

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593089

研究課題名(和文) S. mutans グルカン結合タンパクBの発現メカニズムと調節機構の解析

研究課題名(英文) Functional analyses of expression and regulation of glucan-binding protein B in Streptococcus mutans

研究代表者

藤田 一世 (Fujita, Kazuyo)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・講師

研究者番号：00437386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：Streptococcus mutansの菌体表層タンパクの一つであるグルカン結合タンパクB (GbpB)をコードするgbpB遺伝子上流に存在し、細胞形態決定遺伝子と推定されるmreC遺伝子およびmreD遺伝子を抽出し、GbpBとの発現の関連について検討を行った。mreC遺伝子、mreD遺伝子およびgbpB遺伝子は一つのオペロンとして機能している可能性が示唆された。さらにmreCおよびmreD遺伝子欠失株を作製し、gbpB遺伝子の発現量を親株と比較したところ、有意に低下していた。以上の結果は、mreC遺伝子とmreD遺伝子はgbpB遺伝子の発現に影響を与えている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus mutans is known to synthesize at least 4 different glucan-binding proteins (Gbps), of which GbpB has been purified and shown to be immunologically distinct from the other Gbps. GbpB is considered to play an important role in cell-wall construction. The mreC and mreD, encoding MreC and MreD, respectively, are essential proteins for lateral peptidoglycan synthesis are located upstream of the gbpB encoding GbpB. The purpose of the present study was to analyze the expression of mreC and mreD with focus on GbpB expression patterns. Transcriptional analysis showed that mreC, mreD, and gbpB constituted an operon. Next, MreC- and MreD-deficient mutant strains were constructed by insertional inactivation of the corresponding genes, and the expression level of gbpB was examined. gbpB expression was elevated in the MreC-deficient mutants and reduced in the MreD-deficient mutants. These results suggest that the mreC and mreD genes participate in regulation of gbpB gene expression.

研究分野：分子生物学

キーワード：Streptococcus mutans グルカン結合タンパクB mreC遺伝子 mreD遺伝子 欠失変異株 バイオフィルム

1. 研究開始当初の背景

齲蝕の主要な病原細菌である *Streptococcus mutans* の菌体表層にはグルカン合成酵素 (Glucosyltransferase: GTF), 高分子タンパク抗原 (PAc)、あるいはグルカン結合タンパク (Gbp) 等のタンパク構成成分が存在し、齲蝕の発生に強く関与することが明らかにされている。グルカン結合タンパク (Glucan-binding protein: Gbp) は、これまでに GbpA, GbpB, GbpC, および GbpD の4種が精製され、それぞれをコードする遺伝子が特定されている。そのうち GbpB は細胞壁の構成成分であり、グルカンと結合する性状を有しつつ、細胞分裂や細胞の維持に関連するタンパクであることが明らかとなった。さらに、GbpB は生物学的に他の Gbp とは異なる性状を有するだけでなく、ヒトにおける臨床分離株において特徴的な遺伝子発現をとることが明らかになっている。そこで、GbpB 発現様式を調べることによって、*S. mutans* の病原性を評価することが可能ではないかと考えるにいたった。

2. 研究の目的

gbpB 遺伝子のオープンリーディングフレーム (ORF) の上流には、細胞の形を決定する機能を持つと推定されている *mreC* および *mreD* 遺伝子が存在している。これらの遺伝子が *gbpB* 遺伝子の発現にどのように関与しているかを検討する。まず GbpB の発現が変化している臨床分離株において *mreC* および *mreD* 遺伝子がどのように発現するかを調べるとともに、MreC あるいは MreD タンパクの欠失が GbpB タンパクの発現にどのような影響を与えるかを調べる。さらにこれらの遺伝子が *S. mutans* によるバイオフィーム形成におけるシグナル伝達システムである 2 成分調節因子システムにどのように関与しているかを明らかにしたいと考えている。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子のスクリーニング

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完結し、約 200 万塩基の配列と約 2000 個の ORF 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 (Los Alamos; www.oralgen.lanl.gov) により様々な遺伝子を検索することができる。今回、*gbpB* 遺伝子上流および下流の近傍に位置する ORF のうち、タンパク発現に関連する遺伝子 *mreC* および *mreD* のスクリーニングを行う。

