Bacitracin Resistance of Streptococcus mutans Regulated by Two Component System

北河, 憲雄 九州大学大学院歯学研究院 口腔推進学講座 口腔予防医学分野

https://doi.org/10.15017/19946

出版情報:九州大学,2010,博士(歯学),課程博士 バージョン: 権利関係: Streptococcus mutans の二成分制御系による バシトラシン耐性機序

Bacitracin Resistance of *Streptococcus mutans*

Regulated by Two Component System

2011 年

北河 憲雄

九州大学大学院歯学研究院口腔保健推進学講座

口腔予防医学分野

指導教官:山下 喜久 教授

対象論文

Characterization of MbrC involved in bacitracin resistance in Streptococcus mutans

Norio Kitagawa, Susumu Shiota, Yukie Shibata, Toru Takeshita and

Yoshihisa Yamashita

FEMS Microbiology Letters, Submitted

目次

	自
要旨	1
緒言	3
材料と方法	6
結果	21
考察	40
総括	47
謝辞	49
参考文献	50

略号 一覧表

ATP	adenosine triphosphate (アデノシン三リン酸)
BHI	brain heart infusion (ブレインハートインフュージョン)
bp	base pair (塩基対)
DEPC	diethyl pyrocarbonate (ジエチルピロカーボネート)
DIG	digoxigenin (ジゴキシゲニン)
DIG-11-ddUTP	Digoxigenin-11-dideoxyuridine triphosphate
	(ジゴキシゲニン-11-ジデオキシウラシル三リン酸)
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid (エチレンジアミン四酢酸)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
EMSA	electrophoretic mobility shift assay (電気泳動移動度シフト解析)
НК	histidine kinase (ヒスチジンキナーゼ)
IgG	immunoglobulin G (免疫グロブリン G)
IP	C ₅₅ -isoprenyl phosphate (C ₅₅ -イソプレニルリン酸)
IPP	C ₅₅ -isoprenyl pyrophosphate (C ₅₅ -イソプレニルピロリン酸)
抗 RGS-His 抗体	Anti arginine-glycine-serine (histidine)6 antibody
	(抗アルギニン-グリシン-セリン 6 × ヒスチジン抗体)
MIC	Minimum inhibitory concentration (最小発育阻止濃度)
Ni-NTA	nickel-nitrilotriacetic acid (ニッケルニトリロ酢酸)
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
	(ポリアクリルアミド電気泳動)

- PCR polymerase chain reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)
- RT-PCR reverse transcription-polymerase chain reaction

(逆転写ポリメラーゼ転写反応)

- SDS sodium dodecyl sulfate (ドデシル硫酸ナトリウム)
- TBS Tris Buffered Saline (トリス緩衝生理食塩水)
- TCS Two component system (二成分制御系)
- 2×YT ブロス 10 あたり 10 g バクト・イースト・エキストラクト、16 g バ

クトトリプシン、5g塩化ナトリウムを含む培地

要旨

Streptococcus mutans は、主要なう蝕の原因細菌であり、バシトラシンに耐性 を持つことが知られている。本研究では、この耐性メカニズムを解明するため、 バシトラシン存在下で顕著に発現誘導される遺伝子をマイクロアレイを用いて 探索した。4 倍以上発現誘導されていた 8 つの遺伝子のうち、耐性に主に関与し ていたのは ABC トランスポーターをコードすると推定される 2 つの遺伝子、 *mbrA、mbrB* であった。

以前の研究から、*mbrABCD* 遺伝子群はバシトラシン耐性に関与することが分 かっているが *mbrABCD* 遺伝子群による耐性のメカニズムの詳細は判明してい ない。アミノ酸配列のホモロジーより *mbrCD* は 二成分制御系 (TCS) の遺伝 子と推測されており、*mbrC、mbrD* それぞれの欠損株を作製して検討したところ、 推測通り、 *mbrCD* が *mbrA* の発現を制御していた。また、ゲルシフトアッセ イにより MbrC は *mbrA* の発現調節領域と推定される部位と特異的に結合する こと、及びリン酸化部位と予測される 54 番目のアスパラギン酸をアスパラギ ンに置換した変異 MbrC (D₅₄N-MbrC) はその部位と結合しないことが明らかに なった。また、変異 MbrC (D₅₄N-MbrC) なぞうした *mbrC* D54N 変異株 KD1113 を作製してバシトラシンによる *mbrA* の発現誘導とバシトラシン耐性を調べた が、KD1113 はバシトラシンによる *mbrA* の発現誘導を失っており、バシトラ シン耐性も低下していた。以上の結果から *S. mutans* のバシトラシン耐性はホモ ロジーから推測された様に、二成分制御系である MbrCD の制御による MbrAB の誘導によっていることが示され、さらにその制御には、MbrC の 54 番目のア

スパラギン酸のリン酸化が必須である可能性が高いことが明らかになった。

緒言

バシトラシンはバチルス属により産生される環状の抗菌ペプチドであり、数 種類のポリペプチドを主成分として構成されている。バシトラシンは 2 価の陽 イオンの存在下で C₅₅-isoprenyl pyrophosphate (IPP) と強く結合して、複合体を構 成し、IPP とピロホスファターゼとの反応を阻害する。ペプチドグリカン架橋形 成反応時、IPP はペプチドグリカン糖鎖の末端にムレインモノマーを転移する と脱離し、ピロホスファターゼにより脱リン酸化されて C₅₅-isoprenyl phosphate (IP)となる。IP はムレイン酸モノマーを細胞膜内から細胞壁まで輸送する脂質 担体として働く。バシトラシンによるピロホスファターゼとの反応阻害は脂質 担体として利用可能な IP の量を減少させる。バシトラシンの抗生物質としての はたらきは主に、このペプチドグリカン合成の阻害によると考えられており、 バシトラシンが特にグラム陽性菌に対して阻害剤として顕著に効果を示すのも そのためと考えられる (Storm、1974)。

以下の 5 つのメカニズムが細菌のバシトラシン耐性メカニズムとして報告さ れている。(1) Escherichia coli や Bacillus subtillis は IPP の脱リン酸化酵素の濃 度を増加させることで、バシトラシンが存在しても IPP の脱リン酸化を亢進さ せて IP の供給を確保する。E. coli の bacA 及び、B. subtillis の bcrC 等がこの ような脱リン酸化酵素をコードしている (El Ghachi ら、2004; Bernard ら、2005)。 (2) 細胞膜のオリゴ糖が欠如した E. coli の変異株は、ペプチドグリカン合成以 外に用いる IP の利用量が減るため、よりバシトラシン耐性を獲得する (Fiedler ら、1988)。(3) いくつかのグラム陰性菌は合成に IP を必要とするバシトラシン 存在下で菌体外多糖の生合成を停止することでバシトラシンに対抗する (Pollock ら、1994)。(4) *B. subtilis や Bacillus licheniformis* は 二成分制御系 (two-component signal transduction system; TCS) によって発現が制御される ABC トランスポーターによってバシトラシン耐性を発揮する。このような組み合わ せとしては *B. subtilis* の BceRS と BceAB、*B. licheniformis* の YtsAB と YtsCD が報告されている (Mascher、2006; Wecke ら、2006; Rietkotter ら、2008)。(5) *Enterococcus faecalis* は類似の ABC トランスポーター (BcrAB) を保有するが、 その制御因子である BcrR は TCS とは異なり、一つのタンパク質 (BcrR) に入 カドメイン (レセプター領域) と出力ドメイン (DNA 結合領域) が存在する。 (Manson ら、2004)。

う蝕の主要な原因菌である Streptococcus mutans はバシトラシンに耐性を持 っことが知られており、その特性は Streptococcus mutans の選択培地に利用され ている (Gold ら、1973)。2002年、津田らは mbrABCD 遺伝子 (Fig. 1) がこのバ シトラシン耐性に関与していることを報告した (Tsuda ら、2002)。アミノ酸配 列の相同性より mbrAB は ABC トランスポーター、mbrCD は二成分制御系を コードすると推測される。

TCSはヒスチジン-アスパラギン酸リン酸リレー系とも呼ばれ、様々な環境変 化を蛋白質のリン酸化という生体シグナルに置き換え伝達していくシステムで 広く生物界に見られる (水野 ら、2002)。一般的な TCS はセンサーであり、細 胞膜貫通構造を持つヒスチジンキナーゼ (HK) と DNA に結合してその転写を 制御するレスポンスレギュレーター (RR) から構成されている。HK は外界の 刺激を感知すると特定のヒスチジン残基を ATP を基質として自己リン酸化し、

続いて細胞質中に存在するパートナーである RR の特定のアスパラギン酸残基 に HK の持つリン酸基を転移する。リン酸化された RR は支配下にある遺伝子 の発現調節領域に結合し、その発現を制御する (Hoch ら、2000)。

本研究遂行中、Ouyang ら (2010) は *mbrCD* だけでなく *mbrAB* も、バシト ラシン感知に重要な働きをすること (*mbrABCD* が四成分制御系を構成するこ と)、及び in vitro でリン酸化した MbrC が *mbrABCD* の発現調節領域と推定さ れる部位と結合し、その発現誘導を制御していることを報告した。しかしなが ら、*S. mutans* のバシトラシン耐性メカニズムにはまだ解明されていない点が多 い。近年、薬剤耐性菌が問題となっており、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) においては、バシトラシンの経口投与が効果的であると報告されている

