

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17228

研究課題名（和文）ABCトランスポーターを基軸とした*S. mutans*のシグナル伝達システムの解明研究課題名（英文）Elucidation of *S. mutans* signal transduction system based on ATP-binding cassette transporter

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） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、*Streptococcus mutans* ABCトランスポーターのバイオフィーム形成への関与をその欠失変異株を作製し検討した。その結果、欠失変異株においては親株と比較して、バイオフィーム形成量は低下しその構造は粗造に変化しており、抗菌薬に対する感受性が上昇していた。以上より、ABCトランスポーターはバイオフィーム形成に関与し抗菌薬輸送にも関与していることが明らかとなった。しかしながら、2成分調節因子を主体とするシグナル伝達システムとは関連しないことが明らかとなったことから、本研究で明らかとなったABCトランスポーターは新たなシグナル伝達システムによって制御されていることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

*S. mutans* のABCトランスポーターは、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ため、*S. mutans*はあらゆる環境で生育しバイオフィームを形成し続けることが可能である。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関与し、抗菌薬輸送にも関連することが明らかとなった。しかしながら、着目したABCトランスポーターはCSP以外のシグナル伝達システムによって制御されている可能性が示された。今後、ABCトランスポーターの関与するシグナル伝達システムのメカニズムおよび発現抑制方法を検討することで、新たな齲蝕予防システムの確立に繋がると考えている。

研究成果の概要（英文）：Using ATP-binding cassette (ABC) transporter deficient mutant strains, the present study found that *Streptococcus mutans* ABC transporters are related to biofilm formation. The amount of biofilm formed by deficient mutant strains was lower than that formed by the parental strain, while the structure of biofilm formed by deficient mutant strains was more coarse as compared to that by the parental strain. Additionally, minimum inhibitory concentration findings indicated that the mutant strains had increased susceptibility to vancomycin, chloramphenicol, and tetracycline. Furthermore, the expression level of ABC transporter genes was not altered by addition of a competence-stimulating peptide (CSP).

These results suggest involvement of transporters in biofilm formation and cell membrane transport, especially drug transport. However, rather than a two-component CSP-related signal transduction system, a yet elucidated system may be involved in ABC transporter regulation.

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

小児における齲蝕罹患率の低下は認識されているが、二極化が進んでおり、現在でも齲蝕予防法および抑制法の確立は重要な課題である。また、これ以上の齲蝕罹患率の減少には、新しい齲蝕予防法を見出すことができなければ難しいことが示唆されている。この原因の一つとして、齲蝕の発症の原因である口腔バイオフィームは一旦形成されると、バイオフィーム構成細菌が産生する基質がバリアとなって抗菌物質に対して抵抗性を示し、抗菌薬がバイオフィーム中に入り込むことができなくなることである。そのため、抗菌薬やその他の薬剤によって細菌を除去することは難しく、機械的清掃のみがバイオフィーム除去の最も有効な方法となっている。しかしながら、機械的清掃のみでバイオフィームを根本的に破壊することは不可能であり、新しい齲蝕予防法へのアプローチが必要である。バイオフィーム構成細菌のうち、齲蝕の主要な病原細菌である *Streptococcus mutans* は重要な役割を果たしている。口腔内は温度変化、唾液分泌量、唾液 pH、生活習慣、抗菌薬などの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。特に、ABC トランスポーターは、抗菌薬に対する菌の抵抗性の獲得に重要な役割を果たしている。ABC トランスポーターは、細胞内に局在して細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が主な機能である。さらに、バイオフィームはシグナル伝達システムであるクオラムセンシングのもとで形成され、膜タンパクの発現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おり、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。これまでの齲蝕に関する研究として、*S. mutans* の菌体表層タンパクに着目し数多くなされてきたが、*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ーム形成の抑制に関与する ABC トランスポーターを特定し、これらの発現がシグナル伝達システムによってどのように制御されているのかを解明することで、バイオフィーム形成を抑制する方法の解明につながるのではないかと考えた。

## 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、ABC トランスポーターは ATP が結合する固有のアミノ酸配列を有しており、グラム陽性細菌の間で相同性の高いものが多く存在している。そのため、本研究の対象となる ABC トランスポーターは多くのグラム陽性細菌に共通したタンパクである可能性が高く、*S. mutans* の ABC トランスポーターの機能を同定することで他の多くのグラム陽性細菌の ABC トランスポーターの機能解明につながる可能性がある。本研究の目的は、バイオフィーム形成に関連する ABC トランスポーターを特定し、ABC トランスポーターの発現に影響を与えるシグナル遺伝子を明らかとすることで、新たな齲蝕予防法および抑制法を確立することである。

