

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22592283
 研究課題名（和文）*S. mutans*クオラムセンシングにおけるリコンビナーゼAの分子生物学的解析
 研究課題名（英文）Analysis of biological function of recombinase A in *Streptococcus mutans* quorum sensing
 研究代表者
 稲垣 暁子（INAGAKI SATOKO）
 大阪大学・歯学部附属病院・医員
 研究者番号：50527223

研究成果の概要（和文）：齲蝕病原性細菌 *Streptococcus mutans* は、グルカン合成酵素（GTF）を産生し、歯面に付着する。一方、リコンビナーゼA（Recombinase A: RecA）は、遺伝子のリコンビネーションをおこすタンパクとして報告されている。本研究では、RecAの*S. mutans*のバイオフィーム形成におけるGTFへの影響について検討を行った。RecAの過剰発現により、*gtfB*遺伝子の4235bp下流と*gtfC*遺伝子の788bp上流において、リコンビネーションが起こることが明らかとなった。この研究により、RecAは、*S. mutans*のバイオフィーム形成に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：*Streptococcus mutans* produces 3 types of glucosyltransferases (GTFs), whose cooperative action is essential for cellular adhesion, with the recombinase A (RecA) protein required for homologous recombination. Determination of the sequences of the *gtfB* and *gtfC* genes showed that an approximately 3500-bp region was deleted in the smooth colonies of *S. mutans*. These results suggest that DNA recombination and phenotypic changes that occur through uptake of extracellular RecA may have a relationship with the signal transduction system involving biofilm formation in *S. mutans*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：*Streptococcus mutans*, リコンビナーゼA, クオラムセンシング, バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

う蝕の主要な病原性細菌である

Streptococcus mutans は、口腔内のバイオフィーム形成において最も重要な菌であり、表層

に存在するグルカン合成酵素（GTF）から、粘着性グルカンを合成することにより、その能力を発揮すると考えられている。さらに *S. mutans* は、耐酸性を有し、低 pH のような過酷な環境においても、バイオフィルムを形成し続けることを可能とするタンパクを保有していると考えられている。

一方、リコンビナーゼ A (RecA) は当初、遺伝子発現のリコンビネーションを起こすタンパクとして報告されていたが、*S. mutans* においては、バイオフィルム形成に重要な働きを持つと考えられる細胞間シグナル伝達システムに関与する遺伝子の一つであることが示唆されている。これまでの研究により、RecA をコードする *recA* 遺伝子は、*S. mutans* の増殖において、培地の pH が低くなるにつれ、発現量の増加が認められた。また、RecA 欠失変異株における増殖能は、培地の pH が低くなるにつれ、遅延が認められた。これらのことは RecA が *S. mutans* の耐酸性に関与している可能性が高いと考えられる。また、RecA 欠失変異株では、親株と比較して、バイオフィルムの形成量が低下し、構造も変化することが認められた。さらに、培地にスクロースを添加した場合、RecA 欠失株において、親株と比較して構造の変化が顕著であった。これらのことは、RecA がバイオフィルムの形成において、何らかの機能を果たしていることが示唆される。

バイオフィルムの形成においては、GTF をコードする *gtf* 遺伝子しており、これまでにバイオフィルムの形成中の *gtf* 遺伝子の発現はシグナル伝達システムによってコントロールされていることが示唆されている。これまで、様々なシグナル伝達システムに関与する遺伝子が GTF の発現をコントロールしていることが報告されているが、その発現の制御機能は未だ不明である。しかしながら、*S.*

mutans の形成するバイオフィルムにおいて、この制御機能は重要であり、その発現をコントロールする遺伝子を同定することが、齲蝕の発生メカニズムの解明につながると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの結果をもとに *recA* 遺伝子の発現が口腔内の環境の変化によってどのように変化しているかを調べ、その発現のバイオフィルム形成に与える影響について解析を行う。これまで、GTFB と GTFC がリコンビネーションを起こすことにより、結果として活性が著しく低下した株が口腔内からの臨床分離株において発見されているが、このリコンビネーションに RecA が関与しているかはいまだ不明である。そのため、本研究の目的は、バイオフィルムの形成に最も重要である *gtf* 遺伝子の発現に *recA* 遺伝子の発現がどのような影響を与えているか、分子生物学的手法を用いて検討することである。

