

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18757

研究課題名（和文）口腔バイオフィーム形成に関わる新規ABCトランスポーターの同定と機能解析

研究課題名（英文）Identification and functional analysis of novel ABC transporters involved in oral biofilm formation

研究代表者

後藤 花奈（Goto, Kana）

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：90846495

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）：Streptococcus mutans のバイオフィーム形成における細胞膜輸送に関与するABCトランスポーターの役割について検証するために、ABCトランスポーター遺伝子を抽出し、その欠失変異株を作製した。欠失変異株では、親株と比較してバイオフィーム形成量および構造が変化した。また、欠失変異株の細胞膜流動性は低下し、硫酸亜鉛七水和物存在下における増殖速度は遅延し、ABCトランスポーター遺伝子の発現は増加した。

以上のことより、ABCトランスポーターは、細胞分裂および細胞膜輸送、特に亜鉛の輸送に関与し、S. mutans の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

S. mutans は、環境に応じて様々なタンパクを菌体表層に発現し、あらゆる環境に対応し生育し続けるため、バイオフィームを形成し続けることが可能である。これらのタンパクの1つにABCトランスポーターがあり、限られた栄養源の中で必要なものを取り込み、不必要なものを排出する働きを持つ。本研究において、着目したABCトランスポーターはバイオフィーム形成に重要な役割を果たし、細胞分裂および細胞膜輸送にも関連し、特に亜鉛の輸送に関与することを明らかにした。今後、バイオフィーム形成におけるABCトランスポーターのより詳細な機能を追求することで、新たな齲蝕予防システムを確立することに繋がると考えている。

研究成果の概要（英文）：Streptococcus mutans possesses a large number of ABC transporters in the cell membrane that function to import and export molecules. We constructed ABC transporter deficient mutant strains to examine the roles of those transporters in biofilm formation. Biofilm formed by the mutant S. mutans strains was more coarse and its fluorescence intensity was reduced as compared to that formed by the parental strain. Additionally, in the presence of ZnSO₄, the growth rate of the transporter deficient mutant strains was decreased as compared to that of the parental strain. Furthermore, the level of expression of ABC transporter genes in the parental strains was significantly elevated in the presence of a low amount of ZnSO₄ as compared to in its absence.

These results suggest that ABC transporters play important roles in biofilm formation, as they are involved in cell division and cell membrane transport, particularly zinc transport.

研究分野：小児歯科学

キーワード：Streptococcus mutans バイオフィーム ABCトランスポーター

1. 研究開始当初の背景

小児において、齲蝕罹患率が低下していることが知られているが、その減少率は、近年横ばい状態であり、すでにこれ以上の齲蝕罹患率の減少は難しいことが示唆されている。この原因の一つに、デンタルプラーク(バイオフィルム)は抗菌物質に対して抵抗性を示し、宿主の防御機構を破壊するようになることが挙げられる。そのため、バイオフィルムを構成する細菌の抗菌剤による除去は難しく、現在でも機械的清掃のみがバイオフィルムの除去として最も有効な方法である。しかしながら、これだけでは、齲蝕の撲滅につながる可能性は低い。バイオフィルムを形成する口腔内細菌叢のうち、グラム陽性細菌の代表的なものとしては、齲蝕の主要な病原細菌である *Streptococcus mutans* が挙げられる。口腔内は温度変化、唾液分泌量、唾液 pH、生活習慣、外来物質の侵入などの因子により環境が大きく変化する。*S. mutans* の最大の特徴は、過酷な口腔内の環境に速やかに対応するための機能を有していることである。その中で、ABC トランスポーターは、菌にとって必要な栄養素を取り込むとともに不要なものを排出することで、強固なバイオフィルムを作り出すことができる。このことから、バイオフィルム形成に関連する ABC トランスポーターの存在は、バイオフィルムを維持し、その中で菌が病原性を発揮する上で重要なものである。さらに、口腔内細菌がこのような様々な環境の変化に曝露された際に、膜タンパクは環境変化によるストレスに応答し、その発現動態を変化させることが報告されている。このような種々のストレスによる生育条件の悪化に対するストレス応答システムは、細菌において特に重要な防御機構として考えられている。これらのストレス応答システムにも ABC トランスポーターが関与している可能性が考えられる。これまでの研究において、いずれか1つの表層タンパクをターゲットにして活性を抑制しても、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。また、これまでの齲蝕に関する研究は、*S. mutans* の表層タンパクに着目し行なわれてきたが、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* の感染予防法は確立されてはいない。このような背景から、齲蝕予防におけるバイオフィルム形成の抑制に関与する ABC トランスポーターに着目し、検討を行った。

2. 研究の目的

S. mutans において ABC トランスポーターは、細胞膜上に数十種類存在していることがゲノム情報により推定されている。そして、これらは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ことが示唆されている。

本研究の目的は、バイオフィルム形成に関与する *S. mutans* の新規 ABC トランスポーターを特定し、その機能を解明し、これらをターゲットにして、新たな齲蝕予防および抑制法につなげることである。

3. 研究の方法

(1) *S. mutans* の ABC トランスポーターの同定

S. mutans の全遺伝子配列より、バイオフィーム形成に関連すると推定される ABC トランスポーターをコードする遺伝子のスクリーニングを行い、*SMU_1519* 遺伝子および *SMU_1521* 遺伝子を抽出した。

(2) *SMU_1519* 欠失変異株 (1519) および *SMU_1521* 欠失変異株 (1521) の作製

抽出した遺伝子上流、下流領域およびエリスロマイシンまたはカナマイシン耐性遺伝子を PCR にて増幅後、オーバーラップ PCR で 3 種の DNA 断片を連結させ、精製する。次いで、非働化した馬血清 10% を含む TH 培地で、*S. mutans* を 37 °C で 18 時間培養する。培養菌液を非働化馬血清 10% を含む TH 培地に播種し、37 °C で 2 時間培養を行った後、上記の DNA 断片を添加する。菌液を 37 °C で 2 時間培養後、エリスロマイシンまたはカナマイシン含有 MS 寒天培地に播種し、生じたコロニーを形質転換株として分離する。PCR およびシーケンス分析を行い、遺伝子欠失の確認を行う。

