

*Streptococcus mutans* によるバイオフィルム構造決定における  
グルカン結合タンパク A の役割

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  
行動小児歯科学分野

松三 友紀

**Contribution of glucan-binding protein A of *Streptococcus mutans*  
for film and stable biofilm formation**

Pediatric Dentistry,  
Okayama University Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical  
Sciences

Yuki Matsumi

(平成 25 年 12 月 13 日受付)

## 緒 言

*Streptococcus mutans* は、ヒト齲蝕の主要な病原細菌であり、口腔内のバイオフィルム形成において最も重要な役割を果たしている<sup>1)</sup>。*S. mutans* の菌体表層には、その病原性と深く関与するタンパク構成成分が多数存在し、グルコシルトランスフェラーゼ (Glucosyltransferase; GTF), グルカン結合タンパク (Glucan binding protein; Gbp), および高分子タンパク抗原 c (Protein Antigen c; PAc) などが知られている<sup>2,3)</sup>。そのうち、Gbp は、GTF によってスクロースから合成されるグルカンと結合することにより強固なバイオフィルム形成を行うと考えられている<sup>4)</sup>。これまでのところ Gbp には、GbpA<sup>5)</sup>, GbpB<sup>6)</sup>, GbpC<sup>7)</sup> および、GbpD<sup>8)</sup> の 4 種類が報告されており、それぞれをコードする遺伝子がクローニングされ、その塩基配列も明らかにされている。GbpA は最初に発見されたグルカン結合タンパクであり、GTF 酵素のグルカン結合ドメインと相同性の高い繰り返し構造を含んでいる<sup>9)</sup>。GbpB は菌体結合型であり、細胞の維持や分裂に関わり、ペプチドグリカン加水分解酵素と相同性が高く、生命維持に必要な構成成分であると考えられている。GbpC は菌体結合型であり、歯面への初期付着に重要な役割を演じる PAc の C 末端側のアラニン繰り返し構造領域と約 30% の相同性を持つことが示されており、菌の凝集に関与することが報告されている。さらに GTFD の合成する水溶性グルカンと特異的に結合する

ことによりスクロース依存性付着において重要な役割を果たしていることが明らかにされている<sup>10)</sup>。さらに、GpbD は GbpA と同様に菌体遊離型であり、アミノ酸配列の中央よりやや N 末端側に GbpA で認められた A リピート配列が 3 カ所存在していることが明らかになっている<sup>8)</sup>。

このように Gbp はそれぞれに特徴的な機能を示す。特に GbpA 欠失変異株では、デキストラン結合能だけでなく、スクロース依存性平滑面付着能の低下が認められ、*S. mutans* のバイオフィーム形成に深く関与していると考えられている<sup>11)</sup>。さらに GbpA は菌体へのストレスを最小限にするための最適なバイオフィームの形成に関与していることが報告されている<sup>12)</sup>。一方で、GbpA の欠失は局所 pH とバイオフィーム構造に変化をもたらし、*gtfB* と *gtfC* の間でリコンビネーションが発生したことが報告されており<sup>13)</sup>、その発現は GTF の働きに影響を及ぼすことが示唆される。*gtfB* と *gtfC* の間のリコンビネーションには、Recombinase A が関与していることが明らかとなっているが<sup>14)</sup>、GbpA の欠失が表層タンパクの発現に影響を与える詳細なメカニズムは明らかにされていない<sup>12)</sup>。

GroEL および DnaK はストレス応答タンパクであり、ストレス応答タンパクは新たなタンパクの生成や発現量の変化を誘発することによってさまざまな生命現象において重要な役割を果たしている<sup>15,16,17)</sup>。主な働きとしては、凝集タンパクの再

生や修復に関与することが報告されている<sup>18)</sup>。菌が pH 変化，機械的刺激，酸化還元ストレス，浸透圧変化，あるいは熱などのストレス条件下にさらされた際に発現が上昇して細胞を保護するストレス応答タンパクの中で，GroEL および DnaK は熱ショックタンパク (HSP) と言われ，各種細胞種において最も高度に保存されたタンパクの一つであるとされている。

本研究では，バイオフィルム形成における GbpA の果たす役割について Gbp 欠失株を用いて検討した。さらに，GbpA はバイオフィルム形成に深く関わっていると考えられるため，バイオフィルム形成に関連する他の表層タンパクの発現と GbpA との関連性を分子生物学的手法を用いて検討を行った。

## 材料と方法

### 1) 供試菌株と培養条件

日本人小児の口腔より分離された *S. mutans* MT8148 株<sup>19)</sup>を用いた (表 1)。また, *S. mutans* MT8148 株の GbpA を欠失させた AD1 株, GbpB を欠失させた BD1 株, GbpC を欠失させた CD1 株<sup>11)</sup>を使用した。さらに, *S. mutans* UA159 株, NG8 株, GS5 株<sup>20,21,22)</sup>も実験に供試した (表 1)。

*S. mutans* の培養には, 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), および Mitis-Salivarius (MS) 寒天培地 (Becton Dickinson) を用い, 37 °C で静置培養した。エリスロマイシン (Erythromycin) 耐性遺伝子を保持した *S. mutans* 株の培養には, Erythromycin (EM; 10 µg/mL; 和光純薬, 大阪) を, スペクチノマイシン (Spectinomycin) 耐性遺伝子を保持した *S. mutans* 株の培養には, Spectinomycin dihydrochloride pentahydrate (SP; 1 mg/mL; 和光純薬) を, カナマイシン (Kanamycin) 耐性遺伝子を保持した *S. mutans* 株の培養には, Kanamycin Sulfate (KM; 1 mg/mL; 和光純薬) をそれぞれの培地に添加して用いた。特に記載のない場合は, すべて好気培養とした。

*Escherichia coli* DH5α 株 (ニッポンジーン, 東京) は, Luria-Bertani 培地 (LB; 1%

Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 0.5% NaCl; 和光純薬) あるいはこの培地に 1.5% Agar (和光純薬) を添加した LB 寒天培地を用いて培養した。抗生物質耐性を選択マーカーに用いた *E. coli* の培養には, 必要に応じて LB 培地に EM (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 和光純薬) あるいは Ampicillin Sodium (AM; 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 和光純薬) を添加して用いた。

## 2) *E.coli* への形質転換

上記の *E. coli* DH5 $\alpha$  コンピテント細胞 (ニッポンジーン) を氷上で融解し, 同細胞 100  $\mu\text{L}$  に供試するプラスミド溶液 10  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{g}$ ) を混和し, 氷水中で 30 分間静置した。その後, 42  $^{\circ}\text{C}$  で 40 秒間静置し, 再び氷水中で 2 分間冷却した。この反応液に 400  $\mu\text{L}$  の SOC 液体培地 (2% Tryptone, 0.5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 20 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM  $\text{MgSO}_4$ , 20 mM Sucrose; 和光純薬) を加え, 37  $^{\circ}\text{C}$  で 1 時間震盪培養した。この培養液を選択マーカーに用いた抗生物質を加えた LB 寒天培地に播種し, 37  $^{\circ}\text{C}$  で一晩培養した。

## 3) Polymerase Chain Reaction (PCR) 法

PCR による DNA の増幅には, Ampli Taq Gold 360 Master Mix (Applied Biosystems, CA, USA) を用い, S1000 Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)

を使用して反応を行った。PCR の条件は添付の指示書に従って設定した。

#### 4) アガロース電気泳動

0.7%あるいは1.5% Agarose S (ニッポンジーン) を電気泳動用のゲルとして使用し、泳動用緩衝液には TAE 緩衝液 (40 mM 2-Amino-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris), 40 mM Acetic acid, 1 mM Ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), pH 8.0; 和光純薬) を用い、100 V 定電圧で電気泳動を行った。DNA サイズマーカーは 100 bp ラダーと、1 kb ラダー (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) を使用した。泳動用のゲルを Ethidium bromide (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; 和光純薬) 溶液で 15 分間染色後、波長 312 nm の紫外線で DNA のバンドを可視化し検出した。

#### 5) 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。10 mL の BHI 液体培地にて 37 °C で 18 時間培養した供試菌を遠心分離 (3,000 rpm, 10 分, 4 °C) して集め、250  $\mu\text{L}$  の Glu-TE 緩衝液 (1 M Glucose, 10 mM Tris, 1 mM EDTA; 和光純薬) に懸濁した。この懸濁菌液 250  $\mu\text{L}$  に、N-acetylmuramidase SG (2.0 mg/mL; 和光純薬) 62.5  $\mu\text{L}$  を加

え, 37 °Cで 90 分間反応させた。この反応液に, まず Cell Lysis Solution (QIAGEN) 600  $\mu$ L を加えて 80 °Cで 5 分間, 続いて RNase (10  $\mu$ g/mL; QIAGEN) 3  $\mu$ L を添加して 37 °Cで 30 分間反応させ, 最後に Protein Precipitation Solution (QIAGEN) を 200  $\mu$ L 添加した。この反応液を遠心分離 (15,000 rpm, 3 分, 4 °C) して得た上清に, 600  $\mu$ L のイソプロピルアルコール (和光純薬) を添加して再度遠心分離 (15,000 rpm, 1 分, 4 °C) を行った。得られた沈殿を 70% エタノール (和光純薬) にて洗浄して乾燥後, TE 緩衝液 100  $\mu$ L に溶解させた。DNA 溶液は吸光度 (260 nm) を測定して濃度調整し, 実験に使用した。

#### 6) *S. mutans* の形質転換と GbpA 欠失変異株の作製

*gbpA* 遺伝子挿入変異株は, Lindler と Macrina (1986)<sup>23)</sup>の方法に準じて作製した。

*gbpA* の翻訳開始点から 977-978 塩基下流部分に EM 耐性遺伝子を挿入したプラスミド pMMN26 を制限酵素 *Bam* HI で消化し, フェノールクロロホルム処理を行った後, 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) に UA159 株, NG8 株および GS5 株をそれぞれ播種し, 37 °Cで 18 時間培養した。ついでこの菌液を馬血清を 10%含む新鮮な TH 液体培地に継代し, 2 時間培養した。この培養液に, 制限酵素で消化した

pMMN26 を 200  $\mu\text{g}$  加え、さらに 1 時間培養した。これを遠心分離 (3,000 rpm, 15 分, 4  $^{\circ}\text{C}$ ) して菌体を集め、EM (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を含む MS 寒天培地に播種した。37  $^{\circ}\text{C}$  で 2 日間嫌氣的に培養し、生じたコロニーを形質転換株 UA159 AD1 株, NG8 AD1 株, GS5 AD1 株としてそれぞれ分離した (表 1)。これらの株のゲノム上にある *gbpA* へのエリスロマイシン耐性カセットの挿入は、*gbpA* に特異的なプライマーを用いた PCR 法により確認した (図 1)。

