

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

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 社会環境生命科学専攻  
小児歯科学分野

森川 優子

(平成 27 年 12 月 11 日受付)

## はじめに

膜輸送体は、細菌からヒトに至るさまざまな生物種に普遍的に存在し、病原真菌などから薬剤排出に関連する ABC 膜輸送体遺伝子が発見されている<sup>1)</sup>。これまでに *Escherichia coli* や *Bacillus subtilis* の全ゲノムの 5% は膜輸送体の機能に関与していることが示唆されている<sup>2,3)</sup>。これらの生物は、膜輸送体を介して、栄養素の取り込みや不要物の排出などを行っている<sup>4)</sup>。

口腔内は温度変化、唾液分泌量、唾液 pH、生活習慣、外来物質の侵入などの因子により環境が大きく変化する<sup>5)</sup>。膜輸送体は口腔内細菌がこのような様々な環境の変化に曝露される際に、環境変化によるストレスに応答するために機能することが報告されている<sup>6-10)</sup>。このような種々のストレスによる生育条件の悪化は、菌の生育に大きな影響を及ぼすことから、ストレス応答は細菌において特に重要な細胞防御機構として考えられている<sup>11)</sup>。これらのストレス応答の1つに、膜輸送体が pH やイオン勾配を維持し、微生物の生体恒常性を保つことが知られている<sup>4)</sup>。

グラム陽性細菌 *Streptococcus mutans* は、ヒト齲蝕の主要な病原性細菌であり、口腔内のバイオフィルム（デンタルプラーク）形成において重要な役割を担う

ことが知られている<sup>12)</sup>。*S. mutans* の細胞膜には、多くの膜輸送体が存在し、物質の取り込みに関与し、この菌の生育に大きく関与していることが報告されている<sup>13)</sup>。すでに、*S. mutans* UA159 株のゲノム解析により約 60 種類の ABC 膜輸送体の存在が示唆されており、*S. mutans* における ABC 膜輸送体の機能は、細胞内外に選択的に物質を輸送する機能をもつことが報告されている<sup>13)</sup>。膜輸送体は、①疎水性分子や電荷をもたない小型分子による単純拡散、②濃度勾配と膜をはさんだ電位差（電気化学的勾配）を利用した、濃度勾配に従った輸送（受動輸送）、③電気化学的勾配を利用した、濃度勾配に逆らう方向の輸送（能動輸送）、④アデノシン三リン酸 (ATP) 加水分解で生じるエネルギーを利用した能動輸送を行う ATP 結合カセット輸送体 (ABC 膜輸送体) の 4 種類が報告されている<sup>14)</sup>。ABC 膜輸送体は、分子内にアミノ酸配列のよく保存された ATP 結合領域をもち、ATP 結合ドメイン Nucleotide Binding Domain (NBD) を 1 機能単位あたり 2 つ保持するスーパーファミリーであることが知られている<sup>15)</sup>。その多くは、脂質二重層を貫通する膜貫通ドメイン Membrane Spanning Domain (MSD) を持つ膜タンパク質で、MSD は特異的な物質の透過性と輸送方向に影響していることが報告されている<sup>16)</sup>。*S. mutans* では細胞質内への糖質の取り込

みには、4 個のドメイン (2 個の膜貫通ドメインと 2 個の ATPase サブユニット) を基本構造とする ABC 膜輸送体が関与することが報告されている<sup>17)</sup>。

窒素は、グラム陽性細菌にとって、生育に必要な栄養素であり、様々な形に変えて細胞内に取り込まれている<sup>18)</sup>。アンモニウムから合成される非必須アミノ酸グルタミンは、プリンやピリミジンなどを含む多くの化合物の生合成において窒素源として用いられることが知られている<sup>19-21)</sup>。微生物での細胞内グルタミンやグルタミン酸の濃度は細胞内の窒素代謝に密接に関係していることが報告されている<sup>20,22)</sup>。これら窒素代謝に関連する膜輸送体として、*E. coli* では GlnB, *B. subtilis* では、GlnK が知られており、これらのタンパクに対して、窒素の取り込みだけでなく、グルタミン代謝に関わる酵素活性および遺伝子の発現にも関与していることが示されている<sup>23-25)</sup>。そしてこれらのタンパクに対して、多くの菌において、相同性の高いものの存在が報告されており<sup>26)</sup>, *Staphylococcus aureus* では Amt, *S. mutans* では NrgA がアンモニウムトランスポーターとして知られている<sup>27)</sup>。さらに、*S. mutans* の NrgA は、アンモニウムイオンの取り込みだけでなく、バイオフィーム形成中の菌の生育に関連していることが報告されている<sup>27,28)</sup>。このことから、窒素源の輸送に関連する膜輸送体は、*S. mutans*

のバイオフィルム形成に大きく関与していることが示唆される。しかしながら、これらの膜輸送体とバイオフィルムの関係の詳細はいまだ明らかとなっていない。

本研究では、*S. mutans* の ABC 膜輸送体タンパクの遺伝子に着目し、*S. mutans* UA159 株のゲノム配列から細胞膜輸送に関連するグルタミン ABC 輸送体 (GlnP) をコードしていると推定される遺伝子 *SMu0732* を抽出し、機能解析を行い、バイオフィルム形成への関与を検討した。

## 材料と方法

### 1. 供試菌株と培養条件

用いた細菌およびプラスミドを表 1 に示す。日本人小児の口腔より分離された *S. mutans* MT8148 株を野生株として用いた。*S. mutans* の培養は Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地 (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA), Todd Hewitt (TH) 液体培地 (Becton Dickinson and Company) および Mitis Salivarius (MS) 寒天培地 (Becton Dickinson and Company) を用い、37°C で静置培養した。必要に応じて抗生物質を次の最終濃度で添加した [エリスロマイシン (和光純薬) 10 µg/ml, スペクチノマイシン (和光純薬) 100 µg/ml]。特に記載のない場合は、すべて好気培養とした。*E. coli* DH5α 株 (ニッポンジーン, 東京) の培養は、Luria-Bertani 培地 (和光純薬) を使用し、必要に応じてアンピシリン (和光純薬) 100 µg/ml, カナマイシン (和光純薬) 30 µg/ml あるいはエリスロマイシン (和光純薬) 150 µg/ml となるよう添加した。寒天平板培地の作製には 1.5% (w/v) 寒天 (和光純薬) を添加した。

### 2. 染色体 DNA の抽出

*S. mutans* からの染色体 DNA の抽出には Puregene Yeast/Bact. Kit B (QIAGEN

Sciences, Germantown, MD, USA) を用いた。BHI 液体培地 10 ml 中で 18 時間培養した *S. mutans* 菌体を遠心分離 (3,000 rpm, 10 分, 4°C) により集菌し, 250  $\mu$ l の Glu-TE 緩衝液 (1 M Glucose, 10 mM Tris-HCl, 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), pH 7.0) に再懸濁した。62.5  $\mu$ l の N-acetylmuramidase SG (2.0 mg/ml ; MP Biomedicals) を加え, 37°C で 90 分間反応させた。600  $\mu$ l の Cell Lysis Solution (QIAGEN) を加えて 80°C で 5 分間, 次いで 3  $\mu$ l の RNase A (100 mg /ml ; QIAGEN) を添加して 37°C で 30 分間反応後, Protein Precipitation Solution (QIAGEN) を 200  $\mu$ l 添加した。15,000 rpm で 3 分間遠心して得られた上清に, 600  $\mu$ l のイソプロピルアルコール (ナカライテスク株式会社, 京都) を加え DNA を共沈させ, 70% エタノール (和光純薬) で洗浄した。乾燥後, TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.8) 100  $\mu$ l に溶解し, DNA の濃度を測定した。

### 3. Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

*S. mutans* を TH 液体培地を用い, 37°C で 18 時間培養後, 新鮮な同液体培地に継代し, 波長 600 nm における吸光度が 0.7 になるまで培養した。培養物を 4°C で 5,000 rpm, 15 分間遠心し, 菌体を回収した。得られた菌体を 300  $\mu$ l の UltraPure™ Diethylpyrocarbonate (DEPC) 処理水 (Invitrogen) に懸濁し, Lysing

Matrix B (MP Biomedicals) に菌液を移し、TRI Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を900  $\mu$ l 添加した後、FastPrep (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて菌体を破碎した。破碎菌体を含む懸濁液を遠心し、500  $\mu$ l のクロロホルムを混和させた後、水層中の全 RNA を 300  $\mu$ l のイソプロピルアルコールを用いて沈殿させた。その後、得られた沈殿を75% エタノールにて洗浄し、乾燥後、20  $\mu$ l の DEPC 処理水に溶解させた。RT-PCR を行うため、全 RNA 3  $\mu$ g に RNase-free DNase I (1 unit/ $\mu$ g RNA ; Promega, Madison, WI, USA) を加え、37°C で30分間反応させた。さらに、Random hexamer primers (Promega) および SuperScriptIII (Invitrogen) を用いて cDNA を合成した。cDNA に遺伝子特異的プライマー (表2) を加え、Ampli Taq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) を用い、S1000 Thermal Cycler (Bio-Rad) を使用して反応を行った。PCRのアニーリング温度および伸張反応時間は各プライマーに応じて設定し、これを30回繰り返す PCR 法を行った。増幅産物は TAE 緩衝液 (40 mM Tris, 20 mM 酢酸, 1 mM EDTA, pH 8.0 ; 和光純薬) 中で 1.5% アガロースゲル (Agarose S, ニッポンジーン) を使用し、電気泳動を行った。DNA サイズマーカーには100 bp ラダー (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) と1 kb ラダー (New England

