

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3月31日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890107

研究課題名（和文）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

研究課題名（英文）Functional analysis of ABC transporters in oral biofilm formation

研究代表者

永山 佳代子 (NAGAYAMA KAYOKO)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：80546979

研究成果の概要（和文）：*S. mutans*の細胞膜上には、ABC膜輸送体が多数存在していることが報告されている。本研究では、ABC膜輸送体をコードすると推定される *SMu0835*、*SMu0836*、*SMu0837* 遺伝子の欠失変異株を *S. mutans* MT8148 株を親株として作製し、抗生物質の取り込みに関する機能解析を行った。これらの遺伝子にコードされる ABC 膜輸送体は数種の抗生物質の排出に関与していることが示唆された。また、致死量以下での抗生物質の存在下では、これらの遺伝子の発現が上昇していた。以上の研究成果は、ABC 膜輸送タンパクが、*S. mutans* 抗生物質の排出に関与していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Among the large number of transporters possessed by *Streptococcus mutans*, ATP-binding cassette (ABC) transporters have multiple functions related to sugar metabolism and are considered to be promising targets for antimicrobial strategies. In the present study, *S. mutans* isogenic mutant strains with inactivation of the *SMu0835*, *SMu0836*, and *SMu0837* genes encoding ABC transporters showed high susceptibility to several antibiotics as compared to the parental strain. In addition, the expressions of these genes were elevated when *S. mutans* strain MT8148 was cultured with sublethal concentrations of those antibiotics. Our results suggested that these genes have a strong relationship with the export of molecules such as antibiotics.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

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*, ABC膜輸送体, バイオフィルム, 遺伝子欠失株, 抗生物質, 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

Streptococcus mutans はう蝕の主要な病原細菌であり、口腔内のバイオフィーム形成において重要な役割をする細菌である。この *S. mutans* は、ヒト口腔内において大きな環境の変化や外来物質の侵入といった過酷な環境にさらされている。このため *S. mutans* は、菌を取り巻く様々な環境ストレスに対応するための様々なタンパクを保有していると考えられている。多くの細菌は抗生物質や他の薬物などの侵入に対して、ターゲット分子の不活化や細胞侵入の阻害、排出など様々なメカニズムを発展させ、生育してきたことが知られている。細菌の細胞膜上には、必要な栄養素を取り込み、不要なものを排出する膜輸送体が多数存在していることがこれまでに報告されている。今回、我々は膜輸送体のうち adenosine triphosphate (ATP) を加水分解することにより得るエネルギーを用いて選択的に物質を細胞膜に透過させる ABC 膜輸送体の 1 つをコードすると推定されている遺伝子 *SMu0835*, *SMu0836*, *SMu0837* について機能解析を行うこととした。

2. 研究の目的

S. mutans がヒト口腔内において大きな環境の変化や外来物質の侵入といった過酷な環境下でそのストレスから回避する手法を解明することで、*S. mutans* の病原性を考察する上で重要な示唆を与え、グラム陽性細菌の薬剤耐性における ABC 膜輸送タンパクの関与を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子欠失変異株の作製

日本人小児口腔より分離した *S. mutans* MT8148 株の *SMu0835*, *SMu0836*, *SMu0837* 遺

伝子の中央付近にエリスロマイシン耐性遺伝子を挿入することで *SMu0835* 遺伝子を欠失させた。

(2) 抗菌物質に対する感受性

Todd-Hewitt (TH) 液体培地にて一晩培養した供試菌を、抗菌物質非添加の TH 液体培地および各種抗菌物質 (テトラサイクリン、カナマイシン、トリクロサン、ペニシリン、クロルヘキシジン、クロラムフェニコール) を各濃度で添加した TH 液体培地で培養し、18 時間培養後に濁度を 550 nm にて測定した。

(3) テトラサイクリン添加による *SMu0835*, *SMu0836*, *SMu0837* 遺伝子の発現量の解析

テトラサイクリンを対数増殖期で増殖が阻害されないと考えられる濃度で添加した TH 液体培地に *S. mutans* MT8148 を播種し、対数増殖期まで培養し、菌体を回収し RNA 抽出を行った。RNA を DNase した後これをもとに cDNA を作製した。作製した cDNA をもとに *SMu0835*, *SMu0836*, *SMu0837* 遺伝子の発現を解析した。

(4) 蛍光プローブによる細部膜輸送の解析

細胞質の脂質 2 重層に取り込まれる蛍光物質をプローブとして各供試菌を培養し菌体内の蛍光プローブの残留量を測定し、その菌体間の差を比較することで、ターゲット遺伝子のコードする ABC 膜輸送体の細胞膜輸送における役割を調べた。