#### 7) バイオフィルム形成量の測定

供試菌を 10 mL の BHI 液体培地にて 37  $^{\circ}\text{C}$  で 18 時間培養後、培養した供試菌液を 0.25% スクロース添加 TH 液体培地に希釈し、96 穴平底細胞培養用マイクロタイタープレート (FALCON, Franklin Lakes, NJ, USA) の各ウェルに 100  $\mu\text{L}$  ずつ分注して、37  $^{\circ}\text{C}$  で 2 日間嫌氣的に培養した。各ウェルの浮遊菌液を取り除いた後に、25  $\mu\text{L}$  の 1% Crystal violet 溶液 (ナカライテスク, 京都) を加えて 15 分間室温に静置することにより付着した菌体を染色し、蒸留水で 6 回洗浄を行った。その後、95% エタノール (和光純薬) を加えて洗浄し、乾燥後、蒸留水を加えて波長 570 nm にける吸光度を測定した。

## 8) バイオフィルム構造の観察

24 穴マルチウェルプレート (Nunclon Multidish, Roskilde, Denmark) の各ウェルにガラス製丸型カバーガラス (直径 12 mm, 松浪硝子工業株式会社, 大阪) を挿入した。あらかじめ培養した各供試菌を, 1/100 量になるように TH 液体培地で希釈し, 各ウェル内に 1 mL ずつ分注し, 37 °C で 2 日間嫌気条件下で培養した。培養後, 菌液を取り除き, 等量の 4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)-buffered saline solution (HBSS: 135 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM HEPES) 溶液でカバーガラスを洗浄し, LIVE/DEAD Kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) を用いて, バイオフィルム菌体の染色を行った。Calcein AM でバイオフィルム中の生存菌体を, Ethidium homodimer-1 により死菌体を染色後, HBSS 溶液にて洗浄し, 4% Glutaraldehyde (和光純薬) を添加した HBSS 溶液により固定した。固定後, 再度 HBSS 溶液を加えて遮光し 1 時間静置した後, Slow Fade Light Antifade Kit (Invitrogen) をカバーガラスに滴下した上でスライドガラスに封入した。共焦点走査型レーザー顕微鏡 LSM 510 (Version 4.2, Carl Zeiss MicroImaging Co, Ltd, Jena, Germany) を用いて, それぞれの菌株により形成されたバイオフィルムの構造を観察した。

## 9) ウェスタンブロット分析

供試菌を、BHI 液体培地で 37 °C, 18 時間培養後、TH 液体培地に継代し、培養液の吸光度 (600 nm) が 1.0 になるまで培養した。培養液を、3,000 rpm, 4 °C で 10 分間遠心し、菌体を回収した。得られた菌体をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS; 137 mM NaCl, 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8.1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 和光純薬) 100 μL で懸濁し、Gel loading buffer [1 M Tris (pH6.8), 10% Sodium dodecyl sulfate, 0.2% Bromophenol blue, 5% Glycerol; 和光純薬] 100 μL および、10 mM DTT (threo-Dithiothreitol) 20 μL を加えて 10 分間加熱し、SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis) 用試料とした。

SDS-PAGE は、Laemmli (1970)<sup>24)</sup>の方法に従い、Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad) を用いて、室温で 200 V 定電圧で行った。分子量測定マーカーとして、Precision Plus Protein Dual Color standards (Bio-Rad) を用いた。泳動後、セミドライ式ブロッキング装置 (Trans-blot SD, Bio-Rad) を用い、10 V 定電圧で 1 時間通電することによりアクリルアミドゲル層から Poly vinyliden difluoride (PVDF) 転写膜 (Immobilon; Millipore, Billerica, MA, USA) へ転写した。この PVDF 膜を 5% Skim Milk (Becton Dickinson) を添加した 0.05% TritonX-100 (和光純薬)を含む PBS (PBST) 中にて 4 °C で一晩静置した。PBST で 3 回洗浄後、PBST で 1,000 倍希釈したウサギ抗 CA-GTF 抗体<sup>25)</sup>と室温で 1 時間反応させた。反応後、PBST で 3 回洗

浄し, PBST で 1000 倍希釈した Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunoglobulins/Alkaline Phosphatase (Dako Denmark A/S, Glostrup, Denmark) と室温でさらに 1 時間反応させた。反応後の PVDF 膜を PBST で 3 回洗浄後, Alkaline Phosphatase (AP) 緩衝液 (100 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM Tris, pH 9.5; 和光純薬) で 1 回洗浄した。その後, 5-Bromo-4-chloro-3-indolylphosphate-*p*-toluidine (和光純薬) と Nitro Blue Tetrazolium (和光純薬) を発色基質として添加した AP 緩衝液を加えて発色させ, バンドを視覚化した。GTF タンパクの発現量はバンドの黒化度を NIH Image (Version 1.43, Scion, MD, USA) により数値化することにより決定した。

#### 10) 活性染色

GTFB および GTFC の酵素活性の変化を活性染色法により検討した。分子量測定マーカーとして, Precision Plus Protein Dual Color Standards (Bio-Rad) を用いた。SDS-PAGE には Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad) を用いて, 室温で 200 V 定電圧で行った。SDS-PAGE 後, ゲルをリン酸緩衝液 (10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 和光純薬) 中にて室温で 30 分間振盪させた後, この溶液に 3%スクローズと 0.5% TritonX-100 (和光純薬) を混和させた溶液で, 37 °Cで 18 時間振盪した。12.5% Trichloroacetic Acid (和光純薬) にて 37 °Cで 15 分間振盪し, 蒸留水で 3 分間

洗浄を行った後、Periodic acetic acid solution (1% Orthoperiodic Acid, 3% Acetic Acid; 和光純薬) 中にて 37 °C で 30 分間振盪した。蒸留水で 6 回洗浄を行い、ゲル上に存在する GTFB および GTFC により生成されたグルカンを 0.4% Pararosaniline Base (Sigma, St. Louis, MO, USA) 染色液にて 30 分間染色した。0.5% Sodium Disulfite (和光純薬) で 3 回洗浄後、さらに蒸留水で洗浄を行った。染色されたグルカンの面積を NIH Image (Version 1.43) により数値化することにより相対量として現した。

#### 11) *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*, *dnaK* および *groEL* の発現

供試菌を、TH 液体培地で 37 °C、18 時間培養後、新鮮な同液体培地に継代し、600 nm における吸光度が 0.7 になるまで培養した。培養液を、5,000 rpm、4 °C で 15 分間遠心し、菌体を回収した。得られた菌体を UltraPure™ Diethylpyrocarbonate (DEPC) Treated Water (Invitrogen) で懸濁し、Lysing Matrix B (MP Biomedicals) に菌液を移し、TRI Reagent (Sigma) を添加した後、FastPrep (Bio-Rad) 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、クロロホルムを混和させた後、水層中の全 RNA を イソプロパノールを用いて沈殿させた。その後、回収した全 RNA から染色体 DNA を除去するため、RNase-free DNase (Promega, Madison, WI, USA) を 37 °C で 15 分間反応させた。この全 RNA、Random primers (Promega) そして

SuperScriptIII (Invitrogen) を使用して逆転写反応を行い、cDNA を合成した。作製した cDNA を鋳型として、各遺伝子の発現を SYBR green (Bio-Rad) を用いた Real-time Reverse transcription-PCR (Real-Time RT-PCR) 法により調べた。遺伝子増幅反応ならびに SYBR green 蛍光強度の測定には iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad) を使用した。RT-PCR の条件は添付の指示書に従い設定した。各遺伝子の増幅には、表 2 に示すプライマーを用いた。また、コントロール反応として 16S rRNA 遺伝子の増幅・定量を行った。PCR の条件は添付の指示書に従い設定した。

## 12) バイオフィルム中の菌および菌体外多糖の観察

菌体外多糖グルカンの産生とそれに伴うバイオフィルム構造の変化を、Koo ら (2010)<sup>26)</sup>の方法に従って観察した。供試菌を 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。その後、2.5 mM の SYTO 9 green fluorescent nucleic acid stain (Molecular Probes Inc.) により菌体を染色し、1 μM の Alexa Fluor 647-labeled dextran (Molecular Probes Inc.) を添加した 1%スクロース含有化学合成培地 (CDM; 58 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 15mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 35 mM NaCl, 0.2% Casamino acids, 100 μM MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O (pH7.4), 20 mM Nicotinic acid, 50 mM Pyridoxine HCl, 5 mM Pantothenic acid, 0.5 mM Riboflavin, 0.15 mM Thiamin HCl, 0.015 mM

D-biotin, 50 mM L-glutamic acid, 12.5 mM L-arginine HCl, 16.25 mM L-cysteine HCl, 1.25 mM L-tryptophan, 1 M MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; 和光純薬) にて, 菌液を吸光度 600 nm が 0.1 になるように調整した。この菌液を 8 穴 Lab-Tek チャンバースライドシステム (Nunc, NY, USA) の各ウェルに 200 μL ずつ播種し, 嫌気下で, 37 °C で 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 LSM 510 (Version 4.2, Carl Zeiss MicroImaging Co.) にて観察し, ImageJ (Version 10.2, Bethesda, MD, USA) により, バイオフィルムの性状を検討した。さらに, 形成されたバイオフィルムの密度と厚さを ImageJ (Version 10.2) を用いて数値化した。

