

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 25 年 3 月 31 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890207

研究課題名（和文）

齶蝕細菌の環境情報伝達応答システムの網羅的解析

研究課題名（英文）

Global analysis of two-component signal transduction systems in *Streptococcus mutans*

研究代表者

谷口 誠 (TANIGUCHI MAKOTO)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：50611175

研究成果の概要（和文）：

齶蝕細菌(*Streptococcus mutans*)にとって口腔内は様々な環境ストレスが存在する過酷な環境である。細菌はTwo-component Systemと呼ばれる機構を用いて、環境変化を察知しそれに適応していると考えられているが、その詳細な機序は明らかにされていない。今回、*S. mutans* がもつすべての TCS の欠損株を作製し、歯磨剤に含まれる抗菌物質であるクロルヘキシジンへの抵抗性を調べたところ、14 菌株で抵抗性の減弱が認められた。

研究成果の概要（英文）：

Streptococcus mutans uses two-component signal transduction systems (TCSs) to monitor and respond to changes of various environmental conditions in human oral cavity. However, mechanisms of TCSs in stress tolerance have been still unknown. In this study, we identified 14 components of TCSs involved in resistance to chlorhexidine, a medicated component of tooth powder.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学

キーワード：Two-component system、*Streptococcus mutans*、リン酸化解析、環境適応

1. 研究開始当初の背景

口腔内は細菌にとって様々な環境ストレスが存在する過酷な環境である。ストレスには、酸やアルカリ、温度、浸透圧、飢餓、唾液や歯磨剤に含まれる抗菌物質、消毒薬等がある。このような過酷な環境の中で生存するために、細菌は環境変化を察知し、それに適応するように必要な遺伝子の発現を調節すると考えられており、この環境変化の察知と遺伝子の発現調節に関与すると報告されているのが Two-component システム(TCS)である。TCS はセンサーであるヒスチジンキナー

ゼ(HK)とそれに対応するレスポンスレギュレーター(RR)から構成され、細胞膜に存在する HK が環境ストレスを認識すると自己リン酸化し、そのリン酸基が RR に移行することによって RR が活性化し、様々な遺伝子の発現を調節すると考えられている(Stock, A.M. et al., *Annu Rev Biochem*, 69:183-215, 2000)。このような TCS が *S. mutans* では約 14 種類存在すると報告されている(Ajdic, D. et al., *Proc Natl Acad Sci*, 99:14434-9, 2002)が、HK のストレス認識機序や情報伝達経路など詳細なメカニズムはほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

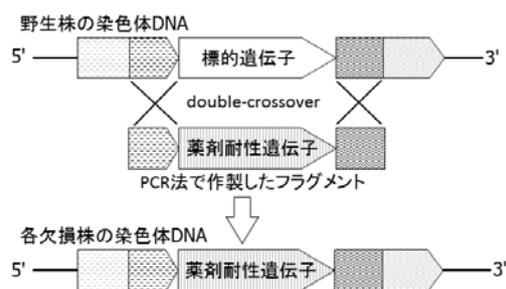
本研究の最終的な目的は、*S. mutans* の菌面への定着を阻止しより効果的な齲蝕予防策を見出すことである。そのために、本研究ではその菌面定着に重要な役割を果たす *S. mutans* の環境情報伝達応答経路の詳細を明らかにすることとした。

3. 研究の方法

S. mutans の環境情報伝達応答経路を解明するために、以下の項目を2カ年間に亘り行った。

(1) ヒスチジンキナーゼ (HK) 欠損株、レスポンスレギュレーター (RR) 欠損株の作製

S. mutans UA159 株が持つ 14 種類の TCS それぞれの HK および RR の欠損株を double-crossover 法にて作製した(図 1)。標的遺伝子上流および下流、ならびに標的遺伝子と置換する薬剤耐性遺伝子を PCR 法にて増幅した後、上流、薬剤耐性遺伝子、下流の遺伝子からなるフラグメントを PCR 法にて作製した。このフラグメントを野生株の培養液に加え形質転換に適した条件で培養し、抗生物質を添加した固形培地に蒔き、形質転換株を得た。得られた形質転換株からゲノム遺伝子を抽出し、上流および下流と薬剤耐性遺伝子を増幅する PCR プライマーを組み合わせて、PCR を行い、標的遺伝子が薬剤耐性遺伝子に置換されていることを確認した。



