

論 文 要 旨

Association of CiaRH with the resistance of *Streptococcus mutans* against antimicrobial peptides in biofilm

Streptococcus mutans における CiaRH を介した
バイオフィルム中での抗菌性ペプチド耐性メカニズム

松田 悠佑

【序論および目的】

口腔内細菌にとって環境適応は生存する上で非常に重要である。細菌がもつ二成分制御系 (TCS) は環境適応に重要であることが指摘されている。う蝕原因菌のひとつである *S. mutans* では、これまでに 15 組の TCS が存在することが明らかになっているが、多くの機能とメカニズムが未解明である。私は口腔内の免疫因子の一つである抗菌性ペプチドに対する TCS を介した適応メカニズムの解析を行ってきた。本研究の目的は、*S. mutans* の口腔内環境適応機構の解明、特に生体の先天性免疫の一つである抗菌性ペプチド耐性における TCS の役割の解明することである。

【材料および方法】

S. mutans 二株の、TCS のひとつ CiaRH、あるいは他菌において抗菌性ペプチド耐性に関与が指摘されている Dlt の欠損株を作成した。これらを用い、プランクトニック、あるいはバイオフィルムセルにおける *ciaR* と *dltC* の RNA 発現量および抗菌性ペプチドを作用させた際の感受性の違いを比較・検討した。RNA の発現解析には逆転写後 cDNA の定量をリアルタイム PCR を用いて行った。バイオフィルム中の抗菌性ペプチド感受性については共焦点顕微鏡を用いて観察を行った。

【結 果】

遺伝子発現について調べた結果、*ciaR* はバイオフィルム中で発現が増加した。この際 *dlt* にも増加傾向が認められた。そこで、バイオフィルム中における遺伝子発現を CiaRH 欠損株を用いて調べたところ *dltC* の発現が野生株に比べ発現が低下した。

バイオフィルム中での抗菌性ペプチド感受性について *dltC* および *ciaRH* 欠損株を用いて調べた結果、*ciaRH* 欠損株は野生株に比べ高い感受性を示した。また、*dltC* 欠損株についてはさらに高い感受性を示した。

【結論及び考察】

TCS は刺激因子により活性化され、ターゲット遺伝子を活性化させ、生じるタンパクにより環境に適応を示す。私は TCS のひとつである CiaRH がバイオフィルム中で高発現を示すことにより、Dlt が発現し、抗菌性ペプチドに対する耐性を示すのではないかと考え、検証を行った。CiaRH や Dlt の欠損株を用い、遺伝子発現や抗菌性ペプチド感受性を調べることにより、バイオフィルム中における抗菌

性ペプチド感受性が CiaRH と Dlt によりレギュレートされていることがわかった。

このことは、*S. mutans* が示す抗菌性ペプチドに対する耐性がバイオフィーム形成という物理的な耐性だけでなく、バイオフィーム形成による刺激が引き起こす分子生物学的な反応によりさらに高い耐性を示すことが本研究により示唆された。

Molecular Oral Microbiology (in press)

論文審査の要旨

報告番号	総研第 158号	学位申請者	松田 悠佑
審査委員	主査	鳥居 光男	学位
	副査	於保 孝彦	副査
	副査	松口 徹也	副査
			博士 (歯学)
			佐藤 友昭
			八木 孝和

Association of CiaRH with the resistance of *Streptococcus mutans* against antimicrobial peptides in biofilm

(*Streptococcus mutans* における CiaRH を介したバイオフィーム中での抗菌性ペプチド耐性メカニズム)

