

平成30年6月21日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K15756

研究課題名(和文) 齲蝕原因菌のグローバルレギュレーションシステムに関する新規遺伝子制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of novel gene regulation mechanism involved in the global regulation system of cariogenic bacterium

研究代表者

香西 克之 (KOZAI, KATSUYUKI)

広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・教授

研究者番号：10178212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ミュータンス菌(う蝕原因菌、以下SM)の環境適応に関してglobal gene regulationを介した遺伝子制御に加え、デグラドゾームと呼ばれるmultiprotein complexの形成やsmall RNAsの関与について検討した。

一方、global gene regulatorの探索に際し、SMの歯垢形成と増殖を阻害するオレアノール酸による環境ストレス下での遺伝子発現の変化を検討した。Global response regulatorのcovRを含め、歯垢形成やquorum sensingに係わる遺伝子発現に変化を認め、遺伝子発現による環境適応力とSM伝播力との関連を示唆した。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus mutans(SM), cariogenic bacterium, develops biofilm and adapts itself to various environmental stresses in the biofilm. There is possibility that SM is controlled by global gene regulation, formation of multiprotein complex called degradosome and small RNA as the method. We performed Pull down assays which were used by each construction, but the necessity of the further examination became clear. On the other hand, for the search of global gene regulator, we examined the formation of cell body outside many sugar of the SM and the increase and decrease of the onset of gene expression under the environmental stress by triterpenoid compounds as anti-cariogenic agents. Including covR of Global response regulator, a change was accepted in the gene which affected formation of exopolysaccharide and quorum sensing. A tendency to reduction of the gene expression to be concerned with formation of exopolysaccharide and acid-resistant was related with MS transmission.

研究分野：小児歯科学

キーワード：ミュータンス菌 デグラドゾーム 環境適応 伝播

1. 研究開始当初の背景

齲蝕は歯科における2大感染症の1つで、特に Early Childhood Caries の場合、治療への協力も得られず、患児、術者双方にとって大きな労力を必要とする。その発症機序の解明並びに予防方法の確立は重大事項であると考えられる。

Streptococcus mutans は齲蝕発症に係る主たる原因細菌であるが、菌体内酵素の glucosyltransferase によりショ糖を基質として粘着性の不溶性グルカンを形成する。さらに多種類の菌とともに、歯面に形成したバイオフィーム内で深在性に生息し、自らの代謝産物である酸により歯面を脱灰、齲蝕の進行に関与する。バイオフィーム内は生育密度の高い閉鎖的な状態となっており、acid-stress, oxidative-stress などを含む環境ストレスへの適応が必要となる。この環境適応には signal transduction, carbon catabolite repression, quorum-sensing などを含む global gene regulation が関与すると考えられる。

Escherichia coli (以下 *E. coli*) では、環境適応における global regulatory system 並びに関連 regulatory gene の解明が進んでいる。一方、遺伝子発現レベルは DNA から mRNA への転写の効率、mRNA の安定性、mRNA からタンパク質への翻訳の頻度の3因子によって決定されると言われてきたが、*E. coli* においては、4つの酵素、endoribonuclease (RNase E), polynucleotide phosphorylase (PNPase), DEAD box helicase (RhlB), enolase が degradosome と呼ばれる multi-protein complex やアミノ酸をコードせず、自身で機能をもつ低分子非翻訳型非翻訳型 small RNA (sRNA) が mRNA のプロセッシング、分解、成熟に働き、細菌の環境変化適応への関与が示唆されている。(図1)

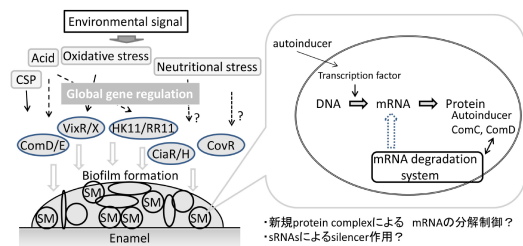


図1 バイオフィーム中での遺伝子制御システム

degradosome は *E. coli* をはじめ、いくつかの細菌において発現が確認されているが、*E. coli* ではストレス存在下で RNase E の活性が阻害されることにより、mRNA の安定化が促進し、ストレスで誘導されるタンパク質の合成が制御されることが確認されている。低分子非翻訳型 small RNA (sRNA) は、標的 mRNA と塩基対を形成することにより転写後の遺伝子発現制御に重要な役割を担っていることが明らかとなり、ゲノム情報に基づくスクリーニングから、各種細菌におい

