

Streptococcus mutans における
分子シャペロン DnaK の分子生物学的解明

岡山大学医歯薬学総合研究科 社会環境生命科学

小児歯科学分野

吉田 衣里

(平成 29 年受付)

緒 言

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し，口腔内細菌の生育環境は様々なストレスに暴露されている¹⁾。これら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ける極めて重要な細胞防御機構であり，ストレス下で菌が生存し続けるためには，それらに対応するための種々のタンパクの発現が必要である²⁻⁷⁾。これらのタンパクはストレス応答タンパクと呼ばれ，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り細胞を保護し，菌の環境への適応に重要な役割を果たしている⁸⁻¹⁰⁾。熱ショックタンパク (heat shock protein ; HSP) である DnaK は熱ショックで誘導されるストレス応答タンパクであり，各種細菌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¹¹⁾。また，DnaK は同じく HSP である DnaJ および GrpE と協調して ATP を分解することで，分子シャペロンとしても機能する^{11, 12)}。その分子シャペロンタンパクの機能の一つとして，タンパクの高次構造を形成するフォールディングを助けたり，環境ストレスにより変性したタンパクの修正を行う¹¹⁾。

グラム陽性細菌における DnaK をコードする *dnaK* の発現は, HrcA タンパク (Heat-inducible transcription repressor) によって制御を受けていることがわかっている¹³⁾。*dnaK* は少なくとも *hrcA*, *grpE*, *dnaK* の3つの遺伝子からなるオペロンを構成している¹⁴⁾。HrcA は逆向き反復配列をもつ CIRCE 配列 (conserved inverted repeat controlling chaperone expression) に結合しており, 通常温度ではこの *dnaK* オペロンの発現をネガティブに制御しているが, ヒートショック温度を感知すると *hrcA* の5'末端に存在する σ^A プロモーターと *hrcA* の3'末端および *grpE* の5'末端に存在する σ^B プロモーターが機能することで, *hrcA* が不活化され, *dnaK* の発現の抑制が解除される¹⁴⁾。また, 別の HSP である GroELS シャペロニンの遺伝子の発現も同様に制御する¹⁵⁾。

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果たしている¹⁶⁾。*S. mutans* に特徴づけられる病原性として付着能, 酸産生能, 耐酸性が挙げられ¹⁷⁾, その菌体表層にはそれらの病原性と深く関与するタンパク構成成分が多数存在する。*S. mutans* の菌体表層には, 歯面に付着するために必要な粘着性のグルカンを産生するグルコシルトランスフェラーゼ

(Glucosyltransferase ; GTF) は GTFB, GTFC, GTFD の 3 種類が存在し, それぞれをコードする遺伝子が明らかにされている¹⁸⁾。GTFB および GTFC は菌体結合型で GTFB は非水溶性グルカンを産生し, GTFC は非水溶性グルカンおよび水溶性グルカンを産生する¹⁸⁾。GTFD は菌体遊離型であり培養上清中に存在し, 水溶性グルカンを産生する¹⁹⁾。グルカン結合タンパク (Glucan binding protein ; Gbp) は, GTF により合成された付着性グルカンと結合し, 菌の付着とデンタルプラークの堆積に関与する²⁰⁻²²⁾。*S. mutans* が産生する Gbp は GbpA²³⁾, GbpB²⁴⁾, GbpC²⁵⁾ の 3 種類が存在し, それらをコードする遺伝子も報告されている。GbpA は菌体外分泌型であり, GTFB のグルカン結合ドメインに存在する繰り返し構造と相同性が高く²⁶⁾, 特に *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²⁷⁾。GbpB は菌体結合型であり, 細胞の維持や分裂に関わり生命維持に必要な構成成分であると考えられている²⁸⁾。GbpC も同様に菌体結合型であり, 菌の凝集に関与することが報告されている²⁹⁾。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³⁰⁾。これらの表層タンパクの各機能を発揮することにより, *S. mutans* はバイオフィームを形成している

31)。形成されたバイオフィルム中で *S. mutans* は、スクロースを代謝することにより酸を産生し、バイオフィルム中の pH を低下させ、歯面を脱灰させる。この低 pH 環境の中で生育し続け酸を産生するには、菌自体の耐酸性が重要となってくる。*S. mutans* は *Streptococcus sanguinis* や *Streptococcus oralis* といったその他の口腔レンサ球菌と比較しても耐酸性能が高く³²⁾、その因子の一つとしてストレス応答タンパクの存在が挙げられる。そのうち DnaK は pH 感受性を持ち、酸によって損傷を受けたタンパクを取り除き、変性したタンパクを再度フォールディングすることで *S. mutans* が低 pH 状態に抵抗できる役割を果たしていると考えられている^{5, 33, 34)}。さらに、耐酸性能をもつことにより酸性環境下でも *S. mutans* は生育し続けるが、低 pH などのストレスにさらされた際に DnaK の発現が上昇することが報告されている³⁵⁾。

