

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390473

研究課題名(和文) S. mutans の膜タンパクが関連する新たなシグナル伝達システムの解明

研究課題名(英文) Functional analysis of signal transduction system involving membrane transporters in *Streptococcus mutans*

研究代表者

仲野 道代(松本道代)(Nakano, Michiyo)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：30359848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,800,000 円、(間接経費) 4,440,000 円

研究成果の概要(和文)：Streptococcus mutans のバイオフィーム形成において、口腔内の環境に適応するためにシグナル伝達システムが存在し、そのシステム中で膜タンパクが機能している。本研究では、栄養素であるアンモニウムイオンの取り込みについて検討した。Bacillus subtilis のアンモニウム輸送体をコードする nrgA 遺伝子と相同性が高い遺伝子 SMu1510 を抽出、その欠失変異株を作成し検討した。アンモニウムイオン存在下において欠失変異株は増殖能およびバイオフィーム形成が低下していたことから、SMu1510 は膜輸送に関与し、シグナル伝達システム関連遺伝子であることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus mutans metabolizes carbohydrates for adherence to and formation of biofilm on tooth surfaces, which allows the pathogen to tolerate rapid and frequent environmental fluctuations, such as nutrient availability, aerobic-to-anaerobic transitions, and pH changes. Investigation of ammonium transporters is important, as they play crucial roles in the uptake of nutrients by S. mutans in biofilm. The present study focused on characterizing the SMu1510 gene corresponding to nrgA in S. mutans, which is homologous to the ammonium transporter gene in Bacillus subtilis. The growth rate of an nrgA-deficient mutant strain (NRGD) was lower than that of the parental strain in the presence of ammonium. In addition, confocal laser scanning microscopy revealed that the structure of biofilm formed by NRGD was drastically different as compared to formed by the parental strain. These results suggest that the nrgA gene in S. mutans is essential for export of molecules and biofilm formation.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児歯科学

キーワード：シグナル伝達 バイオフィーム 齲蝕 ABC膜輸送体 細菌

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。齶蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* は口腔内の過酷な環境の変化の中で生育し、バイオフィームを形成し続けることができる。これは環境変化の情報をシグナルとして細胞内に伝達し、新たな環境に対応するために必要な遺伝子の発現を促進するシステムと考えられている。このシステムの中で膜タンパクが重要な役割を果たしていると考えられる。

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* 全ゲノム配列から膜タンパクをコードする遺伝子を他の菌との相同性により抽出

(2) 抽出した膜タンパクをコードする遺伝子の機能解析

(3) 口腔バイオフィーム形成における膜タンパクの役割

(4) 膜タンパクをコードする遺伝子の発現調節遺伝子の発見

3. 研究の方法

(1) 膜輸送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、膜輸送に関連すると考えられる遺伝子を抽出する。

(2) 膜タンパクをコードする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) 抗生物質取り込み試験

蛍光プローブを用いて、抗生物質の輸送状態を調べる。蛍光プローブを添加した培地で供試菌を培養した後、菌体を分離、洗浄した後、蛍光プローブの偏光度を測定することにより分析する。

(4) 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。

(5) 酸性状態や抗生物質存在下での膜タンパクをコードする遺伝子の mRNA の発現量の変化を調べることにより、ストレス状態での膜タンパクの役割を検討する。

4. 研究成果

Streptococcus mutans のバイオフィーム形成において、口腔内の環境に適応するためにシグナル伝達システムが存在し、そのシステム中で膜タンパクが機能している。本研究では、ABC transporter である *SMu0836* および *SMu0837* を抽出し、その欠失変異株を作成し、それらの機能について検討した。その結果、これらの遺伝子が抗生物質の輸送に関与していることが明らかとなった。さらに、栄養素であるアンモニウムイオンの取り込みについて検討した。*Bacillus subtilis* のアンモニウム輸送体をコードする *nrgA* 遺伝子と相同性が高い遺伝子 *SMu1510* を抽出、その欠失変異株を作成し検討した。アンモニウムイオン存在下において欠失変異株は増殖能およびバイオフィーム形成が低下していたことから、*SMu1510* は、アンモニウムイオンの輸送に関与していることが明らかとなった。以上の結果から、これらの膜タンパクがそれぞれ特異的な物質の輸送に関与し、バイオフィーム形成におけるシグナル伝達システム関連遺伝子であることが示された。

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 12 件)

