

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463269

研究課題名(和文) ミュータンスレンサ球菌にフッ化物耐性を付与するフッ化物輸送タンパクの解明

研究課題名(英文) Identification of fluoride transporter that contribute to fluoride resistance in *Streptococcus mutans*

研究代表者

村田 貴俊 (MURATA, Takatoshi)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：10313529

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：う蝕は世界中に蔓延している疾患の1つである。う蝕予防にはフッ化物応用が効果的である。その主な作用は、歯の強化と初期う蝕の再石灰化である。一方、フッ化物には微生物のエネルギー産生経路を阻害する働きがあるので抗菌作用も期待できる。もしフッ化物がう蝕原因菌の増殖抑制にも貢献すれば画期的である。そのための方策を探る第一歩として、う蝕発生に重要な役割を果たす *Streptococcus mutans* 菌にフッ化物耐性を付与する遺伝子の存在を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Dental caries is one of the most common infectious diseases in the world. Fluoride application is one of the most effective method for dental caries prevention. The mechanisms of action of fluoride in preventing dental caries are thought to involve the promotion of acid resistance in teeth and tooth remineralization. In addition, fluoride inhibits glycolytic system in bacteria. Therefore, fluoride may also provide antimicrobial activity. It is an epoch-making if fluoride also contributes to the growth inhibition of cariogenic *Streptococcus mutans*. To explore the required measures, we identified the genes that resisted fluoride toxicity in *Streptococcus mutans*.

研究分野：予防歯科学

キーワード： *Streptococcus mutans* フッ化物 ミュータンスレンサ球菌 フッ化物耐性遺伝子

様式 C - 19、F - 19、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) フッ化物のう蝕予防機序は、歯質強化と再石灰化促進である。一方、フッ化物は、微生物のエネルギー産生経路を構成する酵素を阻害するため、う蝕関連細菌の増殖抑制に働く可能性がある。しかしながら、多くの微生物がフッ化物耐性を有することが知られていた。

(2) 先行研究により、微生物にフッ化物耐性を付与する2種類の遺伝子、*crcB*と*eriCF*、およびその遺伝子産物が報告された。遺伝子データベース解析により、う蝕関連細菌である *Streptococcus mutans* (*S. mutans*)には、そのうちの*eriCF*と相同で、フッ化物耐性に寄与すると推測される SMU1290_c 及び SMU1289_c 遺伝子と、その2つの遺伝子に独立してコードされる chloride channel permease の存在が明らかにされた。

2. 研究の目的

S. mutans ゲノム上に存在する SMU1290_c 及び SMU1289_c 遺伝子の遺伝子産物である chloride channel permease が真に *S. mutans* にフッ化物耐性を与えていることを証明する。

3. 研究の方法

(1) *S. mutans* 標準株 (*S. mutans* WT) から以下の株を作製した。

SMU1290_c 遺伝子をスペクチノマイシン耐性遺伝子で置換した SMU1290_c 遺伝子破壊株 (*S. mutans* 90)

SMU1289_c 遺伝子をエリスロマイシン耐性遺伝子で置換した SMU1289_c 遺伝子破壊株 (*S. mutans* 89)

SMU1290_c および SMU1289_c 両遺伝子をそれぞれスペクチノマイシン耐性遺伝子、エリスロマイシン耐性遺伝子で置換した両遺伝子破壊株 (*S. mutans* 90&89)

上記各菌株のフッ化物耐性を比較した。

(2) タンパク質発現用大腸菌 (*E. coli* BL21) のフッ化物耐性遺伝子 (*crcB*) 破壊株 (*E. coli crcB*) を作製した。この *E. coli crcB* に対して以下の発現ベクターによる形質転換株を作製した。

SMU1290_c を組込んだ発現ベクターによる形質転換株 (*E. coli*-90)

SMU1289_c を組込んだ発現ベクターによる形質転換株 (*E. coli*-89)

組込み遺伝子のない発現ベクターによる形質転換株 (*E. coli*-empty)

