

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24659911

研究課題名(和文) 齲蝕原因菌が生成する新規タンパク複合体デグラドソームの環境適応に果たす役割

研究課題名(英文) The role of new protein complex, so called 'degradosome' produced by cariogenic microorganism, results to be effective to the environment.

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院・教授

研究者番号：10178212

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：齲蝕原因菌であるミュータンス菌のバイオフィルム内での環境適応の制御方法としてdegradosomeと呼ばれるmultiprotein complexの形成と制御が行われているかどうかを明らかとすることを目的とした。まず、構成タンパクの1つであるenolaseを軸にMSの複合体を形成するタンパクの探索を行う実験系を進めてみた。enolaseのcloningを行い、cDNAを作成し、DNAシーケンスの確認を行い比較検討した結果、UA159に対していずれの株においてもポイントミューテーションが認められ、2株ではアミノ酸レベルで異なっている部分があることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to make sure that the formation of multiprotein complex called degradosome and the control should be performed as a method of adaptation of living environment in biofilm of cariogenic mutans streptococci. Firstly, the experiment of seeking some protein producing MS complex of a center of enolase was performed. The cDNA was made by cloning of enolase and recognition of DNA sequence was done. The results showed that the point mutation was found to UA159 in all strains. In two strains, it is found that some amino acids are different.

研究分野：小児歯科学

キーワード：mutans streptococci 齲蝕 細菌の生育環境 デグラドソーム 環境適応

1. 研究開始当初の背景

Streptococcus mutans (以下 *SM*) はその発症に係る原因細菌の一つであるが、歯面に多種類の菌とともに形成したバイオフィル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、齲蝕の進行に關与する。バイオフィル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 が關与している (F.G. Smith and G.A. Sratafara, JDR, 2011)。

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 (RNaseE), polynucleotide phosphorylase (PNPase), DEAD box helicase (RhlB), enolase が degradosome と呼ばれる multiprotein complex を形成し、mRNA のプロセッシング、分解、成熟に働く、生育に必須なエンド型リボヌクレアーゼであることが報告され、細菌の環境変化の適応への關与が示唆されている。

2. 研究の目的

齲蝕原因菌であるミュータンスレンサ球菌は、バイオフィルムを形成し、その中で様々な環境ストレスに適応して生存し、齲蝕の発症に關与している。環境適応に際し、遺伝子発現レベルにおいて広範囲な制御が行われ、定常状態を呈していると考えられるが、その1つの方法としてデグラドソーム(以下 degradosome) と呼ばれるタンパク複合体(以下 multiprotein complex)の形成によって、環境変化への対応が実際に行われているかどうかについて明らかにすることを目的とした。關与があることが証明された場合、齲蝕発症メカニズム解明の一端あるいはこれをターゲットとした新規の予防、治療への基礎的研究となることが期待できる。

3. 研究の方法

SM における multi-protein complex 構成要素の探索

enolase は glucose 代謝系の1酵素であるが *SM* ではフッ化物の標的タンパクとして研究がすすんでおり、また *E.coli* の degradosome においては働きは未だ明らかとはなっていないが、構成タンパク質の1つであることから、enolase を軸に *SM* での複合体

を形成するタンパク質の探索を行った。

実験1 Enolase の cloning と以後使用するための prasmid construct の作成

SM 標準株として UA159 を用い、PCR にて enolase を cloning した。

1. PCR にて enolase の cDNA を作成し、DNA シークエンスを確認後、以後の実験に使用した。
タンパク産生用 vector 並びに FLAG vector への組換えを行い、construct を作成した。
2. 得られた construct のシークエンスを行い、必要に応じて western blotting により確認を行った。

実験2 複合体候補タンパク探索のための *SM* の cDNA ライブラリー作成

UA159 より得た total RNA を用いて、逆転写ののち cDNA ライブラリーを作成した。

実験3 bacterial two-hybrid system を用いて複合体形成候補タンパクの探索

1. 目的タンパク発現ベクターに上記 enolase を組換え、相互作用タンパク発現ベクターに *SM* ライブラリーより得た cDNA を組換え、それぞれの prasmid を作成した。
2. bacterial two-hybrid system を用いてスクリーニングを行い、候補タンパク質の探索を行った。
3. 上記で得られた候補タンパク質に関しては免疫沈降法あるいは pull down assay にて複合体形成疑似タンパク質でないことを確認した。

SM 培養時に acid-stress, oxidative-stress, heat-stress, starvation-stress となるように培養液を調製し、ストレス時に増減するタンパク質を探索した。

SM の生育環境変化時におけるタンパク質発現の動向

SM 培養時に acid-stress, oxidative-stress, heat-stress, starvation-stress となるように培養液を調整し、各環境でのタンパク質の発現の違いを調べた。

1. *SM* を acid-stress, oxidative-stress, heat-stress, starvation-stress の各条件下で培養したのち、細胞内、細胞外のそれぞれのタンパク質サンプルを調製した。
2. 上記サンプルの各条件下サンプルで通

常培養で得たサンプルをコントロールとして2次元電気泳動, mass spectroscopic analyses を行った。

3. 発現量の変動の大きなタンパク質についてデータベースを用いて同定を行った。

環境変化における mRNA の安定性の変化

上記で得られたタンパク質中で、環境変化においてターゲットとなるタンパク質の mRNA について定量的、経時的な変化を探索する。同時に quorum-sensing 機構に関わると言われている遺伝子との関連についても探索を行った。

