

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463251

研究課題名(和文) 口腔細菌のリボスイッチ制御による口腔フローラ再構成への挑戦

研究課題名(英文) Reconstruction of oral microflora by riboswitch regulation

研究代表者

柴田 幸江 (Shibata, Yukie)

九州大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30274476

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：口腔連鎖球菌についてフッ化物耐性遺伝子(eriCとcrcB)の分布を調べた。相同性検索の結果、18種の口腔細菌には2種類のeriC(eriC1とeriC2)と2種類のcrcB(crcB1とcrcB2)が存在し、これらの分布型によって口腔連鎖球菌は3つに分けられた。グループ1にはeriC1のみ、グループ2にはeriC1とeriC2、グループ3にはeriC2、crcB1とcrcB2が存在した。グループ1と2に属する口腔連鎖球菌ではeriC1が、グループ3ではcrcB1とcrcB2がフッ化物耐性に関与していた。口腔連鎖球菌のフッ化物耐性にはeriC1かcrcBのどちらかが関与していた。

研究成果の概要(英文)：It has been reported that eriC and crcB were involved in the bacterial fluoride resistance. Blast research demonstrated that two kinds of eriCs (eriC1 and eriC2) and two kinds of crcBs (crcB1 and crcB2) existed in 18 oral streptococci. They were divided into three groups on the basis of the distribution of these four genes: group I, only eriC1; group II, eriC1 & eriC2; group III, eriC2, crcB1, & crcB2. Group I consisted of *Streptococcus mutans*, and one of two eriC1s dominantly affected the fluoride resistance. Group II consisted of 8 species, and eriC1 was involved in fluoride resistance, but eriC2 was not, in *Streptococcus anginosus* as a representative species. Group III consisted of 9 species, and both crcB1 and crcB2 were indispensable for the fluoride resistance, but eriC2 was not, in *Streptococcus sanguinis* as a representative species. Base on these results, either EriC1 or CrcB works for the fluoride resistance in oral streptococci.

研究分野：予防歯科学

キーワード：フッ化物 口腔細菌 eriC crcB

1. 研究開始当初の背景

フッ化物応用がう蝕予防に多大なる貢献を果たしていることは周知の事実であり、我が国においてもフッ化物応用を普及させるための懸命な努力が続けられてきた。その結果、平成23年度の歯科疾患実態調査では1歳から14歳までの63.6%の子供たちにフッ化物塗布の経験があることが明らかとなり、また、フッ化物配合歯磨剤の市場占有率及び使用者の割合も約9割に達している。このようなう蝕予防のためのフッ化物応用の普及により、口腔内の細菌はフッ化物に暴露される機会が増大し、口腔細菌の生育環境にフッ化物は大きな影響を及ぼしている。口腔細菌はフッ化物により代謝活性を抑制され、静菌的な効果を受けながらも、ある程度のフッ化物耐性を有している。これまで細菌のフッ化物耐性メカニズムについては全く不明であったが、最近、細菌のフッ化物耐性に *eriC* や *crcB* が関与しており、*eriC* の上流にはリボスイッチが存在することが報告された(文献1)。一方、近年、細菌と疾患、あるいは、細菌と健康状態との関係を考える上で、個々の細菌に重きを置くのではなく、フローラ全体を見ることの重要性が叫ばれている。例えば、糖尿病あるいは肥満と関連性の強い腸内フローラや、歯周病と関連性のある口腔フローラなど多くの研究成果が発表されており、目下当教室でもう蝕と細菌叢との関連についての研究が進行中である。う蝕発症と関連性の強いプラーク細菌叢とはどういうものか、反対に、う蝕発症と関連性の少ないプラーク細菌叢とはどういうものかが明らかになりつつある。

2. 研究の目的

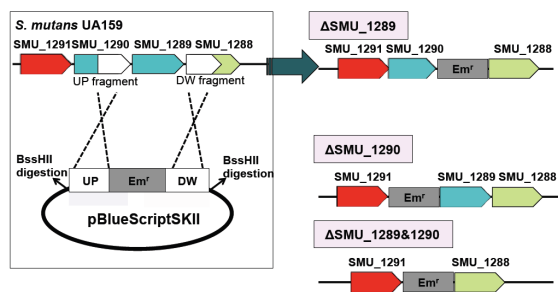
本研究の目的は、う蝕細菌ならびにその他の口腔連鎖球菌のフッ化物耐性に関する遺伝子ならびにフッ化物リボスイッチの機能を明らかにし、口腔連鎖球菌におけるフッ化物耐性メカニズムの全容を解明することである。さらに、う蝕細菌のみに執着するのではなく、う蝕と細菌叢の関連に着目し、口腔連鎖球菌のリボスイッチをコントロールすることにより、う蝕発症に繋がりにくい口腔フローラへと再構築する手段を確立することである。

