

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03897

研究課題名(和文) 膜タンパクをターゲットとした新たな口腔バイオフィーム制御法の確立

研究課題名(英文) Establishment of new oral biofilm formation control system targeting membrane proteins

研究代表者

仲野 道代(松本道代)(Nakano, Michiyo)

岡山大学・医歯薬学域・教授

研究者番号：30359848

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,430,000円

研究成果の概要(和文)：Streptococcus mutans は、菌体表層に発現する病原性の高いタンパクにより口腔内のバイオフィームを形成する。ABC膜輸送体は、必要な栄養素の取り込み、不要な物質の侵入阻害と排出などの機能を発揮し、強固なバイオフィームを形成し続けることを可能にしている。本研究では、S. mutans のABC膜輸送体のバイオフィーム形成に関与することを明らかにするために、ABC膜輸送体をコードするSMU\_1519 およびSMU\_1521の機能解析を行った。その結果、このABC膜輸送体は、亜鉛の細胞膜輸送に関連する遺伝子であり、さらにバイオフィーム形成にも関与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Streptococcus mutans の保有するABC膜輸送体はクオラムセンシングの主要タンパクである膜タンパクの一つであり、菌の生存に必要な物質の輸送だけでなく、バイオフィーム形成能に関与する可能性が示唆されている。クオラムセンシングによってバイオフィーム形成は制御されているため、ABC膜輸送体の機能を明らかにすることはバイオフィーム形成制御メカニズムの解明につながる可能性が高い。本研究で同定したABC膜輸送体は亜鉛の輸送体として機能し、バイオフィーム形成に関与していた。この結果は、バイオフィーム形成を抑制物質を開発する上で、ABC膜輸送体が新たなターゲットとなる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus mutans, reported to be associated with dental caries induction, also forms biofilm. ATP-binding cassette (ABC) transporters exist in cell membranes, and function to export and import molecules. In the present study, functional analyses of the SMU1519 gene, predicted to be a zinc transporter, regarding its relationship to biofilm formation by S. mutans were performed. S. mutans MT8148 (serotype c) and an isogenic mutant strain with inactivation of the SMU1519 gene, termed SMU1519, were used. The growth rate of SMU1519 was slightly lower than that of MT8148, though in the presence of ZnSO<sub>4</sub>, there was no difference between them. Furthermore, while the biomass of biofilms formed by SMU1519 was significantly lower than that of MT8148 biofilms, the difference between them was even greater in the presence of ZnSO<sub>4</sub>. These results suggest that SMU1519 contributes to zinc transport by S. mutans, which is related to biofilm formation by the organism.

研究分野：小児歯科学

キーワード：Streptococcus mutans バイオフィーム 膜タンパク ABC膜輸送体

## 1. 研究開始当初の背景

歯科領域の二大疾患である齲蝕と歯周病は、口腔における「バイオフィーム感染症」と考えられている。バイオフィームを形成する細菌は高い抗菌物質耐性機構を獲得しており、バイオフィームが簡単には除去できない要因となっている。現状では機械的清掃のみがバイオフィーム除去の有効な手段となっている。しかし、それだけではバイオフィームの完全な除去および再形成の抑制は困難であり、機械的清掃に加えて「局所に有効な薬剤を適用する」ことで根本療法の構築につなげたいと考えてきた。バイオフィーム形成は、細胞-細胞間情報伝達機構であるクオラムセンシングにより制御されており、必要な栄養素を取り込み不要な物質を排出する役割を持つ膜タンパクが関与しているがその詳細は不明である。バイオフィームの形成は、クオラムセンシングといわれるシステムによって制御されている。クオラムセンシングは、細菌に広く存在する細胞-細胞間情報伝達機構である。このメカニズムは、細菌が自身と他菌種の生息密度を感知して物質の産生をコントロールし、バイオフィーム中での生存や増殖が有利になるように利用していると考えられている。この働きにより、集合体としてのバイオフィームの病原性が高まっていくと同時に、多種多様な環境変化にも対応できるようになる。古いプラークほど強固な付着と高い病原性、薬剤などの耐性を持つようになり、齲蝕や歯周病をはじめとする様々な疾患を増悪化させる。このことから、クオラムセンシングのシステムを破壊することができれば、バイオフィーム形成抑制の方法も変えることが可能になると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、バイオフィーム形成に関与するクオラムセンシングにおける膜タンパク機能を追究し、新たなバイオフィームの制御法の開発につなげることである。そのため、本研究では、バイオフィーム形成における主要な膜タンパクを同定し、その機能解析を行った。