### 13) 2次元電気泳動

供試菌を BHI 液体培地を用いて 37 °C で 18 時間培養後, 集めた菌体に 8 M Urea (Becton Dickinson) を加え, 1 時間室温で攪拌した後, 遠心分離を行った。得られた上清に 60%飽和 Ammonium sulfate (ナカライテスク) を加え, 4 °C で一晩攪拌した後, 遠心分離により得られたペレットを菌体表層タンパクとして実験に供試した。このタンパクサンプルを Ready Prep 2-D Cleanup Kit (Bio-Rad) を用いて脱塩処理し, Rehydration/Sample Buffer (Bio-Rad) に溶解した。サンプルのタンパク定量を行った後, Destreak rehydration solution (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) および, IPG buffer;

pH4-7 (GE Healthcare) を加え、2次元電気泳動を行った。1次元目として、調整したタンパクを ReadyStrip IPG Strips; pH5.5-6.7 (Bio-Rad) にアプライした後、PROTEAN IEF Cell (Bio-Rad) にセットし、泳動を行った (250 V : 15 分, 4000 V : 6 時間, 5000 V : 12 時間, 20 °C)。泳動後の IPG Strips を ReadyPrep 2-D Starter Kit (Bio-Rad) を用いて、平衡化を行った後、2次元目として、IPG Strips を 7.5% SDS-PAGE ゲル内に ReadyPrep Overlay Agarose (Bio-Rad) にて固定し、分子量測定マーカーに Precision Plus Protein Dual Color standards (Bio-Rad) を用いて、Mini-PROTEAN Tetra System (Bio-Rad) により、室温で 0.03 A 定電流で電気泳動を行った。Plus One Silver Staining kit (GE Healthcare) にて銀染色を行い、タンパクを可視化した。2次元電気泳動像を PDQuest 2次元電気泳動ソフトウェア (Bio-Rad) を用いて解析し、発現量の変化がみられたスポットを同定した。

#### 14) バイオフィルム破碎試験

供試菌を 10 mL の BHI 液体培地にて 37 °C で 18 時間培養後、培養した供試菌液を 0.5% スクロース添加した TH 液体培地に播種し、6 穴細胞培養用マイクロタイタープレート (FALCON) の各ウェルに 10 mL ずつ分注して、37 °C で 24 時間嫌氣的に培養し、バイオフィルムを形成させた。上清を取り除いた後、PBS にて洗浄

し上清を取り除き,再び PBS を加え, Handy Sonic model UR-20P (トミー精工, LTD, 東京) にて 1 分または 2 分間, レベル 7 で超音波を当てた。上清を取り除いた後, PBS で洗浄して, 再び PBS を加え, セルスクレーパー (スミロン, 住友ベークライト, 東京) を用いて, 残存するバイオフィルムを剥がした。その菌液を滅菌生理食塩水にて段階的に希釈し, それぞれの希釈液を Trypticase Soy 寒天培地 (Becton Dickinson) に播種し, 37 °C で 2 日間嫌気培養した。AD1 株の Trypticase Soy 寒天培地には EM (10 µg/mL; 和光純薬) を添加して用いた。

#### 15) 統計処理

実験は各 3 回行い, 得られた結果は平均±標準偏差で示し, 統計学的有意差の検定は ANOVA の Fisher's PLSD を用いて行った。

## 結 果

### 1) バイオフィルム形成量

MY8148 株, AD1 株, BD1 株, CD1 株のバイオフィルム形成量を測定したところ, MT8148 株と比較して, BD1 株, CD1 株ではバイオフィルムの形成量が有意に低下していたが ( $P < 0.001$ ), GbpA 欠失株である AD1 株においては MT8148 株と比較して有意な差は認められなかった (図 2)。また, 親株を UA159 株, NG8 株, GS5 株とした GbpA 欠失株である UA159 AD1 株, NG8 AD1 株, GS5 AD1 株においても, それぞれの親株と比較して有意な差は認められなかった (図 3)。

### 2) バイオフィルム中の菌体分布

バイオフィルムの構造を共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した (図 4)。親株である MT8148 株と比較して, GbpA 欠失株である AD1 株では, 生存菌体による著明な凝集塊が認められた。一方, BD1 株, CD1 株においては, それぞれバイオフィルムの形成に変化はみられたものの, AD1 株に認められたような著明な生存菌体による凝集は認められなかった。

### 3) GTF の発現量と活性

NIH イメージを用いて GTFB と GTFC の発現量を数値化して比較したところ、親株と比較して、それぞれの GbpA 欠失株の GTFB と GTFC の発現量の有意な上昇が認められた (図 5)。

NIH イメージを用いてグルカン合成量を数値化して比較したところ、親株と比較して、それぞれの株の GbpA 欠失株において GTFB と GTFC の活性の上昇が認められた (図 6)。

#### 4) *gtf*, *dnaK* および *groEL* の発現解析

*gtfB* の発現量は MT8148 株と比較して AD1 株で上昇が認められた ( $P < 0.001$ )。  
*gtfC* は *gtfB* と同様、MT8148 株と比較して AD1 株で発現の上昇が認められた ( $P < 0.05$ )。  
*gtfD* の発現量は、MT8148 株と比較して BD1 株では上昇を認めたが ( $P < 0.05$ )、CD1 株では逆に減少していた ( $P < 0.001$ )。また AD1 株の *gtfD* の発現は MT8148 株との間に差は認められなかった (表 3)。MT8148 株と比較して AD1 株では *dnaK*, *groEL* 遺伝子の発現の上昇が認められた (図 7)。

#### 5) 共焦点レーザー顕微鏡によるバイオフィーム構造の観察

MT8148 株では、菌が底面に均一に付着し、その上方に菌体外多糖が合成され、

緊密なバイオフィルムの形成が認められた。しかし、AD1 株においては、菌が底面に不規則に付着しており、その上方のグルカンの合成量が増加し、粗造で不均一なバイオフィルムが形成されていた (図 8)。imageJ によりバイオフィルムの密度と厚さを数値化したところ、AD1 株では、MT8148 株と比較して、バイオフィルムの密度が有意に低かった。一方でバイオフィルムの厚さは、MT8148 株で 11.0  $\mu\text{m}$ 、AD1 株では 28.9  $\mu\text{m}$  であり、AD1 株で有意に増加していた (図 9)。

#### 6) 表層タンパクの発現の変化

2次元電気泳動の結果、数多くのタンパクスポットが検出された。親株である MT8148 株と比較して、AD1 株では、タンパクの発現パターンが大きく変化していた。MT8148 株では GTFB のスポットは認められなかったものの AD1 株では、GTFB が大きなスポットとして観察され、その発現が著明に上昇していることが明らかとなった。NG8 AD1 株においても同様に、GTFB の発現が著明に上昇していることが明らかとなった (図 10)。2次元電気泳動像を PDQuest 2次元電気泳動ソフトウェアを用いて解析し、発現量に変化したスポットを調べた結果、MT8148 株と比較して AD1 株で発現が 2 倍以上上昇したものが 39 個、一方、発現が 2 分の 1 よりも減少したものが 69 個、それぞれ認められ、タンパクの発現パターンが大き

く変化していることが明らかとなった。MT8148 株と比較して BD1 株では、発現上昇しているものが 10 個、発現減少しているものが 6 個であり、CD1 株では、発現上昇しているものが 43 個、発現減少しているものが 43 個であり、やはり AD1 株で大きい変化が認められた (表 4)。

#### 7) 超音波破碎に対するバイオフィルムの抵抗性試験

1 分間超音波を当てた場合に残存したバイオフィルム中の菌数は、MT8148 株と AD1 株で差が認められなかったが、2 分間超音波を当てた場合に残存したバイオフィルム中の菌数は、MT8148 株は 24.7%に減少したが、AD1 株では 8.1%に減少しており、MT8148 株と比較して AD1 株で有意差が認められた。また、超音波破碎前のバイオフィルム中の総菌数には、MT8148 株と AD1 株の間に差は認められなかった。MT8148 株と AD1 株の間に差は認められなかった (図 11)。

## 考 察

Gbp は酵素活性を持たないタンパクであるが、*S. mutans* の病原性において Gbp は、菌の付着と堆積に関与していることが報告されている<sup>4)</sup>。GTF により合成されたグルカンは、*S. mutans* 菌体表層に発現する Gbp と特異的に結合する<sup>27)</sup>。さらにこれらの作用により、Gbp は細菌と強固に結合し、バイオフィルムの骨格を形成し、バイオフィルムの構造を一定に保つ<sup>26)</sup>。しかしながら、GbpA は齲蝕原性に強く関わりがあるとされているにもかかわらず<sup>10)</sup>、本研究において親株 MT8148 株と比較して、GbpA 欠失株におけるバイオフィルムの形成量は、GbpB 欠失株や GbpC 欠失株と比較して、大きな差はないことが示された。そのため、バイオフィルム構造の違いを検討したところ、AD1 株のバイオフィルム構造は、親株と比較して菌の凝集が認められ、大きく異なっていることが明らかとなった。

この凝集が形成された理由として、*gtf* の発現の変化が考えられたため、AD1 株における *gtf* の発現を調べたところ、親株と比較して *gtfB* の発現の上昇が認められた。この変化と同様に、GTFB のタンパク発現量の増加も認められた。さらに、菌の分布とグルカンの構造を検討するために、蛍光ラベルしたデキストランを用いてこれらの菌株にバイオフィルムを形成させ、共焦点レーザー顕微鏡により構造を観察した。AD1 株により形成されたバイオフィルムの構造は親株と比較して菌体

外多糖 (Exopolysaccharide; EPS) の産生が顕著に増加しており、構造は大きく変化していた。

CLSM 像では、AD1 株における EPS の形成量が増加していたために、バイオフィルムの厚みは上昇していたが、これらのバイオフィルムは、密度の低い菌から成り立っていることが認められた。そのため、菌株間の結合の度合いを調べるために超音波によりバイオフィルムの粉砕試験を行ったところ、AD1 株により形成されたバイオフィルムは、親株のものと比較して、結合力は弱いことが明らかとなった。AD1 株により形成されたバイオフィルムの菌体外多糖と菌体の割合が MT8148 株により形成されたものと比較して、顕著に高くなっており、このことは、菌体外多糖に菌体が強固に固定されていないことを示唆する。GbpA は、バイオフィルム形成の成熟段階において、バイオフィルムを完全な状態にするのに寄与していると考えられる。GbpA の特異的な役割として、微小コロニーの散乱、拡散、および分離などを調整している可能性も示唆される。