細菌が持つ二成分制御系 (TCS) は環境適応に重要であることが指摘されている。口腔内常在菌で、う蝕原因菌の1つである *S. mutans* では、これまでに 15 組の TCS が存在することが明らかになっているが、多くの機能とメカニズムが未解明である。本研究の目的は、*S. mutans* の口腔内環境適応機構の解明、特に生体の先天性免疫の1つである抗菌性ペプチドに対する耐性に、TCS がどのような役割を果たすかを解析することである。*S. mutans* UA159 株および NCTC10449 株において TCS の1つである CiaRH、および他菌において抗菌性ペプチド耐性に関与が指摘されている Dlt の欠損株を作成した。バイオフィームにおける *ciaRH* 欠損による *dltC* の RNA 発現量への影響を定量性 PCR を用いて検討した。また、組換え CiaR を作成し、CiaR が *dlt* 遺伝子に対し直接転写調節しているかを調べるために 5'RACE 法による *dlt* 転写開始点の同定とゲルシフトアッセイによる CiaR-*dlt* プロモーター領域フラグメントとの結合の検証を行った。さらに、*ciaRH* 欠損株あるいは *dltC* 欠損株におけるバイオフィーム中での抗菌性ペプチド感受性を共焦点レーザー顕微鏡を用いて比較・検討した。

その結果、以下の知見が明らかになった。

1. 2 種類の *ciaRH* 欠損株におけるバイオフィーム中の *dlt* の遺伝子発現は野生株に比べ低下した。このことから、*dlt* は CiaRH により調節されていることが示唆された。
2. *dlt* 遺伝子の転写開始点、プロモーター領域を明らかにし、DNA 上の CiaR 結合部位を同定した。
3. CiaR が実際に *dlt* 遺伝子のプロモーター領域の同定された領域に結合することを明らかにした。このことから、CiaR が *dlt* 遺伝子に対し直接転写調節していることが示唆された。
4. *ciaRH* 欠損株は野生株に比べ抗菌性ペプチドに対し高い感受性を示した。また、*dltC* 欠損株についてはさらに高い感受性を示した。このことから、バイオフィーム中における CiaRH および Dlt を介した抗菌性ペプチド耐性メカニズムが明らかになった。

TCS の1つである CiaRH はバイオフィーム中で *dlt* 遺伝子の発現を直接転写調節することにより増加させ、抗菌性ペプチドに対する耐性を示していると思われる。このことは、*S. mutans* が抗菌性ペプチドに対し、バイオフィーム形成という物理的な機序だけでなく、バイオフィーム中での CiaRH および Dlt という分子生物学的な機序を介して、さらに高い耐性を示すことを示唆している。

本研究は、う蝕原因菌である *S. mutans* が口腔内に定着するための環境適応機構の解明につながる重要な研究である。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 158号		学位申請者	松田 悠佑
審査委員	主査	鳥居 光男	学位	博士 (歯学)
	副査	於保 孝彦	副査	佐藤 友昭
	副査	松口 徹也	副査	八木 孝和

主査および副査の5名は、平成24年1月11日、学位申請者 松田 悠佑 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 細菌表層の構造、特にグラム陽性、陰性菌における抗菌性ペプチドの殺菌効果で差異はないのか?

(回答) 抗菌性ペプチドには数多くの種類があり、グラム陽性、陰性の違いに対して殺菌効果に違いがあることが指摘されている。これは、表層の構造の差異によるものだと考えられる。

質問2) 抗菌性ペプチドには多くの種類があると言っているが、結果で示した2つのTCSはすべての抗菌性ペプチドの感受性に影響を与えるのか?

(回答) 2つのTCS欠損株を用いた感受性試験の結果では、本研究で用いたすべての抗菌性ペプチドで感受性に変化があった。他の抗菌性ペプチドを用いた場合でもTCSによる感受性への影響があると考えられる。

質問3) 抗菌性ペプチドは種類により作用機序に違いはあるのか?

(回答) 今回用いた抗菌性ペプチド (+に帯電しているもの) に関しては作用機序は同じだと考えられている。

質問4) スクロース依存型のバイオフィームにおいてはCiaRHとの関係を本研究で指摘しているが、スクロース非依存型のバイオフィームにおいてはどうか?

(回答) 本研究ではスクロース依存型のバイオフィームのみ用いているため、本研究からは分からないが、カルシウム依存型のバイオフィーム形成について過去に報告があり、それにはCiaXを含むCiaRHの関与が指摘されている。

質問5) 抗菌性ペプチドを4種類用いているが、生体中の濃度、チャージの強さ、殺菌力に差はあるか?

