

研究者：森川 優子（所属：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 小児歯科学分野 医員）

## 研究題目：齲蝕進行に関連する *Streptococcus mutans* の膜輸送体の機能解析

### 目的：

*Streptococcus mutans* はヒト齲蝕の主要な病原細菌であり、口腔内のバイオフィーム形成において重要な役割を担っている。*S. mutans* はバイオフィーム形成中において、菌を取り巻く様々な環境ストレスに対応するためのタンパクを保有しており、これらのタンパクの一つとして膜輸送体が存在している。

膜輸送体の一つに ATP-binding cassette (ABC) 膜輸送体があり、細胞内外に選択的に物質を輸送する機能を持つことが報告されている。グラム陽性細菌にとって窒素は成育に必要な栄養素であり、アンモニウムから合成されるグルタミンが多くの化合物の生合成の際に必要な窒素源として用いられている。ABC 膜輸送体の中にはこのグルタミンを選択的に輸送するものがあるとされており、本研究では、*S. mutans* のグルタミン輸送体の機能解析を行った。

### 対象および方法：

#### 1. *glnP* 欠失変異株と相補株の作製

*S. mutans* UA159 株の全アミノ酸配列のデータベースから細胞膜輸送に関連すると推定されるグルタミン ABC 膜輸送体 (*glnP*) をコードする遺伝子を特定した。この遺伝子の機能を調べるために *S. mutans* GS5 を親株として *glnP* を欠失させた欠失変異株 (GEMR) を作製した。また欠失変異株に *glnP* が発現するプラスミドを形質導入し、相補株 (comp-GEMR) を作製した。

#### 2. 増殖能の比較

これらの変異株を用いて、増殖能の比較を行いました。Todd Hewitt (TH) 液体培地で一晚培養した供試菌液を 1/100 量になるように TH 液体培地および 10 mM の濃度になるようにグルタミンを添加した TH 液体培地に播種し、波長 600 nm の吸光度を、1 時間毎に経時的に測定した。

#### 3. バイオフィーム構造の観察

GS5 株、GEMR 株および comp-GEMR 株を TH 液体培地で 37°C、18 時間培養後、遠心分離により菌体を回収した。10 mM のヘキシジウムアイオダイドで菌体を染色し、0.5% スクロース含有化学合成培地にて、波長 600 nm における濁度が 0.1 となるよう調整し生菌試料とした。これらの菌液をポリスチレン製 8 穴 Lab-Tek チャンバースライドシステムに 200  $\mu$ l ずつ播種し、37°C、24 時間培養した。形成されたバイオフィームを共焦点走査型レーザー顕微鏡 LSM780 (Version 4.2, Carl Zeiss MicroImaging Co., Germany) にて観察した。形成されたバイオフィ

ルムの密度は ImageJ (Version 10.2, Macintosh computer application, Bethesda, MD, USA) にて断面の赤色面積を数値化し評価した。

#### 4. バイオフィーム破碎試験

GS5 株、GEMR 株および comp-GEMR 株を BHI 液体培地にて 37°C、18 時間培養後、培養した供試菌液を 0.5% になるようにスクロースを添加した TH 液体培地に播種し、6 穴細胞培養用マルチウエルプレートに分注して、37°C で 24 時間嫌氣的に培養した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS: Phosphate buffered saline) にて洗浄後、PBS に再懸濁し、Handy Sonic model で 2 分間超音波処理した。PBS で洗浄後、PBS に再懸濁し、セルスクレーパーで形成されたバイオフィームを剥離した。剥離したバイオフィームを滅菌生理食塩水にて段階的に希釈し、Trypticase Soy 寒天培地に播種し、37°C で 2 日間嫌気培養した。一方、コントロールには超音波未処理のバイオフィームとして、超音波処理をせずに同様に菌体を回収したものを寒天培地に播種して用いた。