ヒト口腔のバイオフィルムは、小さな環境変化に対しては、比較的安定している<sup>28)</sup>。また、バイオフィルムの構造形成においては、細菌の増殖速度、細菌間のシグナル伝達および EPS 産生のような細菌に由来する多くの因子による影響を受ける一方で、物理的な増殖環境もまた、バイオフィルム構造の決定に重要な役割を果た

すとされる<sup>29)</sup>。このことから、GbpA の欠失は、EPS 産生の変化を引き起こし、そのことによって物理的な増殖環境が変化し、バイオフィルムの構造を大きく変化させたと考えられる。一方で、*S. mutans* のシグナル伝達システムである 2 成分制御系は、環境の変化を感受し、特異的な遺伝子の発現を変化させることにより、細菌の適応、生存および病原性において重要な役割を果たす<sup>30)</sup>。DnaK, GroEL はシグナル伝達システムにおいても機能するストレス応答タンパクとして知られている。本研究では、AD1 株において親株と比較して、*dnaK*, *groEL* の発現が上昇していた。AD1 株は、GbpA を欠失しているために菌体外多糖と結合することができず、低 pH や酸などのストレスにさらされることとなる。そのために、GroEL や DnaK などのストレス応答タンパクの発現が上昇したことが示唆される。さらに、2 次元電気泳動でタンパクのプロファイルを観察したところ、AD1 株で多くのタンパクの発現に変化が認められ、GbpA は直接的あるいは間接的に、あるいは多面的にこれらのタンパクの発現に影響を及ぼすことを示している。*gtfB* の発現が顕著に上昇していることは、GbpA の欠失により、GTF の産生するグルカンがバイオフィルム内で架橋構造をつくることができず、安定したバイオフィルムを形成されないことに対するストレス反応である可能性が示唆される。しかしながら、これらにメカニズムは不明な点が多く、今後の検討課題と考えられる。

バイオフィルムは、菌体外多糖のマトリックス内に組み込まれている細菌の集合体である。バイオフィルムの一般的な特徴である菌体外多糖の産生や抗生剤感受性の低下は、すでに報告されているが、バイオフィルム形成には、多くの特異的な遺伝子が関与している<sup>31)</sup>。バイオフィルムの構造は、主として細菌細胞が組み込まれているEPSマトリックスやグリコカリックスから成り立っている<sup>32)</sup>。通常は、バイオフィルムはEPSと菌との規則的な結合により、均一な構造を呈している。そして、このようなバイオフィルムは、酸や、抗生物質そして低pHなどのストレスに対して抵抗性を示す。しかしながら、GbpAの欠失によりバイオフィルムはEPSとの結合が弱いものに変化し、弱く不均一なものに変化する。GbpAの欠失による環境の変化に対応するため、*gtfB*の発現の上昇によるグルカン合成の増加や、ストレス応答タンパクの発現の上昇が行なわれたと考えられる。以上のことから、GbpAは、種々のタンパク発現に影響を与えると同時に、バイオフィルムを構成する菌体外多糖の結合に重要な役割を果たし、バイオフィルムをバランスのとれた安定した形に保つために、極めて重要なタンパクであると示唆される。

GbpAタンパクの欠失は、EPS産生と遺伝子の発現に変化をもたらし、バイオフィルムの構造を大きく変化させることがわかった。そのため、GbpAは安定で強固なバイオフィルムの形成には、不可欠であると考えられる。しかしながら、グル

カン合成に関わるタンパク発現とストレス応答タンパクの関連は今回の実験のみでは明らかとなっていない。今後は、*S. mutans* のバイオフィルム形成における表層タンパクとストレス応答についてさらなる検討が必要である。

## 結 論

*S. mutans* MT8148 株, UA159 株, NG8 株, GS5 株それぞれの *gbpA* を欠失させた株, AD1 株, UA159 AD1 株, NG8 AD1 株, GS5 AD1 株および, MT8148 株の *gbpB* あるいは *gbpC* を欠失させた BD1 株, CD1 株を用いて実験を行い, GbpA の役割について以下の結果を得た。

1. バイオフィルムの構造において, MT8148 株と比較して AD1 株では, 生存菌体による著明な菌体凝集が認められたが, BD1 株, CD1 株においては顕著な菌体凝集は認められなかった。また, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した結果, MT8148 株では, 均一なバイオフィルムが形成されているものの, AD1 株では, 巨大な凝集塊が認められ, 菌が底面に不規則に付着し, 粗造で不均一なバイオフィルムが形成されていた。得られた像を解析したところ, AD1 株では, MT8148 株と比較して密度が有意に低かった。
2. 超音波によるバイオフィルム破砕試験によって, 各菌株により形成されたバイオフィルムを破砕したところ, 残存したバイオフィルム中の菌数は, MT8148 株と比較して AD1 株では減少していた。
3. *gtfB*, *gtfC* の発現量は MT8148 株と比較して AD1 株で発現の上昇が認められ

た。*gtfD* の発現量は, MT8148 株と比較して CD1 株にのみ発現の減少が認められ, AD1 株および BD1 株において発現に変化は認められなかった。さらに AD1 株では, MT8148 株と比較して *dnaK*, *groEL* の発現の上昇が認められた。

以上の結果より GbpA タンパクの欠失は, EPS 産生と *gtf*, *dnaK* および *groEL* などの遺伝子の発現に変化をもたらし, バイオフィルムの構造を大きく変化させることがわかった。そして, GbpA は安定で強固なバイオフィルムの形成には, 不可欠であることが示唆された。

## 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、ならびに大阪大学大学院歯学研究科小児歯科学教室の諸先生に厚く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Hamada, S. and Slade, H. D.: Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.*, **44**, 331-384, 1980.
- 2) Hamada, S., Koga, T. and Ooshima, T.: Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. *J. Dent. Res.*, **63**, 407-411, 1984.
- 3) Kuramitsu, H. K.: Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, **4**, 159-176, 1993.
- 4) Banas, J. A. and Vickerman, M. M.: Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit. Rev. Oral. Biol. Med.*, **14**, 89-99, 2003.
- 5) Russell, R. R. B., Coleman, D. and Dougan, G.: Expression of a gene for glucan-binding protein from *Streptococcus mutans* in *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.*, **131**, 295-299, 1985.
- 6) Smith, D. J., Akita, H., King, W. F. and Taubman, M. A.: Purification and antigenicity of a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, **62**, 2545-2552, 1994.
- 7) Sato, Y., Yamamoto, Y. and Kizaki, H.: Cloning and sequence analysis of the *gbc* gene encoding a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*,

- 65**, 668-675, 1997.
- 8) Shah, D. S. H. and Russell, R. R. B.: A novel glucan-binding protein with lipase activity from the oral pathogen *Streptococcus mutans*. *Microbiology.*, **150**, 1947-1956, 2004.
- 9) Banas, J. A., Russell, R. R. B. and Ferretti, J. J.: Sequence analysis of the gene for the glucan-binding protein of *Streptococcus mutans* Ingbritt. *Infect. Immun.*, **58**, 667-673, 1990.
- 10) Matsumoto, M., Fujita, K. and Ooshima, T.: Binding of glucan-binding protein C to GTFD-synthesized soluble glucan in sucrose-dependent adhesion of *Streptococcus mutans*. *Oral. Microbiol, Immunol.*, **21**, 42-46, 2006.
- 11) Matsumoto-Nakano, M., Fujita, K. and Ooshima, T.: Comparison of glucan-binding proteins in cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Oral. Microbiol. Immunol.*, **22**, 30-35, 2007.
- 12) Banas, J. A., Miller, J. D., Fuschino, M. E., Hazlett, K. R. O., Toyofuku, W., Porter, K. A., Reutzel, S. B., Florczyk, M. A., McDonough, K. A. and Michalek, S. M.: Evidence that accumulation of mutants in a biofilm reflects natural selection rather than stress-induced adaptive mutation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **73**, 357-361, 2007.

- 13) Hazlett, K. R., Mazurkiewicz, J. E. and Banas, J. A.: Inactivation of the *gfpA* gene of *Streptococcus mutans* alters structural and functional aspects of plaque biofilm which are compensated by recombination of the *gtfB* and *gtfC* genes. *Infect. Immun.*, **67**, 3909-3914, 1999.
- 14) Inagaki, S., Fujita, K., Takashima, Y., Nagayama, K., Ardin A. C., Matsumi, Y., and Matsumoto-Nakano, M.: Regulation of recombination between *gtfB/gtfC* genes in *Streptococcus mutans* by recombinase A. *Scientific. World. Journal.*, **10**, 1155, 2013.
- 15) Burne, R. A., Schilling, K., Bowen, W.H. and Yasbin, R. E.: Expression, purification, and characterization of an exo-beta-D-fructosidase of *Streptococcus mutans*. *Microbiology.*, **169**, 4507-4517, 1987.
- 16) Lindquist, S. and Craig, E.A.: The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.*, **22**, 631-677, 1988.
- 17) Craig, E.A., Gambill, B. D. and Nelson, R.J.: Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.*, **57**, 402-414, 1993.
- 18) Ishibashi, K., Shimada, K., Kawato, T., Kaji, S., Maeno, M., Sato, S. and Ito, K.: Inhibitory effects of low-energy pulsed ultrasonic stimulation on cell surface protein antigen C through heat shock proteins GroEL and DnaK in *Streptococcus mutans*. *Appl.*

*Environ. Microbiol.*, **76**, 751-756, 2010.

- 19) Ooshima, T., Izumitani, A., Sobue, S. and Hamada, S.: Cariostatic effect of palatinose on experimental dental caries in rats. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, **36**, 219-223, 1983.
- 20) Murchison, H. H., Barrett, J. F., Cardineau, G. A. and Curtiss, R.: Transformation of *Streptococcus mutans* with chromosomal and shuttle plasmid (pYA629) DNAs. *Infect. Immun.*, **54**, 273-282, 1986.
- 21) Li, Y. H., Tang, N., Aspiras, M. B., Lau, P.C., Lee, J. H., Ellen, R. P. and Cvitkovitch, D. G.: A quorum-sensing signaling system essential for genetic competence in *Streptococcus mutans* is involved in biofilm formation. *J. Bacteriol.*, **184**, 2699-2708, 2002.
- 22) Perry, D., Nilsen, L. J. and Kuramitsu, H. K.: Mapping of cloned glucosyltransferase gene in *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, **50**, 130-135, 1985.
- 23) Lindler, L. E. 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.
- 24) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.*, **227**, 680-685, 1970.

