

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659821

研究課題名(和文) 菌体表層アミロイドを介した口腔バイオフィーム形成の検討

研究課題名(英文) Study of oral biofilm associated with bacterial surface amyloid

研究代表者

泉福 英信 (Senpuku, Hidenobu)

国立感染症研究所・細菌第一部・室長

研究者番号：20250186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：アミロイドは、ある特定の構造を持った非水溶性の繊維蛋白質である。口腔細菌である *Streptococcus mutans* にもアミロイドが存在し、それがバイオフィーム形成に関与している可能性が考えられる。本研究では、*S. mutans* の遺伝子の中で SMU482 と SMU574 がアミロイド形成に関与している可能性が見出された。しかし、SMU482 はバイオフィーム形成に関与し SMU574 はその形成に関与していなかった。よって、アミロイド形成が必ずバイオフィーム形成に関わるとは限らないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Amyloid is an insoluble fiber protein involving one specific structure. It was clearly that this amyloid was associated with the biofilm formation in gram positive bacteria. *Streptococcus mutans* is possessing the amyloid implicated in the biofilm formation. This study showed a possibility that SMU482 and SMU574 associated with amyloid formation in *S. mutans* genes. SMU482 related with the biofilm formation but SMU574 did not related with that. Therefore, it was clearly that the amyloid formation is not necessarily concerned with biofilm formation.

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：アミロイド *S. mutans* バイオフィーム 遺伝子 コンゴレッド 異常蛋白質 SMU482 SMU574

1. 研究開始当初の背景

アミロイドは、ある特定の構造を持つ水に溶けない繊維状のタンパク質である。タンパク質が正常に機能するためには折りたたみ構造をとるがこのアミロイドは、折りたたみがうまくいかず、異常な帯状のシートを多く持った構造をとる。大腸菌でいえば、Curlin タンパク質などがある。近年、Kolter R らは、*Bacillus subtilis* のバイオフィルム形成において TasA によるアミロイド線維がその付着因子として働き、構造を完全な状態に導く分子であることを明らかにした。この TasA は、グラム陽性菌のバイオフィルム形成に深く関わることが見出された。この TasA は、Streptococci にも相同性の高い領域が存在しており十分にこのアミロイド線維を形成していると考えられる。TasA の遺伝子シーケンスと相同性の高い蝕原因菌である *Streptococcus mutans* の遺伝子領域を検索すると、SMU1442 (hypothetical protein)、SMU1658 (NRGA Ammonium transporter)、SMU1035 (bacitracin ABC transporter) が見つかった。我々の以前の研究により、SMU1035 は、*S. mutans* 臨床分離株の中でバイオフィルム形成量の多い菌 (FSC-3) と少ない菌 (FSC-4) で DNA マイクロアレイを行うと、FSC-3 において強く発現する遺伝子であった。この SMU1035 の遺伝子変異株を作製し親株とバイオフィルム形成を比較すると、バイオフィルムの形態に変化が見られた。よって、この SMU1035 はアミロイドの発現に関与しバイオフィルム形成に関わったのではないかと考えられる。

口腔には 700 種類以上の微生物が存在し、歯表面においては Streptococci が多数を占めバイオフィルムの形成に深く関わっている。口腔バイオフィルムは、スクロースのような糖源に曝された場合 Extra Cellular Polysaccharide (EPS) の産生により強固に歯表面に付着し、糖代謝による pH 低下により唾液中に緩衝されない状態を続け、脱灰が起こり、う蝕に導くと考えられている。その際に働く Streptococci は、*Streptococcus*

mutans や *Streptococcus sobrinus* である。しかし、スクロースばかりは摂取しているわけではなく様々な糖源を摂取しており、*S. mutans* や *S. sobrinus* のようなグルコシルトランスフェラーゼによるスクロースから合成される非水溶性グルカンや水溶性グルカン合成によりバイオフィルムが形成されているばかりではない。その他に、バイオフィルムを形成させるメカニズムがあると考えられる。Kolenbrander らは、*Streptococcus gordonii*, *Streptococcus sanguinis* などの初期付着菌の獲得ペリクルに結合、さらに他菌と結合、凝集によるバイオフィルムについて詳細にまとめている、Kolenbrander PE: J Bacteriol. 1993; 175: 3247-3252)。特に歯周病や誤嚥性肺炎は、スクロースに依存して発症しているわけではない。スクロースに依存しないバイオフィルム形成メカニズムが存在しそれが歯周病や誤嚥性肺炎に関わる本来のバイオフィルムである可能性がある。アミロイド線維を介して streptococci が表面に付着し、バイオフィルムを *B. subtilis* のように強固に形成している可能性も十分に考えられる。今までの研究では、streptococci の歯表面への付着は菌体表層蛋白質抗原 (Pac, SspA, SspB など) が唾液蛋白質へ結合することにより始まると考えられた。アミロイド線維を介してバイオフィルムが形成されていたとすれば、プリオンのような異常なタンパク質による歯表面への結合が口腔疾患の発症に関わっていたということになり、これは斬新なアイデアでありチャレンジ性も高い。