3. 研究の方法

口腔連鎖球菌は培地として Brain heart infusion を使用し、37℃、5%CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。菌の生育は、マイクロプレートリーダーを用いて 550 nm における吸光度を測定した。

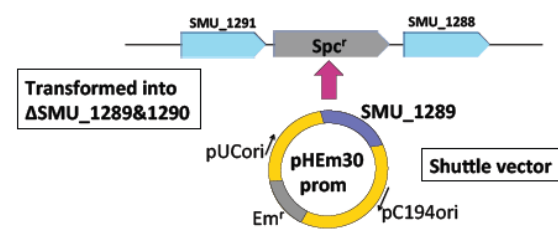
*Streptococcus mutans*、*Streptococcus anginosus*、*Streptococcus sanguinis* の変異株はダブルクロスオーバー法を用いて作製した。一例として、*S. mutans* UA159 ΔSMU\_1289 の作製方法を図1に示す。

図1 *S. mutans* UA159 ΔSMU\_1289 の作製



同菌種あるいは他菌種間での相補実験はシャトルベクターを用いて図2に示すように行われた。

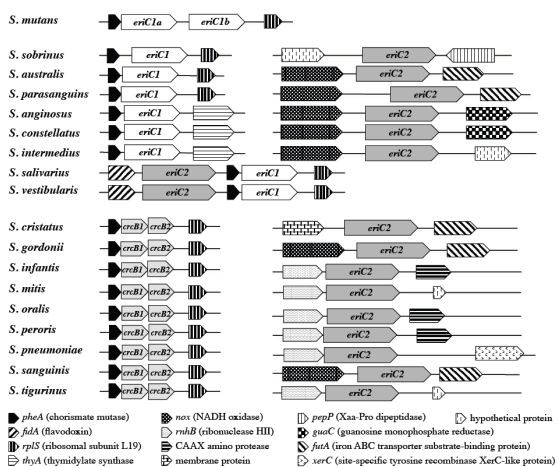
図2 シャトルベクターを用いての相補実験



4. 研究成果

(1) NCBI のデータベースを用いて相同性検索を行った結果、18 菌種の口腔細菌には2種類の *eriC* (*eriC1* と *eriC2*) と2種類の *crcB* (*crcB1* と *crcB2*) が存在することが分かった。*EriC1* は先の研究(文献1)でフッ化物耐性に関与することが報告された *Pseudomonas syringae* *EriC* と50%以上の高い相同性を示したのに対し、*EriC2* は相同性が認められなかった。*CrcB1* と *CrcB2* も同様に、先の研究(文献1)でフッ化物耐性に関与することが報告された *Escherichia coli* K-12 の *CrcB* と高い相同性を示した。図3に示すように、これら4種類の遺伝子の分布様式によって口腔連鎖球菌は3つのグループに分けられることがわかった。グループ1には *eriC1* のみ、グループ2には *eriC1* と *eriC2*、グループ3には *eriC2*、*crcB1* と *crcB2* が存在した。

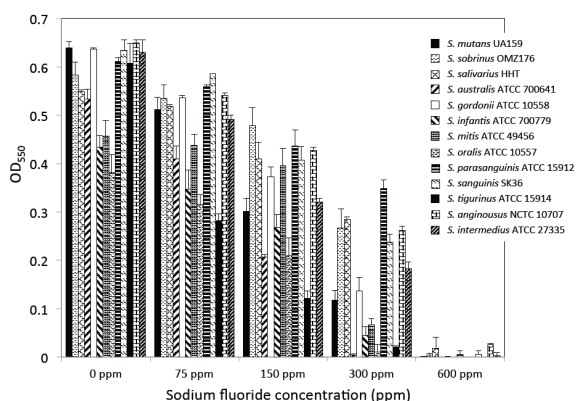
図3 口腔連鎖球菌における *eriC* と *crcB* の分布



口腔連鎖球菌は 16S ribosomal RNA の塩基配列によって、4つのグループ（ミュータンスグループ、ミティスグループ、サリバリウスグループとアンギノーサスグループ）に分類される（文献2）。ミュータンスグループはグループ1と2に、ミティスグループはグループ2と3に分かれて属した。一方、サリバリウスグループとアンギノーサスグループはすべてグループ2に属した。