(O'Donovan ら、1994; Chia ら、1995; Silverblatt ら、2000)。 *S. mutans* のバシ トラシン耐性の形質が VRE に移行する可能性も示唆されており、耐性メカニ ズムの早期の解明が求められている。本研究ではまず、バシトラシンによる *S. mutans* トランスクリプトームへの影響を調べ、さらに *mbr* 遺伝子群が TCS と ABC をコードするという予測をもとに、*Streptococcus mutans* のバシトラシン耐 性メカニズムについて各種変異株を用いて詳細に検討した。

 $\mathbf{5}$

材料と方法

1. 供試菌、プラスミド、培養条件

本実験では Table 1 に記載した各菌株、プラスミドを用いた。*S. mutans* とそ の変異株はブレインハートインフュージョン (BHI) ブロス (Difco, Detroit, MI) を用いて 37℃、5% CO₂ 存在下で培養した。*E. coli* は 2×YT ブロス (Difco) を 用いて 37℃ で好気的に培養した。培養時、必要に応じてエリスロマイシンを 300 µg/ml (*E. coli* 培養時) または 10 µg/ml (*S. mutans* 培養時)、アンピシリンを 100 µg/ml (*E. coli* 培養時)、スペクチノマイシンを 150 µg/ml (*S. mutans* 培養時) 用 いた。

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
Strains		
S. mutans		
UA159	Wild-type strain, sero type c	Koga et al. (1989)
KD9302	UA159-derived, SMU.302-deficient, Em ^r	This work
KD9863	UA159-derived, SMU.863-deficient, Em ^r	This work
KD9864	UA159-derived, SMU.864-deficient, Em ^r	This work
KD1106	UA159-derived, <i>mbrA</i> -deficient, Em ^r	This work
KD1107	UA159-derived, <i>mbrB</i> -deficient, Em ^r	This work
KD1108	UA159-derived, <i>mbrC</i> -deficient, Em ^r	This work
KD1109	UA159-derived, <i>mbrD</i> -deficient, Em ^r	This work
KD1113	UA159-derived, the mutant <i>mbrC</i> encoding D ₅₄ N-MbrC	This work
KD91479	UA159-derived, SMU.1479-deficient, Em ^r	This work
KD91856	UA159-derived, SMU.1856c-deficient, Em ^r	This work
E. coli		
DH5a	φ80 Δ(lacZ)M15 Δ(argF-lac)U169 endA1 recA1 hsdR17 (rK-mK+) deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1	Sambrook & Russell (2001)
Plasmids		
pQE80L	His ₆ tag expression vector; Ap ^r	Qiagen
pBSSKII-Em ^r	pBluescript II SK(+) containing a erythromycin resistance gene at the multiple cloning site, Ap ^r , Em ^r	Shibata <i>et al.</i> (2009)
pKD9302	pBSSK-Em ^r containing fragments upstream and downstream of the SMU.302 gene	This work
pKD9863	pBSSK-Em ^r containing fragments upstream and downstream of the SMU.863 gene	This work
pKD9864	pBSSK-Em ^r containing fragments upstream and downstream of the SMU.864 gene	This work
pKD1106	pBSSK-Em ^r containing fragments upstream and downstream of the <i>mbrA</i> gene	This work
pKD1107	pBSSK-Em ^r containing fragments upstream and downstream of the <i>mbrB</i> gene	This work
pKD1108	pQE80L with the <i>mbrC</i> gene	This work
pKD1109	pQE80L with the <i>mbrD</i> gene	This work
pKD1110	pBSSK-Em ^r containing fragments upstream and downstream of the <i>mbrC</i> gene	This work
pKD1111	pKD1109 in which the PstI fragment in the <i>mbrD</i> gene was replaced by the Em ^r gene	This work
pKD1112	pQE80L with the mutant <i>mbrC</i> encoding D ₅₄ N-MbrC	This work
pKD91479	pBSSK-Em ^r containing fragments upstream and downstream of the SMU.1479 gene	This work
pKD91856	pBSSK-Em ^r containing fragments upstream and downstream of the SMU.1856 gene	This work
pSET4s	Replication function of pG+host3 and pUC19, <i>lacZ</i> ' Spc ^r	Takamatsu <i>et al.</i> (2001)
pSET4s(D54N-MbrC)	pSET4s with the mutant <i>mbrC</i> encoding D ₅₄ N-MbrC	This work

Table 1. Strains and plasmids used in this study

2. DNA の操作

制限酵素による切断、ライゲーション、アガロース電気泳動等、標準的な遺 伝子操作は Sambrook ら (2001) が記載した方法で行った。*S. mutans* の染色体 DNA は、一晩培養した UA159 を回収し、その菌体をグラム陽性菌用溶菌バッ ファー [1% TritonX-100、2 mM エチレンジアミン四酢酸を含む 20 mM トリ ス塩酸緩衝液 (pH8.0)] 50 µl を用いて懸濁し、10 分間、100 °C にて加熱し、遠 心後、その上清を回収することによって得た。*E. coli* の形質転換株は (Hanahan、 1983) に記載された方法で作製した。まず、DH5 α コンピテント細胞を塩化カル シウム法を用いて作製した。次に、プラスミドをコンピテント細胞に加え、氷 上で 45 分静置し、42 °C で 1 分間熱ショックを与え、2 分間氷上で静置した 後、900 µl の 2×YTを加え 1 時間 37°Cで保温した。形質転換株はアンピシリ ンを含む 2×YT 寒天培地を用いて分離した。

3. S. mutans の形質転換法

S. mutans の形質転換株は Perry ら (1983) の方法に基づいて以下の方法で作 製した。5% 非働化馬血清を含む BHI ブロス 中で 18 時間、37 ℃ で培養し た UA159 を新しい培地を用いて 1/40 希釈し吸光度 550 nm の値が 0.3 にな るまで培養し、3 µg/ml になるように DNA フラグメントを加えた。この DNA としては KD1109 株の作製時は、pKD1111 を BamHI、HindIII を用いて切断し て得た、エリスロマイシン耐性遺伝子を含むフラグメントを、その他の S. mutans 遺伝子欠損株作製時は、欠損させたい遺伝子のすぐ上流の塩基配列を持つフラ グメントとそのすぐ下流の塩基配列を持つフラグメントの間にエリスロマイシ

ン耐性遺伝子を挿入したフラグメントを使用した。そしてさらに新鮮な培地を 加え2 倍希釈し、3 時間培養することで形質転換株を得た。形質転換株はエリ スロマイシンを含む BHI 寒天培地を用いて分離した。

4. DNA の増幅

DNA の増幅には KOD DNA ポリメラーゼ (東洋紡、東京) を用いた。PCR の 反応液として 50 µl あたり 10~200 ng の鋳型 DNA、5 µl の 2 mM dNTPs、3 µl の 25 mM 塩化マグネシウム、1.5 µl の 10 µM の 各プライマー、1 Unit の KOD DNA ポリメラーゼ、5 µl の 10 × KOD –Plus バッファーを含む反応液を用いて 行った。PCR 反応は熱変性を 94 $\$ 2 分、アニーリングをプライマーの熱融解 温度から1 $\$ から 5 $\$ 低い温度で 30 秒、伸長反応を 68 $\$ で 30 秒 から 1 分の条件で 25 ~ 30 サイクル行った。

5. 蛋白質発現と精製

以下の方法で、pKD1108 (Table 1) を作製した。まず、 mbrC-F と mbrC-R プ ライマー (Table 2) を用いて PCR によって *S. mutans* の *mbrC* 遺伝子 (野生 株) を含む DNAフラグメントを増幅した。次に、増幅後のフラグメントを BamHI、HindIII によって切断し、 pQE80L ベクターの同一サイト間に挿入し、 pKD1108 を得た。pKD1108 を導入した *E.coli* DH5α を吸光度 550 nm の値が 0.4 となるまで培養し、MbrCの発現を誘導するため最終濃度が 0.1 mM となる 様にイソプロピルβ-D-チオガラクトシドを加え、さらに 3.5 時間培養した。集 菌した後、溶菌バッファー (10 mM イミダゾール、300 mM 塩化ナトリウム、

50 mM リン酸二水素ナトリウム; pH 8.0) を加えて撹拌し、超音波処理によって 破壊した。次にニッケルニトリロ酢酸 (Ni-NTA) カラム (Qiagen, Hilden, Germany) に破砕した菌体の上清を注ぎ、添付されている指示書に従った方法に より非変性条件下で MbrC を精製した。精製した MbrC からイミダゾールを除 くため、透析バッファー (300 mM 塩化ナトリウム、50 mM リン酸二水素ナト リウム、25% (v/v) グリセロール; pH 8.0) を用いて透析を行った。精製した MbrC は 「材料と方法」の 8 に準じた方法で抗 RGS-His 抗体 (QIAGEN) を 一次抗体に、アルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ネズミ IgG 抗体 (Zymed, San Francisco, CA, USA) を二次抗体抗に用いてウェスタンブロットを行うことによ り確認した。

6.S. mutans の遺伝子欠損株の構築

mbrD 欠損株を除く、各遺伝子領域 (SMU.302、SMU.863、SMU.864、*mbrA*、 *mbrB、mbrC、*SMU.1479、SMU.1856c)をエリスロマイシン耐性遺伝子で置き換 えた欠損株は川田ら (Kawada-Matsuo ら、2009)の方法で作製した。*mbrC* 欠損 株作製の概略は以下の通りである。まず、Table 2 に記載したプライマーを用い て*mbrC* の上流 1027 bp のフラグメントと下流 957bpのフラグメントを PCR 法 を用いて増幅し、その 2 つのフラグメントを順次 pBSSK-Em^rに挿入し、組換え 用プラスミド pKD1110を構築した。そして「材料と方法」の 3 に準じた形質 転換の操作を行い、 pKD1110を BamHI と XhoI を用いて切断して得られたフ ラグメントと UA159 染色体 DNA との相同組み換えによる形質転換株、 KD1108を得た。*mbrD* 欠損株作製のための組換え用プラスミド pKD1111 は以