上記各菌株のフッ化物耐性を比較した。

S. mutans 各株の培養はブレインハートインフュージョン液体培地、*E. coli* 各株の培養は Luria-Bertani 液体または寒天培地を使用した。

フッ化物としてフッ化ナトリウム (NaF) を

使用した。

菌の増殖は OD655 で濁度を測定、評価した。

4. 研究成果

(1) *S. mutans* WT のフッ化物耐性を調べたところ、10 mM NaF で増殖不可能であったが、1 mM NaF で増殖が認められた (図1)。

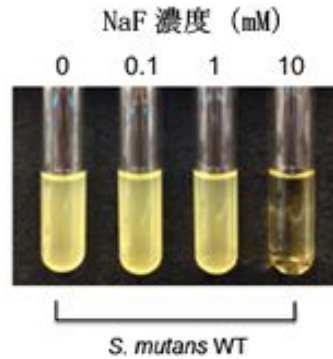


図1

従って、*S. mutans* 各遺伝子破壊株のフッ化物耐性評価を 1 mM 以下の NaF 濃度でおこなった。その結果、*S. mutans* WT で増殖が認められる 1 mM NaF では、*S. mutans* 90、*S. mutans* 89、*S. mutans* 90&89 とも増殖は認められなかった (図2A)。また、0.1 mM NaF では、*S. mutans* 90&89 の増殖が *S. mutans* WT、*S. mutans* 90、*S. mutans* 89 より有

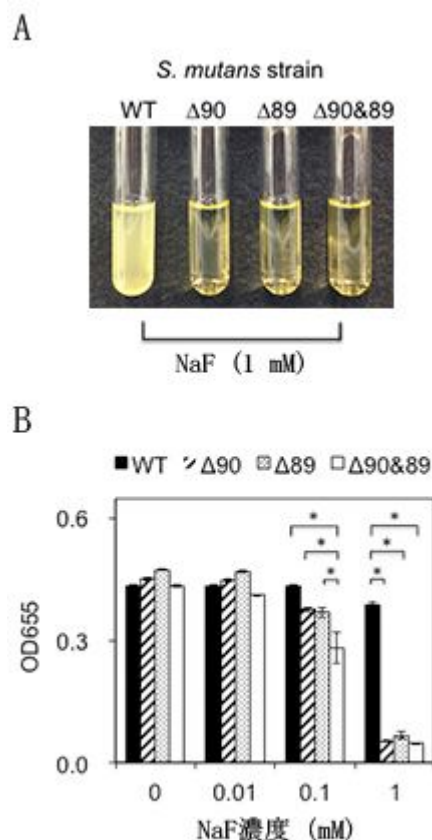


図2

意に抑えられた(図 2B)。このことは SMU1290_c 及び SMU1289_c 遺伝子がフッ化物耐性に寄与していることを示す。

(2)上記の増殖抑制が NaF 特異的抑制なのか確認するために、他のハロゲン化ナトリウム(塩化ナトリウム: NaCl、臭化ナトリウム: NaBr、ヨウ化ナトリウム: NaI)で同様の試験をおこなった。なお、予備実験の結果から、NaCl、NaBr、NaI 濃度を 100 mM とした。その結果、NaF とは異なり、他のハロゲン化ナトリウムを添加した培地でも、添加していない培地と同等の増殖を示した(図 3)。このことは、フッ化物の chloride channel permease への特異性を示唆する。

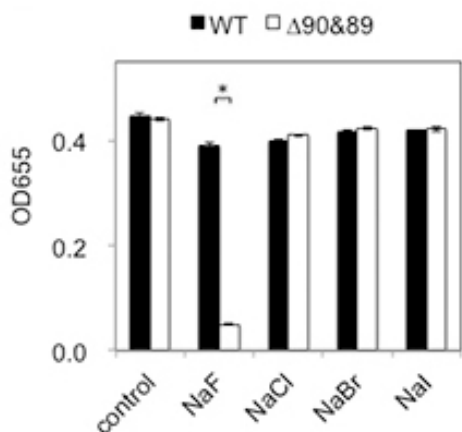


図3

(3)フッ化物耐性遺伝子を破壊してフッ化物耐性能を消失した大腸菌を SMU1290_c または SMU1289_c 遺伝子で形質転換し、フッ化物耐性能が回復するか評価した。

E. coli BL21 は 50 mM NaF で増殖可能であるが、フッ化物耐性遺伝子 *crcB* を破壊した *E. coli* *crcB* はフッ化物耐性を消失しており、1 mM NaF 以上で増殖できない。ところが、SMU1290_c で形質転換した *E. coli*-90、SMU1289_c で形質転換した *E. coli*-89 とともに 10 mM NaF を含む寒天培地上で増幅した(図 4)。ベクターのみの形質転換株(*E. coli*-empty)は増殖しなかった。