実験 1 ターゲットたんぱく質について ORF を持つ prasmid の構築

1. SM 標準株として UA159 を用い、PCR にてターゲットたんぱく質を cloning した。
2. PCR にてターゲットたんぱく質の cDNA を作成し、DNA シークエンスを確認後、以後の実験に使用するための construct を作成した。
3. Northern blotting 用の DNA プローブの作成を行った。

実験 2 Total RNA の調製

SM を acid-stress, oxidative-stress, heat-stress, starvation-stress となるように培養したのち、各条件下の細菌内の total RNA サンプルを調製した。

実験 3 Northern blotting にて、mRNA の動向について環境変化での相違に関する解析

得られた multi-protein complex の degradosome としての作用

Degradosome 形成候補タンパク質についてそれぞれの ORF の cDNA を作成し、prasmid を構築し、複合体形成の機構の解明を行う。また、Perry ら(1983)の方法に基づき、SM の形質転換を行い、それぞれのタンパクをコードする DNA を欠失した変異 SM 株を作成し、それぞれの状況下での mRNA の安定性の状態について探索した。

4. 研究成果

齧蝕原因菌の mutans streptococci は biofilm を形成し、その内部で様々な環境ストレスに適応しながら生存し、齧蝕発症に係わっている。環境適応に際しては、遺伝子発現レベルにおいて広範囲な制御が行われ、定常状態を呈していると考えられるが、その制御方法の1つとして degradosome と呼ばれる multiprotein complex の形成が行われ、これによって制御が行われているかどうか

を明らかとすることを目的とした。

まず、構成タンパクの1つである enolase を軸に MS での複合体を形成するタンパクの探索を行う実験系を進めてみた。enolase は glucose 代謝系の1酵素であり、齧蝕予防で頻用されるフッ化物のターゲットとされている。5株の標準株を用いてフッ化物に対する感受性を確認したところ、その感受性は各標準株で異なっていることから enolase の cloning を行い、cDNA を作成し、DNA シークエンスの確認を行った。シークエンスを比較検討した結果、UA159 に対していずれの株においてもポイントミューテーションが認められ、2株ではアミノ酸レベルで異なっている部分があることが明らかとなった。臨床株の分離並びにこれらについてのフッ化物への感受性についても DNA の変異がないかどうかについての検討を行っている。UA159, UA130 の enolase に関してはタンパク産生用ベクターに組み換え、シークエンスの確認を行った後、タンパク産生について western で確認を行った。これらを用いて Pull down assay を行い、ターゲットタンパクの探索を行っている。また multiprotein complex 構成成分であると予想される RNAase のクローニングを行っている。

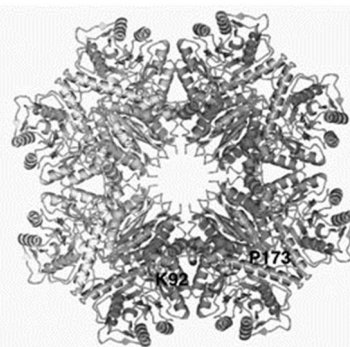
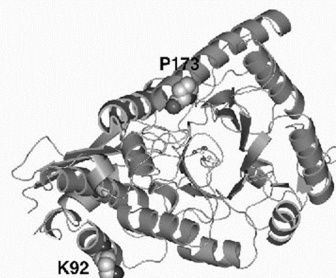


Fig.1 : Computer graphic display indicating the possible 3D structure of enolase. (a) Model of a unit of enolase. Small circles in the center are MgD, P03L 4, and FL. Space-filling representations

are mutated amino acids. (b) Homo-octamer model of enolase.

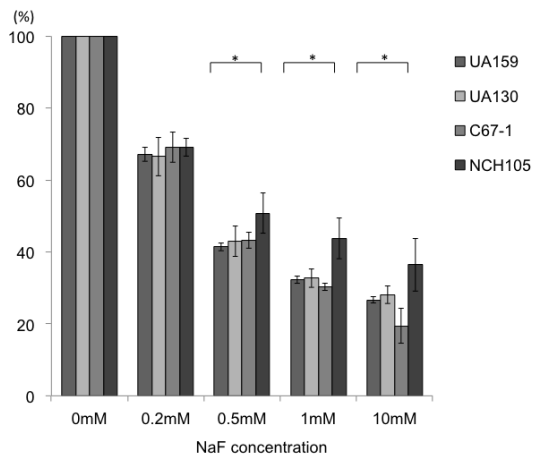


Fig.2 : Effect of fluoride on enolase activity of *S. mutans* strains. Comparison of activity between strains for each fluoride concentration. Error bars represent SE. Statistically significant differences are indicated by asterisks (*P < 0.05).

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)

C.Mitsuhashi, M.Moeharyono Puteri, Y.Ohara, N.Tatsukawa, K.Kozai: Possible involvement of enolase in fluoride resistance in *Streptococcus mutans*., Pediatric Dental Journal, (査読あり) 24:12-16, 2014.

〔学会発表〕(計1件)

大原 紫: 小児の齲蝕重症度と臨床分離 *Streptococcus mutans* の性状の検討, 第50回日本小児歯科学会大会, 2012.5.12-13 東京国際フォーラム.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

〔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院・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院・准教授

研究者番号: 10335664

大原 紫 (OHARA YUKARI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号: 80634469