## 3. 研究の方法

- (1) 欠失変異株の作製：*S. mutans* UA159 株のデータベースから、バイオフィーム形成に関連すると推定される ABC 膜輸送体をコードする *SMU\_1519* および *SMU\_1521* を抽出した。それぞれの遺伝子の上流および下流領域、スペクチノマイシンまたはカナマイシン耐性カセット断片を PCR にて増幅した。オーバーラップ PCR で 3 つの DNA 断片を連結させ、精製した。PCR 産物を MT8148 株に形質転換することにより *SMU\_1519* 欠失変異株 (1519 株) および *SMU\_1521* 欠失変異株 (1521 株) を作製し、実験に供試した。
- (2) 増殖能の検討  
培養した供試菌を硫酸亜鉛七水和物を 0~1 mM 添加した Todd Hewitt (TH) 液体培地に播種し、波長 550 nm の吸光度を 1 時間毎に経時的に測定した。吸光度が 0.2 から 0.6 までの対数増殖期において波長 550 nm の値が 2 倍になる時間をダブリングタイムとし、算出した。
- (3) 遺伝子発現量の解析  
MT8148 株に硫酸亜鉛七水和物を添加または非添加し、対数増殖期まで培養した後、全 RNA 抽出を行った。DNase 処理後、cDNA 合成を行い、*SMU\_1519* および *SMU\_1521* 特異的プライマーを用いて、各遺伝子の発現を Real-time RT-PCR 法を用いて確認した。
- (4) 硫酸亜鉛七水和物存在下における細胞生存率  
MT8148 株、1519 株および 1521 株を 37 °C で 18 時間培養後、遠心分離を行い菌体を回収した。0~250 μM の硫酸亜鉛七水和物を添加した 1% スクロース含有化学合成培地で菌体を懸濁し、吸光度 600 nm が 0.02 となるよう調整した。次いで、25% ヒト唾液でコーティングしたチャンバースライドに調整した菌液を分注し、嫌気条件下で 18 時間、37 °C で培養した。Hank 平衡塩類溶液 (HBSS) で洗浄を行った後、LIVE/DEAD® Bac Light™ Bacterial Viability Kit を使用して、生細胞を SYTO9®、死細胞を Propidium iodide で染色し、遮光で 15 分静置した。HBSS で洗浄を行い、4% グルタルアルデヒドで固定した後、蛍光顕微鏡で観察し、Image J にて生存率を解析した。
- (5) 蛍光プローブを使用した細胞膜流動性の解析

対数増殖期初期まで培養した供試菌を遠心分離し、塩化ナトリウムリン酸緩衝液にて吸光度 600 nm が 0.2 になるように調整した。蛍光プローブ N-Phenyl-2-naphthylamine を添加し、遮光して 30 分反応させた。その後、上清を取り除き 2 回洗浄し、96 穴蛍光測定用プレートに分注し、蛍光偏光度を励起光 355 nm/ 蛍光 460 nm で測定した。

#### (6) バイオフィーム形成量の検討

培養した供試菌液を 0.5%スクロース添加した TH 液体培地に播種し、96 穴細胞培養用マイクロテストプレートの各ウェルに分注し、37 °C で 2 日間嫌氣的に培養した。1%クリスタルバイオレット溶液にて染色を行い、波長 570 nm の吸光度を測定した。