- 25) Hamada, S., Hirokoshi, T., Minami, T., Okahashi, N. and Koga, T.: Purification and characterization of cell-associated glucosyltransferase synthesizing water-insoluble glucan from serotype *c* *Streptococcus mutans*. *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 335-344, 1989.
- 26) Koo, H., Xiao, J., Klein, M. I. and Jeon., J. G.: Exopolysaccharides Produced by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases modulate the establishment of microcolonies within multispecies biofilms. *J. Bacteriol.*, **192**, 3024-3032, 2010.
- 27) Lynch, D. J., Fountain, T.L., Mazurikiewicz, J. E. and Banas, J. A.: Glucan-binding proteins are essential for shaping *Streptococcus mutans* biofilm architecture. *FEMS Microbiol. Lett.*, **268**, 158-165, 2007.
- 28) Marsh, P. D.: Plaque as a biofilm: pharmacological principles of drug delivery and action in the sub- and supragingival environment. *Oral. Dis.*, **9**, 16-22, 2009.
- 29) Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. and Costerton, J. W.: Biofilm as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.*, **56**, 187-209, 2002.
- 30) Lemos, J. A., Abranches, J. and Burne, R. A.: Response of cariogenic streptococci to environmental stresses. *Curr. Issues. Mol. Biol.*, **7**, 95-107, 2005.
- 31) Kolter, R. and Losick, R.: One for all and all for one. *Science.*, **280**, 226-227, 1998.
- 32) Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. and Lappin-Scott,

H. M.: Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.*, **49**, 711-745, 1995.

## 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)

表1 使用したプラスミドおよび菌株

名称	特徴	由来
<i>Streptococcus mutans</i>		
MT8148	<i>S. mutans</i> 臨床分離株 (血清型 <i>c</i> )	Ooshima ら (1983)
UA159	<i>S. mutans</i> 臨床分離株 (血清型 <i>c</i> )	University of Alabama
NG8	<i>S. mutans</i> 臨床分離株 (血清型 <i>c</i> )	University of Florida
GS5	<i>S. mutans</i> 臨床分離株 (血清型 <i>c</i> )	D. Perry ら (1985)
AD1	pMMN26 を用いてMT8148 株のGbpA を欠失させた変異株, Em <sup>r</sup>	Matsumoto-Nakano ら (2007)
UA159 AD1	pMMN26 を用いてUA159 株のGbpA を欠失させた変異株, Em <sup>r</sup>	本研究
NG8 AD1	pMMN26 を用いてNG8 株のGbpA を欠失させた変異株, Em <sup>r</sup>	本研究
GS5 AD1	pMMN26 を用いてGS5 株のGbpA を欠失させた変異株, Em <sup>r</sup>	本研究
BD1	pKF8 を用いてMT8148 株のGbpB を欠失させた変異株, Sp <sup>r</sup>	Matsumoto-Nakano ら (2007)
CD1	pKF6 を用いてMT8148 株のGbpC を欠失させた変異株, Km <sup>r</sup>	Matsumoto-Nakano ら (2007)
<hr/>		
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	クローニング用大腸菌	ニッポンジーン
<hr/>		
プラスミド		
pGEM-T-easy	<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
pGEM-T	<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
pMMN25	MT8148 株より <i>gfpA</i> 遺伝子を含む BamH I と Xho I 断片を pGEM-T に挿入したもの, Amp <sup>r</sup>	Matsumoto-Nakano ら (2007)
pMMN26	pMMN25 の <i>gfpA</i> 遺伝子の977-978塩基部分にエリスロマイシン耐性遺伝子を挿入したもの, Amp <sup>r</sup> , Em <sup>r</sup>	Matsumoto-Nakano ら (2007)
pKF8	MT8148 株由来 <i>gfpB</i> 遺伝子の一部をpSF152に挿入したもの, Sp <sup>r</sup>	Matsumoto-Nakano ら (2007)
pKF5	MT8148 株由来 <i>gfpC</i> 遺伝子をpGEM -T-easy に挿入したもの, Amp <sup>r</sup>	Matsumoto-Nakano ら (2007)
pKF6	pKF5 の <i>gfpC</i> 遺伝子にカナマイシン耐性遺伝子を挿入したもの, Amp <sup>r</sup> , Km <sup>r</sup>	Matsumoto-Nakano ら (2007)
pMMN28	MT8148 株由来 <i>gfpC</i> 遺伝子を含む Nco I と Sac I 断片を pGEM-T に挿入したもの, Amp <sup>r</sup>	Matsumoto-Nakano ら (2007)

Amp<sup>r</sup> : アンピシリン耐性      Em<sup>r</sup> : エリスロマイシン耐性

Sp<sup>r</sup> : スペクチノマイシン耐性      Km<sup>r</sup> : カナマイシン耐性

表2 Real-time RT-PCR 法に使用したプライマー

名称	遺伝子番号	塩基配列	由来
16s-F	-	5'-GATGCTTCTGGGTTCCAAGCT-3'	Inagaki ら (2009)
16s-R		5'-CGATTACGAACTTCATTTCCGG-3'	
GTFB-F	SMU.1004	5'-GATGGGTGACAGTATCTGTTGC-3'	本研究
GTFB-R		5'-GAGCTACTGATTGTCGTTACTG-3'	
GTFC-F	SMU.1005	5'-GATGCTTCTGGGTTCCAAGCT-3'	本研究
GTFC-R		5'-CGATTACGAACTTCATTTCCGG-3'	
GTFD-F	SMU.910	5'-GTTTGATTACCTTGGGCACCACAACATTGG-3'	本研究
GTFD-R		5'-ACGTTTGCCTGACTTTGGGTCTGCGTTTGG-3'	
DnaK-F	SMU.82	5'-GGTACAACAACTCAGCAGTTGCAGTTCTT-3'	本研究
DnaK-R		5'-CCCCATCTTAGATTTGATGGAAAGAATTGT-3'	
GroEL-F	SMU.1954	5'-GCAGATGCAAGAAGTATGGTGCCTGGT-3'	本研究
GroEL-R		5'-AGAAGCAACCTCTGAAACTAGTTTAGCTCC-3'	

表3 *gtf* 遺伝子の発現解析

菌株	発現の割合 <sup>#</sup>		
	<i>gtfB</i>	<i>gtfC</i>	<i>gtfD</i>
AD1	3.15 ± 0.64***	3.23 ± 1.29*	1.1 ± 0.02
BD1	0.43 ± 0.13	1.34 ± 0.36	1.17 ± 0.03*
CD1	0.49 ± 0.06	1.09 ± 0.25	0.47 ± 0.05***

<sup>#</sup> 親株MT8148 株を 1 とした時の相対的な発現量で表す  
 MT8148 株との間で有意差検定を行った (\*  $P < 0.05$ , \*\*\*  $P < 0.001$ : Fisher's PLSD)

表4 Gbp 欠失によるタンパク発現の変化

菌株	スポット数	
	発現上昇 (> 2倍)	発現減少 (< 0.5倍)
AD1	39	69
BD1	10	6
CD1	43	43

## 図の説明

図 1. 親株および GbpA 欠失株の確認 *gbpA* の薬剤耐性カセット挿入部位の上流域と下流域にプライマーを設計し、各菌株の染色体 DNA を鋳型として PCR を行った。欠失株においては、薬剤耐性カセット (EM) の挿入にともない、親株に比べ PCR 産物の断片長が大きくなることを確認した。

図 2. MT8148 株および各 Gbp 欠失株のバイオフィルム形成量 MT8148 株と各 Gbp 欠失株との間で有意差検定を行った (\*\*\*)  $P < 0.001$ 。

図 3. 親株および GbpA 欠失株のバイオフィルム形成量 親株と GbpA 欠失株との間で有意差検定を行った。

図 4. MT8148 株および各 Gbp 欠失株の菌体の分布 (a) MT8148 株, (b) AD1 株, (c) BD1 株, (d) CD1 株。緑色：生存菌体, 赤色：死菌体。

図 5. 親株および各 AD1 株の GTFB および GTFC の発現量 縦軸は GTF タンパクの発現についてバンドの黒化度を NIH Image を用いて数値化した。親株と各

AD1 株との間で有意差検定を行った (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )。

図 6. 親株および各 AD1 株のグルカン合成量 縦軸は染色されたグルカンの面積を NIH Image により数値化した。親株と各 AD1 株との間で有意差検定を行った (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ )。

図 7. MT8148 株および AD1 株における *dnaK* および *groEL* の発現 *dnaK* (a) と *groEL* (b) それぞれの発現量を 1 とした相対値で示す。MT8148 株と AD1 株との間で有意差検定を行った (\*\*\*  $P < 0.001$ )。

図 8. MT8148 株および AD1 株のバイオフィルム構造 (a) MT8148 株, (b) AD1 株。緑色 : 菌体, 赤色 : 菌体外多糖。

図 9. MT8148 株および AD1 株のバイオフィルムの密度と厚さの比較 CLSM により得られた画像からバイオフィルムの密度と厚さを ImageJ を用いて数値化した。MT8148 株と AD1 株との間で有意差検定を行った (\*\* $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ )。

図 10. MT8148 株, NG8 株および各 AD1 株における 2 次元電気泳動プロファイル (a) MT8148 株, (b) AD1 株, (c) NG8 株, (d) NG8 AD1 株。

図 11. バイオフィルム破砕試験による菌数の変化 破砕前における親株 MT8148 株の菌数を 1 とした相対値で示す。MT8148 株と AD1 株との間で有意差検定を行った (\*\* $P < 0.01$ )。

