様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成　２１年　４月１０日現在

研究種目：若手研究(B)
研究期間：２００７～２００８
課題番号：１９７９１４０１
研究課題名（和文）　ストレプトコッカス・ミュータンスのクオラムセンシング機構とバイオフィルム
研究課題名（英文）　The relationship between quorum sensing system and biofilm formation in *Streptococcus mutans*

研究代表者
鹿山　鎮男（KAYAMA　SHIZUO）
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号：５０４３２７６１

研究成果の概要：

バイオフィルム感染症は院内感染などで問題になっており、歯科領域ではう蝕、歯周病、慢性骨髄炎などが挙げられる。*S.mutans* における病原因子を解明していくことにより、う蝕や歯髄炎発症のメカニズムを探り、従来の方法とは全く異なったう蝕治療法、予防法の開発をすることが目的である。まず、バイオフィルム形成におけるスクロースエンザイムII(*scrA*)遺伝子の役割を解析することにした。*scrA* 遺伝子変異株の培養上清中における非水溶性及び水溶性グルカンの産生量は、高濃度スクロース存在下で親株よりも有意に少なく、象牙質板に付着した非水溶性グルカン産生量も、親株より有意に少なかった。このことから、*scrA* 遺伝子を欠損させることにより、スクロースの代謝経路が部分的に遮断されたことが考えられる。また、熱ショック誘導性タンパクである *htrA* 遺伝子変異株を作製した。この株においてもグルカンの産生量は低下していることが明らかになった。これらの結果は、*scrA* 遺伝子及び *htrA* 遺伝子がバイオフィルム形成に重要な役割を担っているということを示唆していると思われる。バイオフィルム形成を阻害する治療法を確立する上でこれらの遺伝子を阻害することが非常に重要であると考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００７年度	2,500,000	0	2,500,000
２００８年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総　計	3,300,000	240,000	3,540,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学
キーワード：保存修復学・バイオフィルム

1．研究開始当初の背景

細菌は、自然界や生体内における様々な環境変化を認識するシステムを持っており、環境変化に適応するためのシステムとして代表的なものの一つにバイオフィルム形成が挙げられる。細菌は、自己が不利な環境におかれた場合に菌体外に多糖体などを産生し、バイオフィルムを形成することによってその危機から逃れようとする。このバイオフィルム形成の結果がバイオフィルム感染症であり、歯科領域ではう蝕、歯周病、慢性骨髄炎などが挙げられる。

最近になって、細菌は環境中における自身の細胞密度を感知し、状況に適した様々な遺伝子発現を制御していることが明らかになってきた。この細菌間密度探知機構はQuorum sensing 機構と呼ばれる。グラム陽性菌の Quorum sensing 機構は、AI-1 としてオリゴペプチドが存在し、レンサ球菌の場合は competence-stimulating peptide（CSP）と呼ばれている。また、この CSP は細胞膜を通過せず、二成分制御系によってシグナル伝達が行われ、遺伝子発現が制御されている。ミュータンスレンサ球菌の場合は、*com* 遺伝子群によって制御される領域が Quorum sensing 機構の中心であり、CSP は 21 個のアミノ酸により構成されている。また、グラム陽性菌には菌種特異性が保たれている AI-1 とは別に、異なる菌種間でも相互に作用することのできる AI-2 の存在が示されると共に、AI-2 の合成には *luxS* 遺伝子が関わっていることも明らかになった。近年、Quorum sensing 機構が感染症において非常に重要な役割を担っているバイオフィルム形成や病原因子の発現などを制御していることが分かってきた。*Streptococcus mutans* においても、Quorum sensing 機構の存在が明らかになっているが、その詳細についてはまだ不明な点が多い。*S. mutans* において、AI-1 に関与する *com* 遺伝子、AI-2 に関与する *luxS* 遺伝子が、それぞれバイオフィルム形成に影響を与えるという報告を元に、*S. mutans* のバイオフィルムと Quorum sensing 機構の関係を明らかにすれば、*S. mutans* のバイオフィルムによって引き起こされるう蝕の予防・治療に貢献できるのではないかという着想に至った。