(2) mRNA 発現量の測定

GbpB の発現形式に異なる臨床分離株の *mreC* および *mreD* 遺伝子の発現を調べることにより、*mreC* および *mreD* 遺伝子と GbpB の関係を明らかにする。

S. mutans MT8148 株と臨床分離株の mRNA の抽出: 供試菌を波長 600 nm が 0.7 になるように Todd Hewitt 液体培地にて培養後、遠心により菌体を回収する。菌体は diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水で懸

濁し、Trizol を添加した後、菌体破碎器を用いて破碎後、遠心し、上清中の mRNA をイソプロピルアルコールを用いて沈殿させる。ペレットを乾燥させ、DEPC 処理水に懸濁し、濃度を測定する。さらに DNA の混入を防ぐために DNase 処理を行う。

Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) による cDNA の定量: 記で抽出した mRNA を鋳型として、逆転写酵素により cDNA を合成する。その cDNA を鋳型として、ターゲット遺伝子の発現を定量する。

(3) 変異株の作製

S. mutans の染色体 DNA を鋳型として *mreC*, *mreD* 遺伝子を Polymerase Chain Reaction 法により増幅し、その DNA 断片をベクター pUC19 に挿入する。そのプラスミドを用いて、*mreC*, *mreD* 遺伝子の中央部にそれぞれ、抗生物質耐性カセットを挿入したプラスミドを作製し、*S. mutans* MT8148 株に形質転換することにより、*mreC*, *mreD* 遺伝子をそれぞれ欠失させた変異株を作製する。

(4) *mreC*, *mreD* 欠失株におけるバイオフィーム形性能の検討

欠失変異株とその野生株のバイオフィームを比較することにより、欠失した遺伝子のバイオフィーム形性における役割を解析する。バイオフィーム形性能は、マイクロタイタープレートを用いて液体培地で供試菌を 2 日間、嫌気下で培養後、クリスタルバイオレットで染色し、マイクロプレートリーダーにより吸光度を測定することにより評価する。またこの実験により、バイオフィーム形成に関連する遺伝子のスクリーニングを行うことができる。

(5) 表層タンパクのプロファイリング

臨床分離株および目的遺伝子欠失変異株の表層タンパクのプロファイリングを行うことにより、発現状態の変化の詳細を調べる。ウエスタンブロッティング: タンパクと 2 倍濃度の SDS-PAGE 用バッファーを等量混合し、加熱して SDS-PAGE 用試料とする。アクリルアミドの濃度は分離用として 10%、濃縮用として 3% を用いて、電気泳動を行う。泳動後、通電することによりアクリルアミドゲル層から転写膜へ転写し、ウサギ抗 rGbpB 抗体と室温で 1 時間反応させる。反応後洗浄し、アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ免疫グロブリンと室温でさらに 1 時間反応させ、発色基質を加えて発色させて、バンドを視覚化する。

4. 研究成果

齲蝕原性細菌 *S. mutans* の菌体表層タンパクの一つであるグルカン結合タンパク B (GbpB) は、細胞の分裂や維持に関係し、*S. mutans* に存在する他のグルカン結合タンパクとは生物学的に異なる性状を有している。本研究では、*S. mutans* の全遺伝子配列より GbpB をコードする *gbpB* 遺伝子上流に存

在し、細胞形態を決定するタンパクをコードすると推定される遺伝子である *mreC* 遺伝子および *mreD* 遺伝子を抽出し、GbpB との発現関連について検討を行った。はじめに *mreC* 遺伝子の一部と相補的な DNA プロンプを作成し、*S. mutans* GS5 株から抽出した RNA を用いてノーザンプロットングを行ったところ、*mreC* 遺伝子、*mreD* 遺伝子および *gbpB* 遺伝子は一つのオペロンとして機能している可能性が示唆された。次に MreC 欠失株および MreD 欠失株を作成し、増殖能およびバイオフィーム形成能について検討した。増殖能においては、MreC 欠失株は親株と比較して差は認められなかったが、MreD 欠失株は親株と比較して有意に低下していた。また、MreC および MreD 欠失株のバイオフィーム形成能は親株と比較して有意に低下していた。さらに、作成した MreC、MreD および GbpB 欠失株から RNA を抽出し、各欠失株における *gbpB* 遺伝子の発現を比較したところ、親株と比較して *gbpB* 遺伝子の発現量は MreC および MreD 欠失株において、有意に増加していた。以上の結果より、*mreC* 遺伝子と *mreD* 遺伝子は *gbpB* 遺伝子の発現に影響を与えている可能性が示唆された。本研究の成果は、*gbpB* 遺伝子の発現に関連する遺伝子を明らかにすることにより、*S. mutans* バイオフィーム形成のメカニズムが明確にすることができた。齲蝕の発症予防法の確立への貴重な知見であると考えられる。