Biolabs) を使用した。泳動用後のゲルは臭化エチジウム (1  $\mu\text{g/ml}$  ; 和光純薬) 溶液で染色後、波長 312 nmの紫外線で DNA のバンドを可視化し検出した。

#### 4. オペロンの解析

##### ① ノーザンブロッティング

MT 8148 株の *glnP* をプライマー GlnP 500-1-F と GlnP 500-1-R (表2) および PCR DIG Probe Synthesis Kit (Roche, Basel, Swiss) を用いた PCR 法で増幅し、ジゴキシゲニン標識 DNA プローブを作製した。

*S. mutans* MT8148 株より抽出した全 RNA 5  $\mu\text{g}$  をローディングバッファー (0.05% bromophenol blue, 50% Formamide, 6.2% Formaldehyde, 10% glycerol, 10×Morpholinopropanesulfonic acid (MOPS) buffer [0.2M MOPS (pH 7.0), 50 mM Sodium acetate, DEPC処理水, 20 mM EDTA] に加えて65°Cで10分間変性させた後、氷中に戻し、泳動用バッファー (1×MOPS) 内で1.2% アガロースゲルを用いて 25 Vの電圧で電気泳動を行った。電気泳動後のゲルは、臭化エチジウムで染色後、中和溶液 (200 mM Sodium acetate) により脱色を行い、波長 312 nm の紫外線で RNA を可視化した。その後SSPE buffer (3 mM NaCl, 173 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 25

mM EDTA, pH7.4 ; 同仁化学, 熊本) を用いて12時間キャピラリーブロット  
ィング法によりナイロンメンブレン (Hybond-N+ ; GE Healthcare, Fairfield,  
CT, USA) に転写を行った。転写後, 0.01N NaOH を用いてアルカリ固定  
を行い, 20×SSC (0.3 M NaCl, 30 mM Sodium Citrate ; ニッポンジ  
ン) で洗浄した。RNA をメンブレンに固定するため, 80°Cで2時間  
ベーキング, 波長 312 nm の紫外線で5分間処理を行った。そして  
上述のジゴキシゲニン標識 DNA プローブを添加し, 55°C, 12時間  
でハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後, 0.1% ラウ  
リル硫酸ナトリウム (SDS; 和光純薬) を添加した SSC で洗浄した。  
さらに洗浄用バッファー (Roche) で15分間, 2回洗浄した。検出用バッ  
ファー (DIG Wash and Block Buffer Set : Roche) で平衡化後, アルカリホス  
ファターゼ化学発光基質 (CDP-Star: Roche) を添加し, メンブレンを20分  
間 X線フィルム (Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film: Roche) に露  
光させ, アルカリホスファターゼ標識抗 DIG 抗体を用いた DIG 標識プロ  
ブの化学発光検出を行った。

## ② PCR assay

PCR には MT8148 株の全 RNA から作製した cDNA と、*SMu0730* から *SMu0733* の各遺伝子間領域を増幅するように設計したオリゴヌクレオチドプライマー 1-F と 1-R, 2-F と 2-R (図 1A, 表 2) を用いた。これらに Ampli Taq Gold® を加え、95°C で 9 分間の反応後、94°C で 30 秒、72°C で 30 秒を 30 回繰り返す反応を行った。ポジティブコントロールとして染色体 DNA, ネガティブコントロールとして、超純水を用いて PCR を行った。

## 5. 形質転換

氷上で融解した *E. coli* DH5 $\alpha$  コンピートメントセル 100  $\mu$ l とライゲーション反応液 10  $\mu$ l をチューブに入れて、氷中で 30 分間静置した。42°C で 40 秒間湯浴し、直ちに氷中に戻した。SOC 液体培地 (2% Triptone, 0.5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 和光純薬, 20 mM Sucrose ; ナカライテスク) 400  $\mu$ l を加え、37°C で 1 時間震盪培養した。選択マーカーに用いた抗生物質含有 LB 寒天培地に播種し、37°C で一夜培養した。

## 6. *glnP* 挿入変異株の作製

*S. mutans* UA159 株の *glnP* (Accession Number: 1028188) 全塩基配列をもとにオリゴヌクレオチドプライマー GlnP2-F と GlnP2-R (表 2) を設計した。Ampli

Taq Gold<sup>®</sup> を加え、95°Cで9分間の反応後、94°Cで30秒、48°Cで30秒、72°Cで30秒を30回繰り返す PCR 法を行った。増幅した PCR 産物にフェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール (PCI ; 50% (v/v) トリス飽和フェノール, 48% (v/v) クロロホルム, 2% (v/v) イソアミルアルコール) を等量加え、攪拌後に水層を回収した。これを2回繰り返した後、水層に10分の1量の3M酢酸ナトリウム (pH 5.2) と2.5倍量の純エタノールを加えてDNAを共沈させた。70%エタノール中で3回洗浄後、TEに溶解した。精製したDNA断片をpGEM-T Vector (Promega) にライゲーション後、形質転換を行い、プラスミド pYM1 を作製した。また、pKN100<sup>29)</sup> を制限酵素 *EcoRI* で消化して切り出すことで得られたエリスロマイシン耐性遺伝子カセットを、*EcoRI* で切断したプラスミド pYM1 に挿入することで、SMu0732 にエリスロマイシン耐性遺伝子が挿入されたプラスミド pYM2 を作製した。*glnP* 挿入変異株は、Lindler and Macrina<sup>30)</sup> の方法に準じて作製した。プラスミド pYM2 を制限酵素 *NcoI* で切断後、フェノール・クロロホルム処理とエタノール沈殿を行った。馬血清 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を10%含むTH液体培地 (Becton Dickinson) で *S. mutans* MT8148 株を2時間培養後、1本鎖に処理した pYM2 を加え、さらに1時間培養した。菌体を回収後、

エリスロマイシン (10 µg/ml) 含有 MS 寒天培地に塗抹し、2 日間嫌氣的に培養し、コロニーを得た。得られたコロニーを PCR 法により、ゲノム上の *glnP* がエリスロマイシン耐性遺伝子の挿入により破壊されていることを確認し、この株を GEMR 株とした。

## 7. 相補株の作製

*S. mutans* MT8148 株からプライマー *glnP-compl.sph1-F* と *glnP-compl.sal1-R* (表 2) を用いて増幅した PCR 産物を *Sph I* ならびに *Sal I* で消化し、大腸菌およびレンサ球菌で増幅可能なシャトルベクター pDL278<sup>31)</sup> にライゲーションし、*glnP* が発現する pYM3 を作製した。Lindler and Macrina<sup>30)</sup> の方法に準じて GEMR 株に pYM3 を形質導入することで相補株 comp-GEMR 株を作製した。

## 8. MT8148 株, GEMR 株および comp-GEMR 株の増殖速度

MT8148 株, GEMR 株および comp-GEMR 株を TH 液体培地で 37°C, 18 時間培養した菌液 100 µl を、最終濃度 10 mM になるようにグルタミンを添加した TH 液体培地および無添加の TH 液体培地 10 ml に継代培養した。可視分光光度計 (Novaspec plus ; GE Healthcare) を用いて、菌液の濁度を波長 570 nm で 1 時間毎に測定した。

## 9. リアルタイム PCR による定量的遺伝子解析

MT8148 株, GEMR 株および comp-GEMR 株を TH 液体培地で培養後, 全 RNA を回収し cDNA を作製した。また必要に応じて, グルタミン (10 mM) を添加した。転写産物の定量には, StepOne™ (Applied Biosystems®, Foster City, CA, USA) を用い SYBR Green PCR protocol に従って行なった。用いたプライマーは表 2 に示すとおりである。目的遺伝子の発現量は, 16S rRNA を内部標準として補正した。

### 10. 蛍光プローブによる細胞膜輸送の解析

MT8148 株, GEMR 株および comp-GEMR 株を TH 液体培地で培養後, 対数増殖期初期まで培養した。5,000 rpm, 4°C, 10 分間の遠心で菌体を回収後, 3 ml の塩化ナトリウムリン酸緩衝液 (10 mM NaCl-50 mM NaPB ; pH7.0) に懸濁し, 再び遠心し菌体を回収した。菌体は, 塩化ナトリウムリン酸緩衝液に懸濁した後, 波長 600 nm で濁度が 0.2 になるように調整した。この菌体懸濁液に蛍光プローブ N-Phenyl-1-naphthylamine (NPN ; 和光純薬) 溶液を 5 µg/ml, 10 µg/ml になるように添加し, 遮光して室温で 30 分反応させた。反応後 3,000 rpm, 4°C で 5 分間遠心し, 塩化ナトリウムリン酸緩衝液で 2 回洗浄し, 500 µl の同緩衝

