

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24年 5月14日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592653

研究課題名（和文） 口腔連鎖球菌の二成分制御系による薬剤排出機構の解明

研究課題名（英文） Mechanisms of drug efflux by two-component control system in oral Streptococci

研究代表者

塩田 進（SHIOTA SUSUMU）

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：00150467

研究成果の概要（和文）：齲蝕に関係している口腔連鎖球菌の *Streptococcus mutans* は抗菌剤のバシトラシンに耐性である。この耐性遺伝子を制御している二成分制御系の発現機構をレスポンスレギュレーターの変異株を用いて検討した。その結果、外界の刺激を検知したセンサーキナーゼにより、54番目のアスパラギン酸がリン酸化されたレスポンスレギュレーターが排出ポンプと考えられるトランスポーター遺伝子のプロモーター領域に特異的に結合し、発現を促進する事が明らかになった。

研究成果の概要（英文）： *Streptococcus mutans*, a major etiological agent of dental caries, is resistant to bacitracin. We studied the mechanisms of two-component signal transduction system (TCS) that controlled the expression of the bacitracin resistant operon. As a result, under the bacitracin stimulation the response regulator of TCS specifically bind to a putative promoter region of ABC transporter genes, then accelerate the expression of these genes. The mutant that substituted asparagine for aspartic acid at position 54 could not bind to a putative promoter and also shows the susceptibility to bacitracin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：細菌・シグナル伝達・発現制御

1. 研究開始当初の背景

細菌感染症の治療において重要な問題点の1つは薬剤に対する耐性機構であり、そのメカニズムを理解する事は正しい治療を行う上でも重要なポイントとなる。この耐性機構の1つにABCトランスポータ

ーによる細胞外への汲み出しがあり、これは複数の基質に働き多剤耐性を付与する原因にもなる事が知られている。

また細菌にはセンサーキナーゼとレスポンスレギュレーターからなる二成分制御系があり、様々な外

界の刺激を感知し、その支配下にある遺伝子(群)の発現をコントロールする事で環境に適応する事が知られている。近年、グラム陰性菌では薬剤排出トランスポーターがこの二成分制御系によってその発現を制御され、多剤耐性を示す事が明らかにされつつあるが、連鎖球菌などグラム陽性菌ではまだその研究は始まったばかりである。

2. 研究の目的

過去に申請者の研究室において同定された *S. mutans* のバシトリン耐性に関する遺伝子は、その塩基配列から ABC トランスポーターと二成分制御系の遺伝子である事が予想される。そこで本研究では遺伝子上から予想されるバシトリン耐性機構を分子レベルで明らかにする。それは、バシトリン刺激に始まり、排出タンパク質の誘導産生への情報伝達経路の流れを確認することである。

また排出ポンプによる薬剤耐性はしばしば多剤耐性を示す。そこで本研究で明らかにされる耐性機構が多剤耐性を示すかも他の薬剤や消毒剤を用いて確認する。

3. 研究の方法

(1) ABC トランスポーターおよび二成分制御系遺伝子の欠損変異株の作成。それぞれの遺伝子の一部をエリスロマイシン耐性遺伝子のカセットと置き換えた DNA 断片を作製し、相同組み換えによって染色体上の正常遺伝子と置き換わった変異株を得る。

(2) リアルタイム PCR による遺伝子の発現測定。作製したそれぞれの欠損株と野生株のバシトリン暴露による ABC トランスポーター遺伝子の発現の変化を mRNA の量的変化としてリアルタイム PCR で比較する。

(3) センサーキナーゼ (SK) とレスポンスレギュレーター (RR) 遺伝子のクローニングと発現。データベースから SK あるいは RR のプライマーを設計し、野生株の染色体 DNA を鋳型とした PCR 反応でそれぞれの遺伝子を含む DNA 断片を得る。これを His タグを有する発現ベクターに繋ぎ、His タグ融合タンパクとして大腸菌内

で大量発現させ、ニッケルカラムによるアフィニティークロマトグラフィーで精製する。

(4) ゲルシフトアッセイによる RR と ABC トランスポーター遺伝子のプロモーター領域との結合。データベースから ABC トランスポーター遺伝子のプロモーター領域を含む DNA 断片を PCR で増幅し、DIG でラベルしたプローブとして準備する。精製 RR とプローブの結合をポリアクリルアミド電気泳動で移動度の差として検出する。また RR のアミノ酸置換変異体を作製し、プロモーターとの結合に重要な部位を同定する。