(3) ABC トランスポーターのバイオフィーム形成における役割の検討

バイオフィーム形成量の検討

あらかじめ培養した供試菌を 1 / 100 量になるように Todd-Hewitt (TH) 液体培地に播種し、96 穴細胞培養用マイクロテストプレートの各ウェルに 100 μ l ずつ分注した後、37 °C で 2 日間嫌気下で培養する。培養後、1% クリスタルバイオレット溶液にて染色を行い、洗浄後、エタノールで固定し、吸光度 570 nm で測定する。

バイオフィーム構造の観察

供試菌を 37 °C で 18 時間培養後、菌体を分離し懸濁を行う。懸濁液に 10mM の Hexidium Iodide を添加し、遮光下にて室温で 15 分間振盪させ、遠心分離を行う。菌体に 0.25% スクロース含有化学合成培地を添加し、吸光度 600 nm が 0.1 となるよう調整する。次いで、バイオフィームを形成させるために、ガラスチャンバーに 25% ヒト唾液を分注し、37 °C で 2 時間静置した後、ヒト唾液を取り除き、PBS で洗浄を行う。染色した菌液を分注し、嫌気条件下で 24 時間、37 °C で培養する。培養後、PBS で洗浄を行い、共焦点レーザー顕微鏡によりバイオフィームの構造を調べ、Image J にてバイオフィームの断面像と側面像の解析を行う。

(4) 蛍光プローブによる細胞膜輸送の解析

同定した ABC トランスポーターの細胞膜輸送における役割を検討するために、蛍光プローブを用いた膜輸送モデルを用い、菌体からの排出機能レベルの測定を以下の方法で行う。供試菌を 37 °C で対数増殖期初期まで培養を行った後、菌体を回収し、PBS で懸濁を行う。再び遠心分離にて菌体を回収し、PBS にて吸光度 600 nm で 0.2 となるよう調整した後、蛍光プローブ N-Phenyl-1-naphthylamine 溶液を添加し、遮光して室温で 30 分間反応させる。上清を除去し PBS で洗浄、懸濁した後、蛍光測定プレートへ分注し、蛍光偏光度の測定を行う。

(5) 増殖能の検討

培養した供試菌を硫酸亜鉛七水和物を 0~1 mM 添加した TH 液体培地に播種し、波長 550 nm

の吸光度を1時間毎に経時的に測定する。吸光度が0.2から0.6までの対数増殖期において波長550 nmの値が2倍になる時間をダブリングタイムとし、算出する。

(6) 遺伝子発現量の解析

MT8148株に硫酸亜鉛七水和物を添加または非添加し、対数増殖期まで培養した後、全RNA抽出を行う。DNase処理後、cDNA合成を行い、*SMU_1519* および *SMU_1521* 特異的プライマーを用いて、各遺伝子の発現を Real-time RT-PCR 法にて定量的PCRを行い、Ct法にて相対定量を行う。

4. 研究成果

(1) バイオフィーム構造

1519 および *1521* のバイオフィーム形成量はMT8148と比較し低下した。共焦点レーザー顕微鏡によるバイオフィーム微細構造の比較検討では、MT8148と比較し *1519* および *1521* の構造は疎であることが明らかとなった。これらの結果より、*SMU_1519* および *SMU_1521* はバイオフィーム形成に関与することが示唆された。

(2) 細胞膜流動性

蛍光プローブによる細胞膜流動性の解析では、蛍光プローブの濃度依存的に *1519* および *1521* の蛍光偏光度は有意に低下した。このことから、*SMU_1519* および *SMU_1521* は細胞膜輸送に関連する遺伝子であることが明らかとなった。

(3) 増殖能

TH液体培地中における増殖能および増殖速度は、*1519* および *1521* 共にMT8148と比較し低下した。また、菌の分裂速度を表すダブリングタイムもMT8148と比較し、延長した。

(4) 亜鉛存在下における *SMU_1519* および *SMU_1521* の発現

TH液体培地中でMT8148に硫酸亜鉛七水和物を添加した場合、*SMU_1519* および *SMU_1521* の遺伝子発現量は有意に上昇していた。

以上のことより、*SMU_1519* および *SMU_1521* はバイオフィーム形成能に関係し、バイオフィーム構造にも影響を及ぼすことが示された。また、*SMU_1519* および *SMU_1521* は細胞分裂および細胞膜輸送に関連する遺伝子であり、特に亜鉛の輸送に関与していることが明らかとなった。今後は、バイオフィーム形成におけるABCトランスポーターの役割について、さらに詳細なメカニズムを検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kana Goto and Michiyo Matsumoto-Nakano
2. 発表標題 ABC transporter activities in biofilm formation by <i>Streptococcus mutans</i>
3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kana Goto and Michiyo Matsumoto-Nakano
2. 発表標題 Role of ABC transporter in biofilm formation by <i>Streptococcus mutans</i>
3. 学会等名 The 69th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後藤 花奈, 仲野 道代
2. 発表標題 <i>Streptococcus mutans</i> のバイオフィルム形成におけるABC膜輸送体の機能解析
3. 学会等名 第59回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後藤 花奈, 仲野 道代
2. 発表標題 口腔バイオフィルム形成におけるABC膜輸送体の 機能解析
3. 学会等名 第40回中四国地方会大会
4. 発表年 2021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
---------	---------