液にて再懸濁後， 96 穴蛍光測定用プレート (Nunclon™ Delta Surface ; Nunc™, Roskilde, Denmark) の各穴に 100  $\mu$ l ずつ分注し， 蛍光偏光度を蛍光分光光度計 (Gemini XPSOK microplate spectrofluorometer ; Molecular Devices Co, Japan) を用いて， 励起光 355 nm / 蛍光 460 nm で測定した。

### 1 1 . バイオフィルム構造の観察

バイオフィルム構造の変化は， Koo ら<sup>32)</sup> の方法に準じて行った。 MT8148 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 のヘキシジウムイオジン (Invitrogen) で菌体を染色し， 0.5% スクロース含有化学合成培地<sup>33)</sup>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 (Nunc) 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ル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。これらは， バイオフィルム 1 画像につき各 3 箇所を無作為に抽出して行った。

## 1 2. バイオフィルム破碎試験

MT8148 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 (FALCON, Franklin Lakes, NJ, USA) 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 UR-20P (TOMY SEIKO, LTD, 東京) で 2 分間, レベル 7 で超音波処理した。PBS で洗浄後, PBS に再懸濁し, セルスクレーパー (スミロン, 住友ベークライト, 東京) で形成されたバイオフィルムを剥離した。剥離したバイオフィルムを滅菌生理食塩水にて段階的に希釈し, Trypticase Soy 寒天培地 (Becton Dickinson) に播種し, 37°C で 2 日間嫌気培養した。必要に応じて抗生物質 (エリスロマイシン, スペクチノマイシン) を添加して用いた。一方, コントロールには超音波未処理のバイオフィルムとして, 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。

## 1 3. 統計処理

得られた結果は平均  $\pm$  標準偏差で示し, 有意差検定は Fisher's PLSD を用いて

行った。

## 結果

### 1. *glnP* のオペロンの確認

*S. mutans* MT8148 株について、*SMu0731* と *glnP* の存在をノーザンブロットティングで検索した結果、*SMu0731* と *glnP* の塩基配列の全長を合わせた約 2,800 bp のバンドが確認された (図 1B)。さらに、*SMu0731* と *glnP* がオペロンであることを確認するために、RT-PCR 法にて解析した。*glnP* と *SMu0733* の遺伝子間領域は増幅が認められなかったが、*glnP* と *SMu0731* の遺伝子間領域では増幅が確認された (図 1C)。これらの結果から、*SMu0731* と *glnP* がオペロンであることが示された。

### 2. GEMR 株および相補株による *SMu0731* の転写量

MT8148 株から抽出した DNA を用いて *glnP* 全長を増幅するプライマーを用いた PCR 法により GEMR 株においてはエリスロマイシンカセットの長さ分バンドの位置が高くなっていることが確認できた (図 2A)。また MT8148 株から抽出した全 RNA から作製した cDNA を用いて *glnP* のプライマーを用いた PCR 法により、comp-GEMR 株において *glnP* が発現していることが確認できた (図 2B)。*SMu0731* の発現を確認するため、リアルタイム PCR 法を行った。*SMu0731*

の発現は GEMR 株で低下する一方で、comp-GEMR 株では MT8148 株と同程度の発現が認められた (図 3)。

### 3. GEMR 株および comp-GEMR 株による増殖速度

*glnP* のグルタミンの取り込みへの影響を確認するために、*S. mutans* の増殖速度を解析した。MT8148 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 (図 4A, C)。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 (図 4B)。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。

### 4. グルタミン添加による *glnP*, *SMu0731* の転写への影響

グルタミンの添加が *glnP* に関連して *S. mutans* の増殖に影響をおよぼすことから、グルタミンによる *SMu0731* および *glnP* の mRNA 量への影響をリアルタイム PCR 法にて解析した。グルタミンの添加により MT8148 株における *SMu0731* の転写量は 4 倍、*glnP* の転写量は 2.3 倍それぞれ上昇した (図 5A, B)。このことは、グルタミンが *glnP* だけでなくオペロンを形成している *SMu0731* にも影響することが示唆された。しかしながら転写量に差があることは、このオペロンの転写が不安定であるか、あるいは他の要因に関連している

可能性が考えられた。

## 5. 蛍光プローブ (NPN) による細胞膜輸送の解析

*glnP* は ABC 膜輸送体のファミリーの遺伝子であり、グルタミンの膜輸送に関係していることが知られている<sup>21)</sup>。そこで *S. mutans* におけるグルタミンの膜輸送との関連性を確認するため、蛍光プローブによる細胞膜輸送の解析を行った。

蛍光プローブは、各種の膜輸送タンパクを通過する際、脂質二重層の間に吸着する性質をもっており、この吸着量は膜輸送体の働きのレベルを反映する<sup>34-36)</sup>。蛍光プローブが吸着すると、その蛍光プローブが菌体内に残存し、蛍光偏光度が大きいくほど、膜輸送タンパクの働きが活発であることを意味する。本研究では蛍光プローブの濃度依存的に、GEMR 株の蛍光偏光度は有意に低下した (図 6)。このことから、*glnP* がグルタミンの取り込みに関与する可能性が高いことが示唆された。

## 6. バイオフィーム構造の観察

ABC 膜輸送体ファミリーに属する抗生物質排出に関係する膜輸送体やアンモニウム膜輸送体は、*S. mutans* のバイオフィーム形成能と密接に関係していることが知られている<sup>27, 28)</sup>。そこで ABC 膜輸送体の 1 つをコードする遺伝子である *glnP*

と *S. mutans* のバイオフィルム形成能との関係を明らかにするため、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、MT8148 株、GEMR 株ならびに comp-GEMR 株のバイオフィルム微細構造を観察し、比較検討した。MT8148 株および comp-GEMR 株のバイオフィルム構造に明確な違いはなく、均一なバイオフィルムの構造が確認された (図 7A, 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 7B)。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、MT8148 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 の構造は疎であることが確認された (図 8)。さらに、バイオフィルムの構造強度を確認するために、砕破試験を行った。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 9)。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。

## 考察

グルタミン酸合成酵素の発見以来<sup>37)</sup>, グルタミン合成酵素 – グルタミン酸合成酵素経路が細菌のアンモニア同化に重要な役割を果たすことが知られている<sup>38)</sup>。グルタミンの生合成過程において, グルタミン合成酵素とグルタミン酸合成酵素は低アンモニア条件下で作用することが明らかになっている<sup>39)</sup>。 *S. mutans* を低アンモニア条件下で生育させた場合, グルタミン合成酵素やグルタミン酸合成酵素の作用が亢進し, グルタミンやグルタミン酸の合成が促進される<sup>40)</sup>。一方で, グルタミンやグルタミン酸は, 菌体内でアンモニアを窒素源として合成酵素によって作られる場合と, 膜輸送体から直接取り込まれる場合がある<sup>41)</sup>。 *Streptococcus pneumoniae* ではグルタミン膜輸送体が6種類存在することが予測されており, これらの膜輸送体は細菌の恒常性に関与するだけでなく, マウスでの病原性の発揮に関与している<sup>42)</sup>。また, *Streptococcus uberis* のグルタミン膜輸送体は, 糖代謝と共に, 初期段階におけるバイオフィルムの形成に関与する<sup>43)</sup>。 *S. mutans* もグルタミンを合成することが知られており, *S. mutans* UA159 株のゲノム解析により, 5つのグルタミン膜輸送体を保有することが推測されている<sup>13)</sup>。しかしながら, *S. mutans* のグルタミン膜輸送体の機能については, これ

まで明らかにされていなかった。本研究では、*S. mutans* MT8148 株のグルタミン ABC 膜輸送体に関連する遺伝子 *glnP* (*SMu0732*) の機能解析を行い、増殖能とバイオフィーム形成に及ぼす影響について明らかにした。

