシステムのもとで形成される。また、細菌の遺伝子のリコンビネーションや形質転換に関与するリコンビナーゼ A は *recA* 遺伝子によってコードされている。*S. mutans* において、*recA* 遺伝子欠失変異株では表層タンパクのひとつであるグルカン合成酵素の発現が減少し、バイオフィームの構造が変化したことから、*recA* 遺伝子がバイオフィームの形成に関与しており、さらにクオラムセンシング関連遺伝子である可能性が示された。

研究成果の概要 (英文)：Quorum sensing has been reported to mediate biofilm formation by *Streptococcus mutans*. Recombinase A (RecA) encoded by the *recA* gene, is essential for transformation of both plasmids and chromosomal DNA. We found that the expression intensity of glucosyltransferases was reduced and biofilm structure altered in an RecA-deficient mutant strain. Thus, RecA was shown to have strong relationships with biofilm formation and quorum sensing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
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：矯正・小児系歯学

キーワード：ミュータンスレンサ球菌, *Streptococcus mutans*, う蝕, シグナル伝達システム, 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

口腔内のバイオフィームは細胞間のシグナル伝達システムであるクオラムセンシングと呼ばれるシステムのもとで形成される。*Streptococcus mutans* のクオラムセンシングシステムにはおいては主として 2 成分調節因子システムが知られているが、*S. mutans* のバイオフィーム形成において最も重要な病原因子であるグルカン合成酵素の

発現がこれらのシグナル伝達システムにどのように組み込まれるかは明らかとなっていない。

これまでに、*S. mutans* のバイオフィーム形成における表層タンパクの発現について様々な分子生物学的解析を行ってきた。その結果、それらの発現は相互作用を持ち、調節制御されている可能性が高いことが明らかとなった。

2. 研究の目的

本研究では、以下の点に関して検討したいと考えている。

(1) *Streptococcus mutans* 全ゲノム配列からのバイオフィームに関連する遺伝子を他の菌との相同性により抽出

(2) 抽出した遺伝子のバイオフィーム形成能への関与

(3) 抽出した遺伝子のグルカン合成酵素の発現に対する影響

(4) 抽出した遺伝子を中心とした新たなシグナル伝達システムの構築

3. 研究の方法

(1) バイオフィーム形成に関連する遺伝子の抽出

S. mutans のゲノムプロジェクトはオクラホマ大学らのグループによって簡潔し、約 200 万塩基の配列と約 2000 個の Open reading frame が明らかにされている。この全ゲノム配列のデータベースをもとに、他の菌との相同性を調べることにより、バイオフィームに関連すると考えられる遺伝子を抽出する。

(2) バイオフィーム形成関連遺伝子の欠失変異株の作製

バイオフィーム形成能を調べるために上記で抽出した遺伝子の中央付近に抗生物質体制遺伝子を挿入したプラスミドを作製する。

(3) バイオフィーム形成能の検討

バイオフィーム形成能はマイクロタイタープレートを用いて、形成されたバイオフィームをクリスタルバイオレットにより染色することにより定量を行う。これにより、欠失変異株と野生株のバイオフィーム形成能を比較する。また、バイオフィームの構造は供試菌株を標識し、共焦点レーザー顕微鏡により観察を行う。

(4) グルカン合成酵素の発現に対する影響をグルカン合成酵素をコードする *gtf* 遺伝子の mRNA の発現量の変化を Reverse Transcription PCR により検討する。

(5) 酸性状態や抗生物質存在下での *recA* 遺伝子の mRNA の発現量の変化を調べることにより、ストレス状態での *recA* 遺伝子の役割を検討する。

4. 研究成果

本研究において、*recA* 遺伝子に関連する遺伝子であることが推定された。そこで、*recA*

遺伝子欠失株を作製し検討したところ、バイオフィーム形成能は低下していた。さらにその構造が親株と比較して明らかに変化するとともに、耐酸性の低下も認められた。また、*recA* 遺伝子欠失変異株においては、*gtf* 遺伝子の発現は顕著に減少していた。培養条件を低 pH に設定して親株を培養したところ、*recA* 遺伝子の発現の上昇が認められた。