下の方法で構築した。まず、mbrD-F プライマーそして mbrD-R プライマー (Table 2) を用いて S. mutans の mbrD 遺伝子 (野生型) を含むフラグメントを PCR 法によって増幅した。次にそのフラグメントを BamHI、HindIII を用いて切断し、 pQE80L ベクターの同一サイト間に挿入し、得たプラスミドを pKD1109 と命名 した。 次に pKD1109 内の mbrD 遺伝子の 51 bp の PstI フラグメントをエリスロ マイシン耐性遺伝子で置換し、pKD1111 を得た。次に「材料と方法」の 3 に準 じた形質転換の操作を行い、pKD1111 を BamHI と HindIII を用いて切断して 得られたフラグメントと S. mutans UA159 染色体 DNA との相同組み換えによ る形質転換株、KD1109 を得た。形質転換株の染色体 DNA の変異は PCR によ って確認した。

7. 抗 MbrA ペプチド抗体の作製、精製

抗 MbrA ペプチド抗体は MbrA の N 末端の 73 番目から 87 番目のアミ ノ酸と同じ配列を持つペプチドの N 末端にシステインを結合させたペプチド と (C+TKIRENNLAKFRLKN)、MbrA の N 末端の 227 番目から 241 番目のア ミノ酸と同じ配列を持つペプチドの N 末端にシステインをつけたペプチド (C+RGNKSNQEFSKEISL)を抗原として作製した。キャリア蛋白質としてはキー ホールリンペットヘモシアニンを用いた。抗原、抗体の作製、及び ELISA によ る抗体価の測定はオペロン バイオテクノロジー 株式会社 (東京) に委託した。 抗 MbrA ペプチド抗体の MbrA に対する特異性を高めるため、抗体精製を KD1106 (*AmbrA*)の粗抽出液と抗体を等量混和し、ROTARY MIXER NRC-20D (日伸理化、東京)を用いて一週間穏やかに転倒撹拌することにより行った。

KD1106 粗抽出液は KD1106 を一晩培養し、集菌した後、TBS (10 mM トリス 塩酸緩衝液、50 mM 塩化ナトリウム; pH 7.5) を用いて懸濁し、ミニビートビー ダー (Biospec Products, OK, USA) を用いて 5000 rpm で 4 分× 6 回震とうさ せ、菌体を破砕することにより作製した。

8. ウェスタンブロット

MbrA 蛋白質の発現を確認するためのサンプルの調製は以下の方法で行った。 37℃、5% CO₂存在下で一晩培養した UA159 及び KD1106 を新しい BHI に植 え継ぎ、550 nm での吸光度が約 0.5 になった時点で最終濃度が 1 U/ml となる ようにバシトラシンを加え、さらに 2 時間培養し集菌した。集菌した菌体は抗 体精製時に KD1106 の粗抽出液を作製した時と同じ方法で破砕した。破砕した 菌体を 5 分間静置し、上清に同量の 2 ×サンプルバッファー (10% グリセロ ール、0.25% ブロモフェノールブルーを含む 50 mM トリス塩酸緩衝液; pH 6.5) を加えた。SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) は Laemmli (Laemmli, 1970) の方法に準じて行った。濃縮用ゲルは 4.5% ポリアクリルアミド、0.1% SDS、0.05% N.N.N'.N'-テトラメチルエチレンジアミン (和光純薬工業)、0.1% ペ ルオキソ硫酸アンモニウム (和光純薬工業) を含む 125 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 6.5) から構成されるゲルを、分離用ゲルには 12.5% のポリアクリルアミド、 0.1% SDS、0.05% N.N.N',N'-テトラメチルエチレンジアミン、0.1% ペルオキソ 硫酸アンモニウムを含む 375 mM トリス塩酸緩衝液 (pH8.8) から構成される ゲルを用いた。電気泳動にはラピダスミニスラブ電気泳動槽 (アトー株式会社) を、泳動バッファーには 25 mM トリスと 0.1 % SDS を含む 200 mM グリシン

溶液を用いて室温にて泳動を行った。ウェスタンブロッティングは Burnette (Burnette、1981)の方法に従って行った。泳動終了後、ゲルをブロッティングバ ッファー (25 mM トリス、192 mM グリシン、 20 % メタノール)で室温にて 15 分震とうし、平衡化した。ニトロセルロースメンブレンへの転写は

TRANS-BLOT SP 転写装置 (Bio-Rad laboratory, Hercules, CA, USA)を用いて 500 mA、15 V で 42 分行った。次に、3% 脱脂粉乳を含む TBS 溶液 (50 mM 塩化 ナトリウム、10 mM トリス塩酸緩衝液; pH 7.5) 中で室温において転写後のメン ブレンに対して一晩ブロッキング処理を行った。1 次抗体としては「材料と方 法」の 7 で精製した抗 MbrA ペプチド抗体を用い、2 次抗体としては抗アルカ リホスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Zymed Laboratories, South San Francisco, CA, USA) を用いた。転写膜は検出バッファー (100 mM トリス塩酸緩 衝液、 100 mM 塩化ナトリウム、50 mM 塩化マグネシウム) に溶解させた ニ トロブルーテトラゾリウム/5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-リン酸を用いて 発色させた。

9. mbrC の部位特異的変異誘発

部位特異的変異誘発 (D₅₄N; MbrC の 54 番目のアスパラギン酸のアスパラギ ンへの置換) は pKD1108 を鋳型として、d54nf プライマー (54 番目のアミノ酸 がアスパラギン酸からアスパラギンに置換されたプライマー) と d54nr プライ マー (Table 2) を用いてインバース PCR 法を用いて行った (Hemsley ら、1989)。 次に、この変異を含む PCR 産物を T4 DNA リガーゼで環状化し、生じたプラ スミド (pKD1112) を DH5α に導入した。発現させた組換え D₅₄N-MbrC 蛋白

質は「材料と方法」の 5 に準じた方法で精製、透析して調製した。精製蛋白質の確認は「材料と方法」 8 に準じた方法で SDS-PAGE 及び 一次抗体に抗 RGS-His 抗体 (QIAGEN) を、二次抗体にアルカリホスファターゼ標識ヤギ抗ネ ズミ IgG 抗体を用いたウエスタンブロットによって行った。

10. mbrC D₅₄N 変異株の作製

変異 *mbrC* (D₅₄N) を持つ *S. mutans* UA159 変異株は温度感受性の suicide vector、pSET4s (Takamatsu ら、2001) を用いて作製した (Fig. 8)。まず、pKD1112 の D₅₄N-MbrC をコードする変異 *mbrC* 領域を含む BamHI、HindIII フラグメントを pSET4 とライゲーションさせ、pSET4s (D₅₄N-MbrC) と名付けた。次に UA159 に pSET4s (D₅₄N-MbrC) を導入した。pSET4s (D₅₄N-MbrC) 内と染色体内 の *mbrC* 領域間の相同組み換えによりスペクチノマイシン耐性を獲得した形 質転換株はスペクチノマイシン添加 BHI 寒天培地を用いて 37℃ の条件で培養 することにより選択した。次に、この形質転換株を 30℃ で培養し、スペクチ ノマイシンを含む BHI 寒天培地と含まない BHI 寒天培地を用いてレプリカ 法によりスペクチノマイシン耐性を失った形質転換株を選択した。遺伝子の変 異はシークエンスにより確認した。こうして選択した、相同組み換えにより野 生型の *mbrC* 遺伝子を *mbrC*(D₅₄N) に置き換え、ベクター由来のスペクチノ

11. 塩基配列の確認

塩基配列の確認は Sanger ら (1977) のジデオキシ法を応用した方法で行っ た。PCR は最終容積が 20 μ l となるように 200~500 ng のプラスミド、3.2 pmol のプライマー、4 μ l の Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA)、滅菌水を混ぜ、変性 96°C 10秒、アニーリング 50°C 5秒、伸長反応 60 °C 4分 の条件で 25 サイクル 行った。次にエタノール沈殿を行い、増幅さ れた DNA を回収し、HI-DI Foramide (Applied Biosystems) を加え二本鎖 DNA を一本化し、急冷した。塩基配列は ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて確認した。

12. RNA の抽出

全 RNA は柴田ら (Shibata ら、1999) が報告した改良酸性グアニジウムフェ ノールクロロホルム法 (Acid Guanidinium Phenol Chloroform 法) により *S. mutans* の各株から抽出した。概要は以下の通りである。抽出には FastPrep[®] System (Qbiogene, Montreal, Canada) を用いた。一晩培養した *S. mutans* 前培養 液を 5 ml の新しい BHI 培地に接種し、550 nm での吸光度が 0.3 となった時点 で 1 U/ml となる様にバシトラシンを加え、その後 30 分間培養を続けた。回収 した菌体に 1 ml の ISOGEN (ニッポンジーン、東京)を加え、Lysing Matrix B tube (Qbiogene, Montreal, Canada) に移し、FastPrep[®] FP120 (Qbiogene, Montreal, Canada) を用いてスピードレベル 6.5 で 40 秒×2 回処理した。次に 170 µl クロ ロホルムを加え、撹拌し、その上清にさらにフェノールクロロホルム抽出を行 った。そして、イソプロパノール沈殿させ、75%エタノールを用いて洗浄し た。乾燥した全 RNA は、ジエチルピロカーボネート (diethyl pyrocarbonate; DEPC) 処理水に溶解させた。