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 4 件)

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 Dent Manag* 査読有 13, 359-365, 2014.

Ardin AC, Fujita K, Nagayama K, Takashima Y, Nomura R, Nakano K, Ooshima T, Matsumoto-Nakano M. Identification and Functional Analysis of an Ammonium Transporter in *Streptococcus mutans*. *PLoS One* 査読有 doi: 10.1371/journal.pone.0107569. 2014.

Matsumi Y, Fujita K, Takashima Y, Yanagida K, Morikawa Y, Matsumoto-Nakano M. Contribution of glucan-binding protein A to firm and stable biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Microbiol* 査読有 doi: 10.0000/omi.12085. 2014

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* 査読有 doi: 10.1155/2013/405075, 2013.

[学会発表](計 9 件)

柳田可奈子、高島由紀子、森川優子、松三友紀、藤田一世、仲野道代 *Streptococcus mutans* 形態決定遺伝子の菌体表層タンパク発現に対する制御メカニズムの検討 第 33 回日本小児歯科学会中四国地方大会 2014 年 11 月 2 日 松山総合コミュニケーションセンター 松山

Fujita K, Matsumi Y, Takashima Y, Matsumoto-Nakano M. Cariogenic properties of Lactobacillus isolated from caries and non-carries region in children. 9th Conference of the Pediatric Dentistry Association of Asia 2014 8 22- 24 Singapore Singapore.

柳田可奈子、藤田一世、Arifah Chieko Ardin、高島由紀子、仲野道代 *Streptococcus mutans* グルカン結合タンパク B の発現制御機構の解析 第 52 回日本小児歯科学会大会 2014 年 5 月 16 日~5 月 17 日 品川、東京

Fujita K, Takashima Y, Matsumoto-Nakano M. Biofilm formation by Lactobacillus species in combination with *Streptococcus mutans* MT8148. 24rd Congress of International Association of Pediatric Dentistry 2013 6 12-15 Seoul Korea.

藤田一世、松三友紀、高島由紀子、仲野道代 Lactobacillus species によるバイオフィーム形成能の検討 第 51 回小児歯科学会大会 2013 年 5 月 23 日~5 月 24 日 長良川国際会議場 岐阜

柳田可奈子、藤田一世、永山佳代子、仲野道代 *Streptococcus mutans* 形態決定遺伝子と齲蝕病原性との関連について 第 51 回小児歯科学会大会 2013 年 5 月 23 日~5 月 24 日 長良川国際会議場 岐阜

藤田一世、仲野道代 小児口腔から分離された乳酸菌のう蝕原性に関する検討 第 31 回日本小児歯科学会中四国地方大会 2012 年 11 月 4 日 サンポートホール高松 高松

藤田一世、高島由紀子、仲野道代、大嶋 隆 小児の唾液中 *S. mutans* 数と Lactobacilli 数の経年的分析 第 50 回日本小児歯科記念大会 2012 年 5 月 11 日~5 月 12 日 東京国際フォーラム 東京

Fujita K, Matsumi Y, Inagaki S, Matsumoto-Nakano M, Ooshima T. GbpA deficiency affects expression of glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. 90th General Session of International Association of Dental Research 2012 6 20-23 Iguacu falls Brazil.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤田 一世 (FUJITA, Kazuyo)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
講師
研究者番号：00437386

(2)研究分担者

仲野 道代 (NAKANO, Michiyo)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・
教授
研究者番号：30359848