2. 研究の目的

口腔バイオフィルム形成はスクロースを糖源とする代謝系が中心となっているが、実際はスクロースに依存しないバイオフィルム形成メカニズムも存在している。菌体表層アミロイドは、近年 *Bacillus subtilis* のバイオフィルム形成に大きく関わることが明らかとなった。TasA がその重要な遺伝子と

して明らかとなり、う蝕原因菌である *Streptococcus mutans* や初期付着菌 *Streptococcus gordonii* にも相同性の高い領域が存在していた。口腔バイオフィルム形成にこの菌体表層アミロイドが関与する可能性が高く、本研究ではバイオフィルム形成におけるアミロイドの関わりについて詳細に明らかにすることを目的とする。

2. 研究の方法

1. *S. mutans* UA159 と *S. gordonii* challis 株のアミロイド候補タンパク質変異株の作製

tasA とのホモロジー検索を行い類似性の高い遺伝子を検索し、*S. mutans* では、SMU1442、SMU1658、SMU1035、*S. gordonii* では、SG00110 (low molecular weight protein tyrosine phosphate)、SG01098 (gamma-glutamyl phosphate reductase)、SG02026 (Capsular polysaccharide biosynthesis protein) が明らかとなった。エリスロマイシンカセットが挿入されたプラスミドを用いて、相同的組み換えによりエリスロマイシンカセットを挿入して、エリスロマイシン入り培地でスクリーニングをかけて、変異株を採取した。Quorum sensing に関わる遺伝子 *comC*, *come*, *comR*, *comX*, グルカン合成に関わる遺伝子 *gtfC*, *gtfB*, *gtfD*, その他 SMU482, SMU484, SMU574, SMU737, SMU834, SMU1013, SMU1598, SMU1693 などとも作製し検討を行った。

2. バイオフィルム形成実験における形成量の評価とアミロイドの観察

バイオフィルム実験は、96 穴マイクロタイタープレートを用いて行った。を用いて行う。ヒト唾液をコートしたウェルに菌を接種、16 時間、37 °C、0.25%スクロース、グルコース、フルクトース、マルトース、マンノース が含まれた Tryptic Soy Broth 存在で、5%CO₂ 好氣的

環境下で培養を行った。培養後のバイオフィルム形成の評価は、LIVE/DEAD® *BadLight*™ Viability Kit で染色し共焦点レーザー顕微鏡を用いて検討した。アミロイドは、シート構造が積層して沈着しているもので、コンゴ レッドで着色させて偏向顕微鏡にて観察した。アミロイドは複屈折により青リンゴ色に見える。

コンゴレッドが含まれる BHI 寒天培地を作製し、そこに菌体を塗布し、48 時間、37 °C、5%CO₂ 好氣的環境下で培養を行った。それぞれの菌コロニーを偏向顕微鏡にて観察し、青リンゴ色に見えるコロニーを特定した。

3. リアルタイム PCR を用いた遺伝子発現の解析

SMU482 変異株がアミロイド形成とバイオフィルム形成および菌凝集に関与したことで、その詳細なメカニズムを解析するために、SMU482 の下流に位置する SMU483, SMU484 の遺伝子発現およびグルカン合成に関わる *gtfB*, *gtfC*, *gtfD* の遺伝子発現解析をリアルタイム PCR にて行った。

3. 研究成果

クオラムセンシングに関わる遺伝子の SMU482 変異株は、親株の UA159 に比べアミロイド形成が上昇する傾向が認められた。また凝集性も高く、さらにグルコースが含まれた TSB 培地では extra cellular DNA に依存したバイオフィルム形成が高まっていた。一方、スクロースが存在している TSB 培地では、バイオフィルム形成が親株よりも低下することが明らかとなった。この場合、SMU482 変異株はスクロース存在下で凝集性が親株よりも強くなり、プレート底面に菌が付着する前に凝集してしまい、洗浄した際に剥がれやす

