

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25862013

研究課題名(和文) バイオインフォマティクス的手法による *S. mutans* の機能ドメイン探索法の確立研究課題名(英文) Establishment of method for search of functional domain in *Streptococcus mutans*

研究代表者

高島 由紀子 (Takashima, Yukiko)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：30589768

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Streptococcus mutansの菌体表層には齲蝕原性と強く関連するグルカン結合タンパクC (GbpC) が存在しているが、本研究では、グルカン結合領域を決定するため、立体構造を構築し結合ドメインと推測される配列を数カ所抽出した。抽出された各配列が欠落したGbpCを発現する変異株を作製し、デキストラン結合能を調べたところ、中央部付近の欠失変異株で有意な低下が認められた。さらにリコンビナントGbpCを用いてドットプロットアッセイを行ったところ、中央部付近を含む断片タンパクの値が有意に高くなった。これらの結果からGbpCのグルカン結合領域は全遺伝子配列の中央部に存在することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Streptococcus mutans produces glucan-binding proteins (Gbps), which participate in biofilm development. Among those, GbpC encoded by the gbpC is known to possess a cariogenic protein. We examined the dextran-binding domain of GbpC using bioinformatics analysis. First, truncated recombinant GbpC (rGbpC) including the upstream or downstream region of the gbpC were produced, and dextran-binding ability was examined. The rate of dextran-binding of truncated rGbpC including the upstream region was higher than that including the downstream region. Next, 5 regions were specified as possible molecular binding sites using bioinformatics analysis and individual mutant strains with deletion of each region were generated, dextran-binding was again examined. The rate of dextran-binding for the mutant strain deficient of the center region was significantly lower as compared to the others. These results suggest that the dextran-binding domain may be located in the center of the gbpC.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Streptococcus mutans グルカン結合タンパク 齲蝕 バイオインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

齧蝕病原性細菌である *Streptococcus mutans* の菌体表層には、グルカン合成酵素 (Glucosyltransferase; GTF)、高分子タンパク抗原 (PAc)、あるいはグルカン結合タンパク (Gbp) 等のタンパク構成成分が存在する。これらのタンパクの作用が複雑に絡み合って機能することによりバイオフィームを形成し、齧蝕を発生させると考えられている。しかし、GTF の作用によりスクロースから合成されたグルカンが *S. mutans* 菌体表層の Gbp とどのように結合し、歯面に付着するかについては不明な点が多い。これまでに、GbpA と GbpC は *S. mutans* の齧蝕発生と強く関与していることが、*in vitro* および *in vivo* 動物実験で明らかにされている。さらに、*S. mutans* MT8148 株を親株として、各 Gbp の欠失変異株を作製し、デキストラン結合能を調べたところ、GbpC 欠失変異株である CD1 株において、最も低下しており、他の Gbp と比較しても齧蝕原性が高いことが示されている。しかしながら、GbpC は齧蝕原性に関与していることはこのように明らかとなっているものの、グルカン結合領域は明らかとなっていない。GbpA は、そのアミノ酸配列から GTF のグルカン結合領域と高い相同性を持ち、グルカン結合機能領域が特定されている。しかしながら、GbpC は、そのアミノ酸配列からは *S. mutans* の初期付着に関係している PAc と高い相同性を持ち、C 末端側に PAc と同様に LPXTG のアンカー配列を持つ菌体結合型のタンパクであることが特定されているものの、グルカン結合の機能領域については未だ不明のままである。