結果および考察：

##### 1. 増殖能の比較

GS5 株と comp-GEMR 株は、グルタミン添加の影響により対数増殖期での増殖速度が減少した。一方で、GEMR 株の増殖速度は、グルタミンの影響を受けなかった。このことから、*glnP* はグルタミンの取り込みに関与し、そのことにより細菌の増殖能に影響することが示唆された。

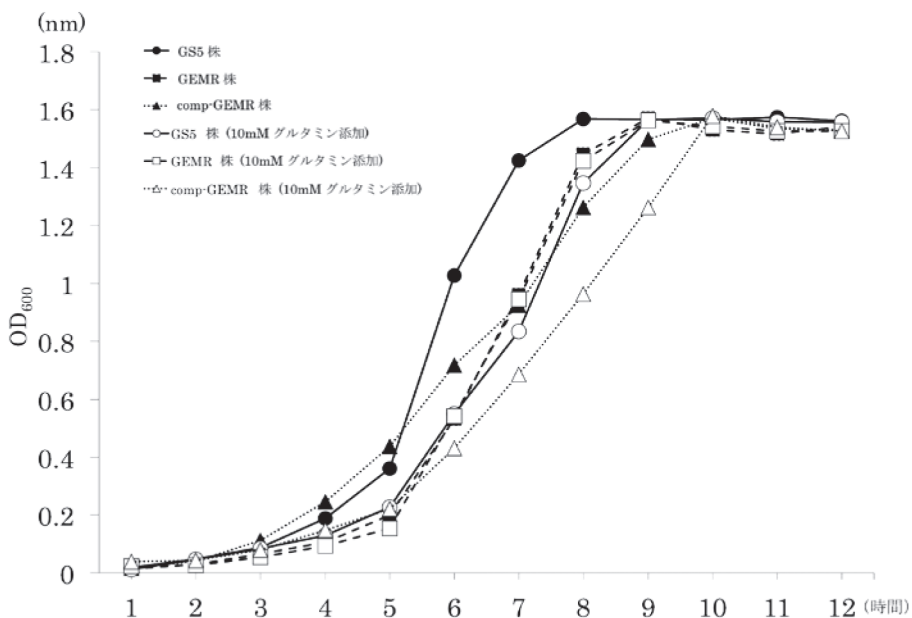


図1 グルタミン添加による *S. mutans* 増殖能への影響

● : GS5 株 ■ : GEMR 株 ▲ : comp-GEMR 株 ○ : GS5 株 + グルタミン  
□ : GEMR 株 + グルタミン △ : comp-GEMR 株 + グルタミン

##### 2. バイオフィーム構造の観察

GS5 株および comp-GEMR 株のバイオフィーム構造に明確な違いはなく、均一なバイオフィームの構造が確認された (図 2A, C)。一方で GEMR 株の構造は疎であることが明らかになっ

た (図 2B)。バイオフィルムの構造を数値化するために、ImageJ で解析を行ったところ、GS5 株および comp-GEMR 株のバイオフィルム構造に違いは認められなかったが、GEMR 株の構造は疎であることが確認された (図 3)。