以上のことから、*recA* 遺伝子が、菌の生育に関与するとともに、バイオフィーム形成に関連する遺伝子であることが明らかとなった。さらに、*recA* 遺伝子が、*gtf* 遺伝子の発現をコントロールしている可能性が示されたため、今後そのメカニズムの検討を行っていくつもりである。

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)

[雑誌論文] (計 24 件)

- ① Matsumoto-Nakano M, Nagayama K, Kitagori H, Inagaki S, Takashima Y, Tamesada M, Kawabata S, Ooshima T. Inhibitory effect of *Oenothera biennis* (Evening primrose) seed extract on *Streptococcus mutans* and *S. mutans*-induced dental caries in rats. *Caries Res* 45, 56-63, 2011. (査読有)
- ② Fujita K, Takashima Y, Inagaki S, Nagayama K, Nomura R, Ardin AC, Gronroos L, Alaluusua S, Ooshima T, Matsumoto-Nakano M. Correlation of biological properties with glucan-binding protein B expression profile in *Streptococcus mutans* clinical isolates. *Arch Oral Biol* 56, 258-263, 2011. (査読有)
- ③ Nomura R, Naka S, Nakano K, Taniguchi N, Matsumoto M, Ooshima T. Detection of oral streptococci with collagen-binding properties in saliva specimens from mothers and their children. *Int J Pediatric Dent* 20, 254-260, 2010 (査読有)
- ④ Matsumoto-Nakano M, Tsuji M, Inagaki S, Fujita K, Nagayama K, Nomura R, Ooshima T. Contribution of cell surface protein antigen *c* of *Streptococcus mutans* to platelet aggregation. *Oral Microbiol Immunol* 24, 427-430, 2009. (査読有)

