

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592746

研究課題名(和文) バイオフィルムを制御する自己溶菌酵素の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and characterization of biofilm regulatory autolysins

研究代表者

加藤 裕久 (KATO, Hirohisa)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：60152740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、口腔レンサ球菌の自己溶菌酵素をコードする遺伝子を同定した。自己溶菌酵素 AtIAはI型コラーゲンとの結合はわずかであること、デキストランと結合しないことがわかった。Streptococcus criceti AtIAでは655位と747位のアスパラギン酸残基が活性に重要であることが判明した。また、Streptococcus oralis ATCC 10557は4つの試験した自己溶菌酵素に対して溶菌抵抗性を示すことがわかった。

研究成果の概要(英文)：In this study, autolysin genes have been identified from oral streptococci. We found that AtIA slightly bound to type I collagen and did not bind to dextran. Furthermore, Asp655 and Asp747 were critical for lytic activity in Streptococcus criceti AtIA. Finally, the four studied autolysins failed to lyse cells of Streptococcus oralis ATCC 10557.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：自己溶菌酵素 口腔レンサ球菌 遺伝子同定

1. 研究開始当初の背景

(1) ミュータンスレンサ球菌での解析状況
 ヒト齲蝕原性細菌である *Streptococcus mutans* の主要な自己溶菌酵素をコードする遺伝子 *atIA* (*ami*) が同定されていた [Shibata et al. (2005); Yoshimura et al. (2006)]。この自己溶菌酵素 AtIA は溶菌のみならず、バイオフィーム形成にも関与する。他方、*Streptococcus sobrinus* AtIG、*Streptococcus downei* AtIH について報告した [Yamada et al. (2009); Tamura et al. (2009)]。しかしながら、口腔レンサ球菌の自己溶菌酵素については未解明であった。

(2) 溶菌活性に関与するアミノ酸残基
S. mutans AtIA では 869 位のアスパラギン酸残基が溶菌活性に関与することがわかってきた [Yoshimura et al. (2006)]。

(3) 生菌を基質としたときの自己溶菌酵素の基質特異性
S. mutans の AtIA は、*S. mutans*、*S. sobrinus* を選択的に溶菌できるが、*Streptococcus sanguinis*、*Streptococcus mitis*、*Streptococcus salivarius* に対し溶菌できないことが報告されていた [Yoshimura et al. (2006)]。

2. 研究の目的

- (1) 自己溶菌酵素をコードする遺伝子を探索し、同定する。
- (2) 自己溶菌酵素の立体構造を予測する。
- (3) 自己溶菌酵素の機能を解析する。
- (4) 自己溶菌酵素に影響する因子を探索する。
- (5) 自己溶菌酵素の溶菌特性を調べる。

3. 研究の方法

(1) 自己溶菌酵素遺伝子の探索と塩基配列の同定
 ミュータンスレンサ球菌に属する 7 菌株に対し、それぞれの自己溶菌酵素特異的プライマーで増幅し、プライマーウォーキング法で塩基配列を同定した。また、口腔レンサ球菌に属する 3 菌株についても縮重 PCR 法で自己溶菌酵素遺伝子を増幅することを試みた。

(2) 自己溶菌酵素の立体構造予測
Streptococcus criceti の AtIA の酵素ドメインをホモロジーモデリング法を用いコンピューターで予測した。

(3) 自己溶菌酵素の機能解析
 デキストラン結合能の評価 組換えタンパク質を発現させ、Ni-NTA HisSorb strips (Qiagen) に固定化した。タンパク質とピオチ

ン標識デキストランとの結合は、ABC ELISA 法で評価した。すなわち、ペルオキシダーゼ標識アビジン、ペルオキシダーゼの基質である TMB Microwell (KPL) と反応させ、塩酸で反応を停止した。このときの、450 nm の吸光度を測定した。

コラーゲン結合能の評価 と同様に、I 型コラーゲンとの結合を抗コラーゲン抗体、ペルオキシダーゼ標識 2 次抗体で評価した。

(4) 自己溶菌酵素に影響する因子の探索
 挿入配列はゲノムの再構成や遺伝子発現に影響することが知られているので、*S. criceti* の挿入配列 *ISScr1* に着目し、サザンハイブリダイゼーション法で E49 株のコピー数を、PCR 法およびプラスミドライブラリーを作製し、ゲノム上の挿入箇所の同定を行った。

自己溶菌酵素はバイオフィーム形成に関与するが、グルカン結合タンパク質も関与することが考えられたので、DbIB のバイオフィーム形成に与える影響を *S. mutans* で調べた。

(5) ザイモグラフィーによる溶菌特異性の検討
 培養した菌体を懸濁したポリアクリルアミドゲルを作製し、ザイモグラフィーを 37 °C で行い、組換えタンパク質の溶菌活性と基質特異性を調べた。

4. 研究成果

(1) 研究の主な成果
 自己溶菌酵素遺伝子塩基配列の探索と同定
 ミュータンスレンサ球菌に属する 7 菌株(血清型 *a*, *b*, *c/e/f*, *d*, *g*) について自己溶菌酵素遺伝子の塩基配列を同定した(表 1)。推定されるアミノ酸配列を解析すると、自己溶菌酵素は 855-979 残基からなるタンパク質で、2 つのドメインから構成されることがわかった。すなわち、タンパク質の中央部分には細胞壁結合ドメインと推定される領域があり、