て多くの sRNA が同定され、これら sRNA が細菌のストレス応答、クオラムセンシングや病原性の調節に関与していることが報告されている。

2. 研究の目的

Streptococcus mutans の環境適応には、遺伝子発現レベルでの広範囲な制御が行われていると考えられるが、その方法として global gene regulation を介した遺伝子制御に加え、degradosome と呼ばれる multiprotein complex の形成や small RNAs などによる制御が行われている可能性がある。これらの関与について明らかにすることを目的とした。関与がある場合、齲蝕発症メカニズム解明の一旦を担うとともにこれらをターゲットとした予防、治療への基礎的研究となることが期待できる。具体的には以下の2点について明らかにする。

- 1) *Streptococcus mutans* において degradosome 形成、その役割として mRNA 安定性への関与を明らかにする。
- 2) *Streptococcus mutans* における global gene regulator の探索並びにシステムの機序の解明を行う。その際、過去に研究代表者の Kozai らが発見した、*Streptococcus mutans* の抗酵素作用、抗 glucosyltransferase 活性を示す Oleanolic Acid および Ursolic Acid を用いる。

本研究の特色と臨床的意義は以下に集約される。細菌が環境適応するためには様々な遺伝子発現レベル、タンパクレベルの変更がなされるが、global regulation としてシステムティックな制御とともに mRNA の安定性との2方向から明らかにすることに特徴があり、新しい治療への応用や齲蝕処置・齲蝕予防のための一助となることで貢献できると考える

3. 研究の方法

本研究では SM が環境ストレス中に生息するために行っているタンパク質発現調整に関し、global gene regulation による制御ならびにタンパク合成量の変化に関連する mRNA の安定性の2つの方向からの探索を目指した実験計画を作成した。global gene regulation による制御に関しては、すでに明らかになっている遺伝子に対する promotor 領域の解析並びに新たな制御遺伝子の探索を行った。mRNA の安定性の変化に関しては、*E. coli* などで明らかにされている multi-protein complex による制御についてその存在ならびに制御機構について、並びに多くの細菌で明らかになっている sRNAs に関しては RNA の網羅的解析を行うことでターゲットとなる sRNA を探索し、制御機構についての解明を行った。

1) *Streptococcus mutans* における degradosome 形成

Streptococcus mutans 標準株 UA159 を用い、gene bank のシーケンスを基にプライマーを設計、enolase の全長を PCR にて cloning を行った。Genetic analyzer にてシーケンスの確認を行った後に、タンパク発現用のプラスミドヘインサートし、再度正しく組み替えられていることを Genetic analyzer にて、シーケンスの確認を行い、正しくコンストラクトが作成されたことを確認した。他のターゲット遺伝子についても同様の手順にてコンストラクトの作成を行った。それぞれの遺伝子についてタンパク発現させた後ウェスタンブロットにて正しいサイズのタンパクが発現したことを確認した。それぞれのタンパクを基に pull down assay をを行い、degradosome 構成タンパクの探索を行った。

2) *Streptococcus mutans* における global gene regulator の探索

triterpenoid compounds は global gene regulation を介した遺伝制御における global gene regulator の探索に際し、*Streptococcus mutans* の菌体外多糖の形成ならびに細菌増殖を抑制することで齲蝕抑制が期待されている。triterpenoid compounds による環境ストレス下での遺伝子発現の増減について検討を行なうため、UA159 を用いて増殖抑制への影響、並びに関連が疑われる遺伝子について RNA の発現への影響について検討した。増殖抑制は microtiter plate dilution assay を行い、BHI broth に triterpenoid compounds のうち Oleanolic acid、Ursolic acid を加え、1時間毎に OD をチェックした。triterpenoid compounds による環境ストレス下での遺伝子発現については、Oleanolic acid あるいは Ursolic acid を加えて増殖させた *Streptococcus mutans* から total RNA を抽出し、real-time PCR にて増減を調べた。