(5) バイオフィーム形成能の検討

TH 液体培地中で培養した各供試菌を 0.1% スクロース含有 TH 液体培地を入れた 100ml/well のマイクロタイタープレートに 1/100 量播種して 2 日間培養を行い、クリスタルバイオレットによりプレート底面に付着している菌体を染色し、吸光度を測定した。

(6) *S. mutans* のシグナル伝達システムとなる *comC* 遺伝子と *SMu0835*, *SMu0836*, *SMu0837* 遺

伝子の関連

MT8148 株と *comC* 遺伝子欠失株を TH 液体培地に播種し、対数増殖期まで培養し、菌体を回収し RNA 抽出を行った。その後(3)と同様の方法で *SMu0835*, *SMu0836*, *SMu0837* 遺伝子の発現の解析を行った。

(7) *comC* 遺伝子が産生する CSP (competence stimulating peptide) と *SMu0835*, *SMu0836*, *SMu0837* 遺伝子の関連

MT8148 株を CSP 非添加および添加 TH 液体培地に播種し、対数増殖期まで培養し、菌体を回収し RNA 抽出を行った。その後(3)と同様の方法で *SMu0835*, *SMu0836*, *SMu0837* 遺伝子の発現の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 抗菌物質に対する感受性

テトラサイクリン、カナマイシン、トリクロサン添加培地においては、各遺伝子欠失変異株において濁度が MT8148 株と比較して低く、感受性の増加が認められた。また、クロラムフェニコールにおいては濁度の増加が認められ、ペニシリン、クロルヘキシジン、H202 においては感受性に変化は認められなかったことから、*SMu0835*, *SMu0836*, *SMu0837* 遺伝子がコードする ABC 膜輸送体は抗生物質の輸送に選択的に関与している可能性が示唆された。

(2) テトラサイクリン添加による *SMu0835*, *SMu0836*, *SMu0837* 遺伝子の発現量の解析

テトラサイクリンを添加して培養すると、各遺伝子の発現の上昇を認めたことから、抗生物質のストレスに反応して遺伝子の発現が変化した可能性が示唆された。

(3) 蛍光プローブによる細部膜輸送の解析

各遺伝子欠失変異株は、MT8148 株と比較して蛍光偏光度が減少しており、*SMu0835*, *SMu0836*, *SMu0837* 遺伝子は物質の排出に関

与している可能性が示唆された。

(4) バイオフィーム形成能の検討

MT8148 株と比較し、各遺伝子欠失変異株においてバイオフィーム形成能が低下していた。

(5) *S. mutans* のシグナル伝達システムとなる *comC* 遺伝子と *SMu0835*, *SMu0836*, *SMu0837* 遺伝子の関連

comC 遺伝子欠失変異株において *SMu0835*, *SMu0836*, *SMu0837* 遺伝子の発現量が増加していたこと、CSP 添加で各遺伝子の発現量が低下していたことから、この ABC 膜輸送体は CSP により発現が抑制されている可能性が示唆された。

以上のことから、口腔内においてう蝕の主要な病原細菌である *S. mutans* は様々なストレスにさらされているが、今回の実験によりそのストレスに対し応答し、生存に寄与するメカニズムの一部が解明できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Nagayama K, Ardin AC, Fujita K, Inagaki S, Matsumoto-Nakano M, Ooshima T. Distribution of bacteriocin genes in *Streptococcus mutans* in Japanese children. 8th Biennial Conference of Paediatric Dentistry of Association of Asia : Proceeding: 55-56, 2012. (査読無)
- ② Matsumoto-Nakano M, Nagayama K, Kitagori H, Fujita K, Inagaki S, Takashima Y, Tamesada M, Kawabata S, Ooshima T. Inhibitory effects 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)

[学会発表] (計3件)

- ① Nagayama K, Nakano M, Inagaki S, Fujita K, Takashima Y, Ooshima T. Stress Response by *Streptococcus mutans* ABC Transporter Proteins. 90th IADR (International Association of Dental Research) Meeting, 2012. 6. 20-23, Iguazu falls, Brazil

- ② Nagayama K, Ardin AC, Fujita K, Inagaki S, Matsumoto-Nakano M, Ooshima T. Distribution of bacteriocin genes in *Streptococcus mutans* in Japanese Children. 8th Biennial Conference PDAA (Pediatric Dentistry Association of Asia), 2012. 5. 24-26

- ③ Nagayama K, Nakano M, Inagaki S, Fujita K, Takashima Y, Ooshima T. Functional Analysis of ABC transporter Proteins of *Streptococcus mutans*. 89th IADR (International Association of Dental Research) Meeting, 2011. 3. 16-19, San Diego, Calif., USA

[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

永山 佳代子 (NAGAYAMA KAYOKO)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：80546979