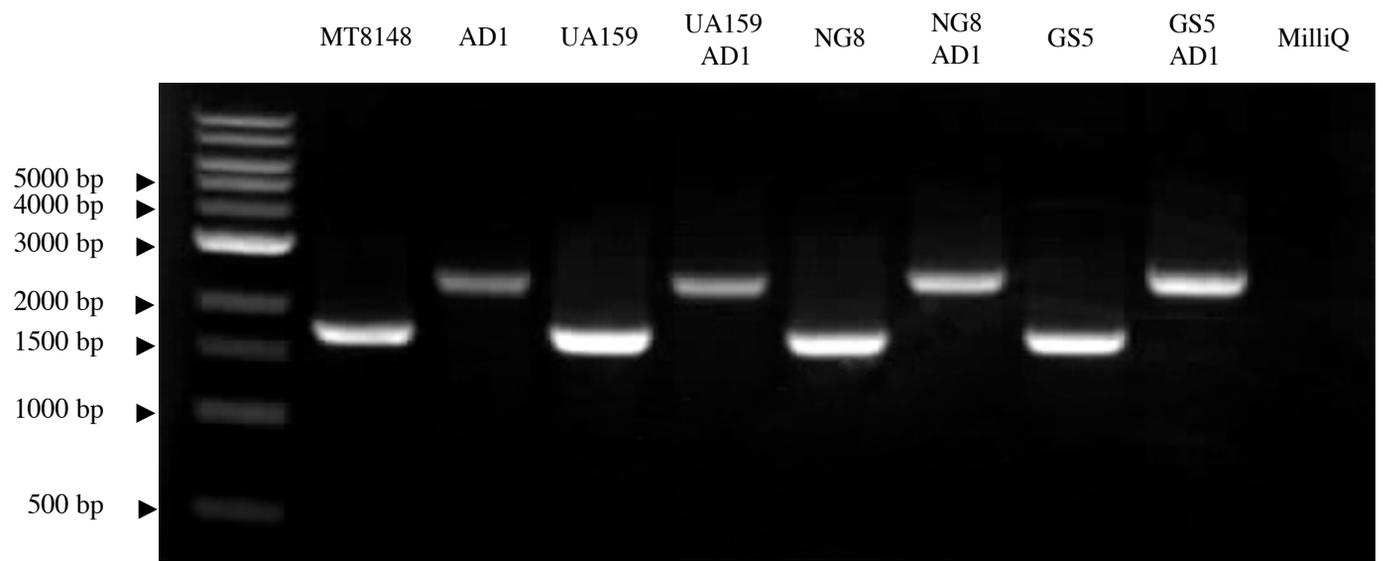


図1.

松三 友紀

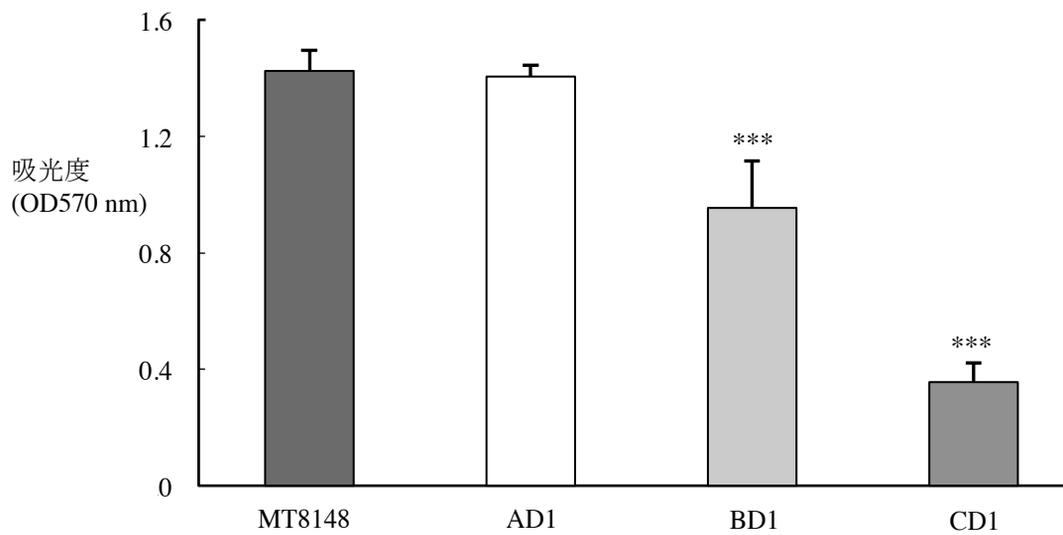


図2.

松三 友紀

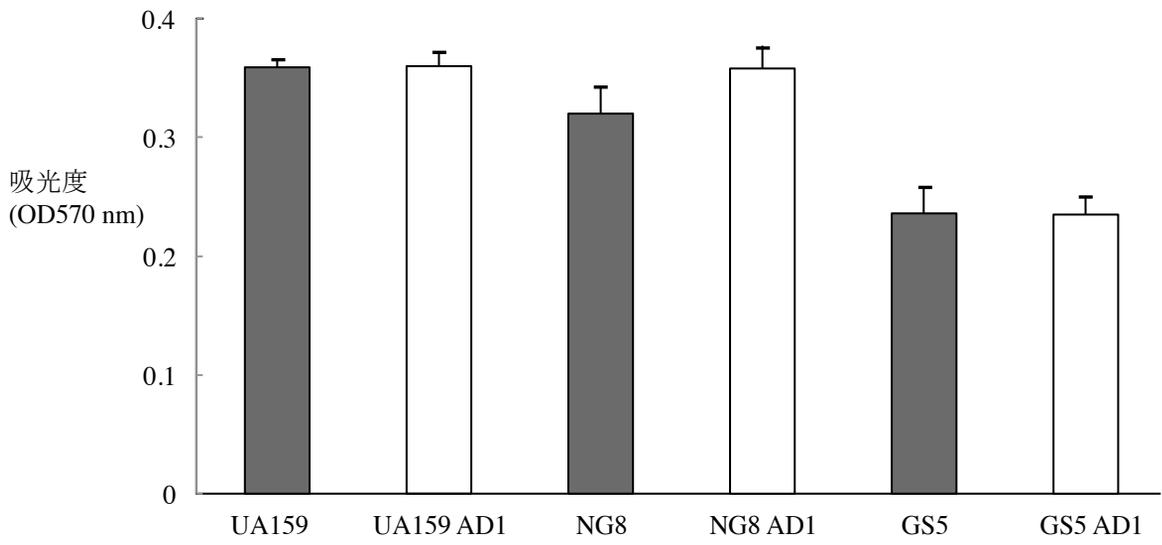
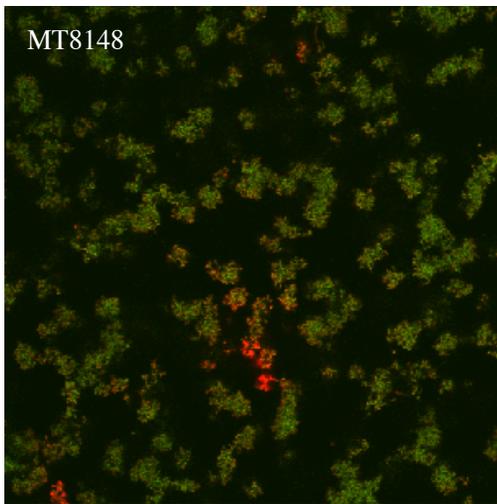


図3.

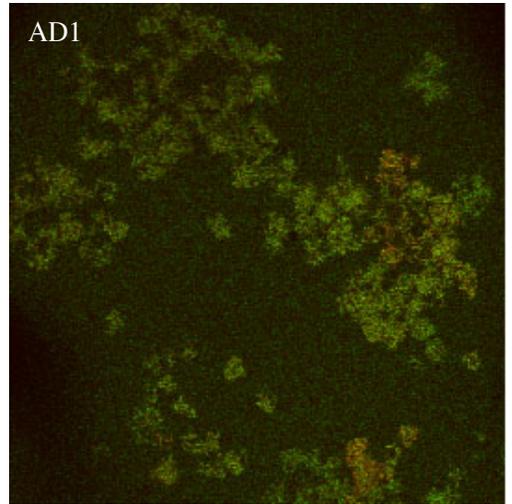
松三 友紀

(a)



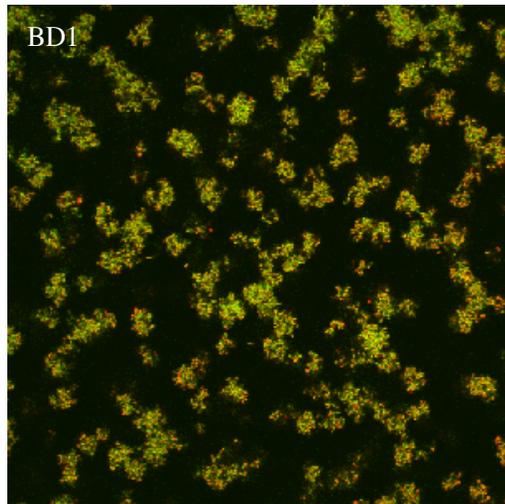
10 μm

(b)



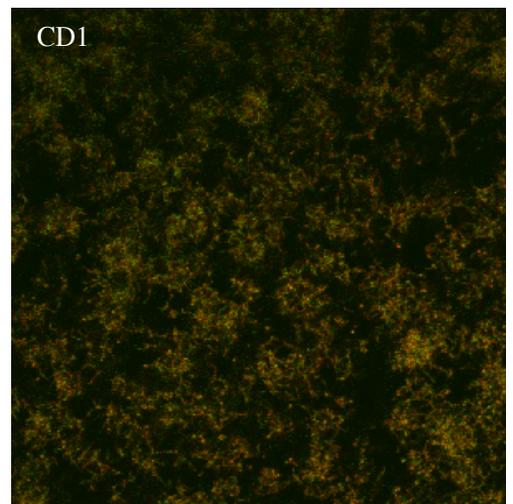
10 μm

(c)



10 μm

(d)



10 μm

図4.