他の環境ストレスとして酸性環境下での適応について、小児とその家族の口腔内より分離された *Streptococcus mutans* 臨床株を用いて、遺伝子の発現変化について検討を行った。得られた臨床株については数種の制限酵素を用いたフィンガープリント法を用いて各個人が口腔内に保有する菌株の homology をデンシトメトリックに決定し、保護者から子どもへの伝播の有無について確認し、伝播した株を伝播菌群、伝播していない株を非伝播菌群とした。それぞれの株を pH7.0、pH5.5 に調整した BHI broth で増殖させたのち、菌を回収し、total RNA を抽出した。ターゲットとした遺伝子について real-time PCR 法にて遺伝子の増減を確認した。

4. 研究成果

1) *Streptococcus mutans* における degradosome 形成

E. coli では degradosome 構成タンパクの 1 つである enolase 並びに scaffold となると考え作成したそれぞれのコンストラクトについては問題なく作成ができたが、pull down assay では新たな複合体となるべくタンパク質の確認はできなかった。このため、この系についてはさらなる検討が必要であることが示唆された。

2) *Streptococcus mutans* における global gene regulator の探索

triterpenoid compounds による環境ストレス下での遺伝子発現の増減について検討を行うため、Oleanolic acid、Ursolic acid の MIC をそれぞれ求めた。MIC 濃度で UA159 を増殖させ、total RNA を抽出し、ターゲット遺伝子について real-time PCR を行った。その結果、Global response regulator の covR を含め、菌体外多糖形成や quorum sensing に係わる遺伝子に発現に変化が認められた (図 2)。

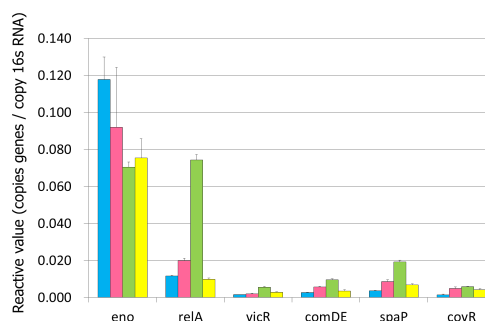


図 2 Effects of OA and UA on RNA expression

また、小児とその家族の口腔内より分離した臨床株を用いて、酸性状態と、酸性ストレス下での遺伝子変化について検討を行った。非伝播 *SM* は伝播 *SM* に比べ、菌体外多糖形成や耐酸性に係わる遺伝子発現量の低減傾向が認められた。

以上のことからこれらの遺伝子発現による環境適応力と伝播との関連性が示唆された。さらに、本研究は生息環境の変化に伴い変化する細菌内タンパク質発現に関して、global な遺伝子制御に基づき発現調整がなされている可能性、並びに multi-protein complex や sRNAs による mRNA の安定性の変化を介したタンパク合成に関わる制御との両方向から研究を進めることが特徴的であり、この手法により *Streptococcus mutans* の環境適応に関する機序の解明の一端を担い、さらにこれをターゲットした基礎的研究を分子レベルでの齲蝕予防システムへと発展させることが期待できる。今後の発展的課題としては、

Degradosome 構成タンパク質の enolase や RNase を軸に *Streptococcus mutans* での

複合体を形成するタンパク質の探索を行う系をさらに進め、Degradosome の形成が実際に行われているか確認する。

Streptococcus mutans を本研究でのストレス環境下以外の条件で培養することによって他のターゲット遺伝子の発現や関連を調べ環境適応に対する細菌内調節機序の全容を明らかにする。

global gene regulator の探索については、広く次世代シーケンサーを用いて RNA-seq を行うことにより非コード RNA などの新規転写産物と既知遺伝子を含めて、網羅的にクリプトーム分析を行い、転写制御に関わる sRNA の探索を行う、ことが期待できる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

C. Mitsuata, N. Kado, Mega M. Puteri, Y. Iwamoto, N. Tatsukawa and K. Kozai: Characteristics in gene expression affecting transmission of *Streptococcus mutans*. 26th Congress of International Association of Pediatric Dentistry, Santiago(Chile), Oct.4-7, 2017. (国際学会)

C.Mitsuata, N.Tatsukawa, Y.Ohara, Y.Iwamoto, K.Kozai: Analysis of effectiveness of triterpenoid compounds for prevention of dental caries. The 25th Congress of International Association of Paediatric Dentistry, Glasgow(UK) July 3-5, 2015, (国際学会)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

香西 克之 (KOZAI, Katsuyuki)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・教授

研究者番号：10178212

(2)研究分担者

光畑 智恵子 (MITSUHATA, Chieko)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究科・准教授

研究者番号：10335664

(3)連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者

()