13. 逆転写 PCR

RT-PCR (逆転写 PCR) 前に、全 RNA から、 RNase free DNaseI [Deoxyribonuclease (RT Grade); ニッポンジーン、東京] を用いて混入した DNA を除いた。DNase 処理は 50 µl の RNA 液に 4 Unit の DNase、20µl の 10×buffer (400 mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.9)、3 mM 塩化カルシウム 20 mM 塩化マグネ シウム)、DEPC 処理水を加え 200µl とし、37℃で 15 分 保温することにより行 った。DNase 処理後、フェノール・クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、 沈殿を回収した。そして75%エタノールを用いて洗浄し、乾燥した RNAを DEPC 処理水で溶解させ、使用時まで-80 ℃にて保存した。cDNA は Multiscribe 逆転 写酵素 (Applied Biosystems) とランダムプライマー (Applied Biosystems) を用 いて添付の指示書に従った方法で作製した。SMU.862、SMU.863、SMU.864 の ポリシストロニックな転写の有無は、作製した cDNA を用いて、SMU.862-863F と SMU.862-863R もしくは SMU.863-864F と SMU.863-864R (Table 2) をプラ イマーセットとして PCR を行い、その増幅産物を 2% アガロースゲルを用いた 電気泳動によって確認することにより行った。その際、実験結果が DNA の混 入によるものではないことを証明するために、逆転写酵素を加えなかった点以 外は同じ反応を行ったサンプルをネガティブコントロールとして同時に泳動し た。また、ポジティブコントロールとして UA159 染色体 DNA を鋳型に SMU.862-863F と SMU.862-863R もしくは SMU.863-864F と SMU.863-864R

(Table 2) をプライマーセットとして PCR を行った物も泳動した。

14. 定量リアルタイム RT-PCR

定量リアルタイム RT-PCR には Step One Real Time PCR システム (Applied Biosystem) を用いた。反応は DNA ポリメラーゼ活性化を 95°C で 15 分の後、 変性 94 °C、15 秒、アニーリング 60 °C、30 秒、伸長反応 72 °C、30 秒の反応 を 40 サイクル行う条件で、最終容積が 20 µl となる様に 10 ng の cDNA、10 µl の 2× QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen)、そして 10 pmol のそれぞ れのプライマーを含む反応液を用いて行った。定量リアルタイム PCR に用いた プライマーは、Table 2 に示した。cDNA は「材料と方法」の 13 に準じた方法 で回収したものを用いた。増幅が全 RNA にコンタミネーションした DNA 由 来の増幅ではなく RNA 由来の増幅であることを確認するため、コントロール として同時に、逆転写反応を行っていないサンプルを用いてリアルタイム PCR を行った。全ての値は内部コントールである 16S rRNA の値で標準化した。遺 伝子の発現量の変化は 2^{-ΔΔCt} 法を用いて決定した (Livak ら、2001)。3 回以上 の独立した実験の平均値を遺伝子の発現量の比とした。

15. マイクロアレイ分析

全 RNA は「材料と方法」の 12 に記載した方法で抽出した。マイクロアレイ 分析のためのサンプルのラベリングやハイブリダイゼーション、は NimbleGen Systems Inc. (Madison, WI) とジーンフロンティア (東京) が行った。それぞれの 遺伝子に対する、ハイブリダイゼーションには 20 種類の完全に一致する 24 mer のプローブを用いた。検出した遺伝子の相同性検索は Oral Pathogen Sequence Databases (<u>http://www.oralgen.lanl.gov/ index.html</u>) を用いて行った。

16. 電気泳動移動度シフト解析

電気泳動移動度シフト解析 (Electrophoretic mobility shift assay; EMSA) は DIG (ジゴキシゲニン) ゲルシフトキット 2nd ジェネレーション (Roche, Mannheim, Germany) 添付の指示書に少し変更を加えた方法で行った。概要は以 下の通りである。DNA プローブは S. mutans UA159 の 染色体 DNA を鋳型に 増幅した PCR 産物を 2 %アガロースゲルで分離、精製することにより作製し た。作製した DNA プローブはジゴキシゲニン (DIG) を用いて 3'末端ラベリン グを行った。ラベリングは DNA プローブ (3.85 pmol) に1µlの1mM DIG-11-ddUTP と 400 Unit のターミナルトランスフェラーゼ、4 ul の 25 mM 塩 化コバルトと4µlの5×ラベリングバッファー(1Mカコジル酸カリウム、125 mM トリス塩酸緩衝液、0.125% ウシ血清アルブミン; pH 6.6), と 10 µl の滅菌水 を混ぜ合わせて 20 µlとなったものを 37 ℃で 15 分間加熱することにより行っ た。次に精製した蛋白質 (500 ng) と 31 fmol DIG ラベル DNA プローブを室温 で15分反応させた。反応は20mMのHepes (pH 7.6)、1mM EDTA、10mM 硫 酸アンモニウム、1 mM ジチオスレイトール、0.2% (w/v) Tween 20、30 mM 塩化 カリウム、1 µg Poly [d(I-C)]、そして 100 ng のポリ L-リジン を含む溶液中で行 った。そしてその後、核タンパク質複合体を 6% の非変性 PAGE を用いて 150 V で分離し、ナイロンメンブレン (アトー株式会社) に 400 mA で 30 分転写した。 転写したナイロンメンブレンは DNA-FIX (アトー株式会社)を用いて 50 秒間

紫外線照射 (総照射量 312 J/cm²) して転写物をナイロンメンブレンに架橋結合 させた。架橋結合したメンブレンは洗浄バッファー [0.1 Mマレイン酸、0.15 M 塩化ナトリウム、0.3% (v/v) Tween 20] で短時間洗浄し、ブロッキングバッファ ー[1 % ブロッキング試薬 (Roche)、0.1 Mマレイン酸、0.15 M塩化ナトリウム] で 30 分ブロッキング処理後、DIG 抗体反応は DIG 抗体溶液 [75 mU/ml アル カリホスファターゼ標識抗ジゴキシゲニン、1 % ブロッキング試薬 (Roche)、 0.1 Mマレイン酸、0.15 M塩化ナトリウム] 中で 30 分間震盪して行った。DNA プローブは検出バッファー [100 mM トリス塩酸緩衝液、100 mM塩化ナトリウ ム (pH 9.5)] に溶解させたニトロブルーテトラゾリウム/ 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-リン酸を用いて発色して検出した。

17. 薬剤感受性試験

野生株 UA159 とその欠損株のバシトラシンに対する最小発育阻止濃度 (MIC) は希釈法により計測した (Masuda、1976)。概略は以下の通りである。一 晩培養した *S. mutans* 培養液を 2 倍段階希釈のバシトラシン添加 BHI ブロスに ブロスの容積の 1/30 播種し、37°C、5% CO₂ 存在下で 20 時間培養した。MIC は裸眼による判定で発育阻害を示した最も低いバシトラシン濃度とした。野生 株 UA159 と KD1109 のバンコマイシンに対する感受性は拡散法 (Kong ら、 2000) によって調べた。一晩培養した *S. mutans* 培養液 300 µl を BHI 寒天培 地に塗布し、寒天培地上に直径 5 mm のろ紙を置き、ろ紙に 1 µg/ml、2 µg/ml の バンコマイシンを含む溶液 5 µl もしくは滅菌蒸留水を滴下し、37°C、5% CO₂ 存 在下で一晩培養し、ろ紙周辺の発育阻止円の直径を比較した。

Table 2. Primers	used	in	this	study
------------------	------	----	------	-------

Primers	Sequence (5'-3')	Reference	Purpose
mbrC-F	AGA <u>GGATCCC</u> TAAAGCAAGAAAAAATTTAC	This study	Plasmid construction
mbrC-R	AGG <u>AAGCTT</u> TTATTTAATTAAATACCCTA	This study	
mbrC-UP-F	AGA <u>CTCGAG</u> AAAAGCAGGTCTTAGCAC	This study	
mbrC-UP-R	CGTCACTTTTTATCTTTCAAT	This study	
mbrC-DW-F	GTAAGAGGAGTAGGGTAT	This study	
mbrC-DW-R	AGA <u>GGATCC</u> TGTGTTCCTTGATCAA	This study	
mbrD-F	AGA <u>GGATCC</u> ATAAGATCTTATTTGAGAG	This study	
mbrD-R	AGG <u>AAGCTT</u> TTACCTTCTTTTAGTAACA	This study	
IGR793F	CTTATCTTAGAAGAATAGTGTTTTG	This study	Gel mobility shift
IGR793R	GCTTCTCCTTTTTATCATTATAAC	This study	
d54nf	TTAATTCTGATGAATATTACTTTGCCC	This study	Mutagenesis
d54nr	ATCGGGTTTAAATTCTTTAACTTCTTG	This study	
16S RT1	CTTACCAGGTCTTGACATCCCG	Korithoski	Real-time PCR
		et al.	
		(2007)	
16S RT2	ACCCAACATCTCACGACACGAG	Korithoski	
		et al.	
		(2007)	
mbrA456f	TGCTCGCAGTCTGATTACCAAT	This study	
mbrA526r	CAAGTGCTGCTGTTGGTTCATC	This study	
mbrD326f	GGTCCCATCAGATGAAAGTTCC	This study	
mbrD445r	GTCTCTGAACATCTTCTTTATCTAA	This study	
SMU.302-518f	GCATGGCAATCAAGTGACTC	This study	
SMU.302-614r	GGCAATCAATTTGACTTGCGAG	This study	
SMU.862-603f	CTGGCAGTGGAAATAGCAATTCT	This study	
SMU.862-721r	GCTGCTGATCTGATGATACAGAGTTT	This study	
SMU.1479-47f	GTGTTATCGGCACTGCTG	This study	
SMU.1479-142r	CGGTTTTCTTCAATGAAAGCTGC	This study	
SMU.1856c-613f	GGTCAGCAGGGCCTTAAAAAC	This study	
SMU.1856c-680r	CAAAGGTGAGCAGGATAAAAAACA	This study	
SMU.862-863F	CTGGCAGTGGAAATAGCAATTCT	This study	RT-PCR
SMU.862-863R	CAATTCCTTTGAGGACCTGC	This study	
SMU.863-864F	ATGGTAACGCATGAACCTGAGA	This study	
SMU.863-864R	CATAGTCGTTACTAGTAAAGGAGC	This study	

Nucleotides underlined in each primer sequence show the positions of the restriction endonuclease sites incorporated to facilitate cloning.

