

研究者：後藤 花奈（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）

研究題目：S. mutans のバイオフィーム形成における ABC トランスポーターの機能解析

目的：

Streptococcus mutans は、齲蝕の主要な病原細菌であり、口腔内のバイオフィームを形成する。*S. mutans* はヒト口腔内において低 pH などの生育環境の変化、イオンや抗菌物質などの侵入といったストレスにさらされている。このため、*S. mutans* は、これらのストレスに対応するための様々なタンパクを保有していると考えられている。また、これらのタンパクの発現は、環境変化の情報をシグナルとして細胞内に伝達するシグナル伝達システムによって制御され、その結果、耐酸性の誘導、侵入物質の阻害と排出などの機能を発揮し、*S. mutans* は強固なバイオフィームを形成し続けることが可能となっている。このシステムの中で菌にとって必要な栄養素を取り込み不要なものを排出する ABC 膜輸送体をはじめとする膜タンパクが重要な機能を果たしていると考えられている。*S. mutans* においては、UA159 株のゲノム解析により、約 60 種類の ABC 膜輸送体が存在することが推定されている。これらのことから、本研究の目的は、*S. mutans* のバイオフィーム形成において最も重要な機能を果たしていると考えられる ABC 膜輸送体を特定することである。

対象および方法：

1. SMU_1520 欠失変異株の作製

S. mutans UA159 株の全アミノ酸配列のデータベースからバイオフィーム形成に関連すると推定される ABC 膜輸送体をコードする SMU_1520 遺伝子を抽出した。この遺伝子の機能を調べるために *S. mutans* MT8148 株を親株として SMU_1520 を欠失させた欠失変異株 (Δ 1520 株) を作製した (図 1)。SMU_1520 遺伝子上流および下流領域、およびエリスロマイシン耐性カセットについて特異的なプライマーを用いて PCR にて各断片を増幅した。オーバーラップ PCR で 3 つの DNA 断片を連結させ、1 本鎖にしたものを精製した。馬血清を 10% 含む Todd Hewitt (TH) 液体培地に MT8148 株を播種し、37°C で 18 時間培養した後、この菌液を馬血清 10% 含む TH 液体培地に継代し、2 時間培養した。培養菌液に精製した DNA 断片を添加し 1 時間培養した後、エリスロマイシン含有 Mitis Salivarius (MS) 寒天培地に播種した。得られたコロニーを培養し、抽出した DNA を鋳型 DNA として、SMU_1520 遺伝子上流

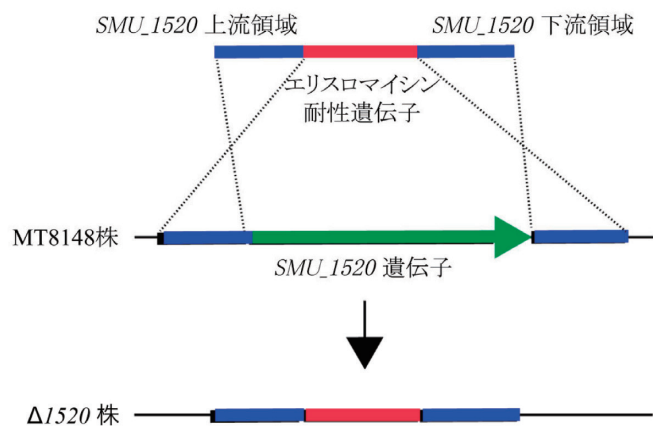


図 1 SMU_1520 欠失変異株の作製

オーバーラップ PCR で 3 つの DNA 断片を連結させ、1 本鎖にしたものを精製した。馬血清を 10% 含む Todd Hewitt (TH) 液体培地に MT8148 株を播種し、37°C で 18 時間培養した後、この菌液を馬血清 10% 含む TH 液体培地に継代し、2 時間培養した。培養菌液に精製した DNA 断片を添加し 1 時間培養した後、エリスロマイシン含有 Mitis Salivarius (MS) 寒天培地に播種した。得られたコロニーを培養し、抽出した DNA を鋳型 DNA として、SMU_1520 遺伝子上流

および下流領域に対するプライマーおよび *S. mutans* 16S rRNA 特異プライマーを用い PCR を行った。電気泳動および PCR 産物のシーケンス解析によって、組み換えが行われたことを確認し、 $\Delta 1520$ 株として実験に供試した。