くなくなってしまったことが考えられた。

リアルタイム PCR による検討により、SMU482 は、細胞壁の構成に関わる遺伝子の SMU484 や SMU483 の発現量も低下させていた。SMU484 変異株は、グルコースが含まれた TSB 培地では extra cellular DNA に依存したバイオフィルム形成が高まっていた。また、GTFB の発現量を増加させ GTFD の発現量を減少させていた。

よって、グルコースが含まれた TSB 培地では、SMU482 は SMU484 の影響を受け菌の凝集、extra cellular DNA に依存したバイオフィルム形成に関わっていることが考えられた。スクロースが含まれた TSB 培地では、SMU482 変異株は *gtfB* 遺伝子発現量の上昇による非水溶性グルカンの合成により菌凝集の増加、それが剥がれやすくさせ結果的にバイオフィルム形成の減少に関わっていることが考えられた。

これらの遺伝子発現に影響を与えたことがアミロイド形成量に直接どのように関係があるか明らかにすることはできなかった。しかし、凝集やバイオフィルム形成に関与していることから、アミロイド形成がこれらの遺伝子の影響による凝集やバイオフィルム形成と関連している可能性が考えられた。

一方、SMU574 変異株はコロニー形成の外側にアミロイド形成が認められた。他の株では認めることができなかった。しかし、SMU574 変異株は、バイオフィルム形成量が親株と変化がなかった。このことは、アミロイド形成が必ずしもバイオフィルム形成に直接関わっていないことを示唆している。

SMU482 と SMU574 の変異株は、それぞれ異なったアミロイド形成とバイオフィルム形成との関係性を示した。これは、アミロイドが直接バイオフィルム形成に関与しているのではなく、凝集のような他の現象に関与し、それが培地などの条件次第では、バイオフィ

ルム形成にも関与してくることが考えられた。今後、既存のバイオフィルム形成メカニズムとアミロイドとの詳細な関係を様々な条件で検討が必要であると考えられた。

5 . 主な発表論文等

1) Norihiko Kanaguchi, Naoki Natisawa, Tatsuro Ito, Yosuke Kinoshita, Yoko Kusumoto, Osamu Shinozuka and **Hiddenobu Senpuku**. Effects of salivary protein flow and indigenous microorganisms on initial colonization of *Candida albicans* in an *in vivo* mode. **BMC Oral Health**. 2012; 12(1): 36.

2) Keitaro Satoh, Takanori Narita, Miwako Matsuki-Fukushima, Ken Okabayashi, Tatsuro Ito, **Hiddenobu Senpuku**, Hiroshi Sugiyama. E2f1-deficient NOD/SCID mice have dry mouth due to a change of acinar/duct structure and the down-regulation of AQP5 in the salivary gland. **Pflugers Archiv - European Journal of Physiology**, Pflugers Arch. 2013 465(2):271-81.

3) Xi Zhang and **Hiddenobu Senpuku**. Dynamic changes in the initial colonization of *Actinomyces naeslundii* and *Streptococcus gordonii* using a new animal model. **Japanese Journal Infectious Diseases**, 2013;66(1):11-6.

4) Saori Yoneda, Taketo Kawarai, Naoki Narisawa, Elif Bahar Tuna, Norito Sato, Takanori Tsugane, Yoji Saeki, Kuniyasu Ochiai, and **Hiddenobu Senpuku**. Effects of short-chain fatty acids on *Actinomyces naeslundii* biofilm formation. **Molecular Oral Microbiology**, ;2013: 28: 354-365.

5) Ryoma Nakao, Shogo Takashiba, Saori Kosonoc, Minoru Yoshida, Haruo Watanabe, Makoto Ohnishi, **Hiddenobu Senpuku**. Effect of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles on gingipain mediated detachment of cultured oral epithelial cells and immune responses. **Microbes and Infection**. 16: 6-16, 2014

〔雑誌論文〕(計 5件)

〔学会発表〕(計 11件)

〔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 泉福英信
(国立感染症研究所細菌第一部)

研究者番号：20250186

(2)研究分担者 中尾龍馬
(国立感染症研究所細菌第一部)

研究者番号：10370901

(3)連携研究者 古川壮一
(日本大学生物資源科学部)

研究者番号：40339289