結果

1. バシトラシン耐性に関与する遺伝子の検索

どの遺伝子が S. mutans のバシトラシン耐性に重要な役割を果たしている かを調べるため、まず S. mutans のトランスクリプトームをマイクロアレイ を用いて調べた。バシトラシン存在下及び非存在下の トランスクリプトーム を比較した結果 8 つの遺伝子 (SMU.302, SMU.862, SMU.863, SMU.864, *mbrA*, *mbrB*, SMU.1479, SMU.1856c) がバシトラシンにより 4 倍以上発現誘 導されていることが分かった (Table 3)。これまで、*S. mutans*のバシトラシ ン存在下で発現が上昇する遺伝子についてゲノム全域に渡って分析を行った 報告はなく、本研究によってはじめて上記の8 つの遺伝子が報告された。遺 伝子の相同性より、SMU.862、SMU.863、SMU.864 は ABC トランスポータ ーをコードすると推測されており、RT-PCR を用いて調べたところ、これら はオペロンを構成していた (data not shown)。*mbrA*, *mbrB* も ABC トラン スポーターをコードすると推測されており、津田ら (2002) によりバシトラ シン耐性遺伝子として報告されている。他の遺伝子 (SMU.302、SMU.1479、 SMU.1856c) についてはコードする蛋白質の局在のみ推定されており、 SMU.302、SMU1856c は細胞膜と細胞質に、SMU.1479 は細胞質と菌体外に存 在する蛋白質をコードすると推測されている。

次にこれらの 8 つの遺伝子の欠損株の作製を試みた。そして、欠損株が作 製できなかった SMU.862 を除くそれぞれの欠損株のバシトラシン耐性を調 べた。その結果、*mbrA*, *mbrB* の欠損株のみ顕著なバシトラシン耐性の低下を

示した (Fig. 2; *mbrB* 欠損株は 1 U/ml のバシトラシン濃度で増殖しなかった; data not shown)。この結果から *mbrA*, *B* の発現誘導がバシトラシン耐性に とって必須であることが明らかになった。

	C		Fold change	
Locus ID	Gene name	Function	(+bacitracin / -bacitracin)	
SMU.302		Conserved hypothetical protein	4.52	
SMU.862		Conserved hypothetical protein	7.88	
SMU.863		ABC transporter (ATP-binding protein)	8.68	
SMU.864		ABC transporter (permease protein)	7.24	
SMU.1006	mbrA	ABC transporter (ATP-binding protein)	35.65	
SMU.1007	mbrB	ABC transporter (permease protein)	33.46	
SMU.1479		Conserved hypothetical protein	6.08	
SMU.1856c		Conserved hypothetical protein	21.25	

Table 3. List of expressed genes on the microarray*

*The highly expressed genes, which show more than four-fold of intensity ratio

(+bacitracin /-bacitracin), are listed.



Fig. 1. mbr 遺伝子クラスター及び隣接する遺伝子

mbrA と mbrB は ABC トランスポーターをコードすると予測され、下流の mbrC と mbrD は二成分制御系をコードすると予測される。



Fig. 2. 各遺伝子欠損によるバシトラシン耐性への影響

吸光度 550 nm における各欠損株の濁度の平均値、及び標準偏差を示した。

1 2 ←MbrA

Fig. 3. UA159 中の MbrA 蛋白質のウェスタンブロット解析.

抗 MbrA ペプチド抗体 (1:500 希釈) を用いてウェスタンブロットにより溶菌 液を解析した。バシトラシン非存在下 (レーン 1) もしくはバシトラシン存在下 (レーン 2) で増殖させた同量の UA159 の溶菌液を用いて実験を行った。図の右 側の矢印にて MbrA のバンドを示した。

2. バシトラシン存在下における MbrA 蛋白質発現

抗 MbrA ペプチド抗体を用いて UA159 の MbrA 蛋白質の発現をウェスタ ンブロットにより調べた (Fig. 3)。バシトラシン非存在下ではほとんど MbrA の 発現は検出できなかったのに対して、バシトラシン存在下では MbrA 蛋白質の 発現が見られた。これまで、*S. mutans* の *mbr* 遺伝子群がメッセンジャーレベ ルでバシトラシンにより誘導されるという報告はあったが、蛋白質発現に関す る報告はなく、本研究で、バシトラシンによる MbrA 蛋白質の発現がはじめて 確認された。

3. mbrA の発現誘導における mbrC, mbrD の役割

mbrC, *D* がアミノ酸配列のホモロジーから予想される様に TCS であるな らば、*mbrA* の発現誘導を制御しているであろう。そこで *mbrC*, *D* の欠損株を 作製し、バシトラシン存在下における *mbrA* の発現誘導をリアルタイム RT-PCR により調べた。その結果、野生株では *mbrA* がバシトラシンにより約 67 倍発 現誘導されていたが、両欠損株ではバシトラシンによる発現誘導は見られなか った (Fig. 4A)。また、この *mbrC* 欠損が *mbrA* の発現調節に直接影響している ことを証明するため、バシトラシン非存在下において、*mbrD* の発現をメッセ ンジャーレベルで調べたところ、野生株との間に差は見られなかった (FIG. 4B)。このことから *mbrC* を欠損してもその下流の遺伝子の転写にはほとんど 影響を及ぼさないと考えられる。以上のことから *mbrC* と *mbrD* のいずれの遺 伝子も *mbrA* の発現誘導を制御していることが分かった。 4. MbrC 蛋白質と mbrA 発現調節領域間の相互作用の解析

mbrA の 264 bp 上流に存在する遺伝子 *gtfC* と *mbrA* とはオペロンを構成 しないこと (Tsuda、2002)、及び *gtfC-mbrA* 遺伝子間領域に *gtfC* の転写終 結区と見られるステムループ構造とチミンの連続配列が見られることから *gtfC-mbrA* 遺伝子間領域に *mbrA* 遺伝子発現調節領域がある可能性が考えられ る。MbrC が RR として機能するという仮説を確かめるため、*gtfC mbrA* 遺伝 子間領域の 261 bp と同じ塩基配列を持つ DIG ラベルされた DNA プローブ mbp1 と MbrC との結合能を EMSA により調べた。実験の結果 MbrC と mbp1 との結合による mbp1 のシフトが見られた (Fig. 5)。また、そのシフト は過剰量のアンラベルの mbp1 を加えることで消失するが、mbp1 と関係の ない配列を持つ DNA フラグメントをコントロールとして加えても消失しな かった (Fig. 5)。以上のことから、MbrC は mbp1 と特異的に結合することが



Fig. 4. *mbrC、mbrD* 欠損によるバシトラシン存在下での *mbrA* 発現誘導の 変化

(A) UA159、KD1108 (ΔmbrC) 及び KD1109 (ΔmbrD) のバシトラシン存在下
(+Bac, 1.0 U/ml)、及びバシトラシン非存在下 (-Bac) における mbrA 遺伝子の発現比。
(B) UA159、KD1108 のバシトラシン非存在下における mbrD 遺伝子と
mbrA 遺伝子の発現比。



Fig. 5. MbrC と mbr オペロン発現調節領域推定部位の結合

mbr オペロン発現調節領域推定部位を含む *gtfC* と *mbrA* の遺伝子間領域の 261 bp と同じ配列を持つ DIG ラベルされた DNA プローブ mbp1 を用いて EMSA を行った。(レーン 1) ネガティブコントロールとして MbrC を加えずに 反応を行ったもの。(レーン 3) mbp1 と MbrC の結合の特異性を確認するため DIG ラベル mbp1 の 125 倍のアンラベルの mbp1 を加え競合試験を行ったも の。(レーン 4) mbp1 と関係のない pUc19 の一部分と同じ配列を持つフラグメ ントを用いて競合試験を行ったもの。

5. MbrC のリン酸化部位の検索

すでに報告されている数種類の細菌の RR と MbrC のアミノ酸配列のア ライメント分析を行ったところ、MbrC の 54 番目のアスパラギン酸が mbrA 発現調節領域との結合に必要なリン酸化部位である可能性が示唆された (Fig. 6)。この可能性を検討するため、部位特異的変異誘発にて MbrC の 54 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換した MbrC を作製し、 D₅₄N-MbrC と命名した。ゲルシフトアッセイを行ったところ、D₅₄N-MbrC と mbp1 との間に特異的結合は見られず (Fig. 7)、54 番目のアスパラギン酸の mbrA 発現調節領域との結合における重要性が示唆された。