本研究では、*S. mutans* によるバイオフィルム形成において分子シャペロン DnaK が *S. mutans* の生物学的特性に与える影響について DnaK の発現変異株を用いて検討した。

材料と方法

1. 供試菌と培養条件

用いた菌株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³⁶⁾を野生株として用いた。また、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 pDL278³⁷⁾を用いて *S. mutans* MT8148 株の DnaK を過剰発現株 DnaK-o , DnaK の発現抑制株 DnaK-s を作製し, pDL278 を *S. mutans* MT8148 株に組み込んだ MT-pDL 株を作製し, コントロールとして実験に供試した。

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 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。spectinomycin 耐性を保持した *S. mutans* 株の培養には, spectinomycin (和光純薬, 大阪) を最終濃度 1 mg/ml で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) の培養は, Luria-Bertani 培地 (LB; 1% Tryptone, 0.5% Yeast Extract; Becton Dickinson and Company, 0.5%

NaCl; 和光純薬) を使用した。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。*E. coli* の培養には, 必要に応じて LB 培地に spectinomycin (100 µg/ml; 和光純薬) を添加して用いた。

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。10 ml の BHI 液体培地にて 37℃ で 18 時間培養した供試菌を遠心分離 (3,000 rpm, 10 分, 4℃) により集菌し, 250 µl の Glc-TE 緩衝液 (1 M glucose, 10 mM Tris-HCl; 和光純薬, 1 mM EDTA; 同仁化学研究所, 熊本) に再懸濁した。この懸濁液 250 µl に, N-acetylmuramidase SG (2.0 mg/ml; MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) 62.5 µl を加え, 37℃ で 90 分間反応させた。この反応液に Cell Lysis Solution (QIAGEN) 600 µl を加えて 80℃ で 5 分間, 次いで 3 µl の RNase A (10 µg/ml; QIAGEN) を添加し, 37℃ で 30 分間反応後, Protein Precipitation Solution (QIAGEN) を 200 µl を添加した。15,000 rpm で 3 分間遠心して得られた上清に, 600 µl の 2-propanol (和光純薬) を加え DNA を共沈させ, 70% ethanol (コニシ株式会社, 大阪) で沈殿を洗浄した。乾燥後,

TE 緩衝液 100 μ l に懸濁させた。DNA 溶液は波長 260 nm で吸光度を測定して濃度調整し、実験に使用した。

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-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol (Tris), 20 mM 酢酸; 和光純薬, 1 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), pH 8.0; 同仁化学研究所) 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 (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) と、1 kb ラダー (New England Biolabs) を使用した。泳動後のゲルは

Ethidium bromide (1 µg/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。

5. DnaK-o 変異株および DnaK-s 変異株の作製

(1) プラスミド pDnaKo および pDnaKs の作製

DnaK-o 変異株および DnaK-s 変異株は、Wang と Kuramitsu の方法³⁸⁾に準じて作製した。*S. mutans* UA159 株の *dnaK* 全塩基配列をもとにオリゴヌクレオチドプライマー DnaK-o-F と DnaK-o-R, DnaK-s-F と DnaK-s-R (表 2) を設計した。親株 MT8148 株の染色体 DNA を鋳型としてこれらプライマーと Ampli Taq Gold®を用いて、PCR 法を行った。PCR の反応は 95°C で 9 分間の事前加熱後、熱変性 (94°C で 30 秒), アニーリング (48°C で 30 秒), 伸長反応 (72°C で 2 分) を 30 サイクル行い、フラグメント A (センス鎖) とフラグメント B (アンチセンス鎖) を作製した (図 1)。シャトルベクター pDL278 を制限酵素 *Bam*HⅠと *Hind*Ⅲで消化した後、同様の制限酵素で消化したフラグメントとライゲーションした。得られた溶液 10 µl および氷上で融解した *E. coli* DH5α コンピテントセル 100 µl をチューブに入れて、氷中で 30 分間静置し、42°C で 40 秒間湯浴し、直ちに

氷中で2分間冷却した。SOC 液体培地 (2% Triptone, 0.5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄; 和光純薬, 20 mM sucrose ; ナカライテスク) 400 μl を加え, 37°C で1時間震盪培養後, spectinomycin 含有 LB 寒天培地に播種し, 37°C でさらに一晩培養した。得られたコロニーを spectinomycin 含有 LB 液体培地に播種し, 37°C で一晩培養して得られた菌液から Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification Systems (Promega, Madison, WI, USA) を用いてプラスミドの精製を行った。作製された各プラスミドを制限酵素 BamH^I と Hind^{III} で切断し, アガロース電気泳動により約 1900 bp および約 6300 bp の大きさの位置にバンドを確認し, プラスミド pDnaKo および pDnaKs とした (図 1)。さらにこれらのプラスミドは, フラグメントの上流に位置する pDL278 のマルチクローニングサイト内に設計した pDL278-F および各フラグメントのリバースプライマー dnaK-BamH^I-R, dnaK-Hind^{III}-R (表 2) を用いて PCR を行い, 電気泳動により pDnaKo および pDnaKs はともに約 2150 bp の大きさの位置にバンドを確認した (図 2)。