松三 友紀

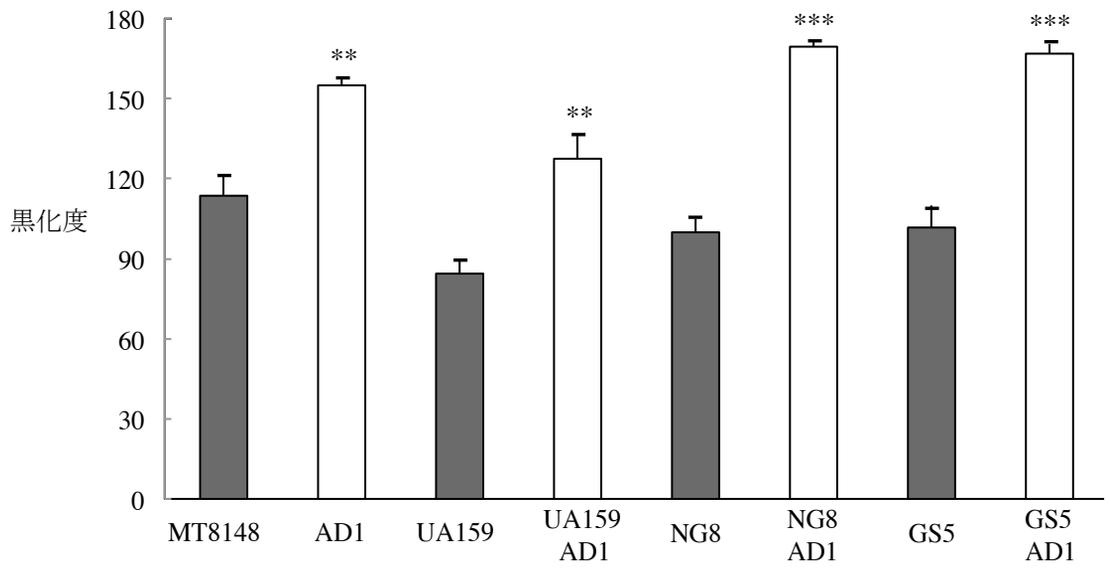


図5.

松三 友紀

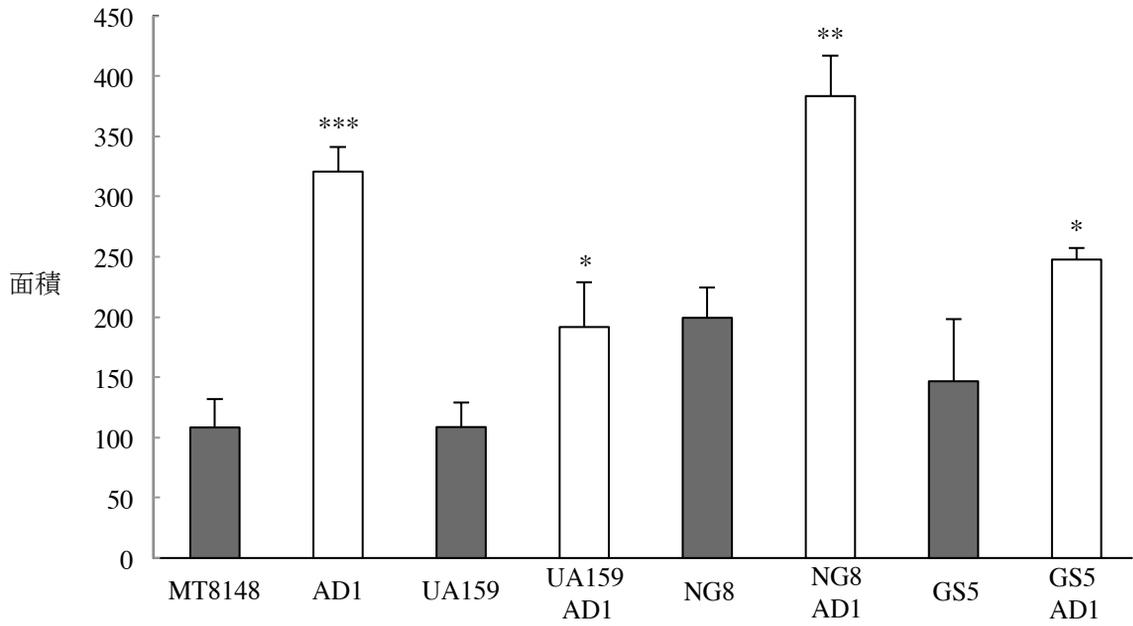


図6.

松三 友紀

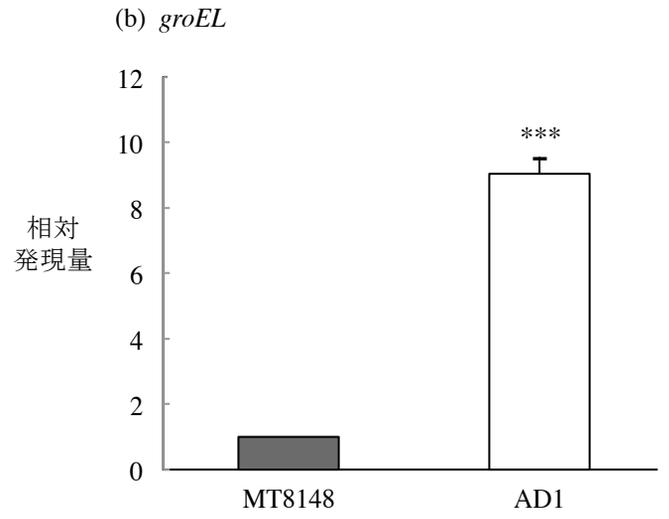
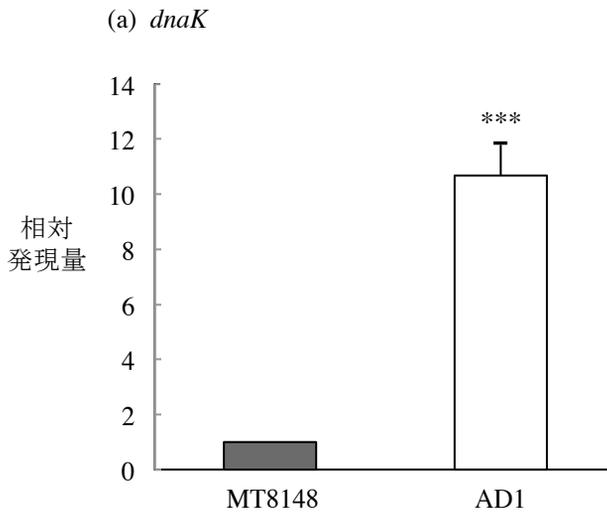
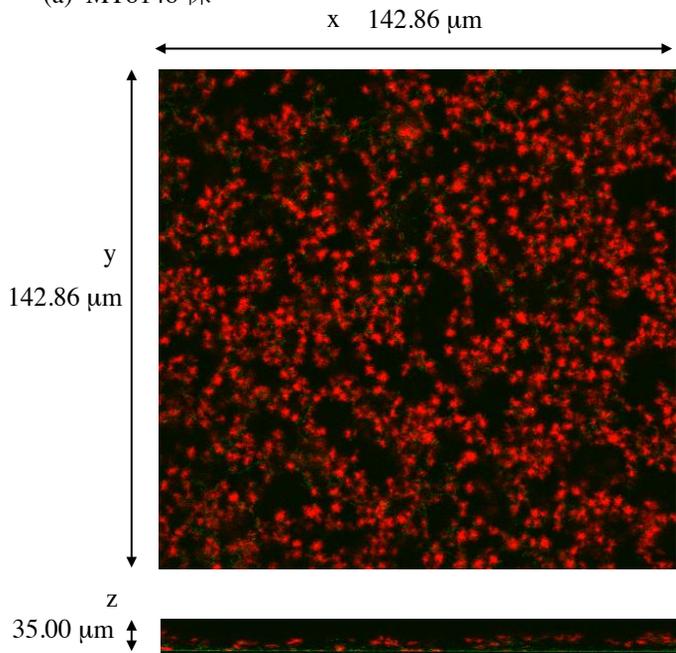


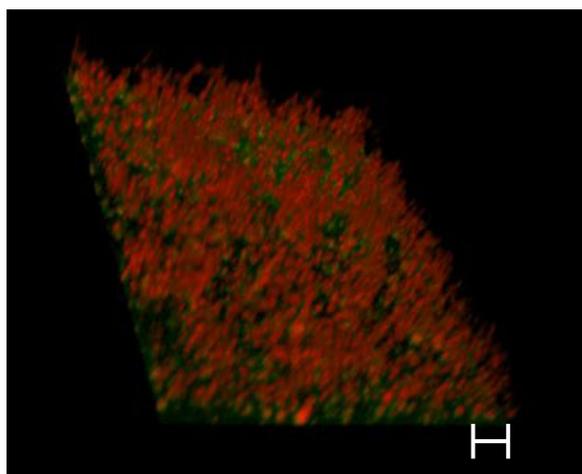
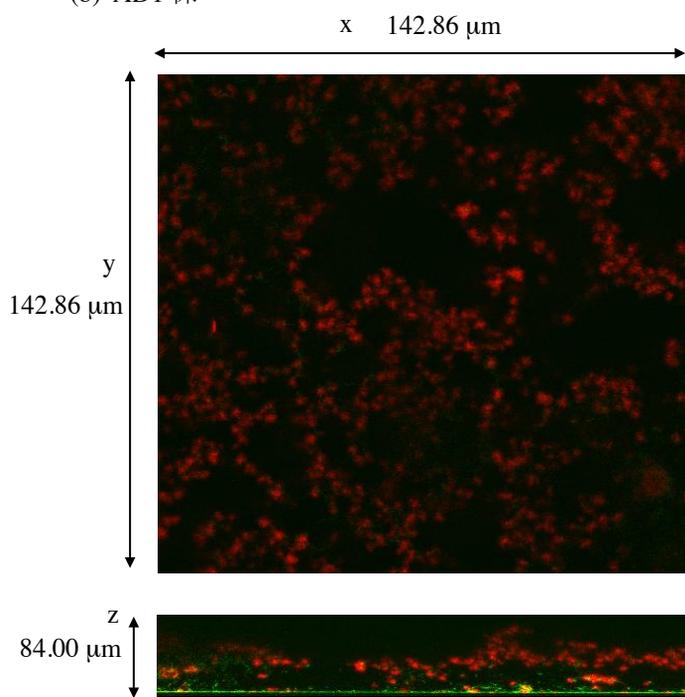
図7.