次にこの 54 番目のアスパラギン酸のリン酸化の重要性を in vivo にて検 討するため、54 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換して発現する変 異 mbrC を導入した mbrC D₅₄N 変異株 KD1113 を作製した (Fig. 8)。こ の KD1113 では mbrC 欠損株 KD1108 と同様に野生株に比べ、バシトラシ 耐性が著しく低下しており (Table 4)、バシトラシン存在下での mbrA の発現 誘導も見られなかった (Fig. 9)。これらの結果からも 54 番目のアスパラギン 酸のリン酸化が MbrC による mbrA の発現誘導に必須である可能性が示唆 された。さらに、マイクロアレイにおいて 4 倍以上の発現を示した遺伝子に ついて KD1108 及び KD1113 におけるバシトラシン存在下での発現誘導を メッセンジャーレベルにて調べた (Fig. 10)。その結果、SMU.1479 を除く 4 つの遺伝子 (SMU.302, SMU.862, mbrA, SMU.1856c) では各遺伝子の発現誘導

れらの遺伝子の発現も制御していると考えられる。また、その制御にも 54 番 目のアスパラギン酸のリン酸化が必要である可能性が示唆された。

N ↑

40	LQEVKEFKPDLILMDITLPYFNGF	63	MbrC	S. mutans
38	IEEFTSLKPDLVIIDIQLPKFDGF	61	BceR	B. halodurans
38	LQEFAAVNPDCVIIDVQLPKFDGF	61	BceR	B. subtilis
42	ARIVEHYHPDVVIMDINMPNVNGV	65	DegU	B. subtilis
43	LNKLQAGGYGFVISDWNMPNMDGL	66	CheY	E. coli
41	DRLLTRESFHLMVLDLMLPGEDGL	64	OmpR	E. coli
40	LAALASKTPDVLLSDIRMPGMDGL	63	NtrC	S. typhimurium

Fig. 6. MbrC 及び数種類の細菌の **RR** のアミノ酸配列のアライメント 分析。

BceR (*Bacillus halodurans*)、BceR (*B. subtilis*)、DegU (*B. subtilis*), CheY (*E. coli*)、 OmpR (*E. coli*)、NtrC (*Salmonella typhimurium*) のリン酸化部位を灰色で示した。 MbrC の 54 番目のアスパラギン酸のアスパラギンへの置換は矢印にて示し た。それぞれの配列のアミノ酸の位置は N 末端側の最初のアミノ酸を基準 に両側に記載した。



Fig. 7. MbrC の D₅₄N 変異による発現調節領域推定部位との結合の変化 MbrC あるいは D₅₄N-MbrC を用い、DIG ラベルされた mbp1 を DNA プロー ブとして EMSA を行った。(レーン 1) ネガティブコントロールとして MbrC を加えずに反応を行ったもの。(レーン 3) mbp1 と MbrC の結合の特異性を確 認するため DIG ラベル mbp1 の 125 倍のアンラベルの mbp1 を加え競合試験 を行ったもの。



Fig.8. 変異株 KD1113 の構築

UA159 に pSET4s (D_{54} N-MbrC)を導入し、染色体上の *mbrC* とこのプラスミド の *mbrC* (D_{54} N) との相同組み換えにより、スペクチノマイシン耐性 (Spc¹)の形 質転換株を得た。次に、2 回目の相同組み換えによりベクター由来の Spc¹ 遺伝 子を失いスペクチノマイシン感受性となったクローンを選択し、染色体上の *mbrC* が *mbrC* (D_{54} N) に置換されたクローンを得た。

Table 4. Bacitracin MICs of each S. mutans strain.

Strain	MIC (U/ml)*
UA159	4.0
KD1108	0.083
KD1113	0.073

*Results are expressed in international units per milliliter.



Fig. 9. バシトラシン存在下における、KD1113 (D₅₄N-MbrC)、KD1108 (Δ*mbrC*) 及び UA159 における *mbrA* の発現誘導 縦軸はバシトラシン存在下 (+Bac, 1.0 U/ml)、バシトラシン非存在下 (-Bac) にお ける *mbrA* の発現比を示している。



Fig. 10. バシトラシン存在下での KD1113 (D₅₄N-MbrC)、KD1108 (Δ*mbrC*)、 UA159 における各遺伝子の発現誘導の比較

縦軸は バシトラシン存在下 (+Bac, 1.0 U/ml) 及び バシトラシン非存在下 (-Bac) における各遺伝子の発現比を示す。

mbrA	TCAATGC <u>TTACAA</u> TT <u>TTGTAA</u> G			
SMU.1856c	GGTTTAT <u>TTACAA</u> AA <u>TTGTAA</u> G			
SMU.862	TTAAAAC <u>TTACAA</u> TT <u>TTGTAA</u> G			
SMU.302	TGAGGAC <u>TTACA</u> AAGG <u>TGTAA</u> G			
	Inverted repeat			
CTACGATTCTTTAAGTGTAAGATATCTTT -64				
TTATAGTACAAAGACTGTAAGATTAGGGC -45				
ττττααςτττα	ATAATGTAAGGCTCTTGA -24			
GTTCTATCTTG	ATTTTTGAGATAAAATAA -58			

Fig.11. 逆方向反復配列の比較

mbrA、SMU.1856c、SMU.862 及び SMU.302 の発現調節領域推定部位を含む塩 基配列の比較。逆方向反復配列は灰色の文字及び下線にて示した。

本研究において 8 つの S. mutans の遺伝子 (SMU.302, SMU.862, SMU.863, SMU.864, mbrA, mbrB, SMU.1479, SMU.1856) がバシトラシンによって4 倍以上 誘導されることが分かった (Table 3)。Ouyang らは SMU.302、SMU.862 そして SMU.1856 の遺伝子発現調節領域推定部位には mbrA のそれと似た共通の逆方 向反復配列が存在することを示した。SMU.862、SMU.863、SMU.864 そして mbrA、 mbrB はそれぞれオペロン構造を示すことから (Tsuda, et al., 2002)、SMU.863 と SMU.864 そして *mbrB* のバシトラシンによる誘導は上流のこれらの遺伝子の 発現調節領域に制御されていると考えられる。一方、SMU.1479 は共通の逆方向 反復配列を持っておらず (Fig. 11)、MbrC による制御は受けていなかった。 SMU.1479 は他のシグナル伝達システムの制御を受けていると考えられる。 SMU.1479 を除くこれら7つの遺伝子(SMU.302、SMU.862、SMU.863、SMU.864、 *mbrA、mbrB*、SMU.1856)は MbrC による制御を受け、バシトラシン耐性に関 与していることが考えられるが、欠損株が作製できなかった SMU.862 を除くそ れぞれの遺伝子の欠損株を用いて検討した結果、mbrAB 以外の遺伝子ではバシ トラシン耐性の低下は見られなかった。耐性への関与が見られない遺伝子がバ シトラシンによる発現誘導を受ける理由は不明であるが、以下の2つの仮説が 考えられる。一つの仮説はこれらの遺伝子は直接バシトラシンを感知して誘導 されるのではなく、バシトラシンによる細胞壁の障害を感知して誘導されるも のであり、バシトラシン耐性にはごく僅かしか関与していないという仮説であ

る。S. mutans の mbrABCD 遺伝子と相同性が高い bceRS-AB 遺伝子を持つ B. subtilis にはバシトラシン存在下で大きく発現誘導される BceRS-AB システム 以外に、細胞障害を感知して発現誘導すると推測されるシステムが複数存在す る (Rietkotter ら、2008)。もう一つの仮説はこれらの遺伝子は MbrC と構造が似 たアクチベーターにより、発現誘導される遺伝子であるという仮説である。現 時点の情報では mbrAB 以外の遺伝子がバシトラシンにより発現誘導を受けた意 味を判断することは難しく、さらなる解析が必要と考えられる。B. subtilis では S. mutans の MbrABCD のホモログである BceRS-AB システム以外に、IPP 脱 リン酸化酵素である BcrC がバシトラシン耐性に関与することが分かっている (Bernard ら、2005)。 bcrC はバシトラシン存在下で 10-30 倍発現誘導され bcrC 欠損株は耐性が野生株の 1/20 になることが報告されている。S. mutans におい ても、bacA 遺伝子 (SMU.244) がアミノ酸配列の相同性によりバシトラシン耐 性に関与する IPP 脱リン酸化酵素をコードすると推測されている (Maruyama ら、2009)。しかしながらマイクロアレイによる解析では bacA のバシトラシン 存在下での発現誘導は約 2.1 倍と低かった。S. mutans における bacA の実際の 機能はまだ解明されていないが、バシトラシン耐性には関与していない可能性 が考えられる。 また津田ら (2002) は S. mutans のラムノース-グルコース多糖体 をコードする rgpABCD 遺伝子が欠損すると耐性が約 1/5 となることを、Lis (Lis ら、2003) らは S. mutans のジアシルグリセロールキナーゼをコードする dgk 遺伝子が欠損すると野生株より低いバシトラシン濃度で発育が阻害される ことを報告しているが、マイクロアレイにおいて、rgpABCD 遺伝子と dgk 遺伝 子の発現誘導は見られなかった。rgpABCD 遺伝子も dgk 遺伝子もバシトラシン

耐性に少しは関与するが、その耐性は *mbrABCD* 遺伝子と異なりバシトラシン の存在に呼応してさらに大きく発現するものではないと考えられる。以上のこ とから、*S. mutans* ではバシトラシンによる強い発現誘導、欠損株のバシトラシ ン感受性の大幅な増加を示す *mbrAB* がバシトラシン耐性に関与する遺伝子の 中でも特に重要な役割を担っていることが判明した。