(回答) 生体中における濃度は、抗菌性ペプチドの種類と生体中の部位によって異なる。チャージの強さについても、種類により異なる。殺菌力についても抗菌性ペプチドにより、グラム陽性、陰性への殺菌効果の違いなどがあり、差がある。

質問6) *dlt* に関しては *dlt* オペロン (*dltXABCD*) の中で *dltC* の遺伝子発現を調べているが、その理由を答えよ。

(回答) 感受性試験に用いた *dlt* の欠損株が *dltC* 欠損株であったため。上流のプロモーター領域、あるいは *dltA* についても遺伝子発現を調べたが、ほぼ同様の結果が得られた。

最終試験の結果の要旨

質問7) *ciaR* コンプリメント株では遺伝子発現の回復が限定的であったが、理由を説明せよ。

(回答) コンプリメント株の *ciaR* のプロモーター (*ff*, スペクチノマイシン耐性遺伝子) による遺伝子発現が野生株バイオフィーム中での *ciaR* の発現よりも低かったためだと考えられる。

質問8) 感受性試験に菌体の生死を染め分ける試薬を用いていたが、この原理を説明せよ。

(回答) 試薬は二種類の核酸を染める色素で構成されており、一つは膜透過性の緑色の色素、もう一つは膜非透過性の赤い色素からなる。緑の色素は膜透過性であるため、すべての菌体が染まる。赤い色素は細胞膜に穴が開いている場合(死菌体)のみ染まる。

質問9) 積立棒グラフの見方を説明し、野生株での形態の特徴を説明せよ。

(回答) 各水平面における生菌体、死菌体の面積比をパーセンテージ表記したものを底面から上面にむかって並べたグラフである。野生株では底面付近における菌体密度が低いという特徴があった。

質問10) *dltC* の欠損株では抗菌性ペプチド非作用時においても死菌体が多く見られるが、この理由について説明せよ。

(回答) *dlt* の欠損株では耐酸性の低下などがすでに指摘されている。バイオフィーム中では特に pH が酸性側に偏る傾向があり、死菌体の増加につながった可能性がある。

質問11) コンプリメント株での *dlt* の遺伝子発現が限定的であるが、その理由を説明せよ。

(回答) *ciaR* の遺伝子発現が限定的であることが理由だと思われる。

質問12) CiaRH はもともと何を認識する TCS なのか?

(回答) 刺激因子の同定は困難であり、*S.mutans* の CiaRH では、カルシウム以外、ほとんど未解析である。他の菌、特に黄色ブドウ球菌においては CiaRH と相溶性の高い TCS が2価の陽イオンや抗菌性ペプチドについて認識することが指摘されている。ただし、以前行った実験より、*S.mutans* の CiaRH は抗菌性ペプチドを認識していないと考えている。

質問13) CiaR のリン酸化はせずともバンドのシフトは起こるか?

(回答) 大腸菌中でも一部がリン酸化している可能性があり、シフトが起こりうる。

質問14) 過去の報告における LTA に結合したアラニンの定量方法を説明せよ。

(回答) 予め放射性同位元素で標識したアラニンと精製した LTA との結合を調べる方法がある。また、*dlt* 欠損株におけるアラニンの結合の有無を核磁気共鳴法にて調べた報告もある。

質問15) この研究の将来展望はどのようなものか? 臨床応用をするならばどのような手法か?

(回答) 細菌特有である TCS を標的にすることで、ヒトへの副作用を最小限にしつつ、効果的に菌体にのみ影響を与えることができる点を考慮し臨床応用することは可能だと考えられる。

質問16) CiaX はセンサーとして働いているのか?

(回答) CiaX はカルシウムに結合し、カルシウムの認識をサポートするタンパクであり、センサーではない。CiaH は膜に陥入しており、菌体表層に出た部位がセンサーとして働く。カルシウム認識の際には CiaX とカルシウムが結合したものが全体として CiaH のセンサー部位に結合していると考えられている。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。