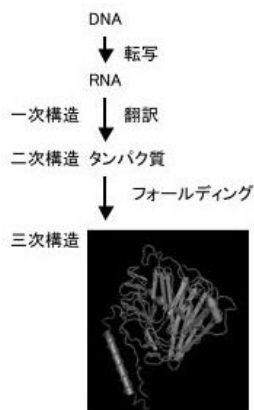


図1. DNAから高次構造まで

2. 研究の目的

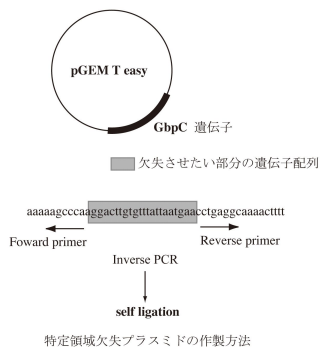
S. mutans は数株において全ゲノムが既に明らかとなっており、データベース上でその情報を入手することが可能である。これまでは、アミノ酸配列より断片タンパクを作製することにより、そのタンパクの機能の解析を行ってきたが、現在においては、図1に示すように、バイオインフォマティクスを用いて、DNA 配列からタンパクの高次構造を推測が可能となっている。また機能ドメ

インについては、タンパクの立体構造と機能との間には相関関係があるため、他菌種において明らかにされた同じ機能を示す配列を *S. mutans* の遺伝子配列から探索することにより、ある機能領域を特定することが可能となる。本研究では、この手法を用いて、GbpC のグルカン結合の機能領域を明らかにし、齧蝕におけるバイオフィーム形成のメカニズムをより明確に示したいと考えている。さらに、どのような遺伝子配列が結合力を持つのかを検討し、あらゆる生物における低分子から高分子化合物の結合ドメインを明らかにしたいと考えている。

- (1) バイオインフォマティクスの手法により、まず GbpC タンパクをコードする遺伝子配列からその立体構造を推測する。
- (2) グルカン結合ドメインは、GbpC がフォールディングした状態で外側に突出した部分に存在すると推測されるため、突出した部分を数カ所スクリーニングする。
- (3) 既知のグルカン結合ドメインの配列と比較することにより、これまで未知の GbpC のグルカン結合ドメインの特定を行う。
- (4) 推定された結合ドメインの機能を決定するために、各領域を欠失した株を作製し、デキストラン結合能を測定することにより、グルカン結合領域を決定する。
- (5) 得られた *S. mutans* の結合領域が他の菌種においても機能しているかを検討し、結合ドメインを決定する。

3. 研究の方法

- (1) GbpC タンパクの推定グルカン結合領域のスクリーニング
GbpC をコードする遺伝子配列から3次構造を推測する。はじめに、マルチプルアライメントを行って分子系統樹を作製し、近縁ですでにタンパクの高次構造が解析されている遺伝子から、GbpC の立体構造を推測する。さらにグルカン結合領域については、既知の結合性タンパクの配列と立体構造から、推測される配列のスクリーニングを行う。
- (2) GbpC 欠失変異株の作製
既に報告されている GbpC をコードする遺伝子を Polymerase chain reaction (PCR) を用いて増幅し、pGEM-T Easy vector に挿入する。遺伝子の中央付近にカナマイシン耐性カセットを挿入し、制限酵素を用いて一本鎖にした後、*S. mutans* MT8148 株に相同組換えを起こすことにより、GbpC 欠失変異株を作製する。



(3) GB1, GB2, GB3, GB4 および GB5 領域欠失変異株の作製

各領域を欠失した *gbpC* 遺伝子を挿入したプラスミドの作製

GB1, GB2, GB3, GB4 および GB5 領域を欠失する変異株を作製するため、はじめに各領域を欠失した *gbpC* 遺伝子を含むプラスミドの作製を行う。*S. mutans* MT8148 株の染色体 DNA を鋳型として、*gbpC* 遺伝子の全配列を増幅するプライマーを用い、PCR 法を行う。増幅した DNA 断片を精製し、pGEM-T easy Vector (Promega, Madison, WI, USA) に挿入して、プラスミド pYY1 を作製する。次に、pYY1 を鋳型として、GB1 領域の外側に制限酵素 *NheI* の認識配列を含むアダプターを付加したオリゴヌクレオチドプライマーを逆向きに設計し、Inverted PCR 法を行う。増幅した DNA 断片を制限酵素 *NheI* で消化し、セルフライゲーションさせることにより GB1 領域欠失変異株用プラスミド pYY2 を得る。同様の方法を用いて、GB2, GB3, GB4, および GB5 領域欠失変異株用プラスミド pYY4, pYY5, pYY6 および pYY7 をそれぞれ得る。