次に本研究ではこの mbrABCD 遺伝子によるバシトラシン耐性機序について 検討した。MbrC と MbrD はいわゆる「バシトラシン反応性 TCS」のファミリ ーに属する TCS である (Chong ら、2008)。このファミリーの中では B. subtilis の bceRS について特にその機能が詳細に解明されている (Rietkotter ら、2008)。 このような TCS をコードする遺伝子は ABC トランスポーター遺伝子と隣り 合って存在し、ABC トランスポーターを制御するものが多い。KD1108 (ΔmbrC)、 KD1109 (Δ*mbrD*) ではバシトラシンによる *mbrA* の発現誘導が見られず、S. *mutans* の *mbrAB* も *mbrCD* に制御されていることが分かった。これは当研究 遂行中に報告された Ouyang ら (2010) の報告と一致した。一方、バシトラシン に反応して mbrAB の mRNA 量は大きく増加したが mbrCD についてはあま り変化が見られなかった。これは mbr 遺伝子群がオペロンを構成するという、 津田ら (2002)の報告と矛盾するように思える。この現象の1 つの説明として、 mbr 遺伝子群が mbrABCD オペロンと mbrAB オペロンの 2 つのオペロン構 造を持ち、バシトラシンにより前者に比べ後者の転写が強く誘導される可能性 が考えられる。実際、多くの bceRS-bceAB 型のクラスターでは TCS と ABC ト ランスポーターは別オペロンを構成している (Mascher ら、2006)。さらに、mbrB と mbrC 遺伝子間にはステムループ構造とそれに続くチミンの連続配列が見ら

れ、転写終結区としてはたらく可能性が考えられる。しかし現在のデーターか ら転写産物を決定することは難しく、さらなる検討が必要であると考えられる。

mbrC はアミノ酸配列から TCS の RR をコードしていると考えられ、予想 通り MbrC は mbrA の遺伝子発現調節領域と推定される部位と特異的に結合 した。通常、RR が標的遺伝子の遺伝子発現調節領域へ結合するには RR のリ ン酸化が必要とされる。Ouyang ら (2010) は MbrC においてもリン酸化が遺伝 子発現調節領域と推定される部位への結合を強化することを報告した。しかし ながら、本実験では MbrC は in vitro のリン酸化を行わない状態でも遺伝子発 現調節領域と推定される部位と特異的に結合した (Fig. 5)。大腸菌の中で発現さ せた他のリコンビナント蛋白質でも in vitro のリン酸化 を行わない状態で、特 異的な結合をすることが報告されており (Kreth ら、2007: Aranda ら、2008)、 これは大腸菌内でリコンビナント蛋白質のリン酸化が行われたためと考えられ ている (Klein ら、2007)。そこで本研究では、MbrC のリン酸化が DNA との結 合に必須なものなのかどうかについて、リン酸化部位と推定される 54 番目の アスパラギン酸に注目して実験を行った。その結果、このアスパラギン酸残基 が mbrA 発現調節領域との結合及び、それに続く mbrA の発現誘導に必須であ ることが分かった。54 番目のアスパラギン酸の重要性は KD1113 (mbrC D54N 変 異株) におけるバシトラシン耐性の低下、mbrA 発現誘導の低下から in vivo に おいても確認された。54 番目のアスパラギン酸がリン酸化されている直接的な 根拠はないが、これらのデーターはこの残基がバシトラシン感知システムにお けるリン酸化部位である可能性が高いことを示唆している。さらに、MbrCの54 番目のアスパラギン酸は SMU.302、SMU.862、そして SMU.1856c のバシトラ

シン存在下における発現誘導においても必須のものであるが、SMU.1479 の発現 誘導においては必須ではないことが *in vivo* の実験で示された (Fig. 10)。これら の結果は 先に記述した様に SMU.1479 が MbrCD 以外のシグナル伝達システ ムに制御されている可能性を示唆している。

S. mutans はバシトラシン耐性を持つが、B. subtilis や B. licheniformis といっ たバシトラシン産生細菌は口腔内の主要な細菌ではなく、S. mutans 自身もバシ トラシンを産生しない (Wu ら、2010)。遺伝子の相同性からバシトラシンを合 成する蛋白質をコードすると推定されていた、S. mutans の SMU.1339c、 SMU.1340c、SMU.1342c は酸素や過酸化水素に対する耐性に関与する非リボソ ーム性ペプチド合成酵素とポリケチド合成酵素をコードするクラスターに含ま れることが報告されている (Wu ら、2010)。そのため、mbr 遺伝子群は本来バ シトラシン耐性が主な働きではなく、より発現が誘導される、主要な機能が存 在するという可能性も考えられる。Chong ら (2008) は MbrD がバンコマイシ ン感知に関与している可能性を報告した。しかし、本研究において UA159 野 生株と KD1109 のバンコマイシン耐性に差は見られなかったことから (data not shown)、MbrD は主要なバンコマイシン感知に働く蛋白質ではないと考えられる。 また、Ouyang ら (2010) は *mbrABCD* の発現が好中球により産生される、α-デ ィフェンシン、上皮系の細胞により産生される β-ディフェンシンといった抗菌 ペプチドに誘導されること、及び mbrABCD がその耐性に関与していることを 報告した。好中球や上皮系の細胞等により産生される抗菌ペプチド LL-37 の耐 性にも mbrABCD が関与している可能性が報告されており (Bernard ら、2007)、 mbrABCD はこれら、宿主の防御機構に対応するシステムを構成している可能性

が考えられる。しかしながら実際に *mbr* 遺伝子がどのような刺激により最も強 く発現するかは分かっておらず、*mbr* 遺伝子を発現させる刺激についてさらな る解析が求められる。また、我々の研究外で MbrAB がバシトラシン感知に関与 することが示唆されているが (Ouyang ら、2010)、MbrD が MbrAB と共にどの ように外界のストレスを認識するのかはいまだに解明されていない。バシトラ シンと α 、 β ディフェンシンの構造が大きく異なることを考えれば、MbrD が直 接バシトラシンや α 、 β ディフェンシンと結合するという仮説よりも、バシトラ シン刺激による細胞壁構造の変化等を感知しているという仮説の方が現時点で は説得力があるように思える。

現在、多剤耐性菌が大きな問題となっており、今後、高齢化社会のさらなる 進行、ガン治療、臓器移植などの高度医療の進歩による易感染性宿主の増加が 予想される中で、耐性菌による感染症の増加が懸念されている。バンコマイシ ン耐性腸球菌 (VRE) においては、バシトラシンの経口投与が効果的であること が報告されている (O'Donovan ら、1994; Chia ら、1995: Silverblatt ら、2000)。 しかしながら、*S. mutans* の mbr 遺伝子群が VRE に移行する可能性が示唆され ており (Hamada ら、1980)、バシトラシン耐性の VRE 出現に対する対処法を検 討するために、*S. mutans* のバシトラシン耐性メカニズムを解明することが求め られている。実際、大から検出されたバシトラシン耐性の *E. faecalis* AR01/DG 株 の耐性メカニズムは *S. mutans* のmbrABCDによるバシトラシン耐性システムと 似ており (Gauntlett ら、2008)、VRE も同様の耐性メカニズムを獲得する可能性 は十分に考えられる。

近年 TCS は有望な新薬のターゲットとして注目を集めている (Okada ら、

2007)。実際 Walk/WalR TCS 阻害剤はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌に有効で あることが報告されている (Gotoh ら、2010)。TCS は細菌や真菌、植物には見 られるものの、哺乳類の細胞には見られない事から、抗 TCS 薬は有効な抗生物 質と成りうると考えられる。特に複数の TCS を阻害する抗 TCS 剤の開発が期 待されている。バシトラシン耐性システムの詳細な解明はバシトラシン耐性菌 への対策にとどまらず、新興の薬剤耐性菌にも有効な抗生物質の開発につなが る可能性も期待でき、更なる研究が必要であると考えられる。

総括

- S. mutansのマイクロアレイ解析から、バシトラシン存在下で発現が4倍以上 誘導された遺伝子が8つ存在することを確認し、その中の7つの遺伝子の 欠損株を作製した。
- 上記の7つの変異株の中で、バシトラシン耐性を欠いたのは *mbrA*, *mbrB* の 変異株であった。
- 3. S. mutans 野生株ではバシトラシン存在下で MbrA 蛋白質の発現量が増加し た。
- 4. 作製した mbrC 変異株 (KD1108) 及び、mbrD 変異株 (KD1109) ではバシト ラシン存在下でも mbrA の発現は誘導されないことから、mbrA の誘導は mbrC, mbrD により制御されていることが示唆された。
- 5. 大腸菌内で発現させ、精製した MbrC は *mbrA* の発現調節領域と推定され る部位と特異的に結合したことから、MbrC が TCS の RR として働くこと で *mbrA* の発現が誘導されている可能性が示唆された。
- 6. 多くの細菌で保存されている RR のリン酸化部位に相当する MbrC の 54 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置換させた変異蛋白質(D₅₄N-MbrC)

は *mbrA* 発現調節領域と結合しないことから、MbrC による *mbrA* 発現誘導 にはリン酸化が必要であり、54 番目のアスパラギン酸がそのリン酸化部位 である可能性が示唆された。