#### 4. 研究成果

TH 液体培地中における硫酸亜鉛七水和物を添加した場合には、MT8148 株と比較して 1519 株の増殖速度は遅延していた。硫酸亜鉛七水和物を添加した場合には、SMU\_1519 および SMU\_1521 の遺伝子発現量は有意に上昇した。また、硫酸亜鉛七水和物存在下における生存率は、MT8148 株は硫酸亜鉛七水和物の濃度に関わらず一定であった。一方、1519 株および 1521 株は、硫酸亜鉛七水和物の濃度依存的に低下した。以上の結果より、SMU\_1519 および SMU\_1521 がコードする ABC 膜輸送体は、亜鉛の細胞膜輸送に関連する遺伝子であることが示された。また、硫酸亜鉛七水和物の濃度依存的に 1519 株および 1521 株の生存率が低下したことから、SMU\_1519 および SMU\_1521 は亜鉛の排出に関与することが示唆された。蛍光プローブによる細胞膜の流動性は、MT8148 株と比較して 1519 株では有意に低かった。また、MT8148 株と比較して 1519 株の TH 液体培地中における増殖速度は遅延しており、分裂速度を表すダブリングタイムは延長していた。さらに、バイオフィーム形成量は、MT8148 株と比較して 1519 株において有意に低下した。以上の結果より、SMU\_1519 および SMU\_1521 がコードする ABC 膜輸送体は、亜鉛の細胞膜輸送に関連する遺伝子であることが示された。また、細菌の分裂に関与している可能性が考えられる。さらに、バイオフィームの形成にも関与していることが示唆されたことから、ABC 膜輸送体は、細胞膜輸送のみならずバイオフィームの形成にも関与していることが明らかとなった。このことは、ABC 膜輸送体をターゲットとしたバイオフィーム形成抑制を目指す創薬の開発の一助になると考えられる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Taro Misaki, Shuhei Naka, Hitoshi Suzuki, Mingfeng Lee, Ryosuke Aoki 4, Yasuyuki Nagasawa 5, Daiki Matsuoka, Seigo Ito, Ryota Nomura, Michiyo Matsumoto-Nakano, Yusuke Suzuki, Kazuhiko Nakano	4. 巻 18
2. 論文標題 cnm-positive Streptococcus mutans is associated with galactose-deficient IgA in patients with IgA nephropathy.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0282367
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0282367.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sho Yoshida, Hiroaki Inaba, Ryota Nomura, Kazuhiko Nakano, Michiyo Matsumoto-Nakano	4. 巻 64
2. 論文標題 Green tea catechins inhibit Porphyromonas gulae LPS-induced inflammatory responses in human gingival epithelial cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Sciences	6. 最初と最後の頁 352-358
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2022.05.006.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shuhei Naka, Daiki Matsuoka, Kana Goto, Taro Misaki, Yasuyuki Nagasawa, Seigo Ito, Ryota Nomura, Kazuhiko Nakano, Michiyo Matsumoto-Nakano	4. 巻 12
2. 論文標題 Cnm of Streptococcus mutans is important for cell surface structure and membrane permeability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 994014
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2022.994014.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida S, Inaba H, Nomura R, Murakami M, Yasuda H, Nakano K, Matsumoto-Nakano M	4. 巻 13
2. 論文標題 Efficacy of FimA antibody and clindamycin in silkworm larvae stimulated with Porphyromonas gulae.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Microbiology	6. 最初と最後の頁 1914499
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/20002297.2021.1914499.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nomura R, Ohata J, Otsugu M, Okawa R, Naka S, Matsumoto-Nakano M, Nakano K.	4. 巻 124
2. 論文標題 Inhibitory effects of flavedo, albedo, fruits, and leaves of Citrus unshiu extracts on Streptococcus mutans.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 105056
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2021.105056.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Morikawa Yuko, Morimoto Setsuyo, Yoshida Eri, Naka Shuhei, Inaba Hiroaki, Matsumoto-Nakano Michiyo	4. 巻 12
2. 論文標題 Identification and functional analysis of glutamine transporter in Streptococcus mutans	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Microbiology	6. 最初と最後の頁 1797320 ~ 1797320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/20002297.2020.1797320	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Urmi Alam Saki, Inaba Hiroaki, Nomura Ryota, Yoshida Sho, Ohara Naoya, Asai Fumitoshi, Nakano Kazuhiko, Matsumoto Nakano Michiyo	4. 巻 -