各欠失変異株の作製

CD1 株への形質転換を行うために、これらのプラスミドにおける *gbpC* 遺伝子部分をレンサ球菌属と大腸菌のシャトルベクターである pAT18 (Trieu-Cuot ら, 1991) に入れ換えることにより、プラスミド pgbpC1, pgbpC2, pgbpC3, pgbpC4 および pgbpC5 を作製する。各領域を欠失した GbpC タンパクを発現させるために、*gbpC* 欠失変異株である CD1 株に、Lindler と Macrina (1986) の方法を用いて形質転換を行う。シャトルベクターのみを形質転換した株 (CDE2 株) も作製する。作製した変異株の確認のために、*gbpC* 遺伝子全長の配列の決定することにより、目的のアミノ酸部分が欠失していることを確認する。

(4) シャトルベクターを用いた部分的アミノ酸配列欠失 GbpC タンパク発現

作製されたプラスミドから、GbpC の配列を制限酵素により切り出し、タンパク発現のプロモーターを持つシャトルベクターに挿入する。作製されたシャトルベクターを上記で作製した GbpC 欠失変異株に形質導入することにより、GbpC 欠失変異株において部分的にアミノ酸配列が欠落した GbpC タン

パクを発現させる。

(5) デキストラン結合能の測定

上記で得られた変異株を用いて、下記の方法でデキストラン結合能を調べる。これにより、どの部分がグルカン結合能を持つ領域であるかを決定できる。リン酸生理食塩水で OD₆₃₀=1.0 に調整した各菌株を 96 穴マルチタイプレートに 4°C で 16 時間固定し、洗浄後ビオチン化したデキストランを加え室温で 10 分間反応させる。洗浄後、ストレプトアビジン・ホースラディッシュペルオキシダーゼを加え室温で 5 分間反応させ、洗浄後発色基質を添加し、マイクロプレートリーダーにより、波長 490 nm での吸光度を測定する。

(6) リコンビナント GbpC の発現と精製
制限酵素の認識配列を付加したプライマーを用いて、GbpC のグルカン結合領域の推定配列を PCR 法にて増幅させた後、この PCR 産物をタンパク発現用ベクター pET42a (+) に挿入し、プラスミドを作製する。作製したプラスミドをタンパク発現用大腸菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 株に形質転換し、Luria-Bertani 液体培地で震盪培養し、遠心分離を行う。得られた菌体を超音波で破碎し、遠心分離した後、上清を GST 融合タンパク質精製用アフィニティゲルを用いてリコンビナント GbpC タンパク (rGbpC) を精製する。

(7) rGbpC を用いたデキストラン結合能の測定

上記で得られたリコンビナントタンパクを用いてデキストラン結合能を調べる。

4. 研究成果

(1) GbpC の断片リコンビナントタンパクの発現と精製

精製したリコンビナントタンパクを用いて、フラグメントタンパクの発現を確認した。rGbpC を免疫したウサギより採取した抗血清を用いてウェスタンブロットング分析を行ったところ、フラグメント A (GbpC 全配列からすでに報告されているプロモーター領域と細胞壁結合領域を除いた領域) は分子量 80 kDa に相当する部位に、フラグメント B (フラグメント A の前半部分にあたりデキストラン凝集に参与すると推定される領域) は分子量 55 kDa に相当する部位に、フラグメント C (フラグメント A からフラグメント B を除いた領域) は分子量 54 kDa に相当する部位にそれぞれ濃い一本のバンドを認めた。これは、アミノ酸配列から推定される分子量と同程度であることから、このバンドがそれぞれフラグメント A, B および C であることを確認し、実験に供試した。