グラム陰性細菌である *Treponema denticola* においては、チアミノピロリン酸 ABC 膜輸送体がチアミノピロリン酸結合タンパク、膜貫通パーミアーゼ、細胞質 ATPase からなり、*tbpABC* (*Td*) オペロンによりコードされている<sup>44)</sup>。一方 *S. mutans* UA159 株では BLAST 解析により、ABC 膜輸送体をコードするとされる 4 つの遺伝子からなる *glnQHMP* と名付けられたオペロンが推測されている<sup>20)</sup>。*glnQHMP* はそれらの遺伝子産物がグルタミン酸膜輸送体として機能し、*S. mutans* のグルタミン酸代謝や耐酸性に関与することが報告されているが、オペロンを構成する各遺伝子 *glnQ* (ATP 結合タンパク)、*glnH* (基質結合タンパク質)、*glnM* (パーミアーゼ)、および *glnP* (膜タンパク) のそれぞれの機能の詳細はこれまでに明らかとされていない。本研究では、ノーザンブロット解析より *glnP* と下流に存在する *SMu0733* との間には intergenic region が存在し、*SMu0731* と *glnP* はオペロンを形成することを明らかとなった (図 1C)。さらに *SMu0731* はアミノ酸 ABC 輸送体として予測されているが、グルタミン添加に

より遺伝子発現が上昇することから、グルタミンに関連する輸送体であることが示唆された。

*S. mutans* の増殖はアミノ酸の影響を受けることが知られており、グルタミン酸とシステインは増殖に必須であるが、メチオニンやリジンは増殖を抑制する<sup>40,45</sup>。今回の結果では、グルタミンは対数増殖期における *S. mutans* の増殖を遅延させたが、静止期にはグルタミン無添加群と同程度の菌の濁度が観察された (図 4A, C)。 *glnP* の挿入変異株では菌体外からのグルタミンの取り込みが抑制された (図 6)。そのため、対数増殖期における *S. mutans* の増殖が遅延しなかったと考えられる (図 4B)。これらの結果から、過剰なグルタミンの存在は *S. mutans* の増殖を抑制するストレス因子の1つであることが示唆される。しかしながら、膜輸送体を介してグルタミンを取り込むことにより、*S. mutans* がその環境に適応し、最終的に菌が増殖したものではないかと考えられる。このことから、グルタミン膜輸送体は、環境の変化を感知する細胞外ストレス防御機構を担う可能性も示唆された。

近年、*Tannerella forsythia* において、シアル酸膜輸送体 NanT が菌の生存とバイオフィーム形成に関与することが明らかになった<sup>46</sup>。また *Haemophilus*

*influenza* が保有するコバルト膜輸送体がバイオフィルム形成に関与している<sup>47)</sup>。  
*S. mutans* では、銅の菌体内取り込みやアンモニウム膜輸送体がバイオフィルム形成を促進する知られている<sup>27,48)</sup>。これらの報告から、細菌の膜輸送体が様々な栄養素を取り込む、または抑制することにより、バイオフィルム形成に関与していることが示唆される。*S. mutans* のグルタミン膜輸送体はバイオフィルムの形成能に関与するだけでなく (図 8), はがれやすさにも影響を及ぼすことが明らかとなった (図 9)。バイオフィルムの最大の特徴は、菌体外多糖からなるグリコカリックスで凝集することであり、バイオフィルム中に菌は保護される<sup>49)</sup>。さらにバイオフィルムの構造は、菌の運動性や増殖能、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<sup>50)</sup>。*Ehrlichia chaffeensis* ではグルタミンの取り込みは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<sup>51)</sup>。実際、二成分制御系は細菌の主要な環境感知・応答システムであり、細菌が環境に適応するために欠かせないシステムであることが知られている<sup>52,53)</sup>。*S. mutans* が保有する *glnP* は、環境変化を感知することで菌の増殖を最終的に維持するだけでなく、バイオフィルム構造の強度に影響を及ぼしている。これらの結果から、グルタミン輸送体は二成分制御系により制御されている可能性も示唆され

る。

本研究の結果を要約すると、グルタミン輸送体は菌の増殖、膜輸送、バイオフィーム形成能ならびにその構造の維持に関与することから、*S. mutans* の *glnP* は菌の増殖能、菌体内へのグルタミン輸送やバイオフィーム形成に携わるタンパクをコードする遺伝子を制御し、さらにグルタミン輸送体が環境に応答する二成分制御系と関連することが示唆された。一方で、グルタミン輸送体が菌体外多糖産生能へ影響（バイオフィーム形成に直接的関与）するのか、あるいは凝集によりさまざまな菌との結合を促進するのかなどの多くの課題が残っている。膜輸送体とバイオフィーム形成の関連が明らかになることで、将来的に膜輸送体をターゲットとした方法による齲蝕予防に繋がっていくことが期待できる。今後は、*S. mutans* が保有する膜輸送体とバイオフィーム形成能の解析、様々な口腔内細菌との関連性を探索することにより、*S. mutans* のバイオフィーム形成の一端が解明できるのではないかと考えられる。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、終始御懇篤なるご指導と御校閲を賜った岡山大学大学院  
医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻小児歯科学分野の仲野道代教授に心か  
ら感謝致します。また、様々な面にわたり貴重な御助言と御協力を下さいました、  
岡山大学大学院医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻小児歯科学分野の諸先  
生に厚く御礼申し上げます。

## 文献

- 1) Dominique, S., Françoise, I., Michel, M., Jacques B. : Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of CDR2, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiol.*, **143**, 405-416, 1997.
- 2) Linton, K.J. and Higgins, C.F. : The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol.*, **28**, 5-13, 1998.
- 3) Young, J. and Holland, I.B. : ABC transporters: bacterial exporters-revisited five years on. *Biochem Biophys Acta.*, **1461**, 177-200, 1999.
- 4) Padan, E. : Superfamilies of transport proteins. In: Encyclopedia of Life Sciences. Chichester, UK: John Wiley & Sons; 1-10, 2009.
- 5) Lemos, J.A., Abranches, J., Burne, R.A. : Response of cariogenic streptococci to environmental stresses. *Curr Issues Mol Biol.*, **7**, 95-107, 2005.
- 6) Belli, W.A. and Marquis, R.E. : Adaptation of *Streptococcus mutans* and *Enterococcus hirae* to acid stress in continuous culture. *Appl Environ Microbiol.*, **57**, 1134-1138, 1991.
- 7) Hamilton, I.R. and Buckley, N.D. : Adaptation by *Streptococcus mutans* to acid tolerance. *Oral Microbiol Immunol.*, **6**, 65-71, 1991.

- 8) Carlsson, J. : Bacterial metabolism in dental biofilms. *Adv Dent Res.*, **11**, 75-80, 1997.
- 9) Svensäter, G., Sjögreen, B., Hamilton, I.R. : Multiple stress responses in *Streptococcus mutans* and the induction of general and stress-specific proteins. *Microbiol.*, **146**, 107-117, 2000.
- 10) Len, A.C., Harty, D.W., Jacque, N.A. : Stress-responsive proteins are upregulated in *Streptococcus mutans* during acid tolerance. *Microbiol.*, **150**, 1339-1351, 2004.
- 11) Stortz, G. and Hengge-Aronis, R. : Bacterial stress responses. In: *Microbial Bioremediation of Chemical Pollutants*. Washington, D.C., USA : ASM Press ; 485, 2000.
- 12) Hamada, S. and Slade, H.D. : Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Rev.*, **44**, 331-384, 1980.
- 13) Ajdic, D., McShan, W.M., McLaughlin, R.E., Savic, G., Chang, J., Charson, M.B., Primeaux, C., Tian, R., Kenton, S., Jia, H., Lin, S., Qian, Y., Li, S., Zhu, H., Najjar, F., Lai, H., White, J., Roe, B.A., Ferretti, J.J. : Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic pathogen. *Proc*

*Natl Acad Sci USA.*, **99**, 14434-14439, 2002.

- 14) Putman, M., van Veen, HW., Konings, W.N. : Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev.*, **64**, 672-693, 2000.
- 15) Rice, A.J., Park, A., Pinkett, H.W. : Diversity in ABC transporters: type I, II and III importers. *Biochem Mol Biol.*, **49**, 426-437, 2014.
- 16) Hosie, A.H., Allaway, D., Jones, M.A., Walshaw, D.L., Johnston, A.W., Poole P.S. : Solute-binding protein-dependent ABC transporters are responsible for solute efflux in addition to solute uptake. *Mol Microbiol.*, **40**, 1449-1459, 2001.
- 17) Schneider, E. and Hunke, S. : ATP-binding-cassette (ABC) transport systems: functional and structural aspects of the ATP-hydrolyzing subunits/domains. *FEMS Microbiol Rev.*, **22**, 1-20, 1998.
- 18) Detsch, C. and Stülke, J. : Ammonium utilization in *Bacillus subtilis*: transport and regulatory functions of NrgA and NrgB. *Microbiol.*, **149**, 3289-97, 2003.
- 19) Tomas, G.K., Wouter, T.H., Jetta, J.E., Hester, J.B., Sacha, A.F.T., Jan, K., Peter, W.M., Oscar, P.K. : Regulation of glutamine and glutamate metabolism by GlnR and GlnA in *Streptococcus pneumoniae*. *J Bio Chem.*, **281**, 25097-25109,

2006.