2. 増殖能の比較

MT8148 株および $\Delta 1520$ 株を用い、増殖能の比較を行った。TH 液体培地で一晚培養した菌液を 1/100 量になるように 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 12 時間測定した。

3. バイオフィーム形成量の測定

MT8148 株および $\Delta 1520$ 株を Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地にて 37°C で 18 時間培養後、0.5% スクロース添加 TH 液体培地に 1/100 量になるように添加した。菌液を 96 穴平底細胞培養用マイクロタイタープレートの各ウェルに 100 μ l ずつ分注し、37°C で 24 時間嫌氣的に培養した。各ウェルの浮遊菌液を除去した後、1% クリスタルバイオレット溶液にて底面に、付着した菌体の染色を行った。蒸留水で 6 回洗浄を行った後、95% エタノールで固定、乾燥後蒸留水を加え波長 570 nm の吸光度を測定した。

4. バイオフィーム構造の観察

MT8148 株および $\Delta 1520$ 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 μ 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にて観察した。形成されたバイオフィームの密度は Image J にて断面の赤色面積を数値化し評価した。

結果および考察：

結果

1. *SMU_1520* 欠失変異株の作製

抽出したゲノム DNA を鋳型 DNA として *S. mutans* 16S rRNA 特異プライマーを使用し PCR を行った結果、MT8148 株および $\Delta 1520$ 株において約 250 bp のバンドを認めた。一方で、*SMU_1520* 遺伝子上流および下流領域に対するプライマーを用いた PCR では、MT8148 株では約 700 bp のバンドが認められるが、 $\Delta 1520$ 株にバンドは認められなかった (図 2)。このことから $\Delta 1520$ 株では、*SMU_1520* 遺伝子が欠失していることが示された。

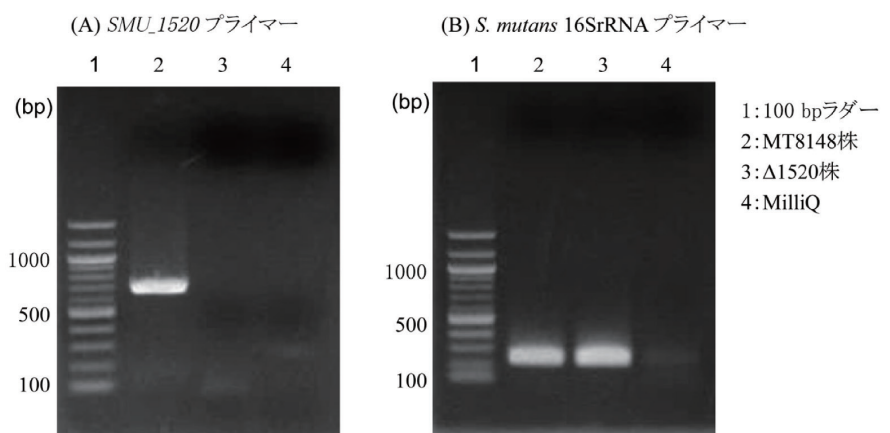


図 2 *SMU_1520* の遺伝子欠失の確認

2. 増殖能の比較

波長 600 nm の吸光度を経時的に測定し、増殖速度を測定したところ、MT8148 株と比較して TH 培地中における $\Delta I520$ 株の増殖速度は遅延していた (図 3)。また、 $\Delta I520$ 株の最終的な吸光度も MT8148 株と比較して低下しており、増殖能の低下が認められた。

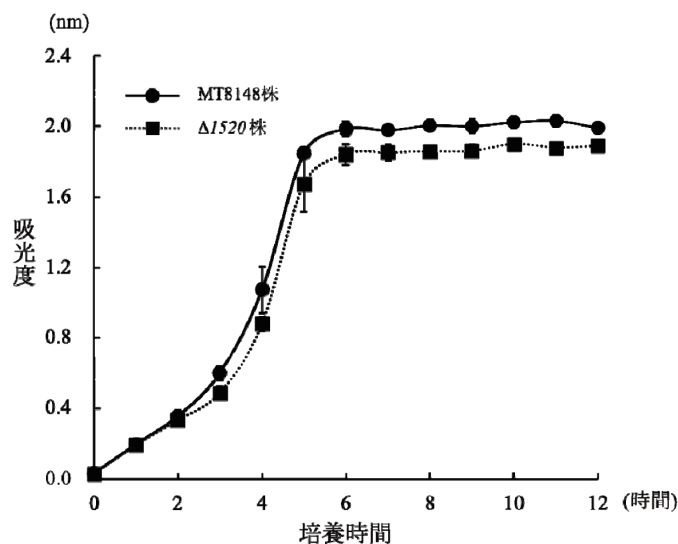


図 3 MT8148 株および $\Delta I520$ 株の増殖曲線

3. バイオフィーム形成量の比較

バイオフィーム形成量を測定したところ、MT8148 株と比較して $\Delta I520$ 株においてバイオフィーム形成量が有意に低下していることが示された (図 4)。