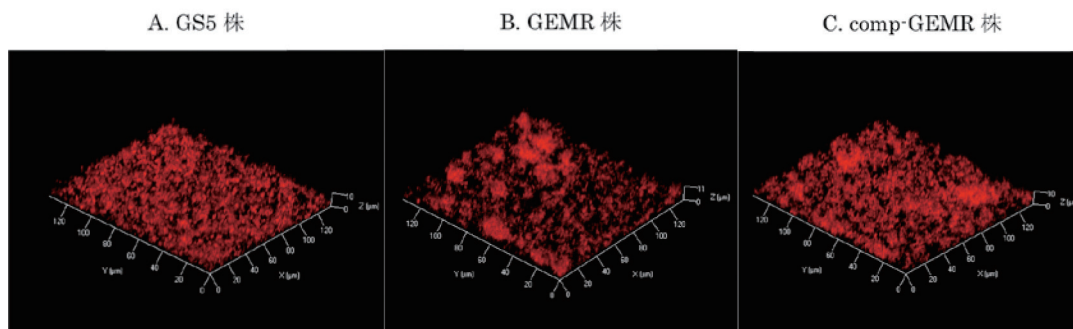


図 2 *glnP* 挿入変異株によるバイオフィルム形成能への影響

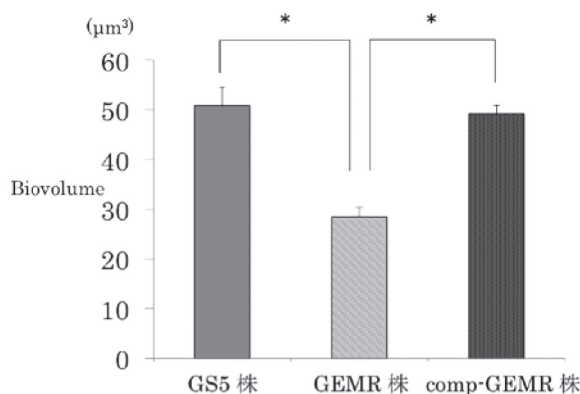


図 3 *glnP* 挿入変異株によるバイオフィルム構造への影響 (Fisher's PLSD 検定 \* $P < 0.001$ )

### 3. バイオフィルム破砕試験

超音波処理後に回収した菌体のコロニー数を計測したところ、有意に GEMR 株のコロニー数が減少していることが確認された (図 4)。

これらの結果より、*glnP* の発現はバイオフィルム形成能および構造の強度に関係することが示唆された。

本研究では、*S. mutans* GS5 株のグルタミン ABC 膜輸送体に関連する遺伝子 *glnP* の機能解析を行い、増殖能とバイオフィルム形成に及ぼす影響について明らかにした。またバイオフィルムの形成量に関するだけでなく、構造にも影響を及ぼすことが明らかとなった。バイオフィルムの構造は、菌の運動性、増殖能、二成分制御系、ならびに菌体外多糖の産生の影響を受けるため、グルタミンの取り込みも二成分制御系を介して遺伝子の発現や菌の増殖に影響を及ぼす可能性が示唆される。今後は膜輸送体とバイオ

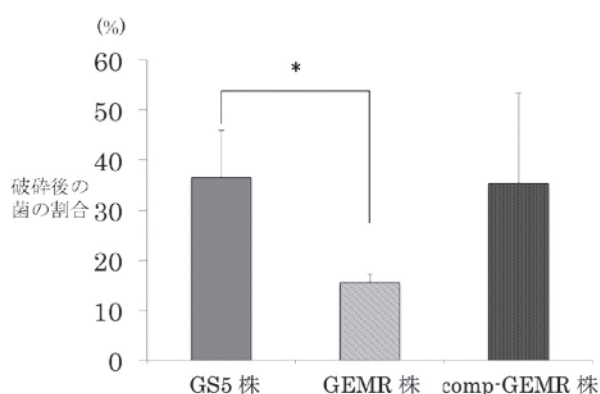


図 4 *glnP* 挿入変異株によるバイオフィルム強度への影響 (Fisher's PLSD 検定 \* $P < 0.05$ )

フィルム形成の関連をさらに追究し、将来的に膜輸送体をターゲットとした齲蝕予防法の開発に繋げていきたいと考えている。

**成果発表：**（予定を含めて口頭発表、学術雑誌など）

- ・ Morikawa Y, Takashima Y, Fujita K, Matsumoto-Nakano M. Functional analysis of role of glutamine metabolism-related gene in biofilm formation by *Streptococcus mutans*. 10th Biennial Conference of PDAA, 2016.5.26.
- ・ 森川 優子, 口腔バイオフィルム形成における *Streptococcus mutans* グルタミン代謝関連遺伝子の機能とその役割の解明, 岡山歯学会雑誌, vol.35 第2号, 2016.6.30.