- ⑤ Inagaki S, Matsumoto-Nakano M, Fujita K, Nagayama K, Funao J, Ooshima T. Effects of recombinase A deficiency on biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 24, 104-108, 2009. (査読有)
- ⑥ Miyamoto E, Nakano K, Fujita K, Nomura R, Okawa R, Matsumoto M, Ooshima T. Bacterial profiles of oral streptococcal and periodontal bacterial species in saliva specimens from Japanese subjects. *Arch Oral Biol* 54, 374-379, 2009. (査読有)
- ⑦ Matsumoto-Nakano M, Tsuji M, Amano A, Ooshima T. Molecular interactions of alanine-rich and proline-rich regions of cell surface protein antigen c in *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 23, 265-270, 2008. (査読有)
- ⑧ 松本道代. *Streptococcus mutans* における bacteriocin immunity protein による抗生物質感受性メカニズムの解析 小児歯科学雑誌, pp. 501-504, 46, 2008. (査読無)
- [学会発表] (計 47 件)
- ① Inagaki S, Matsumoto-Nakano M, Fujita K, Nagayama K, Takashima Y, Ooshima T. GTF activity concerning the RecA protein of *Streptococcus mutans* for the clinical isolates. 89th IADR meeting, 2011.3.18, San Diego, USA.
- ② Matsumoto-Nakano M, Takashima Y, Fujita K, Inagaki S, Nagayama K, Nomura R, Ooshima T. Functional domain of glucan-binding protein C of *Streptococcus mutans*. 89th IADR meeting, 2011.3.18, San Diego, USA.
- ③ Nagayama K, Matsumoto-Nakano M, Inagaki S, Fujita K, Takashima Y, Ooshima T. Functional analysis of ABC transporter proteins of *Streptococcus mutans*. 89th IADR meeting, 2011.3.18, San Diego, USA.
- ④ 稲垣暁子, 松本道代, 藤田一世, 永山佳代子, 高島由紀子, 大嶋 隆. *Streptococcus mutans* RecA タンパクのグルカン合成酵素の活性に及ぼす影響 平成 22 年度日本小児歯科学会秋季大会 2010. 12. 2, 郡山.
- ⑤ Fujita K, Matsumoto-Nakano M, Takashima Y, Inagaki S, Nagayama K, Ooshima T. Characterization of glucan-binding protein B of *Streptococcus mutans* clinical isolates. 88th IADR meeting, 2010.7.17, Barcelona, Spain.
- ⑥ Inagaki S, Matsumoto-Nakano M, Fujita K, Nagayama K, Takashima Y, Ooshima T. Contribution of RecA protein to GTF activity of *Streptococcus mutans*. 88th IADR meeting, 2010.7.17, Barcelona, Spain.
- ⑦ Matsumoto-Nakano M, Nagayama K, Fujita K, Inagaki S, Takashima Y, Kawabata S, Ooshima T. Anticariogenic effects of *Oenothera biennis* seed extract on *Streptococcus mutans* activity. 57th ORCA congress, 2010.7.7, Montpellier, France.
- ⑧ 稲垣暁子, 松本道代, 藤田一世, 永山佳代子, 高島由紀子, 大嶋 隆. *Streptococcus mutans* の GTF 活性に対する RecA タンパクの発現の影響 第 28 回日本小児歯科学会近畿地方会大会, 2009.10.18, 大阪.
- ⑨ Inagaki S, Matsumoto-Nakano M, Fujita K, Nagayama K, Takashima Y, Ooshima T. Contribution of *recA* gene for gtf expression of *Streptococcus mutans*. 22nd IAPD meeting, 2009.6.16, Munich, Germany.
- ⑩ Matsumoto-Nakano M, Nagayama K, Inagaki S, Fujita K, Takashima Y, Ooshima T. Functional analysis of ATP transporter proteins associated with antibiotic resistance in *Streptococcus mutans*. 22nd IAPD meeting, 2009.6.16, Munich, Germany.
- ⑪ Fujita K, Matsumoto-Nakano M, Takashima Y, Inagaki S, Ooshima T. Correlation of biological properties and expression profile of glucan-binding protein B in *Streptococcus mutans* clinical isolates. 22nd IAPD meeting, 2009.6.16, Munich, Germany.
- ⑫ 稲垣暁子, 松本道代, 大嶋 隆.

Streptococcus mutans RecA タンパクの
gtf 遺伝子発現制御における分子生物学的
的検討 第 47 回日本小児歯科学会大会,
2009. 5. 14, 吹田

- ⑬ 藤田一世, 稲垣暁子, 松本道代, 大嶋 隆.
Streptococcus mutans の表層タンパク
欠失におけるバイオフィーム構造の比較
第 47 回日本小児歯科学会大会,
2009. 5. 14, 吹田
- ⑭ 永山佳代子, 松本道代, 稲垣暁子, 藤田
一世, 大嶋 隆. *Streptococcus mutans*
における stress response regulator の
分子生物学的解明 第 47 回日本小児歯
科学会大会, 2009. 5. 14, 吹田
- ⑮ 稲垣暁子, 松本道代, 大嶋 隆. バイオ
フィルム形成における *Streptococcus*
mutans recA 遺伝子の機能解析 第 27 回
日本小児歯科学会近畿地方会大会,
2008. 10. 19, 大阪.
- ⑯ 稲垣暁子, 松本道代, 藤田一世, 大嶋 隆.
Streptococcus mutans recA 遺伝子によ
るグルカン合成酵素の発現調節機能 第
46回日本小児歯科学会大会, 2008. 6. 12,
さいたま.
- ⑰ 藤田一世, 松本道代, 大嶋 隆.
Streptococcus mutans のバイオフィ
ーム形成における遺伝子修復機能について
第 46 回日本小児歯科学会大会,
2008. 6. 12, さいたま.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

仲野 道代 (NAKANO MICHIO)

大阪大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：30359848