松三 友紀

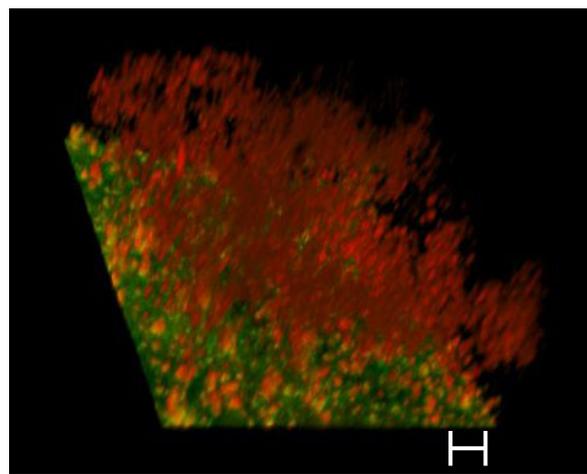
(a) MT8148 株



(b) AD1 株



10 $\mu\text{m}$



10 $\mu\text{m}$

図8.

松三 友紀

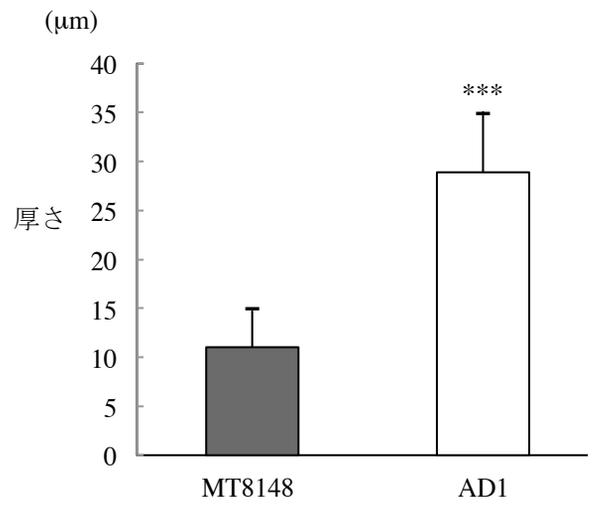
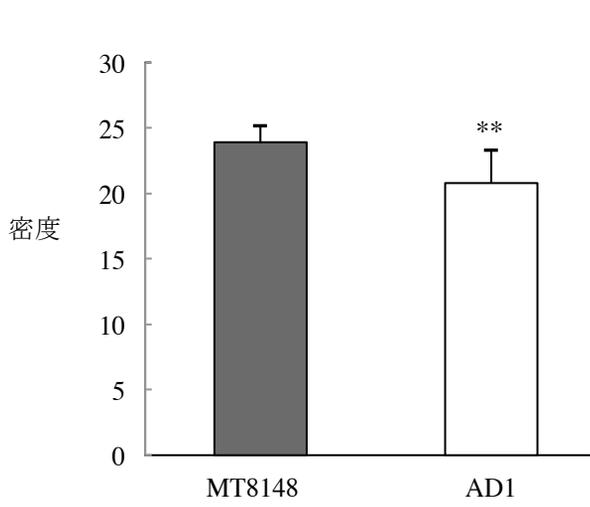
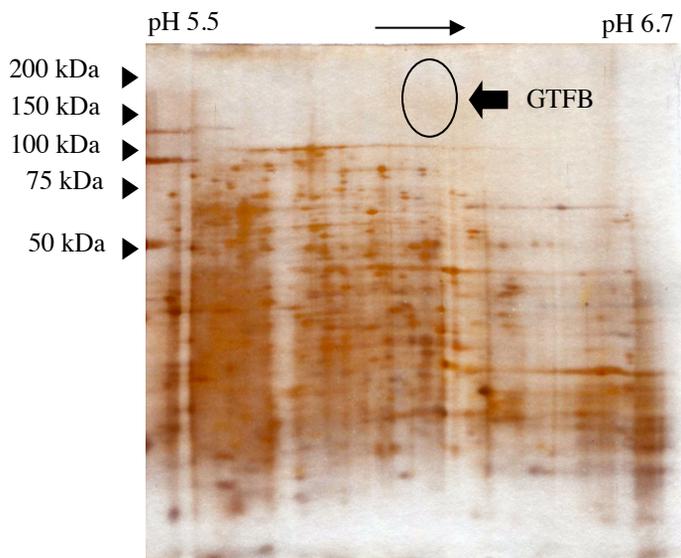


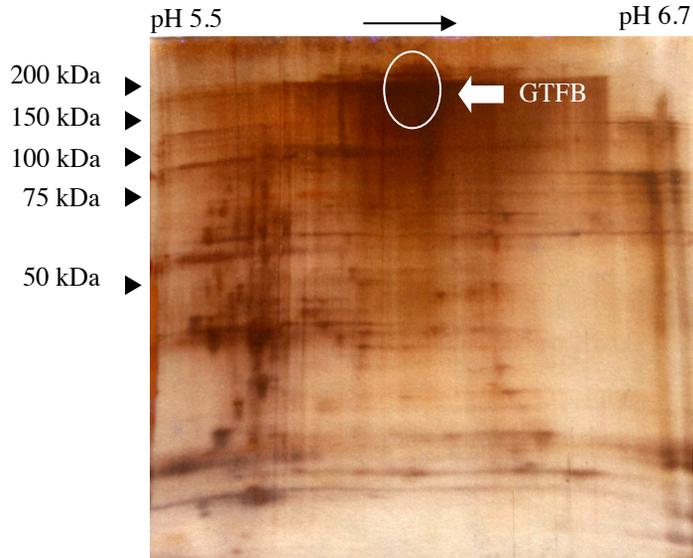
図9.

松三 友紀

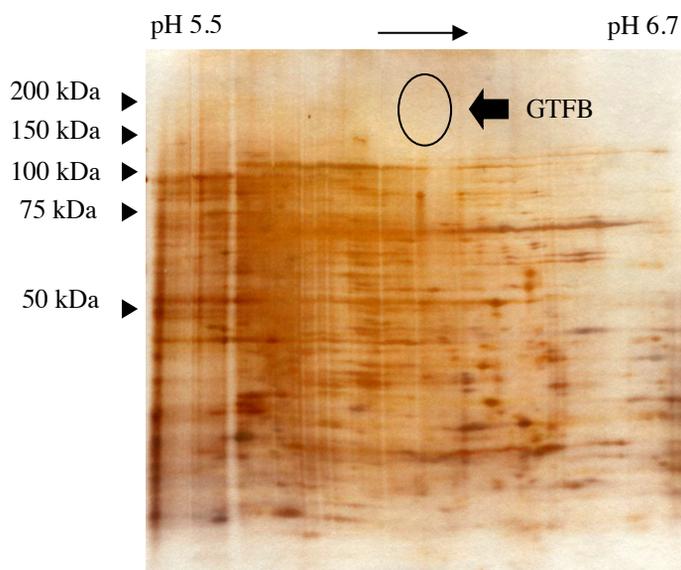
(a) MT8148 株



(b) AD1 株



(c) NG8 株



(d) NG8 AD1 株

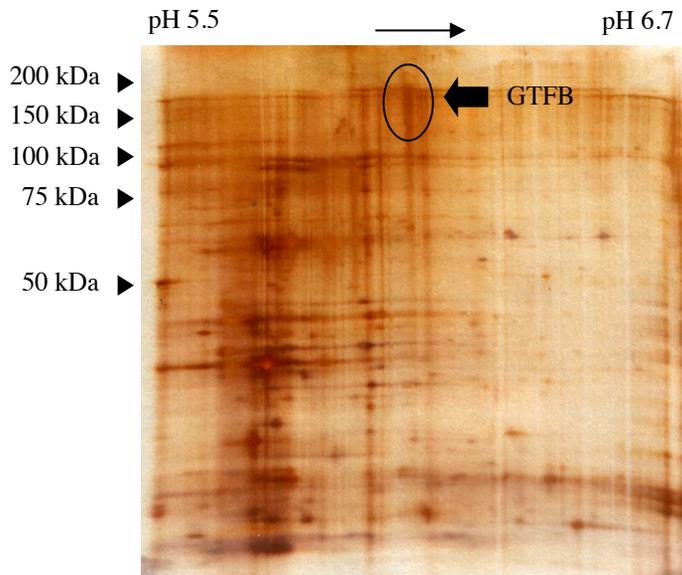


図10.

松三 友紀

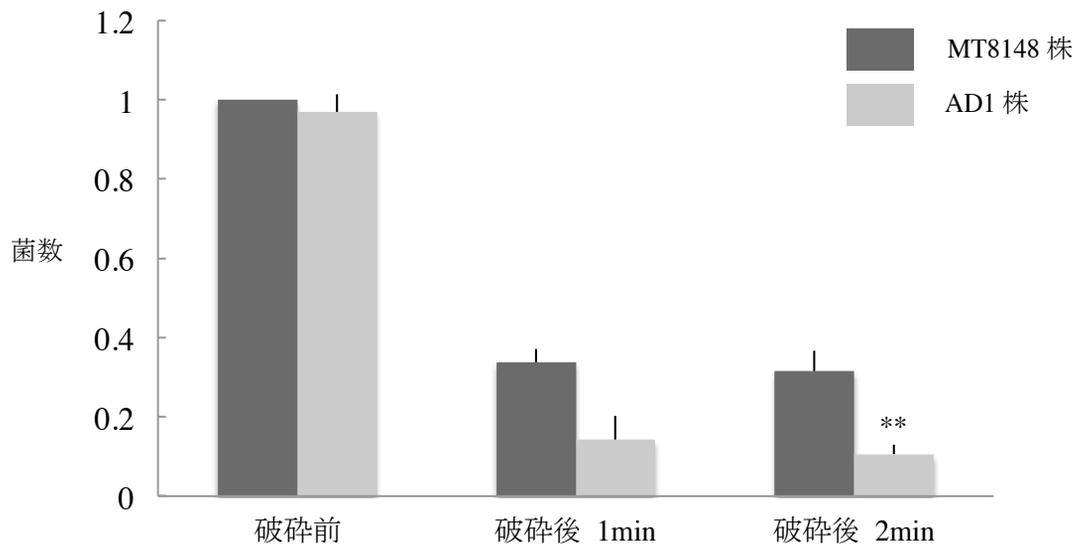


図11.

松三 友紀