

論文内容要旨

Opposing genetic polymorphisms of two ABC transporters contribute to the variation of nukacin resistance in *Streptococcus mutans*

(*Streptococcus mutans* におけるヌカシン耐性の多様性には、2つのABCトランスポーターの相反する遺伝子多型が関与している)

Applied and Environmental Microbiology Journal,
2024, in press.

主指導教員：柴 秀樹教授
(医系科学研究科 歯髄生物学)
副指導教員：大毛 宏喜教授
(広島大学病院 感染症学)
副指導教員：小松澤 均教授
(医系科学研究科 細菌学)

貞岡 直樹

(医系科学研究科 医歯薬学専攻)

【緒言】

Streptococcus mutans はう蝕原因細菌であるだけでなく、全身疾患にかかわる重要な病原細菌である。*S. mutans* は様々なバクテリオシンを産生し、同時にそれらに対する自己耐性を保持している。本研究では、*S. mutans* におけるバクテリオシン耐性メカニズムを解明する目的で、バクテリオシンの一つであるヌカシン耐性に関わる 2 つの ABC トランスポーター (LctFEG と MukFEG) に着目し、検証した。

【材料と方法】

1. *S. mutans* 臨床分離株における LctFEG, MukFEG 領域のアミノ酸配列の比較

S. mutans 臨床分離株 126 株と UA159 株の全ゲノムデータを用いて、LctFEG と MukFEG のアミノ酸配列に加えて、それらに関連する DNA 領域を検証した。

2. 遺伝子改変株および相補株の作製

S. mutans の培養は trypticase soy broth 液体培地 (TSB) を用いた。エリスロマイシン耐性遺伝子 (Em^r) またはスペクチノマイシン耐性遺伝子 (Sp^r) をそれぞれ PCR を用いて増幅し、ダブルクロスオーバー法を用いて *S. mutans* の標的遺伝子欠損株を作製した。相補株はフルクトース転移酵素をコードする *ftf* 遺伝子に Em^r と標的遺伝子を導入し、ダブルクロスオーバー法によって形質転換させた欠損変異株を用いた。

3. 感受性試験

バクテリオシンの抗菌活性は液体培地希釈法 (以下 MIC) と Direct 法で評価した。MIC は、精製したヌカシン ISK-1 とヌカシン KSE650 の 2 倍連続希釈液 (2 倍~128 倍希釈) を調整し、被検菌を接種し、37°C で 24 時間培養した後測定した。Direct 法では、ヌカシン ISK-1 産生菌の一晚培養液を TS 寒天培地 (TSA) にスポットし、37°C 好気条件下で 24 時間培養した。引き続き、指標菌を含む加温した TSA 軟寒天培地 (1%寒天) 5mL を TSA プレートに注ぎ、37°C CO₂ 条件下で 16 時間培養し、発育阻止円の直径からコロニーサイズ 5mm を差し引いた数値を抗菌活性範囲とし評価した。

4. 定量的 PCR 解析

RNA 抽出は Fast RNA Pro Blue Kit を用いて行った。cDNA 合成は First Stand cDNA Synthesis Kit を用いて行った。定量性 PCR は LightCycler を用いて行い、*lctF* と *mukF* の発現をそれぞれ評価した。

5. ヌカシン ISK-1 および KSE650 の精製

ヌカシン ISK-1 と KSE650 の培養上清を Macro-Prep CM を用いて粗精製し、HPLC によって両ヌカシンを精製した。ヌカシンの活性は一晚培養した *M. luteus* を TSA プレートに播種し、その後各ヌカシン精製サンプル 5μL を TSA にスポットし、抗菌活性を評価した。

6. 統計解析

GraphPad Prism version 10.1.0 を用いてスチューデントの t 検定および一元配置分散分析を用いて遺伝子発現の比較を行った。

【結果】

1. *S. mutans* 127 株のヌカシン感受性は多様であった。
2. ヌカシン耐性に関与する 2 つ ABC トランスポーターの LctF と MukF のアミノ酸配列タイプの組み合わせから、大きく 4 つのタイプ (TypeI α , TypeII α , TypeII β , TypeII γ) に分類した。
3. LctF-I 保有株 19 株の中で 18 株は Mutacin K8 合成関連遺伝子 (*mukA-T*) と MukFEG を保有していたが、LctF-II 保有株 108 株では 8 株のみが保有し、MukFEG のみの保有株が 19 株、両領域非保有株が 83 株であった。また、LctF-I 保有株は全て MukFa を保有していた。
4. 遺伝子破壊株のヌカシン感受性を検証した結果、LctF-I と MukFa のみ耐性に関与することが明らかとなった。
5. 2 つの ABC トランスポーターにおいて、1 つの ABC トランスポーターが耐性に関与するタイプである場合、もう一方の ABC トランスポーターは不活性化タイプ、非保有タイプあるいは発現抑制タイプであった。

【考察】

S. mutans のヌカシン耐性に相反する遺伝子多型が、ヌカシン感受性の多様性に寄与することが判明した。この多様性には Mutacin K8 合成に関わる *mukA-T* 領域の有無による LctF と MukF の 2 つの ABC トランスポーター間の変異が関与している。今回の結果からヌカシン耐性を担う 2 つの因子が存在する場合、一方の ABC トランスポーターは変異により機能を失い、よりその菌株にとって有効な因子のみが耐性機能を発揮するようになると考えられる。本研究は細菌のバクテリオシン耐性機構における新規メカニズムの存在を示唆し、遺伝子獲得による細菌の進化を理解する上でとても重要な知見を創出する。