(2) 上記の口腔連鎖球菌の中から13菌種についてフッ化物耐性を測定した。その結果を図4に示す。

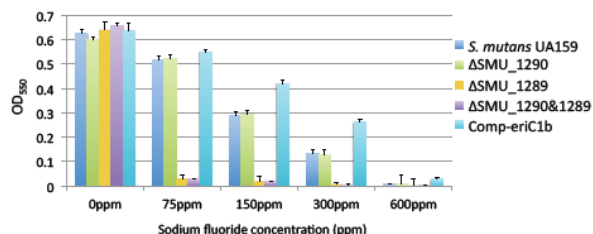
図4 口腔連鎖球菌のフッ化物耐性



口腔連鎖球菌のフッ化物耐性能力は菌種によって違いがあることがわかった。しかしながら、600 ppm NaF ですべての菌種が成育不能となった。*eriC* と *crcB* の分布様式とフッ化物耐性能力との間に強い関連性は認められなかった。

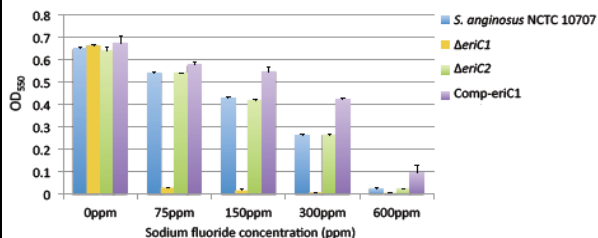
(3) グループ1には *S. mutans* のみが属し、*S. mutans* UA159 には *eriC1* が2個 (SMU\_1289 と SMU\_1290) 存在した。SMU\_1289 の失活はフッ化物耐性の消失という結果になったが、SMU\_1290 を失活してもフッ化物耐性は野生株 UA159 と同様であった。さらに、SMU\_1289 と SMU\_1290 の両方を失活しても、フッ化物耐性は SMU\_1289 失活株と同等であった（図5）。これらの結果より、*S. mutans* UA159 においてフッ化物耐性に関与しているのは SMU\_1289 のみであることがわかった。

図5 *S. mutans* UA159 および変異株のフッ化物耐性



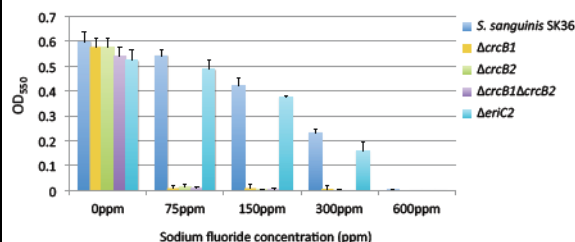
(4) グループ2は8種類の口腔連鎖球菌で構成され、その代表として *S. anginosus* NCTC 10707 のフッ化物耐性を調べた。*S. anginosus* には *eriC1* と *eriC2* が存在するが、*eriC2* を失活してもフッ化物耐性に変化はなかった。一方、*eriC1* の失活はフッ化物耐性を大きく消失する結果となった（図6）。以上の結果より、グループ1と同様に、グループ2も *eriC1* がフッ化物耐性に関与していることがわかった。

図6 *S. anginosus* NCTC 10707 および変異株のフッ化物耐性



(5) グループ3は9種類の口腔連鎖球菌で構成され、その代表として *S. sanguinis* SK36 についてフッ化物耐性に関与する遺伝子を同定した。*S. sanguinis* SK36 は *eriC2*、*crcB1* と *crcB2* を有するが、*crcB1* 失活株も *crcB2* 失活株もともに、フッ化物耐性を失い、両者のフッ化物感受性は同程度であった。*crcB1/crcB2* 二重変異株のフッ化物感受性は一重変異株と変わらなかった。これらの結果より、*S. sanguinis* SK36 では *crcB1* と *crcB2* の両方がフッ化物耐性に関与していることがわかった。一方、*eriC2* を失活してもフッ化物耐性に変化はなかった（図7）。