表 1 同定した自己溶菌酵素遺伝子

菌株	アミノ酸 アミノ酸		番号 ^b
	残基数	一致率 (%) ^a	
<i>Streptococcus criceti</i> OMZ 61	855	40.9	AB759514
<i>Streptococcus rattii</i> BHT	963	59.7	AB820804
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	979	99.1	AB663344
<i>Streptococcus mutans</i> LM7	979	99.2	AB930283
<i>Streptococcus mutans</i> OMZ 175	979	98.9	AB930284
<i>Streptococcus sobrinus</i> SL1	863	39.9	AB723987
<i>Streptococcus sobrinus</i> OMZ 65	863	39.9	AB765628

^a AtIA (*Streptococcus mutans* UA159 株) を対照とした場合

^b DDBJ/EMBL/GenBank データベースのアクセッション番号

15 残基の反復配列がみられた。例えば、*S. rattii* (血清型 *b*) の At1B では 5 個の反復配列が認められた。またカルボキシル末端側には酵素ドメインがみられ、202–205 残基から構成されていることがわかった。アミノ酸一致率が低い *S. criceti*、*S. sobrinus* では細胞壁結合領域の長さが *S. mutans* に比較して短いことが原因であると考えられた。一方、*S. mutans* At1A のアミノ酸配列はこれら *S. mutans* の菌株で高度に保存されており、保存度の低い領域の有無についても検討したが、変異が集中している領域は認められなかった。一方、*S. mutans* の菌株についてプロモーターが結合すると予想される領域を調べてみると、菌株によっては、一部塩基配列が欠失しているものも認められた。この所見は、菌株によって、自己溶菌酵素の発現に違いが生じる可能性を示唆している。

Streptococcus oralis ATCC 10557 から縮重プライマーで増幅された PCR 産物が *N*-acetylmuramoyl-L-alanine amidase の一部であることがわかった(図 1)。本酵素は *N*-アセチルムラミン酸と L-アラニンの間の切断に参与すると考えられた。しかしながら、At1A 様のムラミダーゼを同定することは縮重 PCR 法ではできなかった。

```
FDKAYKSIWFLKEDGHYANQEWI GAYYLKSGGYMAKSEW IYDNADKARYYLDNNGHYVSG 60
TYKIDGKEHLFQKYQWII SEVSTEGGFTKGLYSNT IFLDPGHGRDGSAGFYNNVAEKDLN 120
MQIYRKLRTKLEELGYKVLTSRSDSDI DVDFVTERSVMVKNKNSDIFISIHFNATGNTYSK 180
ASGIQTYSYSDEPDVPTK 198
```

図 1 *Streptococcus oralis* ATCC 10557 から縮重プライマーで増幅された部分の推定アミノ酸配列
Amidase_3 (Pfam ID PF01520.13) モチーフに相当する部分 (96–188 残基) を下線で示す。

口腔レンサ球菌では、*Streptococcus orisratti* ATCC 700640、*Streptococcus mitis* ATCC 49456、*Streptococcus anginosus* NCTC 10713 についても縮重プライマーを用い PCR を行ったが、自己溶菌酵素をコードする遺伝子を同定することができなかった。

自己溶菌酵素の機能解析

At1A のデキストラン結合能を評価した結果、検出限界以下であった。対照として、glucan-binding protein D (GbpD) を用いたが、GbpD はデキストランと結合することがわかった。また、At1A は I 型コラーゲンとの結合もわずかであることが分かった。これらの結果から、At1A はデキストランと I 型コラーゲンとの結合には寄与していないことが示唆された。

S. criceti at1A の同定と機能解析

S. criceti E49 株、HS-6 株に加えて、OMZ 61 株で at1A を同定した。塩基配列の解析の結果、3 株の at1A 遺伝子の塩基配列は同一であった。OMZ 61 株はエリスロマイシン耐性を示すので [Tamura et al. (2012)], 自己溶菌酵素と薬剤耐性との間に何らかの関与があるという仮説は否定できるものと考えられた。*S. criceti* での遺伝子操作が困難なことから at1A 欠失による機能変化を解明するには至らなかった。そこで、アミノ酸配列の保存度から酵素の立体構造についてコンピューター解析することとした。

S. criceti の At1A の酵素ドメインは *Streptomyces coelicolor* の cellosyl と立体構造の類似性を示した。タンパク質の立体構造予測の結果から酵素活性に寄与するアミノ酸残基を 4 つ同定した。この 4 つのアミノ酸残基は表 1 の 7 つの At1A (ホモログ) すべてで保存されていた。それぞれのアミノ酸残基をアラニンに置換した変異体を構築し、ザイモグラフィー法で変異体の溶菌活性を調べたところ、655 位と 747 位のアスパラギン酸残基が活性に重要であることが判明し、831 位のトリプトファン残基と 849 位のアスパラギン酸残基も活性に参与することが示唆された。