## 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* 遺伝子を抽出した。

#### ( 2 ) *SMU\_1519* 欠失変異株 ( *1519* ) の作製

抽出した遺伝子 *SMU\_1519* の上流、下流領域およびスペクチノ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 Todd-Hewitt (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% 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、スペクチノマイシン含有 Mitis Salivarius 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 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  $\mu$ 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 TH 液体培地で 37 °C、18 時間培養後、菌体を分離し懸濁を行う。懸濁液に 10 mM 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 0.5% 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 ) 抗菌薬に対する感受性

供試菌を 37 °C で 18 時間培養後、1 ウェルあたり  $3 \times 10^5$  CFU になるよう調整した。96 穴プレートにて各種抗菌薬 ( ペニシリン、セフェピム、ドリペネム、バンコマイシン、エリスロマイシン、バシトラシン、テトラサイクリン、オフロキサシン、クロラムフェニコール、クリンダマイシン ) をミューラーヒントン培地で段階希釈した後、供試菌を添加した。37 °C で 24 時間培養し、最小発育阻止濃度 ( MIC ) を測定し、MT8148 株と比較した。

#### ( 5 ) 遺伝子発現状態の検討

供試菌を 37 °C で対数増殖期まで培養し、全 RNA を抽出後、RNA シーケシング解析のサンプルとして使用した。RNA シーケシングを実施し、得られたデータから MT8148 株と比較して、発現量の増加もしくは減少の認められた遺伝子のうち、2 倍以上の変化を認める遺伝子を抽出し解析を行った。

#### ( 6 ) Competence-stimulating peptide (CSP)の影響

2 成分調節システムや *S. mutans* のオートインデューサーであるシグナル物質の一つである CSP の合成ペプチドを用い、着目した ABC トランスポーターとシグナル伝達システムの関連を以下の方法で検討した。MT8148 株に CSP を添加または非添加し、37 で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* 特異的プライマーを用いて、遺伝子の発現を Real-time 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* 株のバイオフィーム形成量は、MT8148 株と比較し低下した。共焦点レーザー顕微鏡によるバイオフィーム構造の比較検討では、MT8148 と比較し *1519* 株のバイオフィーム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* はバイオフィーム形成に関与することが示唆された。

##### ( 2 ) 抗菌薬に対する感受性

*1519* 株は MT8148 株と比較してバンコマイシン、クロラムフェニコール、およびテトラサイクリンに対する感受性が上昇していた。このことから、*SMU\_1519* は抗菌薬輸送に選択的に関連する遺伝子であることが明らかとなった。

##### ( 3 ) 遺伝子発現状態の検討

RNA シーケシング解析では、MT8148 株と比較し *1519* 株は、糖代謝に関与する遺伝子を含む 46 遺伝子の発現量の減少と、アンモニアトランスポーターを含む 56 遺伝子の発現量の増加を認められた。

##### ( 4 ) CSP の影響

CSP 添加によって *SMU\_1519* の発現量に変化は認めなかった。そのため、*SMU\_1519* は CSP 以外のシグナル伝達系によって制御されている可能性が示された。

以上のことより、*SMU\_1519* はバイオフィーム形成能において重要な役割を果たすことが示された。また、*SMU\_1519* は細胞膜輸送に関連する遺伝子であり、抗菌薬輸送にも選択的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発現抑制方法の検討を行う予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 後藤 花奈、仲野 道代
2. 発表標題 亜鉛の細胞膜輸送に関連するABCトランスポーターの機能解析
3. 学会等名 第60回日本小児歯科学大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松浦沙久矢、浅海春華、後藤花奈、仲野道代
2. 発表標題 Streptococcus mutans の抗菌薬耐性メカニズムに関連するオペロンの解析
3. 学会等名 第61回日本小児歯科学大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松浦沙久矢、浅海春華、後藤花奈、仲野道代
2. 発表標題 Streptococcus mutans の抗菌薬耐性メカニズムに関連するオペロンの解析
3. 学会等名 第44回岡山歯学会総会・学術集会
4. 発表年 2023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
---------	---------