2. 論文標題 Roles of Porphyromonas gulae proteases in bacterial and host cell biology	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cellular Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cmi.13312	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inaba Hiroaki, Yoshida Sho, Nomura Ryota, Kato Yukio, Asai Fumitoshi, Nakano Kazuhiko, Matsumoto Nakano Michiyo	4. 巻 22
2. 論文標題 Porphyromonas gulae lipopolysaccharide elicits inflammatory responses through toll like receptor 2 and 4 in human gingivalis epithelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cmi.13254	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Lapirattanakul Jinthana, Nomura Ryota, Okawa Rena, Morimoto Setsuyo, Tantivitayakul Pornpen, Maudcheingka Thaniya, Nakano Kazuhiko, Matsumoto-Nakano Michiyo	4. 巻 54
2. 論文標題 Oral Lactobacilli Related to Caries Status of Children with Primary Dentition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Caries Research	6. 最初と最後の頁 194 ~ 204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1159/000506468	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Inaba Hiroaki, Yoshida Sho, Nomura Ryota, Kato Yukio, Asai Fumitoshi, Nakano Kazuhiko, Matsumoto Nakano Michiyo	4. 巻 22
2. 論文標題 Porphyromonas gulae lipopolysaccharide elicits inflammatory responses through toll like receptor 2 and 4 in human gingivalis epithelial cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cellular Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cmi.13254	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 後藤 花奈, 仲野 道代
2. 発表標題 亜鉛の細胞膜輸送に関連するABCトランスポーターの機能解析
3. 学会等名 第60回日本小児歯科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 後藤 花奈, 仲野 道代
2. 発表標題 Streptococcus mutansのバイオフィーム形成におけるABC膜輸送体の機能解析
3. 学会等名 第59回日本小児歯科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後藤 花奈, 仲野 道代
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第 40 回日本小児小児歯科学会中四国地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 K. Goto, M. Matsumoto-Nakano
2. 発表標題 Role of ABC transporter in biofilm formation by Streptococcus mutans
3. 学会等名 69th JADR (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 後藤 花奈, 仲野 道代
2. 発表標題 Streptococcus mutans のバイオフィルム形成における ABC 膜輸送体の機能解析
3. 学会等名 第 59 回日本小児歯科学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Goto K, Matsumoto-Nakano M
2. 発表標題 ABC transporter activities in biofilm formation by Streptococcus mutans
3. 学会等名 68th Annual Meeting of JADR (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田衣里、松三友紀、森川優子、仲 周平、高島 由紀子、仲野道代
2. 発表標題 Streptococcus mutans におけるDnaKの表層タンパク発現への影響と役割
3. 学会等名 第58回日本小児歯科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Alam Urmi Saki, 稲葉 裕明, 吉田 翔, 野村 良太, 仲野 和彦, 仲野 道代
2. 発表標題 The role of Porohyromonas gulae protease on bacterial growth and hemagglutination
3. 学会等名 第58回日本小児歯科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Asaumi H, Goto K, Matsumoto-Nakano M
2. 発表標題 Inhibitory effect of cyclodextran on glucosyltransferase B in Streptococcus mutans.
3. 学会等名 68th Annual Meeting of JADR (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	仲 周平  (Naka Shuhei)  (10589774)	岡山大学・大学病院・講師    (15301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	稲葉 裕明  (Inaba Hiroaki)  (70359850)	岡山大学・医歯薬学域・准教授     (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関