(2) GbpC 断片リコンビナントタンパクのデキストラン結合能

フラグメント A は、反応 5 分後においてフラグメント B の約 1.5 倍のデキストラン結合能を示し、フラグメント C の約 17 倍の強

いデキストラン結合能を示した。さらに反応10分後には、フラグメント A は、フラグメント B の約 1.4 倍、フラグメント C の約 23 倍も強いデキストラン結合能の値を示した。

(3) グルカン結合領域の推定

3次元構造においてループ状でポケットを形成する5カ所の部位は、他菌種のグルカン結合タンパクと高い相同性を示した部位と一致し、この5カ所が GbpC におけるグルカン結合領域として推定されたそれぞれを GB1、GB2、GB3、GB4 および GB5 とした。

(4) 推定グルカン結合領域欠失株のデキストラン結合能

各領域欠失株のデキストラン結合能は、スロットプロットアッセイにより調べた。CDGB1株、CDGB2株、CDGB3株およびCDGB5株では *S. mutans* MT8148株と同程度の発色が認められたが、CD1株、CDGB4株およびCDE2株では、発色の程度は低かった。これらのバンドを NIH image (Version 1.43) にて発色の度合いを数値化すると、CDGB1株、CDGB2株、CDGB3株およびCDGB5株では、*S. mutans* MT8148株よりも高いデキストラン結合能を示した。一方、CD1株、CDGB4株およびCDE2株においては、*S. mutans* MT8148株と比較して有意に低い値であった。

(5) グルカン結合領域の確認

スロットプロットアッセイでフラグメント X (GB1 と GB3 を含む領域) と Y (GB4 と GB5 を含む領域) のデキストラン結合能を調べたところ、GB4 と GB5 を含むフラグメント Y のデキストラン結合能は GB1 と GB3 を含むフラグメント X のそれより約 1.7 倍有意に高い値を示した。さらに発現ベクターである pET42a (+) のみを発現させたタンパクと比較すると、フラグメント Y との間に有意な差を認めた。

(6) GbpC のグルカン結合領域の検討

以上のことから、GbpC のグルカン結合領域は全遺伝子配列の中央部に存在することが示唆された。本研究の成果は、齲蝕予防のためのターゲットを決定する重要な知見である。

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3件)

Matsumi Y、Fujita K、Takashima Y、Yanagida K、Morikawa Y、Matsumoto-Nakano M. Contribution of glucan-binding protein A to firm and stable biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Mol Oral Microbiol* 2014 (査読有) doi: 10.1111/omi.12085.

Ardin AC、Fujita K、Nagayama K、Takashima Y、Nomura R、Nakano K、Ooshima T、Matsumoto-Nakano M. Identification and Functional Analysis of an Ammonium Transporter in *Streptococcus mutans*.

PLoS One. 2014 Sep 17;9(9):e107569. doi: 10.1371/journal.pone.0107569. eCollection 2014. (査読有)

Nagayama K、Fujita K、Takashima Y、Ardin AC、Ooshima T、Matsumoto-Nakano M. Role of ABC transporter proteins in stress responses of *Streptococcus mutans*. *Oral Health Dent Manag.* 2014 Jun;13(2):359-65. (査読有) [学会発表](計3件)

Takashima Y、Fujita K、Matsumoto-Nakano M. Function of dextran-binding domain encoding peptide in *Streptococcus mutans*. 92nd General Session & Exhibition of the IADR, 25-28, Jun, 2014, Cape Town, South Africa.

Takashima Y、Fujita K、A. C. Ardin and Matsumoto-Nakano M. Identification of Functional Biological Domains of GbpC in *Streptococcus mutans*. 2nd Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region. 21-23, Aug, 2013 Bangkok, Thailand.

高島由紀子、藤田一世、仲野道代、*Streptococcus mutans* のグルカン結合タンパク C の構造による正常の比較、第 51 回小児歯科学会大会 2013 年 5 月 23 日～5 月 24 日 長良川国際会議場 岐阜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高島 由紀子 (TAKASHIMA、Yukiko)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：30589768