2．研究の目的

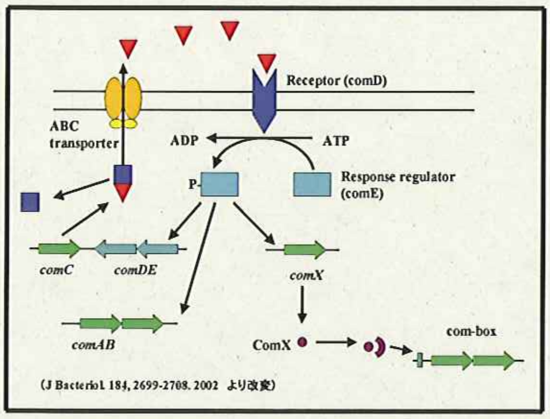
S.mutans の Quorum sensing 機構のメカニズムを明らかにし、その病原因子との関連を解明していくことによりう蝕や歯髄炎発症のメカニズムを探り、従来の方法とは全く異なったう蝕治療法、予防法の開発をすることが目的である。そこで、Quorum sensing 機構を構成する遺伝子群が、主要なう蝕病原因子であるグルコシルトランスフェラーゼの発現やバイオフィルムの形成にどの様に関連しているかについて解明することを目的とする。今までは AI-1 に関与する *com* 遺伝子を中心に解析を行ってきたが、本研究においては主にスクロースエンザイム II(*scrA*)遺伝子及び熱ショック誘導性タンパクである *htrA* 遺伝子について解析をすすめる。

HtrA（ high-temperature requirement factor A）は、1983 年に *Escherichia coli* において初めて報告された熱ショック誘導性のタンパクである。HtrA は生物の種を超えて高度に保存されており、細菌・真菌・植物・ヒトなどで多くの相同タンパク質が同定されている。これまでに報告された HtrA の主な機能は、熱ショックや酸化的ストレスなどの環境ストレスに暴露されることによってダメージをうけたタンパク質を分解することであると考えられている。*E. coli* において HtrA は、42℃以上の高温ストレス環境下での生存に必須であることが示唆されている。また、*Salmonella* 属においては、*htrA* を欠失させることによって病原性を失わせた菌株がワクチン用に開発され、その有用性が唱えられている。また、*Salmonella* 属以外でも、多くの病原性細菌において、*htrA* 変異株は野生株に比べて毒力が低下するという報告がある。環境ストレスに対する抵抗性だけでなく、う蝕の原因菌として知られている *S. mutans* においては、そのバイオフィルム形成能に HtrA が関与する可能性が示唆されている。このように、種々の病原性細菌において HtrA は、環境ストレスに対する抵抗性や病原性に重要な役割を果たしている。

3．研究の方法

本研究においては、代表的なう蝕原因菌である *S. mutans* を用いて行う。なお、菌株としてはゲノムプロジェクトにより全ゲノム配列が決定されている UA159 株を使用する。UA159 株の Quorum sensing 機構についてはこれまでの報告により、competence regulation operon として存在する *comC, D, E, X* 遺伝子や、autoinducer1（AI-1）と呼ばれるシグナル分子として competence-stimulating peptide（CSP）分