以上の所見は、SMU1290_c、SMU1289_c の遺伝子産物がフッ化物耐性に寄与することを示す。

(4)一連の研究結果から「SMU1290_c または SMU1289_c 単独の形質転換で *E. coli* *crcB* のフッ化物耐性を回復したので、*S. mutans* において 2 つある遺伝子の片方のみを破壊し、もう片方を残した菌株(*S. mutans* 90、*S. mutans* 89)は *S. mutans* WT と同等のフッ化物耐性、つまり 1 mM NaF 存在下で増殖可能である」と考えられたが、実際は増殖不可能であった。しかしながら、0.1 mM NaF 存在下では両遺伝子を破壊した *S. mutans*

90&89 よりも有意な増殖を示した。

以上のことから「2 量体を構成する chloride channel permease は、SMU1290_c および SMU1289_c 遺伝子産物の共存により、より高いフッ化物耐性能を持つ」という仮説を立てた。

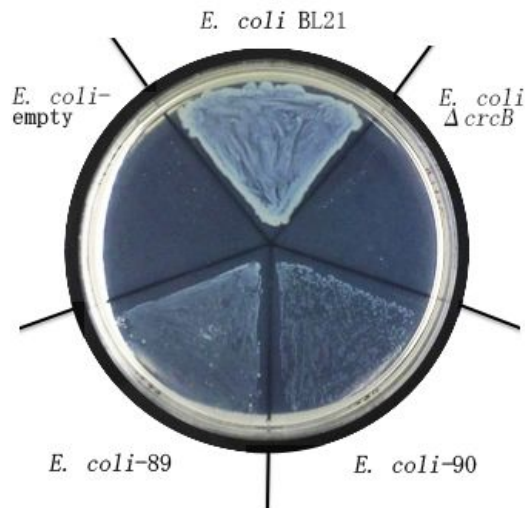


図4

この仮説を検証するために、SMU1290_c と SMU1289_c 両遺伝子を同時に形質転換した株(*E. coli*-90&89)を作製し、フッ化物耐性能を他の株と比較した。その結果、*E. coli*-90&89 は 1 mM NaF までフッ化物耐性は回復したが、単独遺伝子の形質転換株 *E. coli*-90、*E. coli*-89 よりフッ化物耐性能が勝ることはなかった。以上の所見は、仮説の検証を満たすものではなかった。この点の解決は今後の課題であり、大腸菌と *S. mutans* の遺伝子発現機構の違い等も考慮しなければならない。

研究成果をまとめると、

S. mutans の SMU1290_c および SMU1289_c の遺伝子産物 chloride channel permease は *S. mutans* にフッ化物耐性を与える。

この chloride channel permease 阻害剤の開発は、フッ化物との併用による新たな *S. mutans* 増殖抑制法につながるかもしれない。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Takatoshi Murata, Nobuhiro Hanada, Contribution of chloride channel permease to fluoride resistance in *Streptococcus mutans*, FEMS Microbiology Letters, 査読有 (印刷中)

DOI: 10.1093/femsle/fnw101

〔学会発表〕(計 5 件)

Takatoshi Murata, Contribution of

chloride channel permeases to fluoride resistance in *Streptococcus mutans*, International Association for Dental Research, 2016年6月23日 ソウル(韓国)

Takatoshi Murata, Chloride channel permeases in *Streptococcus mutans* play a role in fluoride resistance, Japanese Association for Dental Research, 2015年10月31日 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

村田貴俊, *S. mutans* のフッ化物耐性に寄与する chloride channel permease、歯科基礎医学会 2015年9月13日 朱鷺メッセ(新潟県・新潟市)

村田貴俊, *Streptococcus mutans* にフッ化物耐性を付与するフッ化物イオンチャンネル、日本細菌学会関東支部会 2015年10月29日 東京歯科大学(東京・千代田区)

村田貴俊, *Streptococcus mutans* にフッ化物耐性を付与する遺伝子の同定、日本口腔衛生学会 2015年5月28日 つくば国際会議場(茨城県・つくば市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村田 貴俊 (MURATA, Takatoshi)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：10313529

(2) 研究分担者

花田 信弘 (HANADA, Nobuhiro)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：70180916