- 20) Kirsten, K., Dilani, B.S., Richard, M., Jennifer, S.D., Steven, D.G., Dennis, G.C. : Characterization of a glutamate transporter operon, *glnQHMP*, in *Streptococcus mutans* and its role in acid tolerance, *J Bacteriol.*, **192**, 984-993, 2010.
- 21) Pei-Min, C., Yi-Ywan, M.C., Sung-Liang, Y., Singh, S., Chern-Hsiung, L., Jean-San, C. : Role of GlnR in acid-mediated repression of genes encoding proteins involved in glutamine and glutamate metabolism in *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol.*, **76**, 2478-2486, 2010.
- 22) Dashper, S.G., Riley, P.F., Reynolds, E.C. : Characterization of glutamine transport in *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol.*, **10**, 183-187, 1995.
- 23) Arcondéguy, T., Jack, R., Merrick, M. : P(II) signal transduction proteins, pivotal players in microbial nitrogen control. *Microbiol Mol Biol.*, **65**, 80-105, 2001.
- 24) Hsieh, M.H., Lam, H.M., Van, Dee, Loo, F.J., Coruzzi, G. : A PII-like protein in Arabidopsis: Putative role in nitrogen sensing. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **95**,

- 13965–13970, 1998.
- 25) Coutts, G., Thomas, G., Blakey, D., Merrick, M. : Membrane sequestration of the signal transduction protein GlnK by the ammonium transporter AmtB. *EMBO J.*, **21**, 536-545, 2002.
- 26) Wolf, D.M., Zhang, Y., Roberts, G.P. : Specificity and regulation of interaction between the PII and AmtB1 proteins in *Rhodospirillum rubrum*. *J Bacteriol.*, **189**, 6861-6869, 2007.
- 27) Ardin, A.C., Fujita, K., Nagayama, K., Takashima, Y., Nomura, R., Nakano, K., Ooshima, T., Matsumoto-Nakano, M. : Identification and functional analysis of an ammonium transporter in *Streptococcus mutans*. *PLOS ONE.*, **9**, e107569, 2014.
- 28) Nagayama, K., Fujita, K., Takashima, Y., Ardin, A.C., Ooshima, T., Matsumoto-Nakano, M. : Role of ABC transporter proteins in stress responses of *Streptococcus mutans*. *Oral Health Dent Manag.*, **13**, 359-365, 2014.
- 29) Nakano, K., Nomura, R., Nakagawa, I., Hamada, S., Ooshima, T. : Demonstration of *Streptococcus mutans* with a cell wall polysaccharide specific to a new serotype

- k*, in the human oral cavity. *J Clin Microbiol.*, **42**, 198-202, 2004.
- 30) Lindler, LE. and Macrina, F.L. : Characterization of genetic transformation in *Streptococcus mutans* by using a novel high-efficiency plasmid marker rescue system. *J Bacteriol.*, **166**, 658-665, 1986.
- 31) LeBlanc, D.J., Lee, L.N., Abu-Al-Jaibat, A. : Molecular, genetic, and functional analysis of the basic replicon of pVA380-1, a plasmid of oral streptococcal origin. *Plasmid.*, **28**, 130–145, 1992.
- 32) Koo, H., Xiao, J., Klein, M.I., Jeon, J.G. : Exopolysaccharides produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *J Bacteriol.*, **192**, 3024–3032, 2010.
- 33) Bouvet, A., van de Rijn, I. and McCarty, M. : Nutritionally variant streptococci from patients with endocarditis: growth parameters in a semisynthetic medium and demonstration of a chromophore. *J Bacteriol.*, **146**, 1075–1082, 1981.
- 34) Nieva-Gomez, D. and Gennis, R.B. : Affinity of intact *Escherichia coli* for hydrophobic membrane probes in a function of the physiological state of the cells. *Proc Natl Acad Sci USA.*, **74**, 1811-1815, 1977.

- 35) Loh, B., Grant, C., Hancock, R.E. : Use of the fluorescent probe 1-N-phenyl-naphthylamine to study the interactions of aminoglycoside antibiotics with the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother.*, **26**, 546-551, 1984.
- 36) Ocaktan, A., Yoneyama, H., Nakae, T. : Use of fluorescence probes to monitor function of the substrate proteins of the MexA-MexB-oprM drug extrusion machinery in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biol Chem.*, **29**, 21964-21969, 1997.
- 37) Tempest, D.W., Meers, J.L., Brown, C.M. : Synthesis of glutamate in *Aerobacter aerogenes* by a hitherto unknown route. *J Biochem.*, **117**, 405-407, 1970.
- 38) Thomas, G.H., Coutts, G., Merrick, M. : The *glnK amtB* operon: a conserved gene pair in prokaryotes. *Trends Genet.*, **16**, 11-14, 2000.
- 39) Brown, C.M., McDonald-Brown, D.S., Meers, J.L. : Physiological aspects of microbial inorganic nitrogen metabolism. *Advances Microbiol Physiol.*, **11**, 1-52, 1974.
- 40) Martin, E.J. and Wittenberger, C.L. : Regulation and function of ammonia-assimilating enzymes in *Streptococcus mutans*. *Infect Immun.*, **28**, 220-

224, 1980.

- 41) Karl, E.K. and John, J.M. : Simultaneous prevention of glutamine synthesis and high-affinity transport attenuates *Salmonella typhimurium* virulence. *Infect Immun.*, **65**, 587-596, 1997.
- 42) Tobias, H., Matthias, K., Uwe, K., Manfred, R., Lothar, P., Sven, H. : Impact of glutamine transporters on pneumococcal fitness under infection-related conditions. *Infect Immun.*, **79**, 44-58, 2011.
- 43) Crowley, R.C., Leigh, J.A., Ward, P.N., Lappin-Scott, H.M., Bowler, L.D. : Differential protein expression in *Streptococcus uberis* under planktonic and biofilm growth conditions. *Infect Immun.*, **77**, 382-384, 2011.
- 44) Jiang, B., Hongwu, S., Youbin, T., Aiming, Y., Chunhao, L. : The Riboswitch Regulates a Thiamine Pyrophosphate ABC Transporter of the Oral Spirochete *Treponema denticola*. *J Bacteriol.*, **193**, 3912-3922, 2011.
- 45) Cowman, R.A., Perrella, M.M., Fitzgerald, R.J. : Influence on incubation atmosphere on growth and amino acid requirements of *Streptococcus mutans*. *Microbiol.*, **27**, 86-92, 1974.

- 46) Honma, K., Ruscitto, A., Frey, A.M., Stafford, G.P., Sharma, A. : Sialic acid transporter NanT participates in *Tannerella forsythia* biofilm formation and survival on epithelial cells. *Microb Pathog.*, 1-9, 2015.
- 47) Tikhomirova, A., Jiang, D., Kidd, S.P. : A new insight into the role of intracellular nickel levels for the stress response, surface properties and twitching motility by *Haemophilus influenzae*. *Metallomics.*, 7, 650-661, 2015.
- 48) Singh, K., Senadheera, D.B., Lévesque, C.M., Cvitkovitch, D.G. : The copYAZ operon functions in copper efflux, biofilm formation, genetic transformation, and stress tolerance in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.*, 197, 2545-2557, 2015.
- 49) Marsh, P.D. : Dental plaque as a microbial biofilm. *Caries Res.*, 38, 204-211, 2004.
- 50) Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W. : Biofilm as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol.*, 56, 187-209, 2002.
- 51) Cheng, Z., Lin, M., Rikihisa, Y. : *Ehrlichia chaffeensis* proliferation begins with NtrY/NtrX and PutA/GlnA upregulation and CtrA degradation induced by proline and glutamine uptake. *mBio.*, 5, e02141-14, 2014.

- 52) John, S.P. and Eric, C.K. : Communication modules in bacterial signaling proteins. *Genet.*, **26**, 71-112, 1992.
- 53) Ann, M.S., Victoria, L.R., Paul, N.G. : Two-component signal transduction. *Ann Rev Biochem.*, **69**, 183-215, 2000.