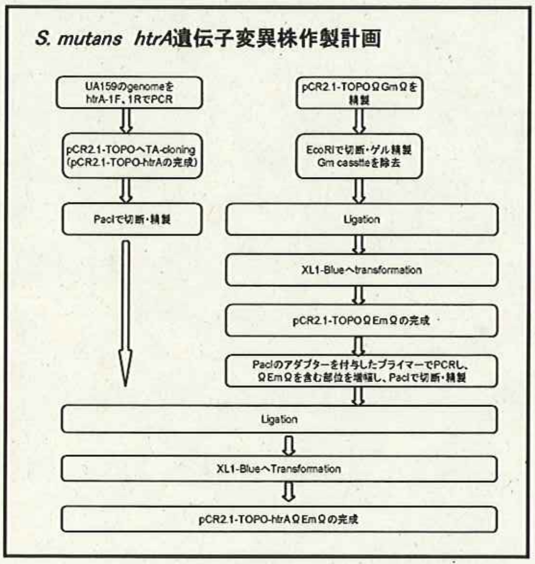
子を利用していることが明らかとなっている（下図）。



申請者らは、これまでに *comC, D, E, X* 各遺伝子に薬剤耐性遺伝子を挿入することにより相同組み換え変異株を作製し、バイオフィルム産生に重要な働きをしているグルコシルトランスフェラーゼと AI-1 に関与する *com* 遺伝子の関係を中心に解析を進めてきた。また、グルコシルトランスフェラーゼの他にも、バイオフィルム形成に関与しているといわれている *scrA* 遺伝子が存在するが、その詳細は明らかになっていない。この様な経緯より、バイオフィルム形成に関与する因子の解明には、従来からの AI-1 の解析に加えて、*scrA* 遺伝子・*htrA* 遺伝子との相互関係を中心に解析するのがより効率的であると考え、変異株を作製することにした。

４．研究成果

S. mutans UA159 株を親株とし、下図に基づいて *htrA* 遺伝子の変異株を作製した。



S. mutans UA159 株の染色体上の *htrA* 構造遺伝子内に設定したプライマーで PCR を行った。次に、増幅 DNA 断片を精製した後、TA クローニングベクターである pCR2.1-TOPO に挿入し、さらに *E.coli* XL1-Blue へ形質転換することにより pTOPO-htrA を得た。一方、pBE31 よりエリスロマイシン（Em）耐性遺伝子を PCR クローニングし、pACΩGm より PCR クローニングしたΩフラグメントとライゲーションし、$\Omega \mathrm{Em}^{r}\Omega$ カセットを得た。その後、pTOPO-htrA を制限酵素 *Pac* I にて切断後、$\Omega \mathrm{Em}^{r}\Omega$ カセットを挿入し、pHtrAE$\mathrm{m}^{r}\Omega$ を得た。この pHtrAE$\mathrm{m}^{r}\Omega$ を、*S. mutans* UA159 株の染色体上の *htrA* 遺伝子との間で相同組み替えを起こさせることにより、Em^{r} 遺伝子挿入型の *htrA* 遺伝子変異株を作製した。相同組み替えの確認は、変異株のゲノム DNA を精製した後、PCR を行った。さらに、この PCR 断片を用いてサイクルシークエンスを行い、塩基配列を解析することにより、相同組み替えを確認した。

このようにして作製した、*htrA* 変異株及びスクロースエンザイム II(*scrA*)遺伝子の役割を解析することにした。*scrA* 遺伝子変異株の培養上清中における非水溶性及び水溶性グルカンの産生量は、高濃度スクロース存在下で親株よりも有意に少なく、象牙質板に付着した非水溶性グルカン産生量も、親株より有意に少なかった。このことから、*scrA* 遺伝子を欠損させることにより、スクロースの代謝経路が部分的に遮断されたことが考えられる。また、*htrA* 遺伝子変異株においてもグルカンの産生量は低下していることが明らかになった。これらの結果より、*scrA* 遺伝子及び *htrA* 遺伝子がバイオフィルム形成に重要な役割を担っているということを示唆していると思われる。この結果は、24 穴プレートにて *comC*、*comD*、*comE*、*comX* 遺伝子改変株を用いてバイオフィルムを形成させると、バイオフィルムの形成量が低下し、構造も不完全であったとの過去の報告に通じるものがあると考えられる。これらの結果より、バイオフィルム形成を阻害する治療法を確立する上でこれらの遺伝子を阻害することが非常に重要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１件）

①鹿山鎭男、三宅洋一郎　緑膿菌の抗菌薬抵抗性に影響を与える因子について　四国歯誌　21(2)　421-422　2009　査読あり

〔学会発表〕（計１件）

①木村智子、尾崎和美、鹿山鎭男、藤坂菊美、湯本浩通、三宅洋一郎　*Streptococcus mutans* の病原性におけるスクロース輸送系遺伝子の役割について　第 81 回日本細菌学会総会　平成 20 年 3 月 26 日　京都

６．研究組織

(1)研究代表者

鹿山　鎭男（KAYAMA　SHIZUO）
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・助教
研究者番号：50432761