S. criceti E49 株では挿入配列 ISScr1 が少なくとも 3 コピーあることが判明し、挿入箇所の周辺域を同定することができた。その結果、周辺域にグリコシドヒドロラーゼはみられなかったため、溶菌活性に対する ISScr1 の関与は少ないことが示唆された。

Db1B をコードする遺伝子をもった菌株はデキストラン添加により容易に凝集した。また、グルコースとマルトース添加培地でバイオフィーム量が増加し、スクロース添加培地では逆に減少することがわかった。

基質特異性をザイモグラフィーで検討したところ、*S. criceti*、*S. mutans*、*S. sobrinus*、*S. downei* それぞれの自己溶菌酵素組換え体はこれら 4 菌種を溶菌することがバンドとして観察できた。この結果から、*S. mutans* の At1A によって、他のミュータンスレンサ球菌も溶菌できることが示唆された。しかしながら、*S. oralis* ATCC 10557 を基質とした場合、4 つすべてで溶菌抵抗性を示した。このことから、*S. oralis* の自己溶菌酵素と *S. mutans* の At1A には何らかの機能的な違いがあることが示唆された。

(2) 得られた成果の位置づけとインパクト

本研究成果の自己溶菌酵素遺伝子の同定は、細菌の全ゲノム配列の解読が一般的となった中で、インパクトは弱いことは否めない。しかしながら、多くの自己溶菌酵素の遺伝子情報を解析することは、本酵素の進化生物学的観点から重要であると考えられる。事実、ミュータンスレンサ球菌の自己溶菌酵素は保存されていることが明らかになったことは特記すべきことである。また、ヒトペプチ

ドグリカン認識タンパク質 PGLYRP-2 と同じ酵素活性を示すアミダーゼの一部配列を *S. oralis* で同定できたことは興味深い。

自己溶菌酵素の酵素活性に関与するアミノ酸残基を同定できたことと、溶菌抵抗性を示す菌種を同定できたことは、自己溶菌酵素の阻害剤開発の基礎となることから極めて重要である。

S. mutans AtIA に対し、*S. oralis* が溶菌抵抗性を示したことは、*S. mutans* が口腔内で *S. oralis* と共生していることを支持している。

(3) 今後の展望など

タンパク質の結晶構造解析を行うことで、自己溶菌酵素とペプチドグリカンなどの分子との相互反応の様式を解明することが望まれる。また、細胞壁結合ドメインの立体構造の情報は乏しいので、今後の研究の進展を期待したい。さらに、酵素ドメインの変異株のバイオフィルム形成能を評価することは今後の課題である。自己溶菌酵素に対する阻害剤の開発に向けて、*S. oralis* における阻害様式について解明したい。

S. mutans の血清型 *cl/ef* では、プロモーター領域に違いのある菌株が認められたので、プロモーター活性に違いがあるか否かについて検討する必要がある。

本研究では *S. oralis* のアミダーゼの一部配列を同定できた。今後、*S. oralis* にムラミダーゼがあるか否かについて明らかにする必要がある。

謝辞 *S. mutans* LM7 株、OMZ 175 株を分譲してくださった九州大学山下喜久先生と柴田幸江先生に感謝します。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Tamura H, Yamada A, Kato H. Identification and characterization of an autolysin gene, *atIA*, from *Streptococcus criceti*. J Microbiol. 査読あり, 50(5), (2012), 777-784. DOI:10.1007/s12275-012-2187-1

Tamura H, Yamada A, Kato H. Characterization of *Streptococcus criceti* insertion sequence *ISScr1*. Genes Genet Syst. 査読あり, 87(3), (2012), 153-160. DOI:10.1266/ggs.87.153

〔学会発表〕(計 4 件)

田村 晴希、山田 ありさ、加藤 裕久、*Streptococcus criceti* デキストラン結合レクチン B 遺伝子の *Streptococcus mutans* における解析、第 55 回歯科基礎医学会学術大会、2013 年 9 月 22 日、岡山

田村 晴希、山田 ありさ、加藤 裕久、*Streptococcus criceti* における *Streptococcus sobrinus* デキストラン結合レクチン遺伝子ホモログ *dbIA*, *dbIB* の同定、第 86 回日本薬理学会年会、2013 年 3 月 23 日、福岡

田村 晴希、山田 ありさ、加藤 裕久、*Streptococcus criceti* E49 株の挿入配列 *ISScr1* の挿入部位の同定、第 54 回歯科基礎医学会学術大会、2012 年 9 月 16 日、郡山

田村 晴希、山田 ありさ、加藤 裕久、*Streptococcus criceti* のグルカン結合タンパク質 GbpD の遺伝子解析、第 53 回歯科基礎医学会学術大会、2011 年 10 月 2 日、岐阜

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等 該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 裕久 (KATO, Hirohisa)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号: 6 0 1 5 2 7 4 0

(2) 研究分担者

田村 晴希 (TAMURA, Haruki)
岩手医科大学・歯学部・講師
研究者番号: 3 0 3 1 6 3 9 3

(3) 連携研究者

なし