

研究者：浅海 春華

(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：Streptococcus mutans のバイオフィルム形成に関連する新たな病原タンパクの解析

目的：

口腔内では、様々な細菌種による高密度の微生物叢（フローラ）が存在し、齲蝕の原因であるデンタルプラークはバイオフィルムと呼ばれ、口腔フローラの一つである。口腔バイオフィルム形成において主要な役割を果たす代表的な細菌として齲蝕病原性細菌 *Streptococcus mutans* が挙げられる。*S. mutans* はグラム陽性通性嫌気性細菌であり、この菌は自ら産生するグルカン合成酵素によってスクロースから粘着性のグルカンを合成し、歯面に強固なバイオフィルムを形成する。さらに菌が形成したバイオフィルム中でスクロースを代謝し酸を産生することにより歯の表面が脱灰し、齲蝕は発症する。*S. mutans* のバイオフィルム形成は、クオラムセンシングと呼ばれる細胞-細胞間情報伝達機構によって制御されている。この機構により細菌が物質の産生をコントロールし、バイオフィルムが高い病原性や薬剤耐性を持つこととなる。グラム陽性細菌のクオラムセンシングの主要タンパクはほとんどが膜タンパクであり、そのうち ABC トランスポーターを始めとする膜トランスポーターが薬剤耐性の獲得に重要な役割を示していることが報告されている。しかしながら、これら膜トランスポーターについての全容は明らかにされていない。そのため、本研究では、分子生物学的手法を用いて、クオラムセンシングに関連する膜タンパクのスクリーニングを行った。

対象および方法：

1. RNA シーケシング解析

供試菌として日本人小児由来の *S. mutans* MT8148 株（血清型 c）を実験に用いた。供試菌を、1% スクロース含有 Todd Hewitt 液体培地に播種した後、6 穴細胞培養用マルチウェルプレートに分注し、37℃で24時間培養した。その後、形成されたバイオフィルムをセルスクレーパーにて剥離し 3000 rpm、10 分、4℃にて遠心分離し、バイオフィルム形成菌および浮遊菌を採取した。リン酸緩衝生理食塩水にて懸濁後、RNA 抽出を行った。精製した RNA の断片化を行い、mRNA から cDNA ライブラリーを作製した。ディープシーケンシングを行い、*S. mutans* UA159 株の既知の配列をもとにしたマッピングにより、遺伝子の発現状況を確認した。

2. ABC トランスポーター関連遺伝子のオペロン形成

供試菌を対数増殖基まで培養し、RNA 抽出を行い、mRNA から cDNA を合成した。得られた cDNA を鋳型として、SMU_919 遺伝子から SMU_925 遺伝子の各プライマー、SMU_1091 遺伝子から SMU_1098 遺伝子の各プライマーを使用し、PCR を行った。得られた PCR 産物を使用し、アガロース電気泳動を行い、各 ABC トランスポーター関連遺伝子の発現を確認した。

結果：

1. RNA シーケシング解析

バイオフィーム形成菌と浮遊菌の遺伝子の発現量を比較したところ、バイオフィーム形成菌では、ABC トランスポーターやホストトランスフェラーゼシステム関連遺伝子の発現量の上昇が認められた（表1）。ABC トランスポーター遺伝子の発現は上昇した全遺伝子の 8.1 % であった。加えて 2 成分調節因子の関連遺伝子である *comC* 遺伝子の発現量が大きく上昇していた。一方で浮遊菌においては、リン酸化酵素の発現量が上昇していた（表2）。

表1 MT8148 株のバイオフィーム形成菌と比較し、浮遊菌において発現が減少した主な遺伝子

遺伝子名	名称	機能	発現抑制量 (倍)
<i>comC</i>	Competence stimulating peptide	受容能刺激ペプチド	-395.171
<i>SMU_1094</i>	ABC transporter ATP-binding protein	ABC 膜輸送体、DNA の取り込み	-2.281
<i>SMU_922</i>	ABC transporter ATP-binding protein	ABC 膜輸送体、DNA の取り込み	-2.135
<i>SMU_872</i>	PTS system fructose-specific transporter subunit IIABC	フルクトースの細胞内への取り込み	-3.602
<i>mtlA2</i>	PTS system mannitol-specific transporter subunit IIA	マンニトールの細胞内への取り込み	-3.075

表2 MT8148 株のバイオフィーム形成菌と比較し、浮遊菌において発現が増加した主な遺伝子

遺伝子名	名称	機能	発現抑制量 (倍)
<i>SMU_1299c</i>	acetate kinase	リン酸基転移酵素	18.725
<i>SMU_1494</i>	tagatose-6-phosphate kinase	タガトース -6- リン酸の加水分解酵素	2.018

2. *SMU_922* 遺伝子、*SMU_1094* 遺伝子のオペロン形成

バイオフィーム形成菌において発現量が上昇した遺伝子の中でも、ABC トランスポーター関連遺伝子と推測される *SMU_922* 遺伝子、*SMU_1094* 遺伝子の発現が大きく上昇していることが分かった。そのため、それぞれの遺伝子上流と下流の遺伝子を含め、PCR アッセイを行ったところ、*SMU_921* 遺伝子、*SMU_922* 遺伝子、*SMU_923* 遺伝子がオペロンを形成し（図1）、*SMU_1095* 遺伝子、*SMU_1096* 遺伝子、*SMU_1097* 遺伝子がオペロンを形成していることが確認された（図2）。



図1 *SMU_921* - *SMU_932* 遺伝子のオペロン



図2 *SMU_1095* - *SMU_1097* 遺伝子のオペロン

考 察：

浮遊菌と比較して、バイオフィルム形成菌において *comC* 遺伝子の活性が高かったことは、*S. mutans* のシグナル伝達システムの1つである2成分調節因子システムが機能することにより、抗菌薬耐性獲得に関与している可能性が示された。また、今回スクリーニングされた遺伝子のうち *SMU_921-SMU_923* と *SMU_1095-SMU_1097* がそれぞれオペロンを形成していることから、これらが何らかの機能を持つ可能性があることが示唆された。今後は抽出した ABC トランスポーター遺伝子の機能解析を進めていくことにより、これらの遺伝子がバイオフィルム形成および抗菌薬耐性メカニズムにどのような役割を担っているかを解明し、バイオフィルムの破壊および再形成を抑制するための新たな方法の発見を目指していく予定である。

成果発表： (予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

- ・第61回日本小児歯科学会大会 発表予定