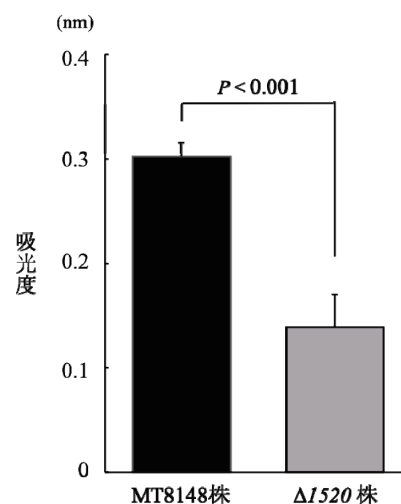


図 4 MT8148 株および $\Delta I520$ 株のバイオフィーム形成量の比較

4. バイオフィーム構造の観察

MT8148 株では、均一なバイオフィームが形成されていたが、 $\Delta I520$ 株のバイオフィーム構造は菌量が少なくなっており、そのため密度が低下していた (図 5)。さらに形成されたバイオフィームの密度を Image J にて断面の赤色面積を数値化し評価した場合、MT8148 株と比較して、 $\Delta I520$ 株の場合では有意に密度が低下していた (図 6)。

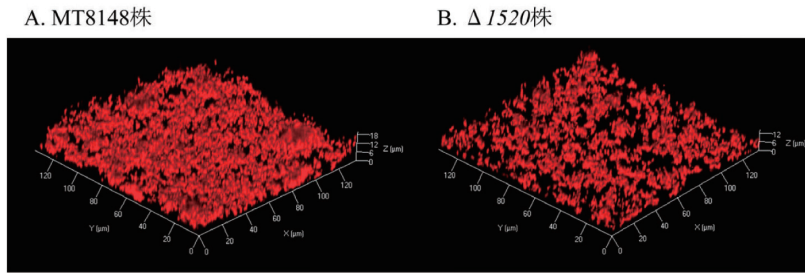


図5 3次元的なバイオフィーム構造の比較

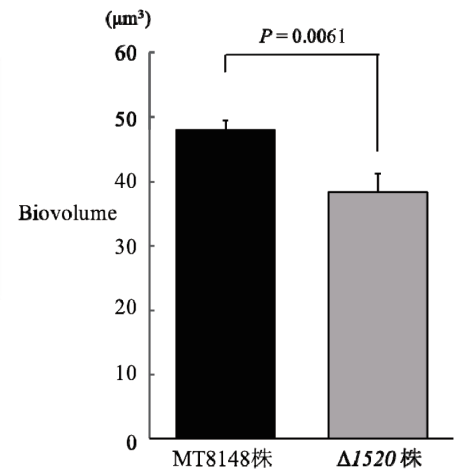


図6 バイオフィームの密度の比較

考 察

以上の結果より、*SMU_1520* の欠失は、菌の増殖速度が遅延していることから、*SMU_1520* が細菌の分裂に関与している可能性が示唆される。さらに菌の増殖能に影響を与えることから、*SMU_1520* は、ABC 膜輸送体の機能の1つに必要な栄養素の取り込みがあるため、何らかの栄養素の輸送を行っている可能性が考えられる。また、*SMU_1520* の欠失によりバイオフィーム形成量の低下およびバイオフィーム構造に変化が起きたことから、*SMU_1520* はバイオフィーム形成にも関与していることが示された。今後は、*SMU_1520* のバイオフィーム形成にどのように関連があるか、また細胞内への特定の栄養素の取り込みなどを検討する予定である。これらことから、ABC 膜輸送体の機能を分析し、最終的には ABC 膜輸送体が関わる *S. mutans* のシグナル伝達システムの詳細なメカニズムを解明し、バイオフィームを制御する方法の確立に繋がりたいと考えている。

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

第 68 回 JADR 総会・学術大会 発表予定