(図 1) Double-crossover 法による各遺伝子欠損株の作製

(2) 各 HK・RR 欠損株の形質変化(グルコン酸クロルヘキシジンへの抵抗性)の解析

野生株および各 HK・RR 欠損株の環境ストレスへの抵抗性を検討した。刺激する環境ストレスとして、齲蝕予防に発展させられると考えられるクロルヘキシジンについて行った。菌の培養液を寒天平板の一面に塗布し、寒天平板の中心にグルコン酸クロルヘキシ

ジン溶液を含ませた濾紙ディスクを配置した。37°Cで 24 時間後、形成された阻止円の直径から、各 HK・RR 欠損株のクロルヘキシジンへの抵抗性を評価した。

(3) 代表的な HK および RR の組換えタンパク質の精製

In vivo での各 HK および RR のリン酸基転移反応を検出するために、代表的な HK である CiaH、代表的な RR である CiaR、ComE、VicR、LiaR の組換えタンパク質を精製した。それぞれの遺伝子を発現ベクターにクローニングし、各タンパク質を発現する大腸菌を得た。それぞれを大量に培養した後、アフィニティカラムを用いてそれぞれの組換えタンパク質を精製し、SDS-PAGE にて確認した。

(4) リン酸化された HK・RR の検出条件の検討 (抗 CiaH 抗体、抗 CiaR 抗体の作製)

今後継続して行う HK および RR のリン酸化反応の検出のための条件検討として、代表的な TCS である CiaRH システムの HK (CiaH) と RR (CiaR) の抗体を作製することとした。(3) で得られた CiaH と CiaR の組換えタンパク質を抗原として利用し、ポリクローナル抗体を得た。

(5) *S. mutans* の菌体表層画分、細胞質画分抽出法の検討

菌体表層画分、細胞質画分抽出法の検討を検討するために、*S. mutans* の菌体をリゾチームとムタノリシンにて処理し、細胞壁を溶解したプロトプラストにした。菌体表層画分は Triton X-114 を用いた二相分離法より抽出した。細胞質画分は Na₂CO₃ 溶液に可溶化した画分を vivaspin にて脱塩・濃縮した。各画分に目的のタンパク質が含まれているかどうかを検出するために、(4) で得られた抗体を用いた Western Blot 法にて、野生株および CiaH 欠損株、CiaR 欠損株から菌体表層画分および細胞質画分を抽出し、各成分の検出を試みた。

4. 研究成果

(1) ヒスチジンキナーゼ (HK) 欠損株、レスポンスレギュレーター (RR) 欠損株の作製

Streptococcus mutans UA159 株に存在する全 14 種類の TCS 構成成分欠損株の作製に成功した(表 1)。そのうちの一つは過去に作製できないという報告がなされているもので、この欠損株が得られたことは TCS の網羅的解析の点で大きな意義を持つと考えている。

#	locus_tag	Gene ID	name	Function
0	Smu. 45	SMu0041		HK
1	Smu. 46	SMu0042		RR
2	Smu. 659	SMu0601	SpaR	RR
3	Smu. 660	SMu0602	SpaK	HK
4	Smu. 927	Smu0841	LlrF	RR
5	Smu. 928	Smu0842	KinF	HK
6	Smu. 1008	Smu0918	LlrG	RR
7	Smu. 1009	Smu0919	KinG	HK
8	Smu. 1037	Smu0946		HK
9	Smu. 1038	Smu0947		RR
10	Smu. 1128	Smu1031	CiaH	HK
11	Smu. 1129	Smu1032	CiaR	RR
12	Smu. 1145	Smu1047		HK
13	Smu. 1146	Smu1048		RR
14	Smu. 1814	Smu1652	ScnK	HK
15	Smu. 1815	Smu1653	ScnR	RR
16	Smu. 486	Smu0440	LiaS	HK
17	Smu. 487	Smu0441	LiaR	RR
18	Smu. 1547	Smu1406		RR
19	Smu. 1548	Smu1407		HK
20	Smu. 1964	Smu1782	LevR	RR
21	Smu. 1965	Smu1783	LevS	HK
22	Smu. 1916	Smu1740	ComD	HK
23	Smu. 1917	Smu1741	ComE	RR
24	Smu. 576	Smu0525	LytT	RR
25	Smu. 577	Smu0526	LytS	HK
26	Smu. 1516	Smu1378	VicK	HK
27	Smu. 1517	Smu1379	VicR	RR