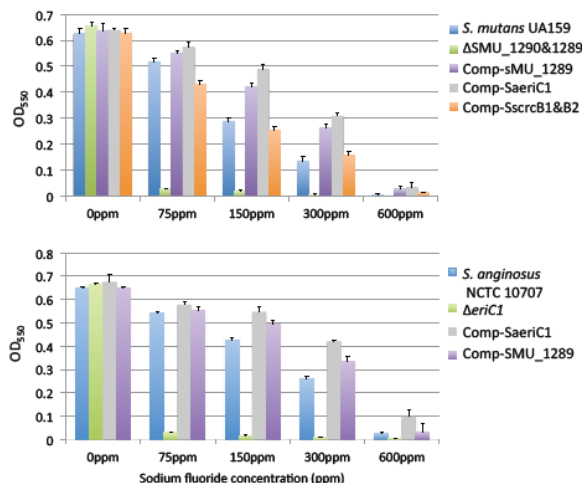
図7 *S. sanguinis* SK36 および変異株のフッ化物耐性



(6) 上記の結果より、口腔連鎖球菌においては、*eriC1* あるいは *crcB1/B2* のどちらかがフッ化物耐性に関与することが明らかになった。そこで、*eriC1* 同士あるいは *eriC1* と *crcB1/B2* との間で相補が可能かどうかを調べた。図8に示すように、*S. mutans* UA159 SMU\_1289/SMU\_1290 二重変異株に *S. anginosus* *eriC1* あるいは *S. sanguinis* *crcB1/B2* を導入したところ、変異株のフッ化物耐性はともに回復した。さらに、*S. anginosus* *eriC1* 失活株への *S. mutans*

SMU\_1289 の導入もフッ化物耐性の回復という結果になった。*eriC1* 同士あるいは *eriC1* と *crcB1/B2* との間での相補が確認された。

図 8 菌種間の相補実験



(7) 従来、EriC は塩化物イオンチャンネルタンパクであると考えられていた。文献 1 で EriC の中にフッ化物イオンタンパクとして機能するものがあることが発見され、さらにフッ化物イオンチャンネルタンパクには塩化物イオンチャンネルタンパクとは異なる特異的なアミノ酸配列が存在することが示された。そこで、今回同源性検索の結果得られた *EriC1* について、アミノ酸配列を調べた(表 1)。口腔細菌のすべての *EriC* がフッ化物イオンチャンネルタンパク特有のアミノ酸配列を有することが分かった。本研究ではそれらすべての機能を調べてはいないが、フッ化物イオンチャンネルタンパクである可能性が示唆された。

表 1 EriC における保存されたアミノ酸配列

Substrate	Organism	Conserved channel-forming residues
Cl <sup>-</sup>	human (ClC-1)	GSGIP GKEGP GGFMP Y
Cl <sup>-</sup>	<i>Escherichia coli</i>	GSGIP GREGP GIFAP Y
F <sup>-</sup>	<i>Pseudomonas syringae</i>	GNNLI GREGT GEVTP Y
F <sup>-</sup>	<i>Clostridium difficile</i>	GNNLI GREGV GEVTP Y
F <sup>-</sup>	<i>Streptococcus mutans</i>	GMGLI GREGV GEVTP Y
F <sup>-</sup>	<i>Streptococcus anginosus</i>	GMTLI GREGV GEVTP Y
F <sup>-</sup>	<i>Streptococcus sobrinus</i>	GMGLV GREGV GEVTP Y
F <sup>-</sup>	<i>Streptococcus australis</i>	GMELL GREGV GEVTP Y
F <sup>-</sup>	<i>Streptococcus parasanguinis</i>	GMGLI GREGV GEVTP Y
F <sup>-</sup>	<i>Streptococcus salivarius</i>	GMGLI GREGV GEVTP Y
F <sup>-</sup>	<i>Streptococcus vestibularis</i>	GMGLI GREGV GEVTP Y
F <sup>-</sup>	<i>Streptococcus constellatus</i>	GMTLI GREGV GEVTP Y
F <sup>-</sup>	<i>Streptococcus intermedius</i>	GMTLI GREGV GEVTP Y

Red: conserved in Cl<sup>-</sup> channels  
Blue: differ from Cl<sup>-</sup> channels

文献 1

Baker JL, Sudarsan N, Weinberg Z, Roth A, Stockbridge RB, et al. (2012) Widespread genetic switches and toxicity resistance proteins for fluoride. *Science* 335:233–235.

文献 2

Kawamura Y, Hou XG, Sultana F, Miura H, Ezaki T. (1995) Determination of 16S rRNA sequences

of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus *Streptococcus*. *International journal of systematic bacteriology* 45:406-408.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Men X, Shibata Y, Takeshita T, Yamashita Y. Identification of genes involved in fluoride resistance in oral streptococci. 第 65 回日本口腔衛生学会・総会, 2016 年 5 月 27、28、29 日、東京

〔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 0 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  
柴田 幸江 (Shibata, Yukie)  
九州大学・大学院歯学研究院・助教  
研究者番号： 30274476

(2)研究分担者  
山下 喜久 (Yamashita, Yoshihisa)  
九州大学・大学院歯学研究院・教授  
研究者番号： 20192403

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：