## 表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 社会環境生命科学専攻 小児歯科学分野

(指導：仲野道代教授)

## 図の説明

図1 *S. mutans* MT8148 株 *glnP* の発現様式

A: *S. mutans* UA159 株の全ゲノム配列より予測した *glnP* のオペロンとプライマー設計図。B: ノーザンブロッティングによる解析。レーン 1: RNA 分子量マーカー, レーン 2: MT8148 株全 RNA。C: PCR による解析。1F-1R: *SMu0731* と *glnP* を増幅するプライマー 2F-2R: *glnP* と *SMu0733* を増幅するプライマー, M: DNA 分子量マーカー, レーン 1: MT8148 株染色体 DNA, レーン 2: MT8148 株 cDNA, レーン 3: 超純水 (ネガティブコントロール)。

図2 *glnP* 挿入変異株及びの相補株の確認

A. GEMR 株のエリスロマイシン耐性遺伝子挿入の確認。M: DNA 分子量マーカー, レーン 1: MT8148 株, レーン 2: GEMR 株, レーン 3: 超純水 (ネガティブコントロール)。

B. 相補株 comp-GEM R 株の *glnP* 発現の確認。M: DNA 分子量マーカー, レーン 1: MT8148 株染色体 DNA, レーン 2: MT8148 株 cDNA, レーン 3: GEMR 株 cDNA, レーン 4: comp-GEMR 株 cDNA, レーン 5: MiliQ 水 (ネ

ガティブコントロール)。

### 図3 *S. mutans* における *SMu0731* mRNA の発現

MT8148 株, GEMR 株および comp-GEMR 株の cDNA を作成し, リアルタイム PCR により *SMu0731* mRNA の転写量を評価した。MT8148 株の遺伝子転写量を基準値とし, 相対比を示す。GEMR 株と他の菌株との間で有意差検定を行った。(Fisher's PLSD 検定 \*  $P < 0.001$ ) (n = 5)。

### 図4 グルタミン添加による *S. mutans* 増殖能への影響

MT8148 株, GEMR 株および comp-GEMR を 10 mM グルタミン添加培地で培養し, 経時的に濁度を測定することにより, 菌の増殖能を評価した。A: MT8148 株, B: GEMR 株, C: comp-GEMR 株。GEMR 株と他の菌株との間で有意差検定を行った。(Fisher's PLSD 検定 \*  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.001$ ) (n = 5)。

### 図5 グルタミン添加による *SMu0731*, *glnP* mRNA の発現への影響

グルタミン添加培地中で培養した MT8148 株の cDNA を作製し, リアルタイム

ム PCR により *SMu0731* と *glnP* mRNA の転写量を評価した。グルタミン非添加群遺伝子転写量を基準値とし、相対比を示す。A: *SMu0731*, B: *glnP*。(Fisher's PLSD 検定 \*  $P < 0.001$ ) (n = 5)。

#### 図 6 *glnP* 挿入変異株による細胞膜輸送への影響

MT8148 株, GEMR 株および comp-GEMR 株に蛍光プローブ N-Phenyl-1-naphthylamine (NPN) を 5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  添加し, 蛍光偏光度を計測することによる, 細胞膜輸送のレベルを評価した。GEMR 株と他の菌株との間で有意差検定を行った。(Fisher's PLSD 検定 \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ) (n = 5)。

#### 図 7 *glnP* 挿入変異株によるバイオフィーム形成能への影響

(A) MT8148 株, (B) GEMR 株および (C) comp-GEMR 株の共焦点レーザー顕微鏡像を示す。ヘキシジウムイオジンを用いて染色後, 37°C, 24 時間培養し, バイオフィームを形成した。

図 8 *glnP* 挿入変異株によるバイオフィルム構造への影響

MT8148 株, GEMR 株および comp-GEMR 株の菌体をヘキシジウムイオジンで染色し, バイオフィルムを形成後, 共焦点レーザー顕微鏡下で観察した。共焦点レーザー顕微鏡像は Image J により数値化を行った。GEMR 株と他の菌株との間で有意差検定を行った。(Fisher's PLSD 検定 \*  $P < 0.001$ ) (n = 3)。

図 9 *glnP* 挿入変異株によるバイオフィルム強度への影響

バイオフィルムを形成した MT8148 株, GEMR 株および comp-GEMR 株を超音波処理し, 残存した菌体を Trypticase Soy 寒天培地に播種した。コロニー数をカウントすることにより, 各菌株のバイオフィルムの強度として評価を行った。GEMR 株と他の菌株との間で有意差検定を行った。(Fisher's PLSD 検定 \*  $P < 0.001$ ) (n = 5)。

表1 使用菌株およびプラスミド

名称	特徴	由来
<i>Streptococcus mutans</i>		
MT8148	<i>S. mutans</i> 臨床分離株 (血清型 c)	Ooshima ら (1983)
GEMR	pGEM-T を用いて 8148 株の GlnP を欠失させた変異株 ( $\Delta glnP$ ), Em <sup>r</sup>	本研究
comp-GEMR	pDL278 を用いて GEMR 株の GlnP を相補させた変異株	本研究
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$		
	クローニング用	ニッポンジーン
pGEM-T	<i>E. coli</i> クローニングベクター、Amp <sup>r</sup>	Promega
pDL278	<i>E. coli</i> - <i>Streptococcus</i> 属シャトルベクター、Sp <sup>r</sup>	LeBlanc ら (1991)
pSP73	<i>E. coli</i> に対する PCR 産物のクローニングベクター、Amp <sup>r</sup>	Promega
pKN100	エリスロマイシン耐性遺伝子を挿入した pSP73、Em <sup>r</sup>	Nakano ら (2004)
pYM1	MT8148 株の <i>SMu0732</i> を pGEM-T に導入した組み換えプラスミド、Amp <sup>r</sup>	本研究
pYM2	pYM1 の <i>SMu0732</i> 内にエリスロマイシン耐性遺伝子を挿入した組み換えプラスミド、Em <sup>r</sup> 、Amp <sup>r</sup>	本研究
pYM3	MT8148 株の <i>SMu0732</i> を pDL278 に挿入した組み換えプラスミド、Sp <sup>r</sup>	本研究

Amp<sup>r</sup>: アンピシリン耐性 Sp<sup>r</sup>: スペクチノマイシン耐性 Em<sup>r</sup>: エリスロマイシン耐性

表2 本研究で使用したプライマー

名称	塩基配列 (5'-3')		由来
GlnP2-F GlnP2-R	ATG AAG AAC AAA TTT AAA GCT CTG ATG CTG TTA TTT AAT CCT CTT TTC TAA ACG TTT TGC	Cloning	本研究
EcoR1-pkn-F EcoR1-pkn-R	AAG AAT TCG TAA TTA AGA AGG AGT GAT TAC GCC GCA AGG AAT TCA TAG AAT TAT TTC CTC	Erythromycin cassette	本研究
glnP-compl.sph1-F glnP-compl.sal1-R	AGA AGT TTG TAG AAA GCA TGC ACA TGA AGA ATC AAT TTT TAG GTC GAC CAT TAT TTA ATC	Cloning	本研究
731RT-F 731RT-R	TAT CTG GGT TCA TGG CTA AGC TGC GTG CAA ATG TCA CTT TTG CTC CTA TCG AAC TTG GCA	<i>SMu0731</i> qRT-PCR	本研究
glnpRT-F glnpRT-R	ACG GCG TCA GCT TGG CTG GAT TGG ACA GTA GGT TGT TAT GGA CTC TTC TTT TGC ACC CTT	<i>glnP</i> qRT-PCR	本研究
1-F 1-R	ATA ACC ATC TAC AAT GAC CTT GCC GCT AGT GGA CAA ATG GAA GCC AGC CGC AGT TTA GGG	PCR assay	本研究
2-F 2-R	GGC CTT TTT AAT AAT ATC CAC ATC AAT TCC CTA AAA ATC CGC CTC CTA GTT GCC CCA AAA	PCR assay	本研究
glnpRT-F glnpRT2-R	ACG GCG TCA GCT TGG CTG GAT TGG ACA GTA AGG CCG ATG GCA GCT ATG ATG AAA TCA TGA	Cloning	本研究
GlnP 500-1-F GlnP 500-1-R	TAA TCC TCT TTT CTA AAC GTT TTG CTA GGC TTC TAT CTT TGT TGA TGT GGT TCG CGG TAT	northern blotting	本研究
16s - F 16s - R	GAT GCT TCT GGG TTC CAA GCT CGA TTA CGA ACT TCA TTT CCG G	16S rRNA qRT-PCR	Inagaki ら (2009)

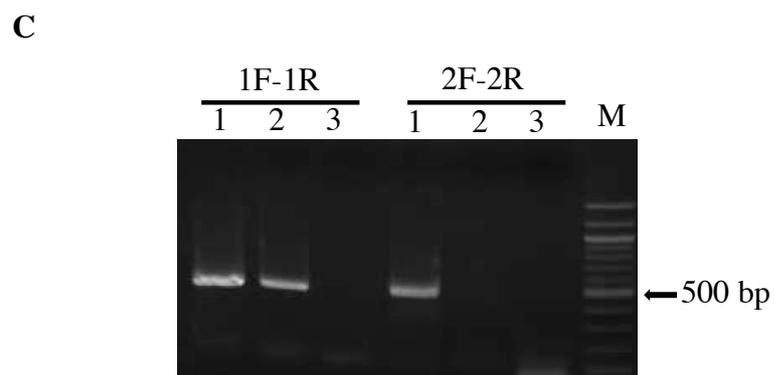
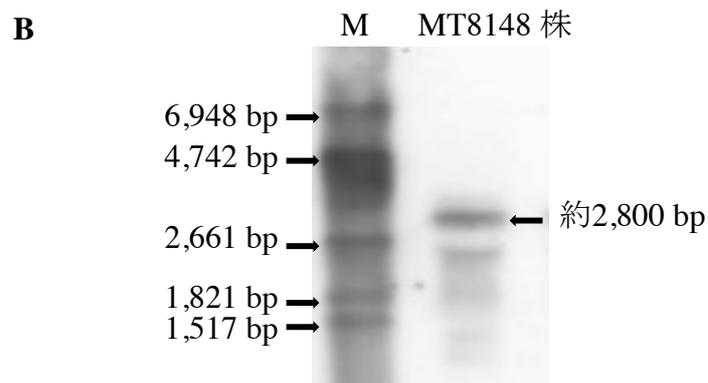
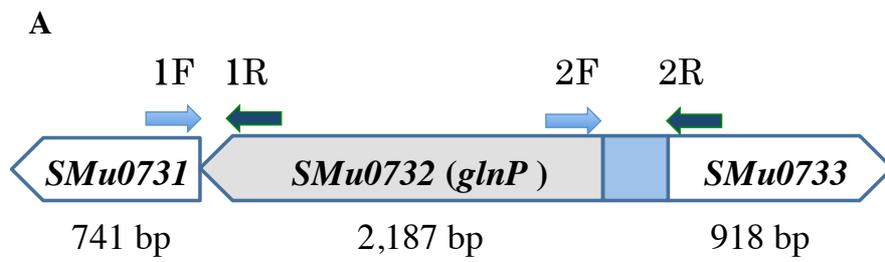