- ① Nagayama K, Fujita K, Takashima Y, Ardin AC, Ooshima T, Matsumoto-Nakano M. Role of ABC transporter proteins in stress responses of *Streptococcus mutans*. Oral Health and Dental Management, in press. (査読有)
- ② 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. Scientific World Journal. Volume 2013, Article ID 405075, doi.org/10.1155/2013/405075 (査読有)
- ③ Nomura R, Nakano K, Naka S, Nemoto H, Masuda K, Lapidattanakul J, Alaluusua S, Matsumoto M, Kawabata S, Ooshima T. Identification and characterization of a collagen-binding protein, cbm, in *Streptococcus mutans*. Mol Oral Microbiol, 27, 308-323, 2012. (査読有)
- ④ 仲野 道代 総説 *Streptococcus mutans* における口腔バイオフィーム形成とシグナル伝達システム 岡山歯学雑誌, 61-66, 2012. (査読無)
- [学会発表] (計 13 件)
- ① Ardin AC, 仲野道代, 藤田一世, 仲野和彦 *Streptococcus mutans*におけるアンモニウム輸送体オペロンの解析およびバイオフィーム形成における役割 第 51 回日本小児歯科学会大会, 2013. 5. 24, 岐阜.
- ② 松三友紀, 稲垣暁子, 藤田一世, 仲野道代 *Streptococcus mutans*のプロテオーム解析による表層タンパク発現メカニズムの検討 第 51 回日本小児歯科学会大会, 2013. 5. 24, 岐阜.
- ③ Ardin AC, Matsumoto-Nakano M, Ooshima T. Regulation of ammonium transport of nitrogen regulatory protein in *Streptococcus mutans*. 60th ORCA (European Organization of Caries Research) Congress, 2013. 7. 3, Liverpool, UK.
- ④ Matsumoto-Nakano M, Nagayama K, Fujita K, Ooshima T. Correlation between cariogenicity and bacteriocin production on *Streptococcus mutans* clinical isolates. 60th ORCA (European Organization of Caries Research) Congress, 2013. 7. 3, Liverpool, UK.
- ⑤ Ardin AC, Matsumoto-Nakano M, Nagayama K, Fujita K, Ooshima T. Role of ammonium transporter in biofilm formation of *Streptococcus mutans*. 91st IADR (International Association of Dental Research) Meeting, 2013. 3. 20, Seattle, USA.
- ⑥ Ardin AC, Matsumoto-Nakano M, Inagaki S, Nagayama K, Fujita K, Ooshima T. Contribution of ammonium transport proteins in *Streptococcus mutans* to biofilms formation. 8th Conference of Pediatric Dentistry Association of Asia, 2012, 5, 24, Bali, Indonesia.
- ⑦ 仲野道代, Ardin AC, 永山佳代子, 高島由紀子, 藤田一世, 大嶋 隆 *Streptococcus mutans* の口腔バイオフィーム形成における膜輸送体の関与. 第 21 回 Lancefield レンサ球菌研究会および第 44 回レンサ球菌感染症研究会, 2012. 6. 8, 大阪.
- ⑧ Nagayama K, Matsumoto-Nakano M, Inagaki S, Fujita K, Takashima Y, Ooshima T. Stress response by *Streptococcus mutans* ABC transporter proteins. 90th International Association of Dental Research, 2012. 6. 23, Iguacu falls, Brazil.
- ⑨ Fujita K, Matsumi Y, Inagaki S, Nakano M, Ooshima T. GbpA deficiency affects expressions of glucosyltransferases of *Streptococcus mutans*. 90th International Association of Dental Research, 2012. 6. 23, Iguacu falls, Brazil.
- ⑩ 松三友紀, 稲垣暁子, 藤田一世, 大嶋 隆,

仲野道代 *Streptococcus mutans* における
表層タンパク欠失に対するストレス応答
因子の解析 第 50 回日本小児歯科学会記
念大会, 2012. 5. 12, 東京.

⑪ Ardin AC, Matsumoto-Nakano M, Inagaki
S, Nagayama K, Fujita K, Ooshima T. Role
of ammonium transporter in biofilms
formation by *Streptococcus mutans*. 第
50 回日本小児歯科学会記念大会, 2012. 5.
12, 東京.

⑫ Ardin AC, Fujita K, Nagayama K,
Matsumoto-Nakano M. Functions of
membrane transporters in *Streptococcus
mutans*. 第 31 回日本小児歯科学会中四国
地方会大会, 2012. 11. 4, 香川.

⑬ Ardin AC, 仲野道代, 稲垣暁子, 永山
佳代子, 藤田一世, 大嶋隆
Streptococcus mutans の窒素分子の取り
込みにおけるアンモニウム輸送体の機
能解析 第 30 回日本小児歯科学会記念
大会, 2011. 10. 30, 大阪.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

藤田 一世 (KAZUYO FUJITA)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：00437386

大嶋 隆 (OSHIMA TAKASHI)

大阪大学・歯学研究科・研究員

研究者番号：80116003