4. 研究成果

(1) 二成分制御系 (SK, RR) および ABC トランスポーター遺伝子の欠損変異株のバシトリン感受性は野生株に比べて亢進していた。また SK の欠損株を用いてバシトリン暴露後の ABC トランスポーター遺伝子の発現をリアルタイム PCR で検討した。その結果、野生株では薬剤暴露後 ABC トランスポーター遺伝子は、転写レベルで 100 倍以上に上昇するのに比べ、SK 欠損株では全く変化が見られなかった。このトランスポーター遺伝子は二成分制御系によりその発現をコントロールされている事が明らかになった。

(2) クローン化した SK および RR 遺伝子が大腸菌内で発現させ、His タグを利用してタンパク質の精製を試みた。SK タンパク質はインクルージョンボディを形成したが、RR タンパク質は可溶性のタンパクとして得られた。

この精製 RR を用いて RR と ABC トランスポーター遺伝子のプロモーター領域の相互作用をゲルシフトアッセイ法で検討した。その結果、RR はプロモーター領域を含む DNA に特異的に結合することが示された。

(3) 次に RR がプロモーターに結合するために必要なアミノ酸の同定を試みた。いくつかの他の細菌において RR の結合にはアミノ末端領域にある保存されたアスパラギン酸のリン酸化が必須であることが知られている。本研究における

S. mutans では 54 番目のアスパラギン酸が候補となり得る。そこで PCR 法でこのアスパラギン酸をアスパラギンに置換した変異 RR(D54N) 遺伝子を作製し、大腸菌内で発現後、精製した。この変異 RR(D54N) タンパク質は野生型 RR のようにプロモーター領域には結合できないことがゲルシフトアッセイで確認された。

従って、外界のバシトラシンを感知した SK によって RR の 54 番目のアスパラギン酸がリン酸化され (P-RR), その P-RR が ABC トランスポーターのプロモーターに結合し、排出ポンプとしての ABC トランスポーターの高発現を促し、バシトラシン耐性を示すものと考えられる。

(4) 以上は in vitro で得られた結果である。In vivo でも同様な現象が起こるかを染色体上に変異遺伝子 RR(D54N) を導入し、その変異株のバシトラシン感受性を調べることで検討した。下記の表に示すとおり RR 欠損株と同様に RR(D54N) 変異株は野生株に比較してバシトラシンに対する MIC が顕著に低下していることが明らかになった。

表 バシトラシンに対する MIC の比較

UA159: S. mutans 野生株 .
 KD1113: S. mutans RR 欠損株 .
 KD1108: S. mutans RR(D54N) .

Strain	MIC (U/ml)
UA159	4.0
KD1113	0.073
KD1108	0.084

(5) 今回解析した ABC トランスポーターは現在までに他の薬剤、消毒剤に対しては機能している結果は得られていない。バシトラシンに特異性を示している。しかしながら、この二成分制御系によって誘導される遺伝子をリアルタイム RT-PCR 法で検索した結果、機能未知の二つの単独遺伝子と一つのオペロンをデータベース上で同定した。これ

らの遺伝子のプロモーター領域には共通な配列が確認され、この二成分制御系によって転写制御を受けている可能性が示された。これらの機能未知の遺伝子の in vivo での役割に興味を持たれる。

ヒスチジン-アスパラギン酸リン酸化経路で作用する細菌の二成分制御系は、動物細胞には見いだされていない。従って、このシステム、特に外部環境の感知に働くセンサーキナーゼは新規の抗菌剤の標的として有望である。またその支配下にある ABC トランスポーターが複数の基質を認識すれば、多剤耐性菌に対する選択毒性の高い抗菌剤の開発に寄与できる可能性がある。

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 Norio Kitagawa, Susumu Shiota, Yukie Shibata, Toru Takeshita and Yoshihisa Yamashita
 Characterization of MbrC involved in bacitracin resistance in *Streptococcus mutans* FEMS Microbiol Lett 388(2011) 61-67. 査読あり

[学会発表] (計 2 件)

① 北河 憲夫. MbrC の 54 番目のアスパラギン酸が *Streptococcus mutans* のバシトラシン耐性に関与する。歯科基礎医学会. 2010.09.21. 東京.

② 北河 憲夫. *Streptococcus mutans* の二成分制御系によるバシトラシン耐性機構。歯科基礎医学会. 2009.09.10. 新潟.

[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◇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
塩田 進 (SHIOTA SUSUMU)

研究者番号：00150467

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
山下 善久 (YAMASHITA
YOSHIHISA)

研究者番号：20192403