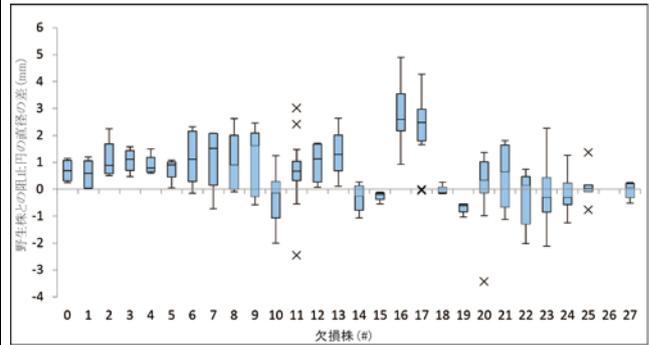
(表1 作製した TCS 構成成分欠損株)

(2)各 HK・RR 欠損株の形質変化グルコン酸クロルヘキシジンへの抵抗性の網羅的解析

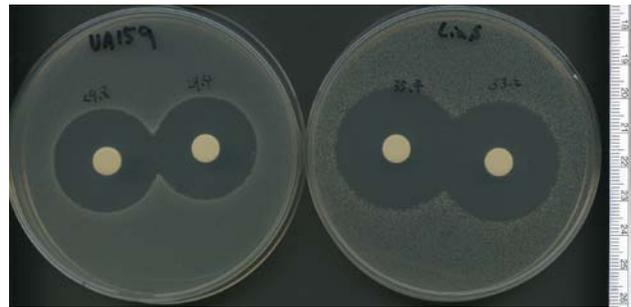
作製した各欠損株を用いてクロルヘキシジンに対する抵抗性を濾紙ディスク法により判定したところ、#0~#9、#12~#13、#16、17株で野生株より大きな阻止円が形成された。この結果はそれら欠損株でクロルヘキシジンへの抵抗性が減弱したことを示している(図2)。このうち、#16(LiaS 欠損株)(図3)および#17(LiaR 欠損株)はすでにクロルヘキシジンへの抵抗性への関与が報告されており、今回の網羅的解析でもそれが確認された(Suntharalingam, P. *et al.*, *J Bacteriol*, 191(9):2973-2984, 2009)。しかし、#16、#17を含めて TCS のクロルヘキシジン抵抗性に関する機序は未だ明らかにされておらず、今後より詳細な検討が必要である。

また、#10(CiaH 欠損株)、#11(CiaR 欠損株)、#20(LevR 欠損株)、#21(LevS 欠損株)、#22(ComD 欠損株)、#23(ComE 欠損株)、#24(LytT 欠損株)はクロルヘキシジンへの抵抗性が野生株と比較して増強と減弱の両方の性質を示した(図2)。このように性質が大きく変動した原因は現在のところ不明であ

る。TCS の構成成分を欠損させると、その欠損させた構成成分の機能を他の TCS の構成成分が代償すると推測されるが、その代償する経路が一定ではないため、結果として異なる形質が現れたのではないかと推測している。この事は、TCS のクロストークが深く関与していることを示唆し、今後これら複数の構成成分を欠損した株を作製し、クロルヘキシジン抵抗性を調べることで未だ明らかにされていないクロストークネットワークの解明を試みる予定である。



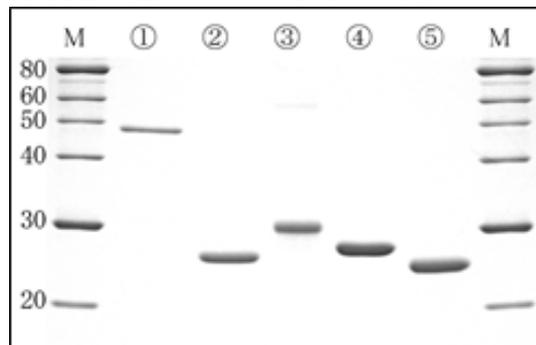
(図2 各欠損株のクロルヘキシジン抵抗能)



(図3 クロルヘキシジンによる阻止円の比較: 野生株(左), LiaS 欠損株(右))