(2) DnaK 発現変異株の作製

馬血清 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を 10%含む TH 液体培地で *S. mutans*

MT8148 株を濁度が波長 600 nm で 0.4~0.5 になるまで培養後、プラスミド pDnaKo および pDnaKs 200µg/ml を加え、さらに 2 時間培養した。菌体を回収後、spectinomycin (1 mg/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。これらを DnaK 過剰発現株 (DnaK-o 株) および DnaK 発現抑制株 (DnaK-s 株) として実験に供試した。同様に pDL278 を *S. mutans* MT8148 株に形質転換した株 (MT-pDL 株) を作製し、実験に供試した。

6. コロニー形態の比較

各変異株を 10 ml の BHI 液体培地にて 37°C で 18 時間培養後、培養した菌液を spectinomycin 含有 MS 寒天培地にそれぞれ播種した。37°C で嫌氣的に 2 日間培養を行った後、実体顕微鏡 (SZ2-ILST; オリンパス株式会社, 東京) を用いてコロニー形態を観察した。

7. 各変異株の pH 5.5 と pH 7.0 における増殖速度

供試菌を TH 液体培地で 37°C, 18 時間培養した菌液 100 µl を pH 5.5 と pH 7.0 に調整した TH 液体培地に継代培養した。可視分光光度計 (Novaspec plus ; GE

Healthcare, Little Chalfont, UK) を用いて、菌液の濁度を波長 600 nm で 1 時間毎に測定した。

8. 耐酸性能の測定

耐酸性能の測定は、Hanna らの方法³⁹⁾に準じて行った。BHI 液体培地で一晚培養した供試菌を 10 ml の 0.3% Yeast Extract 含有 TH (THYE) 液体培地に播種し、18 時間培養した。この菌液 1 ml を新しい 9 ml の THYE 液体培地に播種し、濁度が波長 600 nm で 0.4~0.5 になるまで培養した。培養後、遠心して得られた菌体に pH 5.0 に調整した THYE 液体培地を 2 ml 加え、37°C で 2 時間培養した。培養後、その 100 μ l を pH 5.0 に調整した THYE 寒天培地に播種し、残りの 1 ml の菌液を pH 3.5 に調整した 9 ml の THYE 液体培地に播種した。pH 3.5 の液体培地を 37°C で 3 時間培養後、その 100 μ l を pH 3.5 に調整した寒天培地に播種した。これらの寒天培地を 37°C で 2 日間嫌氣的に培養し、寒天培地上のコロニー数を計測した。pH 5.0 の培地上のコロニー数に対する pH 3.5 の培地上のコロニー数の割合をその菌の耐酸性を示す指標として算出した。

9. 酸性状態における凝集能の測定

各変異株を TH 液体培地で 37°C, 18 時間培養し, 遠心分離で菌体を回収した。sucrose 添加, 非添加リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; 137 mM NaCl, 10 mM NaH₂PO₄, 8.1 mM Na₂HPO₄; 和光純薬) を添加し, 波長 600 nm が 0.2 になるまで調整し, 37°C で培養した。培養開始後, 1.5 時間, 6 時間, 10 時間後の凝集の状態を観察した。凝集が開始し始めた時点をもと, 強い凝集が認められた場合を+として評価した。

10. 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 らの方法⁴⁰⁾に準じて行った。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。10 mM の Hexide iodide (Invitrogen) で菌体を染色し, 0.5% sucrose 含有化学合成培地 [CDM; 58 mM K₂HPO₄, 15mM KH₂PO₄, 10 mM (NH₄)₂ SO₄, 35 mM NaCl, 0.2% Casamino acids, 100 μM MnCl₂ · 4H₂O (pH7.4), 20 mM Nicotinic acid, 50 mM Pyridoxine HCl, 5 mM Pantothenic acid, 0.5 mM Riboflavin, 0.15 mM Thiamine 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 MgSO₄ · 7H₂O; 和光純薬]⁴¹⁾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, Rochester, NY, USA) に 200 μl ずつ播種し、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 LSM780 (Version 4.2, Carl Zeiss MicroImaging Co., Jena, Germany) にて観察した。形成されたバイオフィルムの厚さは ImageJ (Version 10.2, Macintosh computer application, Bethesda, MD, USA) により数値化し評価した。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。

11. リアルタイム PCR による定量的遺伝子解析

各変異株を 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、濁度が吸光度 600 nm で 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 μl 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 μ l 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, 500 μ l の chloroform を混和させた後, 水層中の全 RNA を 300 μ l の 2-propanol を用いて沈殿させた。その後, 得られた沈殿を 75% ethanol にて洗浄し, 乾燥後, 20 μ l の DEPC 処理水に懸濁した。全 RNA 3 μ g に RNase-free DNase I (1 unit/ μ g RNA ; Promega) を加え, 37°C で 30 分間処理した後, Random primers[®] (Promega) および SuperScriptIII[®] (Invitrogen) を用いて cDNA を合成した。作製した cDNA を鋳型として, 各株における *dnaK*, *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*, *gbpA*, *gbpB*, *gbpC* の発現を SYBR green[®] (Bio-Rad) を用いた Real-time Reverse transcription-PCR (RT-PCR) 法により調べた。遺伝子増幅反応ならびに蛍光強度の測定には StepOnePlus[™] (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) を使用した。Real-time 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, オリゴヌクレオチドプライマー *dnaK*-F と *dnaK*-R のプライマーのほか, 表 2 に示すプライマーを用いた (表 2)。また, 目的遺伝子の発現量は, 16S rRNA を内部標準として補正した。