図1 森川優子

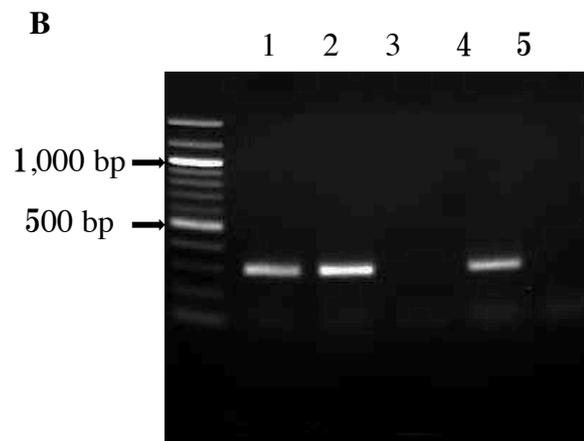
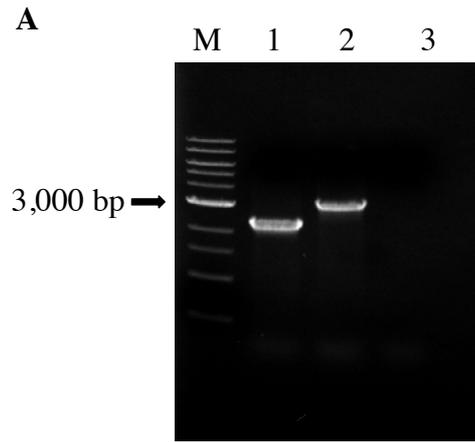


図2 森川優子

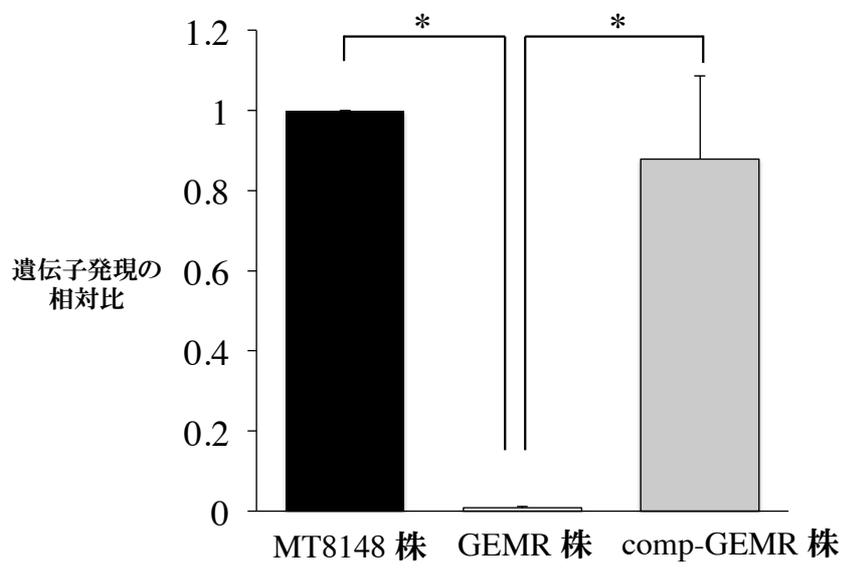


図3 森川優子

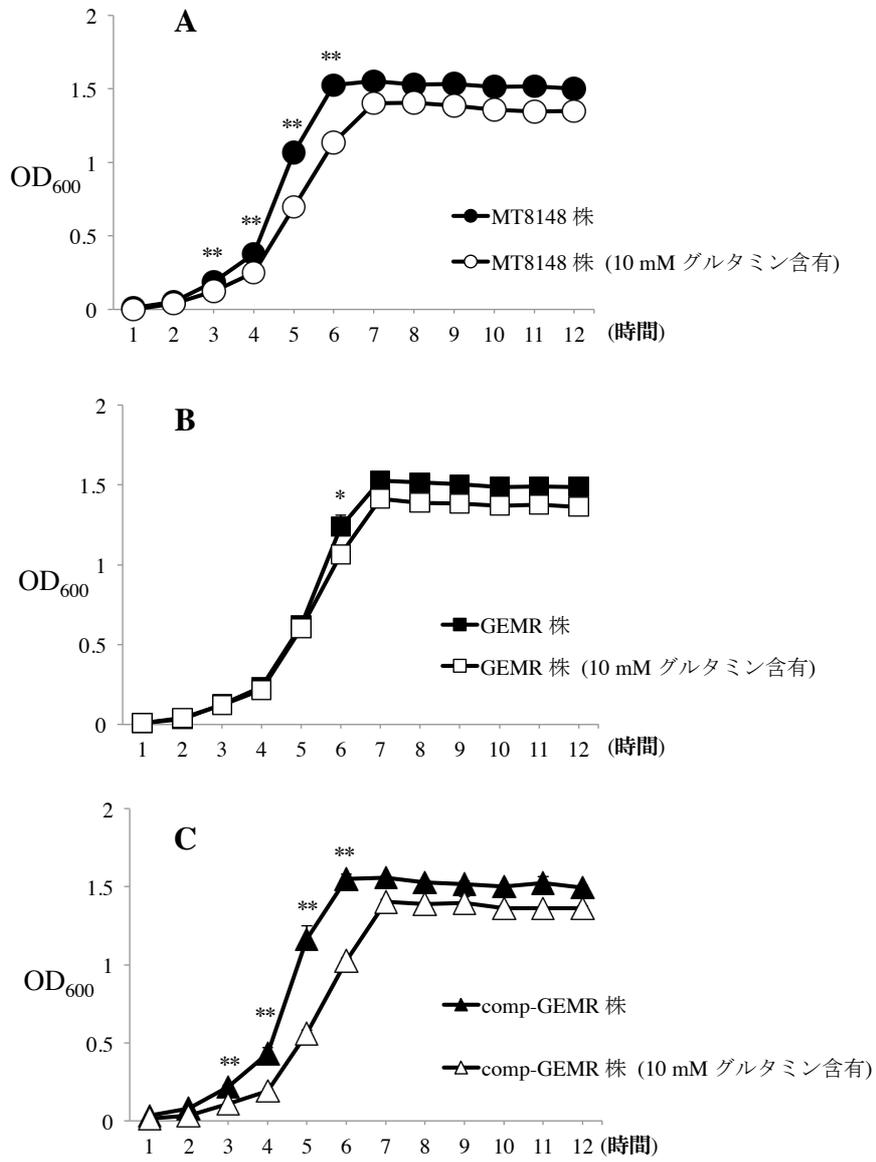


図4 森川優子

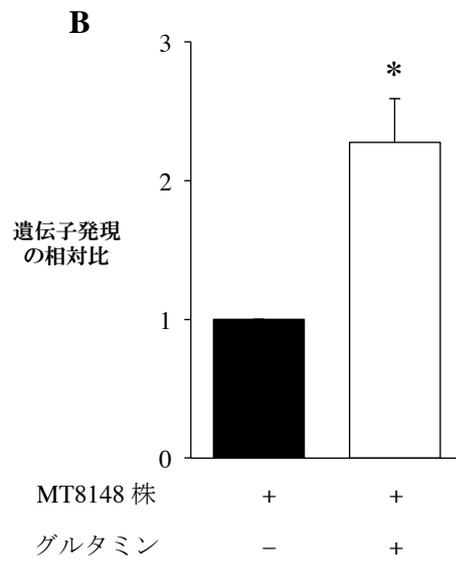
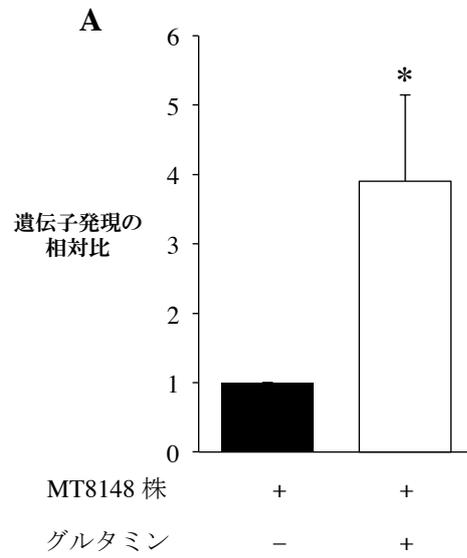