3. 研究の方法

(1) リコンビネーションの頻度

供試菌株に過剰のリコンビナント RecA タンパクを加えて培養することにより、RecA が過剰発現した際の GTF の発現に与える影響をコロニーの形状を観察することにより、検討した。

(2) GTF の発現

リコンビナント RecA タンパクを加えて培養した場合の GTF の発現を Polymerase Chain Reaction 法や、ウエスタンブロットィング法を用いて、検討した。

(3) GTF 活性染色

gtf 遺伝子により合成されたグルカンを染色することにより、GTF 活性の測定を行った。

(4) *gtfBC* リコンビネーション位置の決定

*gtfBC*のリコンビネーションを認める菌の遺伝子のシーケンスを行うことにより、リコンビネーションの位置の決定をおこなった。

(5) *gtfBC*リコンビネーション株における

RecAの発現

*gtfBC*リコンビネーション株のメッセンジャーRNA (mRNA)を抽出した。この抽出した mRNAを用いて、Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)法により cDNA を合成し、*recA*遺伝子の発現を定量した。

4. 研究成果

(1)リコンビネーションの頻度

リコンビナント RecA タンパクを添加すると 0.2%の頻度で、リコンビネーションによるスムーズコロニーが認められた。

(2) GTF の発現

*gtfBC*にリコンビネーションを認める株の *gtfBC* 遺伝子の大きさを PCR 法を用いて検討したところ、親株では約 9000bp であったのに対して、リコンビネーションを認める株では 4500bp であった。また、ウエスタンブロットング解析により、GTFB、GTFC 相当部位に、親株では二本のバンドを認めたがリコンビネーションを認めた株では、一本のバンドが認められた。

(3) GTF 活性染色

GTF 活性は、リコンビネーションを起こしている株では親株と比較して低下することが明らかとなった。

(4) *gtfBC*リコンビネーション位置の決定

*gtfBC*がリコンビネーションを起こしている遺伝子の長さは 4368bp であった。また *gtfB* 遺伝子の 4235bp 下流と *gtfC* 遺伝子の 788bp 上流において、リコンビネーションが起こっていることが明らかとなった。

(5) *gtfBC*リコンビネーション株における

RecA の発現

リコンビネーションしている株では、親株と比較して、*recA* 遺伝子の発現が上昇していた。

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 1 件)

- ① Inagaki S, Fujita K, Takashima Y, Nagayama K, Ardin AC, Matsumi Y, Matsumoto-Nakano M. Regulation of recombination between *gtfB/gtfC* genes in *Streptococcus mutans* by recombinase A. Sci World J. 10.1155 /2013 /405075. 2013. (査読有)

[学会発表] (計 3 件)

- ① Inagaki S, Nakano M, Fujita K, Nagayama K, Takashima Y, Ooshima T. Contribution of recombinase A of *Streptococcus mutans* to glucosyltransferase activity. 89th General Session of International Association of Dental Research, San Diego (USA), 2011. 3. 16
- ② 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, 郡山, 2010. 12. 2
- ③ Inagaki S, Matsumoto-Nakano M, Fujita K, Nagayama K, Takashima Y, Ooshima T. Contribution of RecA protein to GTF activity of *Streptococcus mutans*. 88th General Session of International Association of Dental Research, Barcelona (Spain), 2010. 7. 14.

[その他]

ホームページ等

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~pedo/research/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

稲垣 暁子 (INAGAKI AKIKO)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：50527233

(2)研究分担者

大嶋 隆 (OOSHIMA TAKASHI)

大阪大学・歯学研究科・招聘教員

研究者番号：80116003

仲野 道代 (NAKANO MICHIO)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30359848