12. 活性染色による GTF 発現量の分析

(1) SDS-PAGE による分析

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, 培養液の濁度が波長 600 nm で 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 PBS 100 μ l で懸濁し, Gel loading buffer [1 M Tris (pH 6.8), 10% Sodium Dodecyl sulfate (SDS), 0.2% Bromophenol blue, 5% Glycerol ; 和光純薬] 100 μ l および, 10 mM Dithiothreitol (DTT) 20 μ l を加えて 10 分間加熱し, SDS-PAGE (SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE)) 用試料とした。SDS-PAGE は, Laemmli の方法⁴²⁾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, 50% methanol, 5% acetic acid, 2.5g/l Coomassie Brilliant Blue R250 (和光純薬) で 30 分染色した後, 5% methanol, 7% acetic acid で一晩脱色し, バンドを視覚化した。

(2) 酵素活性の検討

SDS-PAGE 後, ゲルをリン酸緩衝液(10 mM NaH₂PO₄, 10 mM Na₂HPO₄ ; 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% sucrose 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, 神奈川) 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 ImageJ により数値化することにより相対量として表した。

13. 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. *dnaK* の発現量

MT-pDL 株における *dnaK* 遺伝子の発現量を 1 とした相対値で示す。*dnaK* の発現量は MT-pDL 株と比較して DnaK-o 株で有意な増加が認められた ($P < 0.001$)。一方, DnaK-s 株の *dnaK* の発現は MT-pDL 株と比較して有意に減少していた ($P < 0.001$) (図 3)。

2. コロニー形態

コントロールである MT-pDL 株は, 辺縁がラフな形態のコロニーを形成していた。それと比較して DnaK-o 株は分葉化し, さらにラフな形態を示していた。DnaK-s 株は MT-pDL 株と比較して差は認められなかった (図 4)。

3. 各変異株の増殖能の比較

DnaK-s 株の増殖速度は MT-pDL 株と比較して pH 7.0 において有意に遅延していた ($P < 0.001$)。同様に DnaK-s 株は MT-pDL 株と比較して pH 5.5 でも有意に増殖速度が遅延していた ($P < 0.001$)。DnaK-o 株は 7 時間後までは MT-pDL 株

と比較して増殖速度が遅延していたが ($P < 0.01$, $P < 0.001$), その後は認められなかった (図 5)。

4. 耐酸性能

各変異株の耐酸性能は、MT-pDL 株は 0.99 %, DnaK-o 株は 2.64 %, DnaK-s 株は 0.04 %であった (図 6)。MT-pDL 株と比較すると DnaK-o 株は有意に耐酸性能が上昇し ($P < 0.001$), DnaK-s 株は有意に減少していた ($P < 0.001$) (図 6)。

5. 凝集試験

培養開始 1.5 時間後では DnaK-o 株の凝集が開始し、10 時間培養後では DnaK-o 株に強い凝集が認められた。一方、DnaK-s 株は 10 時間後においても凝集は認められなかった (表 3)。

6. バイオフィルム構造

共焦点レーザー顕微鏡を用いてバイオフィルムの構造を観察したところ、MT-pDL 株では均一なバイオフィルムが形成されていた (図 7)。MT-pDL 株と

比較して、DnaK-o 株では著明な凝集塊が認められた。一方、DnaK-s 株においては DnaK-o 株のような凝集塊は認められず、MT-pDL 株と同様な構造が認められた。

また、バイオフィルム構造の厚みの分析を行った結果、MT-pDL 株と比較すると DnaK-o 株および DnaK-s 株では厚みが有意に増加していた ($P < 0.05$, $P < 0.001$) (図 8)。

7. *gtf* および *gbp* の発現解析

MT-pDL 株を 1 として遺伝子発現の相対値を出し、MT-pDL 株と各株で有意差検定を行った。*gtfB* の発現量は MT-pDL 株と比較して DnaK-o 株で有意に発現の増加が認められた ($P < 0.001$)。*gtfC* の発現量は DnaK-s 株で発現が有意に減少していた ($P < 0.001$)。*gtfD* の発現量は DnaK-o 株で有意に増加しており、一方で DnaK-s 株では有意に減少していた ($P < 0.01$, $P < 0.001$) (図 9)。*gbpA* の発現量は MT8148 株と比較して DnaK-o 株および MT-pDL 株で増加していた ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。*gbpB* の発現量では MT-pDL 株で発現量が増加していたが ($P < 0.001$)、DnaK-s 株の *gbpB* の発現量は減少していた ($P < 0.001$) (図

10)。

8. GTF の発現量と活性

GTF の発現量は、DnaK-s 株、MT-pDL 株と比較して DnaK-o 株の GTFB と GTFC に相当する位置のバンドが認められた (図 11 A)。

GTF の活性は、MT-pDL 株と比較して DnaK-o 株で強い活性が、DnaK-s 株ではより弱い活性が認められた (図 11 B)。ImageJ を用いて GTFB と GTFC の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、DnaK-o 株は有意に増加し ($P < 0.001$)、DnaK-s 株と MT-pDL 株は有意に減少していた ($P < 0.001$) (図 12)。

考 察

ヒト口腔内は温度変化, pH, 炭水化物摂取状況, 酸化ストレスなどの因子により大きく環境が変化するため, 口腔内細菌はその環境変化に適応していかなければならない¹⁾。その中でも特に *S. mutans* は耐酸性を有しており, 酸性条件下で生存することが可能である^{5, 32, 34, 43)}。その耐酸性能は, 菌体内から菌体外に H⁺ を排出するプロトン輸送 ATP アーゼの至適 pH が低いことや酸性環境下でその活性が誘導されること³⁴⁾, H⁺ の細胞膜透過性が低下すること^{5, 44)}, シグナル認識分子タンパクをコードする *ffh* 遺伝子の発現が増加すること⁴⁵⁾, 膜の脂肪酸組成が変化すること²¹⁾, DNA 修復機構が亢進すること^{46, 47)} などが関与していると考えられている。さらに DNA 修復機構が亢進することから, 分子シャペロン DnaK や GroEL の関与も示唆されている^{14, 32)}。*S. mutans* は, pH の低下が急激であると十分な適応能力が発揮できず発育できないが, 徐々に pH が低下した場合は厳しい酸性環境でも発育することが可能であることが報告されている⁴⁸⁾。そこで耐酸性実験において, pH 5.0 で 2 時間暴露させた後に pH 3.5 の厳しい酸性下に暴露させたところ, DnaK-o 株が MT-pDL 株と比較して有意に耐酸性能が上昇し, DnaK-s 株が有意に減少していた。このことから, DnaK が *S.*

mutans における緩和な酸性環境による暴露によって獲得される耐酸性に関与していることが示唆された。

S. mutans はこのような口腔内環境の変化に暴露され、その環境変化によるストレスに応答するために、それに対応する様々なタンパクを有しており、それらの発現はシグナル伝達システムによりコントロールされている⁴⁹⁾。口腔内のバイオフィームは細菌間のシグナル伝達システムであるクオラムセンシングにより、菌体内の各種遺伝子の発現状態が変化してバイオフィーム形成に適した表現系へと分化する⁴⁹⁾。同種細菌間のシグナル伝達システムとして、グラム陽性細菌ではこの調整に2成分調整因子が関与し、*S. mutans* では *comABCDE* 遺伝子群が遺伝的形質転換としてこのシグナル伝達システムに関与していることが明らかとなっている⁵⁰⁾。*comC* 遺伝子がコードする competence-stimulating peptide (CSP) 前駆体は *comA* 遺伝子および *comB* 遺伝子がコードする ATP-binding cassette (ABC) transporter (ABC 膜輸送体) によりプロセッシングを受け、CSP として菌体外に輸送される。菌体外に放出された CSP は細胞膜に存在する *comD* がコードする2成分調整因子のセンサーにより感知され、*comE* がコードする反応調節因子により調節を受ける⁵¹⁾。また、異種細菌間のシグナル

伝達システムとしては、シグナル物質オートインドューサー2 (AI-2) を産生する LuxS タンパクをコードする *luxS* 遺伝子が関与していることが明らかとなっている^{52,53}。さらに *S. mutans* では、Recombinase A (RecA) をコードする *recA* 遺伝子は細胞間のシグナル伝達システム⁵⁴の中で、バイオフィーム形成⁵⁵および耐酸性への関与も報告されている⁵⁶。

GTFB をコードする *gtfB* を欠失させた株では *S. mutans* のラフ型のコロニー形態がスムーズ型に変化することから、コロニー形態には GTFB が産生する非水溶性グルカンの量が関与しているとの報告がある¹⁸。今回、MT-pDL 株や DnaK-s 株では親株である MT8148 株とほぼ変化が認められなかったのに対し、DnaK-o 株におけるコロニー形態は分葉化しラフな形態をしていたことから、DnaK は GTF の発現に関与している可能性が示唆された。また、バイオフィーム構造において、MT-pDL 株と比較して DnaK-o 株では著明な凝集塊が認められた。そこで GTF の発現と酵素活性を SDS-PAGE を用いた分析により調べたところ、DnaK-o 株の GTF のバンドが MT-pDL 株のバンドと比較してより濃く大きく出現していることから、DnaK-o 株の GTF 酵素活性が上昇していることが示された。さらに凝集試験では、培養開始 1.5 時間後では DnaK-o 株の凝集が開

始し、10 時間培養後では DnaK-o 株に強い凝集を認めた。この結果より、DnaK は菌の凝集に関与する Gbp の発現にも関与している可能性が示唆された。そこで、各変異株における GTF と Gbp の各遺伝子の発現を調べたところ、MT-pDL 株と比較して DnaK-o 株における *gtfB*, *gbpA*, *gbpC* の発現の増加が認められた。

外環境の pH が低下すると *S. mutans* はタンパクのシグナル分子を菌体外に分泌して、自らの耐酸性能を誘導する可能性がある⁴⁹⁾。また、過去の研究において、*S. mutans* MT8148 株において GbpA を欠失させると、MT8148 株と比較してストレス応答タンパクである DnaK, GroEL の発現が上昇していたとの報告がある³⁵⁾。今回の研究により、DnaK が GTF や Gbp の発現にも関与していることが示唆された。しかし、DnaK の GTF や Gbp といった表層タンパクを制御している機序については明らかとなっていない。口腔内のバイオフィルムはシグナル伝達システムであるクオラムセンシングのもとで形成され、表層タンパクの発現には多くの調節因子が口腔内の環境変化に併せて機能していると考えられる⁵¹⁾。そのため、DnaK の発現に影響を与えるシグナル遺伝子を明らかにすることも含め、今後さらなる検討が必要である。

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くださいました，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) Lemos, J.A., Abranches, J. and Burne, R.A.: Response of cariogenic streptococci to environmental stresses. *Curr. Issues Mol. Biol.*, **7**, 95-107, 2005.
- 2) Len, A.C., Harty, D.W. and Jacque, N.A.: Stress-responsive proteins are upregulated in *Streptococcus mutans* during acid tolerance. *Microbiology*, **150**, 1339-1351, 2004.
- 3) Stortz, G. and Hengge-Aronis, R.: Bacterial stress responses. In: Microbial Bioremediation of Chemical Pollutants. Washington, D.C., USA : ASM Press ; 485, 2000.
- 4) 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.
- 5) Hamilton, I.R. and Buckley, N.D.: Adaptation by *Streptococcus mutans* to acid tolerance. *Oral Microbiol. Immunol.*, **6**, 65-71, 1991.
- 6) Carlsson, J.: Bacterial metabolism in dental biofilms. *Adv. Dent. Res.*, **11**, 75-80, 1997.

- 7) Svensäter, G., Sjögreen, B. and Hamilton, I.R.: Multiple stress responses in *Streptococcus mutans* and the induction of general and stress-specific proteins. *Microbiology*, **146**, 107-117, 2000.
- 8) 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*. *J. Bacteriol.*, **169**, 4507-4517, 1987.
- 9) Lindquist, S. and Craig, E.A.: The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.*, **22**, 631-677, 1988.
- 10) Craig, E.A., Gambill, B.D. and Nelson, R.J.: Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.*, **57**, 402-414, 1993.
- 11) Hartl, F.U.: Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, **381**, 571-580, 1996.
- 12) Bukau, B.: Regulation of the *Escherichia coli* heat shock response. *Mol. Microbiol.*, **9**, 671-680, 1993.
- 13) Hecker, M., Schumann, W. and Volker, U.: Heat shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.*, **19**, 417-428, 1996.

- 14) Jayaraman, G.C., Penders, J.E. and Burne, R.A.: Transcriptional analysis of the *Streptococcus mutans* hrcA, grpE and dnaK genes and regulation of expression in response to heat shock and environmental acidification. *Mol. Microbiol.*, **25**, 329-341, 1997.
- 15) Lipinska, B., King, J., Ang, D. and Georgopoulos, C.: Sequence analysis and transcriptional regulation of the *Escherichia coli* grpE gene, encoding a heat shock protein. *Nucleic Acids Res.*, **16**, 7545-7562, 1988.
- 16) Hamada, S. and Slade, H.D.: Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.*, **44**, 331-384, 1980.
- 17) Banas, J.A.: Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front. Biosci*, **9**, 1267-1277, 2004.
- 18) Ooshima, T., Matsumura, M., Hoshino, T., Kawabata, S., Sobue, S. and Fujiwara, T.: Contributions of three glycosyltransferases to sucrose-dependent adherence of *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.*, **80**, 1672-1677, 2001.
- 19) Fujiwara, T., Terao, Y., Hoshino, T., Kawabata, S., Ooshima, T., Sobue, S., Kimura, S. and Hamada, S.: Molecular analyses of glucosyltransferase genes among strains

- of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol. Lett.*, **161**, 331-336, 1998.
- 20) Hamada, S., Koga, T. and Ooshima, T.: Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. *J. Dent. Res.*, **63**, 407-411, 1984.
- 21) Kuramitsu, H.K.: Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, **4**, 159-176, 1993.
- 22) Banas, J.A. and Vickerman, M.M.: Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, **14**, 89-99, 2003.
- 23) 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. Microbiology*, **131**, 295-299, 1985.
- 24) 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.
- 25) Sato, Y., Yamamoto, Y. and Kizaki, H.: Cloning and sequence analysis of the *gbpC* gene encoding a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, **65**, 668-675, 1997.

- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) Mattos-Graner, R.O., Jin, S., King, W.F., Chen, T., Smith, D.J. and Duncan, M.J.: Cloning of the *Streptococcus mutans* gene encoding glucan binding protein B and analysis of genetic diversity and protein production in clinical isolates. *Infect. Immun.*, **69**, 6931-6941, 2001.
- 29) Sato, Y., Yamamoto, Y., Kizaki, H.: Cloning and sequence analysis of the *gbpC* gene encoding a novel glucan-binding protein of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, **65**, 668-675, 1997.
- 30) 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.

- 31) Shemesh, M., Tam, A., Aharoni, R. and Steinberg, D.: Genetic adaptation of *Streptococcus mutans* during biofilm formation on different types of surfaces. *BMC Microbiol.*, **10**, 2010.
- 32) Takahashi, N. and Yamada, T.: Acid-induced acidogenicity and acidtolerance of non-mutans streptococci. *Oral Microbiol. Immunol.*, **14**, 43-48, 1999.
- 33) 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.
- 34) Bender, G.R., Sutton, S.V.W., and Marquis, R.E.: Acid tolerance, proton permeabilities, and membrane ATPases of oral streptococci. *Infect. Immun.*, **53**, 331-338, 1986.
- 35) Matsumi, Y., Fujita, K., Takashima, Y., Yanagita, K., Morikawa, Y. and Matsumoto-Nakano, M.: Contribution of glucan-binding protein A to firm and stable biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Mol. Oral Microbiol.*, **30**, 217-226, 2015.

- 36) 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.
- 37) LeBlanc, D.J., Lee, L.N. and Abu-Al-Jaibat, A.: Molecular, genetic, and functional analysis of the basic replicon of pVA380-1, a plasmid of oral streptococcal origin. *Plasmid.*, **28**, 130-45, 1992.
- 38) Wang, B. and Kuramitsu, H.K.: Inducible antisense RNA expression in the characterization of gene functions in *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, **73**, 3568-3576, 2005.
- 39) Hanna, M.N., Ferguson, R.J., Li, Y.H. and Cvitkovitch, D.G.: uvrA is an acid-inducible gene involved in the adaptive response to low pH in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.*, **183**, 5964-5973, 2001.
- 40) 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.
- 41) 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.
- 42) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685, 1970.
- 43) Loesche, W.J.: Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.*, **50**, 353-380, 1986.
- 44) Iwami, Y., Kawarada, K., Kojima, I., Miyasawa, H., Kakuta, H., Mayanagi, H. and Takahashi, N.: Intracellular and extracellular pHs of *Streptococcus mutans* after addition of acids : loading and efflux of a fluorescent pH indicator in streptococcal cells. *Oral Microbiol. Immunol.*, **17**, 239-244, 2002.
- 45) Crowley, P.J., Svensäter, G., Snoep, J.L., Bleiweis, A.S. and Brady, L.J.: An *ffh* mutant of *Streptococcus mutans* is viable and able to physiologically adapt to low pH in continuous culture. *FEMS Microbiol. Lett.* **234**, 315-324, 2004.
- 46) Gutierrez, J.A., Crowley, P.J., Cvitkovitch, D.G., Brady, L.J., Hamilton, I.R., Hillman, J.D. and Bleiweis, A.S.: *Streptococcus mutans ffh*, a gene encoding a homologue of the 54 kDa subunit of the signal recognition particle, is involved in

- resistance to acid stress. *Microbiology*, **145**, 357-366, 1999.
- 47) Hahn, K., Faustoferri, R.C. and Quivey, R.G. Jr.: Induction of an AP endonuclease activity in *Streptococcus mutans* during growth at low pH. *Mol. Microbiol.*, **31**, 1489-1498, 1999.
- 48) Svensäter, G., Larsson, U.B., Greif, E.C., Cvitkovitch, D.G. and Hamilton, I.R.: Acid tolerance response and survival by oral bacteria. *Oral Microbiol. Immunol.*, **12**, 266-273, 1997.
- 49) Li, Y.H., Hanna, M.N., Svensäter, G., Ellen, R.P. and Cvitkovitch, D.G.: Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans* : implications for survival in biofilms. *J. Bacteriol.*, **183**, 6875-6884, 2001.
- 50) 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, 2001.
- 51) Senadheera, D. and Cvitkovitch, D.G.: Quorum sensing and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **631**, 178-188, 2008.

- 52) Merritt, J., Qi, F., Goodman, S.D., Anderson, M.H. and Shi, W.: Mutation of *luxS* affects biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, **71**, 1972-1979, 2003.
- 53) Wen, Z.T. and Burne, R.A.: LuxS-mediated signaling in *Streptococcus mutans* is involved in regulation of acid and oxidative stress tolerance and biofilm formation. *J. Bacteriol.*, **186**, 2682-2691, 2004.
- 54) Pearce, B.J., Naughton, A.M., Campbell, E.A., Masure, H.R.: The *rec* locus a competence-induced operon in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.*, **177**, 86-93, 1995.
- 55) Li, Y.H., Lau, P.C., Tang, N., Svensäter, G., Ellen, R.P. and Cvitkovitch, D.G.: Novel two-component regulatory system involved in biofilm formation and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.*, **184**, 6333-6342, 2002.
- 56) 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. *Sci. World J.*, **10**, 1155, 2013, <http://dx.doi.org/10.1155/2013/405075>

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 *dnaK* 変異株作製のためのプラスミド作製

A: *S. mutans* UA159 株の *dnaK* 全塩基配列をもとにオリゴヌクレオチドプライマーを設計し、PCR 法により増幅した *dnaK* 断片を作製し、これをフラグメント A (センス鎖) とした。フラグメント A を pDL278 にライゲーションし、プラスミド pDnaKo を作製した。

B: A で使用したオリゴヌクレオチドプライマーを逆読みしたプライマーを設計し、PCR 法により増幅した *dnaK* 断片を作製し、これをフラグメント B (アンチセンス鎖) とした。フラグメント B を pDL278 にライゲーションし、プラスミド pDnaKs を作製した。

図2 *dnaK* 変異株のプラスミドの確認

pDnaKo および pDnaKs におけるフラグメント挿入の確認。M: DNA 分子量マーカー, レーン 1: pDnaKo, レーン 2: 超純水, レーン 3: pDnaKs, レーン 4: 超純水

図3 *S. mutans* 変異株における *dnaK* の発現

MT-pDL 株, DnaK-o 株および DnaK-s 株の cDNA を作製し, リアルタイム PCR により *dnaK* の転写量を評価した。MT-pDL 株の遺伝子転写量を基準値とし, 相対比を示す。MT-pDL 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 各変異株におけるコロニー形態の比較

MT-pDL 株, DnaK-o 株および DnaK-s 株をスペクチノマイシン添加培地で培養し, コロニー形態の比較を行った。

図 5 各変異株の pH 7.0 と pH 5.5 における増殖能の比較

MT-pDL 株, DnaK-o 株および DnaK-s 株を pH 7.0 および pH 5.5 に調整した培地で培養し, 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 (Fisher's PLSD 検定 *** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$) ($n = 3$)。A: pH 7.0, B: pH 5.5。

図 6 各変異株における耐酸性の比較

MT-pDL 株, DnaK-o 株および DnaK-s 株を pH 5.0 で培養したのち, 急激な酸性状態にするため pH 3.5 の培地で培養した。それぞれの pH で培養した菌液を寒天培地に播種し, 寒天培地上のコロニー数を計測した。pH 5.0 の培地上のコロニー数に対する pH 3.5 の培地上のコロニー数の割合をその菌の耐酸性を示す指標として算出した。MT-pDL 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 7 各変異株のバイオフィルム構造の分析

(A) MT-pDL 株, (B) DnaK-o 株および (C) DnaK-s 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, バイオフィルムを形成した。

図 8 各変異株のバイオフィルム構造の分析

MT-pDL 株, DnaK-o 株および DnaK-s 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 によりバイオフィルムの厚みの数値化を行った。

MT-pDL 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 RT-qPCRによる各変異株の *gtf* 遺伝子発現の比較

MT-pDL 株, DnaK-o 株および DnaK-s 株の cDNA を作製し, リアルタイム PCR により(A) *gtfB*, (B) *gtfC* および(C) *gtfD* の転写量を評価した。MT-pDL 株の遺伝子転写量を基準値とし, 相対比を示す。MT-pDL 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10 RT-qPCRによる各変異株の *gbp* 遺伝子発現の比較

MT-pDL 株, DnaK-o 株および DnaK-s 株の cDNA を作製し, リアルタイム PCR により(A) *gbpA*, (B) *gbpB* および(C) *gbpC* の転写量を評価した。MT-pDL 株の遺伝子転写量を基準値とし, 相対比を示す。MT-pDL 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11 SDS-PAGEによる各変異株の GTF 発現と活性

MT-pDL 株, DnaK-o 株および DnaK-s 株の SDS-PAGE 用試料を作製し, 7.5% SDS-polyacrylamide gel を用いて電気泳動を行った。A: 泳動後, 50% メタノール, 5% 酢酸, 2.5 g/l Coomassie Brilliant Blue R250 で染色し, 5% メタノール, 7% 酢酸で一晩洗浄し, バンドを視覚化し, GTF の発現を確認した。B: 泳動後, 3% スクロース, 0.5% TritonX-100, 10mM リン酸ナトリウム(pH6.8) 溶液中で 37℃, 18 時間振盪培養し, 0.4% Pararosaniline Base 染色液で染色してバンドを視覚化し, GTF の活性を確認した。

図 12 変異株のグルカン合成量の比較

0.4% Pararosaniline Base 染色液で視覚化されたグルカンの面積を Image J により数値化することにより相対量として現した。MT-pDL 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)