- 7. D₅₄N-MbrC を発現する *mbrC* 変異株 (KD1113) を作製し、バシトラシン存在 下で *mbrA* の発現誘導が見られないこと、及びバシトラシン耐性が低下する ことを確認し、in vivo においても MbrC による *mbrA* 発現誘導にはリン酸 化が必要であり、54 番目のアスパラギン酸がそのリン酸化部位である可能 性が示唆された。
- 野生株にてバシトラシン存在下で誘導される 8 つの遺伝子のうち、 SMU.1479 を除く 7 つの遺伝子 (SMU.302、SMU.862、SMU.863、SMU.864、 *mbrA、mbrB、*SMU.1856c) が KD1108 及び、KD1113 においては誘導されて おらず、これらの遺伝子も MbrC による制御を受け、その制御には 54 番目 のアスパラギン酸のリン酸化が必要である可能性が示唆される一方で、バシ トラシン存在下での SMU.1479 の誘導は MbrC による制御を受けていない ことが示唆された。
- 9. バシトラシン存在下で誘導される 8 つの遺伝子のうち、7 つの遺伝子の発現調節領域と推定される部位に、共通した特徴を持つ逆方向反復配列が見られたが、SMU.1479 の発現調節領域と推定される部位には見られず、この逆方向反復配列が MbrC の結合部位である可能性が示唆された。

本研究は、九州大学大学院歯学研究院口腔保健推進学講座 山下喜久教授 のご指導のもとに行われたものであり、先生の御懇篤な御指導、御高閲に心 より深く感謝いたします。本研究を遂行するにあたり、終始御指導、御援助 頂きました九州大学大学院歯学研究院口腔保健推進学講座 塩田進助教な らびに柴田幸江助教に謹んで御礼申し上げます。最後になりましたが、本研 究に御指導、ご協力下さいました九州大学大学院歯学研究院口腔保健推進学 講座の皆様に、心から感謝いたします。

参考文献

- Aranda J, Garrido ME, Cortes P, Llagostera M & Barbe J (2008) Analysis of the protective capacity of three *Streptococcus suis* proteins induced under divalent-cation-limited conditions. *Infect Immun* 76: 1590-1598.
- Bernard R, El Ghachi M, Mengin-Lecreulx D, Chippaux M & Denizot F (2005) BcrC from *Bacillus subtilis* acts as an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase in bacitracin resistance. *J Biol Chem* 280: 28852-28857.
- Bernard R, Guiseppi A, Chippaux M, Foglino M & Denizot F (2007) Resistance to bacitracin in *Bacillus subtilis*: unexpected requirement of the BceAB ABC transporter in the control of expression of its own structural genes. *J Bacteriol* 189: 8636-8642.
- Burnette WN (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem* 112: 195-203.
- Chia JKS, Nakata MM, Park SS, Lewis RP & McKee B (1995) Use of bacitracin therapy for infection due to vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Clinical Infectious Diseases* 21: 1520.
- Chong P, Drake L & Biswas I (2008) LiaS regulates virulence factor expression in *Streptococcus mutans. Infect Immun* 76: 3093-3099.
- El Ghachi M, Bouhss A, Blanot D & Mengin-Lecreulx D (2004) The bacA gene of Escherichia coli encodes an undecaprenyl pyrophosphate phosphatase activity. J Biol Chem 279: 30106-30113.
- Fiedler W & Rotering H (1988) Properties of *Escherichia coli* mutants lacking membrane-derived oligosaccharides. *J Biol Chem* **263**: 14684-14689.
- Gauntlett JC, Gebhard S, Keis S, Manson JM, Pos KM & Cook GM (2008) Molecular analysis of BcrR, a membrane-bound bacitracin sensor and DNA-binding protein from *Enterococcus faecalis*. *J Biol Chem* **283**: 8591-8600.
- Gold OG, Jordan HV & Van Houte J (1973) A selective medium for *Streptococcus* mutans. Archives of Oral Biology 18: 1357-1364.
- Gotoh Y, Eguchi Y, Watanabe T, Okamoto S, Doi A & Utsumi R (2010) Two-component signal transduction as potential drug targets in pathogenic

bacteria. Curr Opin Microbiol 13: 232-239.

- Hamada S, Masuda N & Kotani S (1980) Isolation and serotyping of *Streptococcus mutans* from teeth and feces of children. *J Clin Microbiol* 11: 314-318.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.
- Hemsley A, Arnheim N, Toney MD, Cortopassi G & Galas DJ (1989) A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res* 17: 6545-6551.
- Hoch JA (2000) Two-component and phosphorelay signal transduction. Curr Opin Microbiol 3: 165-170.
- Kawada-Matsuo M, Shibata Y & Yamashita Y (2009) Role of two component signaling response regulators in acid tolerance of *Streptococcus mutans*. Oral Microbiol Immunol 24: 173-176.
- Klein AH, Shulla A, Reimann SA, Keating DH & Wolfe AJ (2007) The intracellular concentration of acetyl phosphate in *Escherichia coli* is sufficient for direct phosphorylation of two-component response regulators. *J Bacteriol* 189: 5574-5581.
- Kong W, Shiota S, Shi Y, Nakayama H & Nakayama K (2000) A novel peroxiredoxin of the plant Sedum lineare is a homologue of *Escherichia coli* bacterioferritin co-migratory protein (Bcp). *Biochem J* **351**: 107-114.
- Kreth J, Hung DC, Merritt J, et al. (2007) The response regulator ComE in Streptococcus mutans functions both as a transcription activator of mutacin production and repressor of CSP biosynthesis. Microbiology 153: 1799-1807.
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lis M & Kuramitsu HK (2003) The stress-responsive *dgk* gene from *Streptococcus mutans* encodes a putative undecaprenol kinase activity. *Infect Immun* **71**: 1938-1943.
- Livak KJ & Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25: 402-408.
- Manson JM, Keis S, Smith JM & Cook GM (2004) Acquired bacitracin resistance in *Enterococcus faecalis* is mediated by an ABC transporter and a novel regulatory

protein, BcrR. Antimicrob Agents Chemother 48: 3743-3748.

- Maruyama F, Kobata M, Kurokawa K, *et al.* (2009) Comparative genomic analyses of *Streptococcus mutans* provide insights into chromosomal shuffling and species-specific content. *BMC Genomics* **10**: 358.
- Mascher T (2006) Intramembrane-sensing histidine kinases: a new family of cell envelope stress sensors in Firmicutes bacteria. *FEMS Microbiol Lett* **264**: 133-144.
- Mascher T, Helmann JD & Unden G (2006) Stimulus perception in bacterial signal-transducing histidine kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 70: 910.
- Masuda G (1976) Studies on bactericidal activities of beta-lactam antibiotics on agar plates: the correlation with the antibacterial activities determined by the conventional methods. J Antibiot (Tokyo) 29: 1237-1240.
- 水野猛、鈴木友美 (2002) 蛋白質核酸酵素 Vol 47 No 2:113-125
- O'Donovan CA, Fan-Havard P, Tecson-Tumang FT, Smith SM & Eng RHK (1994) Enteric eradication of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* with oral bacitracin. *Diagnostic microbiology and infectious disease* **18**: 105-109.
- Okada A, Gotoh Y, Watanabe T, Furuta E, Yamamoto K & Utsumi R (2007) Targeting two-component signal transduction: a novel drug discovery system. *Methods Enzymol* 422: 386-395.
- **Ouyang J, Tian XL, Versey J, Wishart A & Li YH** (2010) The BceABRS Four-Component System Regulates Bacitracin-Induced Cell Envelope Stress Response in *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents Chemother*.
- **Perry D, Wondrack LM & Kuramitsu HK** (1983) Genetic transformation of putative cariogenic properties in *Streptococcus mutans*. *Infection and immunity* **41**: 722.
- Pollock TJ, Thorne L, Yamazaki M, Mikolajczak MJ & Armentrout RW (1994) Mechanism of bacitracin resistance in gram-negative bacteria that synthesize exopolysaccharides. *Journal of Bacteriology* 176: 6229.
- Rietkotter E, Hoyer D & Mascher T (2008) Bacitracin sensing in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* **68**: 768-785.
- Sambrook J & Russell DW (2001) *Molecularcloning: a laboratory manual, 3rd ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

- Sanger F, Nicklen S & Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467.
- Shibata Y, Yamashita Y, Nakano Y & Koga T (1999) Isolation and characterization of the *rml* gene homologs from *Porphyromonas gingivalis*. Oral Microbiol. Immunol. 14: 339-347.
- Silverblatt FJ, Tibert C, Mikolich D, Blazek-D'Arezzo J, Alves J, Tack M & Agatiello P (2000) Preventing the spread of vancomycin-resistant enterococci in a long-term care facility. *Journal of the American Geriatrics Society* **48**: 1211-1215.
- Storm DR (1974) Mechanism of bacitracin action: a specific lipid-peptide interaction. Ann N Y Acad Sci 235: 387-398.
- Takamatsu D, Osaki M & Sekizaki T (2001) Thermosensitive suicide vectors for gene replacement in *Streptococcus suis*. *Plasmid* 46: 140-148.
- Tsuda H, Yamashita Y, Shibata Y, Nakano Y & Koga T (2002) Genes involved in bacitracin resistance in *Streptococcus mutans*. Antimicrob Agents Chemother 46: 3756-3764.
- Wecke T, Veith B, Ehrenreich A & Mascher T (2006) Cell envelope stress response in Bacillus licheniformis: integrating comparative genomics, transcriptional profiling, and regulon mining to decipher a complex regulatory network. J Bacteriol 188: 7500-7511.
- Wu C, Cichewicz R, Li Y, et al. (2010) Genomic island TnSmu2 of Streptococcus mutans harbors a nonribosomal peptide synthetase-polyketide synthase gene cluster responsible for the biosynthesis of pigments involved in oxygen and H2O2 tolerance. Appl Environ Microbiol 76: 5815-5826.