図5 森川優子

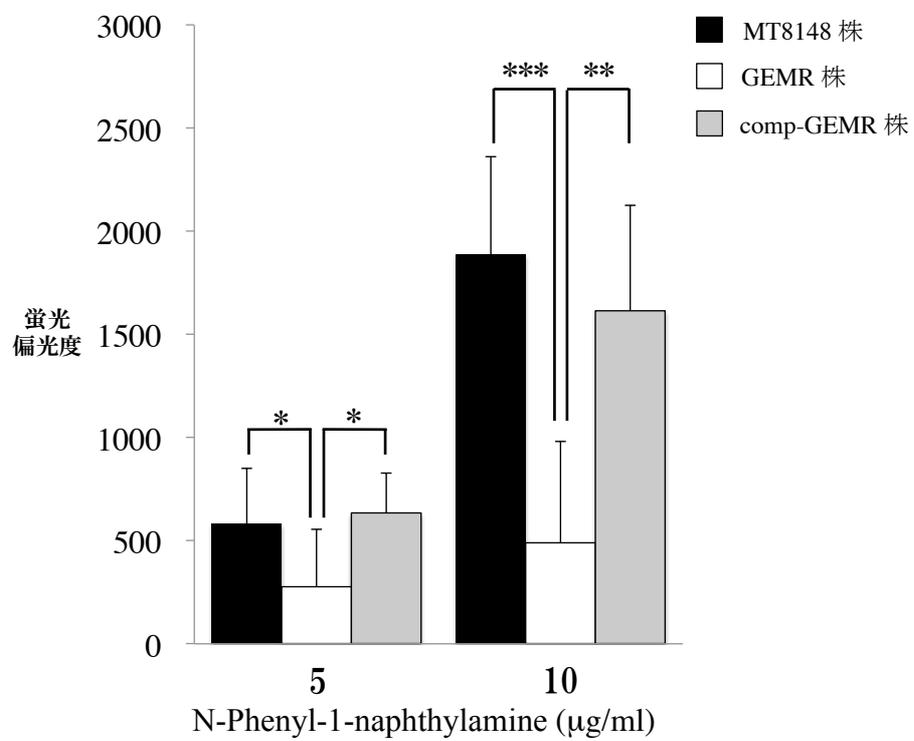
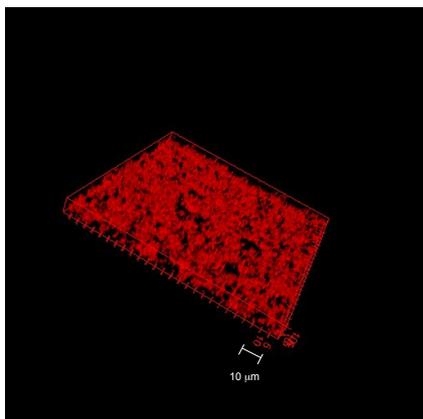
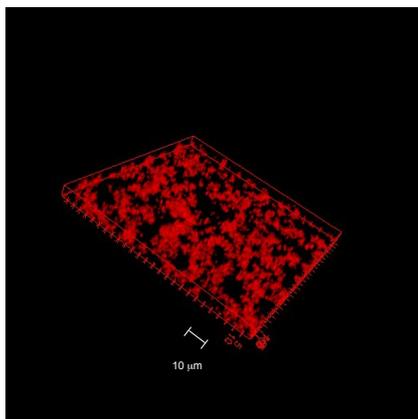


図6 森川優子

A. MT8148 株



B. GEMR 株



C. comp-GEMR 株

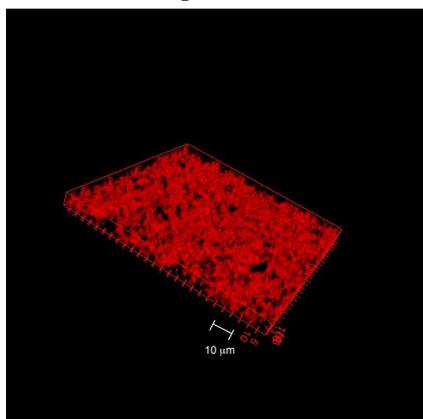


図7 森川優子

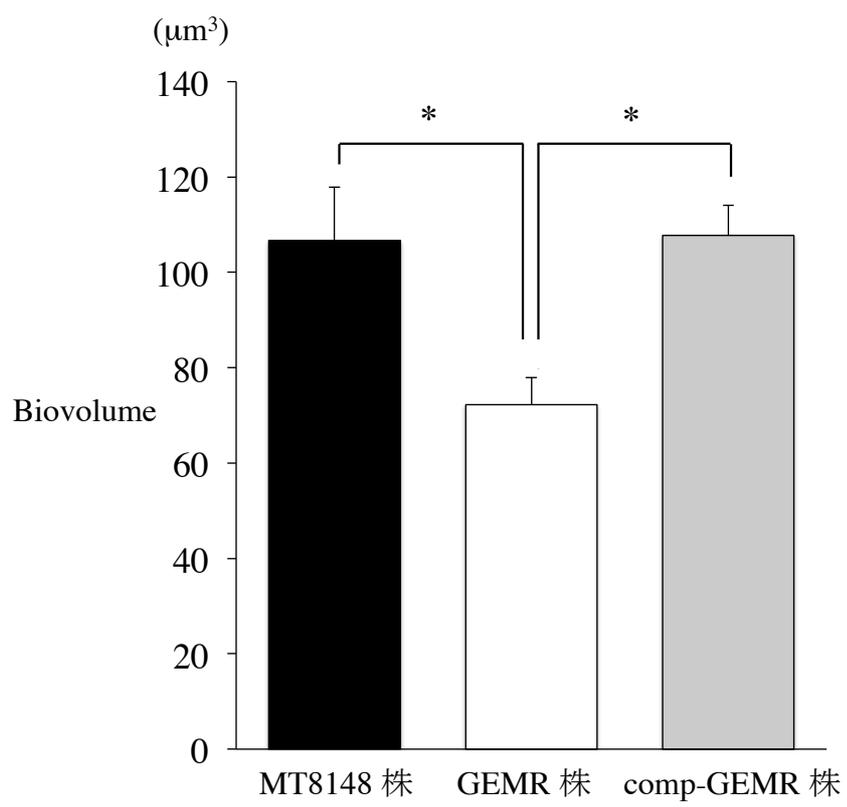


図8 森川優子

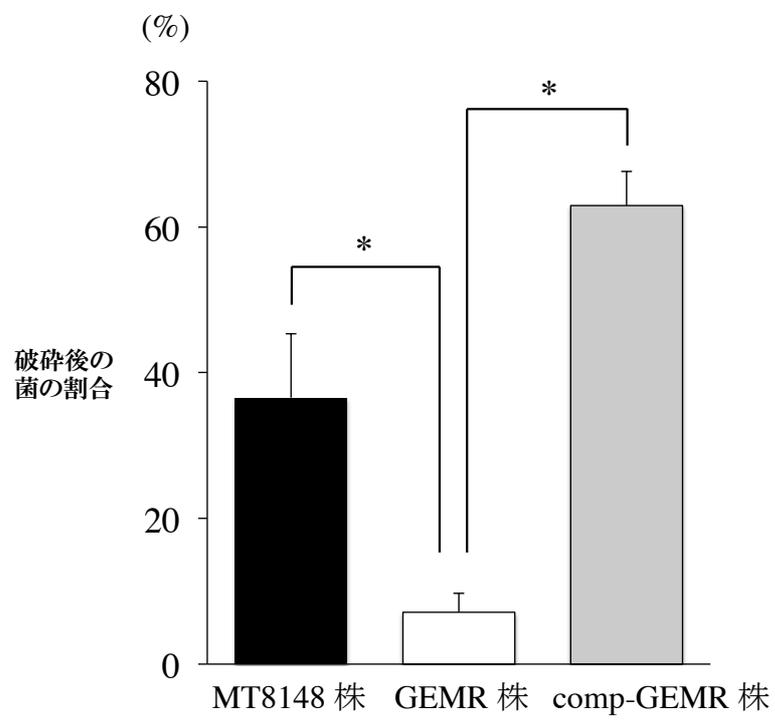


図9 森川優子