(3)代表的な HK および RR の組換えタンパク質の精製

構築した各発現ベクターにて形質転換した大腸菌から組換えタンパク質を抽出し、アフィニティカラムを用いて精製した(図4)。ここで得られた各組換えタンパク質は今後継続して行う TCS の *in vivo*でのリン酸基転移反応の検出に用いる予定である。



(図4 精製した各組換えタンパク質 M:サイズマーカー(kDa)①:CiaH②:CiaR③:ComE④:VicK⑤:LiaR)

(4) リン酸化された HK・RR 検出条件の検討

環境ストレスで刺激した *S. mutans* の菌体から HK および RR を抽出し、そのリン酸化レベルを測定するために、本研究期間内で HK・RR の抽出条件を検討することとした。そこで代表的な TCS である CiaRH の HK(CiaH) と RR(CiaR) の抗体を作製し、それを用いて細菌表面画分と細胞質画分抽出方法の検討を行うことにした。得られた抗 CiaH 抗体および抗 CiaR 抗体を用いて Western Blot 法を行ったところ、抗 CiaR 抗体は、*S. mutans* 野生株の菌体および組換え CiaR と反応を示したが、抗 CiaH 抗体は組換え CiaH とは反応を示したが *S. mutans* 野生株の菌体とは反応を示さなかった。膜タンパク質である CiaH は膜貫通領域を削除した組換えタンパク質を作製したため、立体構造を失い、得られた抗体が野生株の CiaH と反応しないのではないかと考えられた。

(5) *S. mutans* の菌体表面画分、細胞質画分抽出法の検討

S. mutans の野生株および CiaR 欠損株から菌体表面画分および細胞質画分を抽出し、抗 CiaR 抗体を用いた Western Blot 法を行った。その結果、細胞質タンパク質である CiaR は細胞質画分から検出されたが、菌体表面画分からは検出されなかった。このことから細胞質画分を適切に抽出することが確認できた。

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 2 件)

① Taniguchi M, Arimoto T, Igarashi T. Relationship between CiaRH and lipoprotein OpcC in the acid tolerance of *Streptococcus mutans*. *Dental Medicine Research*, 33:56-67, 2013. (査読有り)

② Nishio J, Taniguchi M, Higashi J, Takahashi M, Ando T, Hasegawa T, Igarashi T. Rapid detection and identification of *Streptococcus ratti* by a species-specific PCR method. *Anaerobe*, 18:44-47, 2012. (査読有り)

[学会発表] (計 6 件)

① Kataoka H, Arimoto T, Taniguchi M, Fukamachi H, Morisaki H, Cho K, Yamamoto M, Kuwata H. *Rothia dentocariosa* induces TNF-alpha production in a TLR2 dependent manner. 第 86 回 日本細菌学会総会. 千葉県千葉市 (2013/3/19)

② 森崎弘史, 有本隆文, 片岡嗣雄, 谷口誠, 深町はるか. *Streptococcus mitis* の choline binding protein E 欠損株の性状. 第 54 回 歯科基礎医学会学術大会. 福島県郡山市 (2012/9/14)

③ Taniguchi M, Arimoto T, Nishio J, Higashi J, Igarashi T. Relationship between lipoprotein OpcC and two-component system CiaH in acid tolerance of *Streptococcus mutans*. 第 84 回 日本細菌学会. 北海道札幌市 (2011/9/9)

④ Cho K, Arimoto T, Taniguchi M, Ando T, Yamamoto M, Igarashi T. Relationship between lipoprotein PpiA and scavenger receptors in *S. grodii* evasion of phagocytosis. 第 84 回 日本細菌学会. 北海道札幌市 (2011/9/9)

⑤ Kunii M, Arimoto T, Taniguchi M, Chou K, Fukura K, Hasegawa T, Igarashi T. Identification of a lipoprotein PrtM involved in osmotic stress response of *Streptococcus mutans*. 第 84 回 日本細菌学会. 北海道札幌市 (2011/9/9)

⑥ Arimoto T, Taniguchi M, Nishio J, Ando T, Igarashi T. Functional analysis of a putative ABC transporter, LivFGMHK, in *Streptococcus mutans*. *American Society for Microbiology*. アメリカニューオーリンズ州 (2011/5/23)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 誠 (TANIGUCHI MAKOTO)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号 : 50611175

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし