

## 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

	頁
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)
HK	histidine kinase (ヒスチジンキナーゼ)
IgG	immunoglobulin G (免疫グロブリン G)
IP	C <sub>55</sub> -isoprenyl phosphate (C <sub>55</sub> -イソプレニルリン酸)
IPP	C <sub>55</sub> -isoprenyl pyrophosphate (C <sub>55</sub> -イソプレニルピロリン酸)
抗 RGS-His 抗体	Anti arginine-glycine-serine (histidine) <sub>6</sub> 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)
RR	response regulator (レスポンスレギュレーター)
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	1 ℓ 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、5 g 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 (D<sub>54</sub>N-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 (D<sub>54</sub>N-MbrC) を導入した *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 C<sub>55</sub>-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 C<sub>55</sub>-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 subtilis* 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. subtilis* 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) に入力ドメイン (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つ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。

## 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°C、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養した。*E. coli* は 2×YT ブロス (Difco) を用いて 37°C で好氣的に培養した。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。

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Source or reference
Strains		
<i>S. mutans</i>		
UA159	Wild-type strain, sero type <i>c</i>	Koga <i>et al.</i> (1989)
KD9302	UA159-derived, SMU.302-deficient, Em <sup>r</sup>	This work
KD9863	UA159-derived, SMU.863-deficient, Em <sup>r</sup>	This work
KD9864	UA159-derived, SMU.864-deficient, Em <sup>r</sup>	This work
KD1106	UA159-derived, <i>mbrA</i> -deficient, Em <sup>r</sup>	This work
KD1107	UA159-derived, <i>mbrB</i> -deficient, Em <sup>r</sup>	This work
KD1108	UA159-derived, <i>mbrC</i> -deficient, Em <sup>r</sup>	This work
KD1109	UA159-derived, <i>mbrD</i> -deficient, Em <sup>r</sup>	This work
KD1113	UA159-derived, the mutant <i>mbrC</i> encoding D <sub>54</sub> N-MbrC	This work
KD91479	UA159-derived, SMU.1479-deficient, Em <sup>r</sup>	This work
KD91856	UA159-derived, SMU.1856c-deficient, Em <sup>r</sup>	This work
<i>E. coli</i>		
DH5 $\alpha$	$\phi$ 80 $\Delta(lacZ)M15 \Delta(argF-lac)U169 endA1 recA1 hsdR17$ (rK-mK+) <i>deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1</i>	Sambrook & Russell (2001)
Plasmids		
pQE80L	His <sub>6</sub> tag expression vector; Ap <sup>r</sup>	Qiagen
pBSSKII-Em <sup>r</sup>	pBluescript II SK(+) containing a erythromycin resistance gene at the multiple cloning site, Ap <sup>r</sup> , Em <sup>r</sup>	Shibata <i>et al.</i> (2009)
pKD9302	pBSSK-Em <sup>r</sup> containing fragments upstream and downstream of the SMU.302 gene	This work
pKD9863	pBSSK-Em <sup>r</sup> containing fragments upstream and downstream of the SMU.863 gene	This work
pKD9864	pBSSK-Em <sup>r</sup> containing fragments upstream and downstream of the SMU.864 gene	This work
pKD1106	pBSSK-Em <sup>r</sup> containing fragments upstream and downstream of the <i>mbrA</i> gene	This work
pKD1107	pBSSK-Em <sup>r</sup> 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 <sup>r</sup> 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 <sup>r</sup> gene	This work
pKD1112	pQE80L with the mutant <i>mbrC</i> encoding D <sub>54</sub> N-MbrC	This work
pKD91479	pBSSK-Em <sup>r</sup> containing fragments upstream and downstream of the SMU.1479 gene	This work
pKD91856	pBSSK-Em <sup>r</sup> containing fragments upstream and downstream of the SMU.1856 gene	This work
pSET4s	Replication function of pG+host3 and pUC19, <i>lacZ'</i> Spe <sup>r</sup>	Takamatsu <i>et al.</i> (2001)
pSET4s(D <sub>54</sub> N-MbrC)	pSET4s with the mutant <i>mbrC</i> encoding D <sub>54</sub> N-MbrC	This work

## 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、一晚培養した 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  $\mu$ l 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 $\alpha$  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  $\mu$ l の 2 $\times$ 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 $\times$ 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 °C 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  $\mu$ g/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  $\mu$ l あたり 10~200 ng の鋳型 DNA、5  $\mu$ l の 2 mM dNTPs、3  $\mu$ l の 25 mM 塩化マグネシウム、1.5  $\mu$ l の 10  $\mu$ M の各プライマー、1 Unit の KOD DNA ポリメラーゼ、5  $\mu$ l の 10  $\times$  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  $^{\circ}$ C 2 分、アニーリングをプライマーの熱融解温度から 1  $^{\circ}$ C から 5  $^{\circ}$ C 低い温度で 30 秒、伸長反応を 68  $^{\circ}$ C 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* DH5 $\alpha$  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 $\beta$ -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) を加えて攪拌し、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<sup>r</sup> 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 ( $\Delta mbrA$ ) 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攪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、菌体を破碎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°C、5% CO<sub>2</sub> 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碎した。破碎した菌体を 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% ペルオキシ硫酸アンモニウム (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% ペルオキシ硫酸アンモニウムを含む 375 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.8) 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。ウェスタンブロットリングは Burnette (Burnette, 1981) の方法に従って行った。泳動終了後、ゲルをブロットリングバッファー (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 分を行った。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 (D<sub>54</sub>N; 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 DH5 $\alpha$  に導入した。発現させた組換え D<sub>54</sub>N-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* D<sub>54</sub>N 変異株の作製

変異 *mbrC* (D<sub>54</sub>N) 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 D<sub>54</sub>N-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 (D<sub>54</sub>N-MbrC) と名付けた。次に UA159 に pSET4s (D<sub>54</sub>N-MbrC) を導入した。pSET4s (D<sub>54</sub>N-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°C 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°C 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ケ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* (D<sub>54</sub>N) に置き換え、ベクター由来のスペクチノマイシン耐性遺伝子を失った変異株を KD1113 と名付けた。

## 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  $\mu$ 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 $\mu$ l の Terminator Ready Reaction Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA)、滅菌水を混ぜ、変性 96 $^{\circ}$ C 10秒、アニーリング 50 $^{\circ}$ C 5秒、伸長反応 60  $^{\circ}$ 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<sup>®</sup> System (Qbiogene, Montreal, Canada) を用いた。一晚培養した *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<sup>®</sup> FP120 (Qbiogene, Montreal, Canada) を用いてスピードレベル 6.5 で 40 秒 $\times$ 2 回処理した。次に 170  $\mu$ l クロロホルムを加え、攪拌し、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  $\mu$ l の RNA 液に 4 Unit の DNase、20  $\mu$ l の 10 $\times$ 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 200  $\mu$ l とし、37 $^{\circ}$ C 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  $^{\circ}$ C 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  $\mu$ l となる様に 10 ng の cDNA、10  $\mu$ l の 2 $\times$  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ロールである 16S rRNA の値で標準化した。遺伝子の発現量の変化は  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  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 ([http://www.oralgen.lanl.gov/\\_index.html](http://www.oralgen.lanl.gov/_index.html)) 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 2<sup>nd</sup> 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 1  $\mu$ l の 1 mM DIG-11-ddUTP と 400 Unit のターミナルトランスフェラーゼ、4  $\mu$ l の 25 mM 塩化コバルトと 4  $\mu$ l の 5 $\times$ ラベリングバッファー (1 M 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  $\mu$ l の滅菌水を混ぜ合わせて 20  $\mu$ l となったものを 37 °C 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 20 mM の Hepes (pH 7.6)、1 mM EDTA、10 mM 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  $\mu$ g 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  $312 \text{ J/cm}^2$ ) 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。一晚培養した *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、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  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。一晚培養した *S. mutans* 培養液 300  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{g/ml}$ 、2  $\mu\text{g/ml}$  のバンコマイシンを含む溶液 5  $\mu\text{l}$  もしくは滅菌蒸留水を滴下し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  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	AG <u>AGGATCC</u> CTAAAGCAAGAAAAAATTTAC	This study	Plasmid construction
mbrC-R	AGGA <u>AAGCTT</u> TTTATTTAATTAATACCCTA	This study	
mbrC-UP-F	AGACTCGAGAAAAGCAGGTCCTTAGCAC	This study	
mbrC-UP-R	CGTCACTTTTTATCTTTCAAT	This study	
mbrC-DW-F	GTAAGAGGAGTAGGGTAT	This study	
mbrC-DW-R	AGAGGATCCTGTGTTCCCTTGATCAA	This study	
mbrD-F	AG <u>AGGATCC</u> CATAAGATCTTATTTGAGAG	This study	
mbrD-R	AGGA <u>AAGCTT</u> TTTACCTTCTTTTAGTAACA	This study	
IGR793F	CTTATCTTAGAAGAATAGTGTTTTG	This study	Gel mobility shift
IGR793R	GCTTCTCCTTTTTATCATTATAAC	This study	
d54nf	TTAATTCTGATGAATATTACTTTGCC	This study	Mutagenesis
d54nr	ATCGGGTTTAAATTCTTTAACTTCTTG	This study	
16S RT1	CTTACCAGGTCTTGACATCCCG	Korithoski <i>et al.</i> (2007)	Real-time PCR
16S RT2	ACCCAACATCTCACGACACGAG	Korithoski <i>et al.</i> (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、SMU.1856c 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。

Table 3. List of expressed genes on the microarray\*

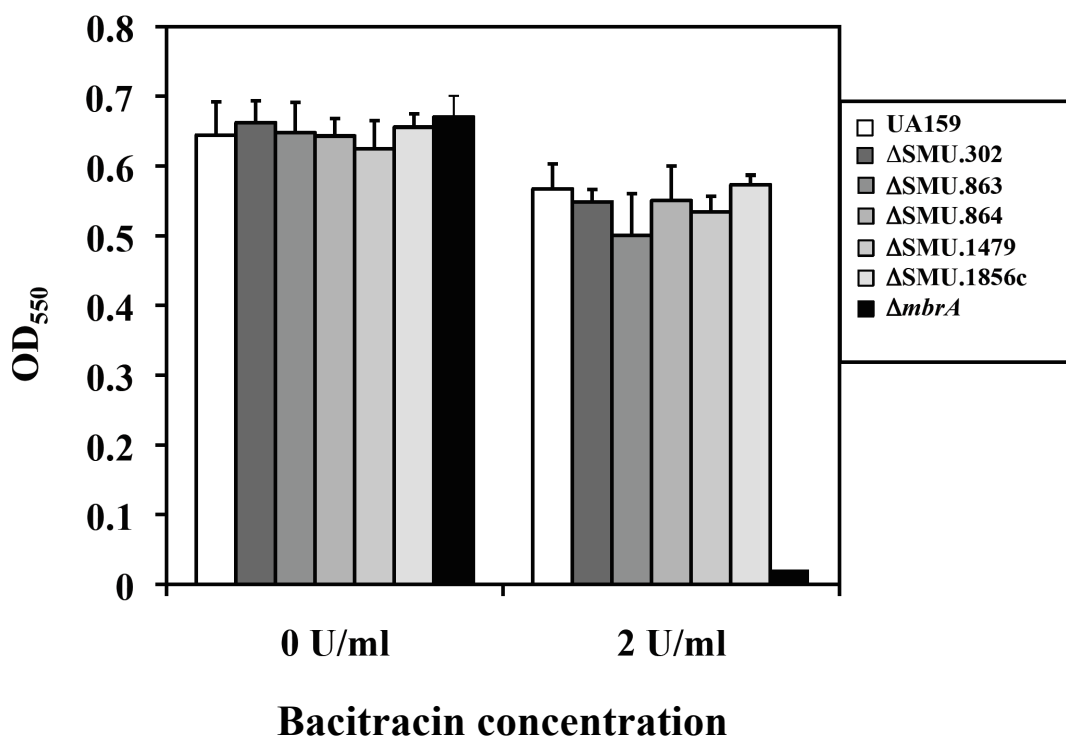
Locus ID	Gene name	Function	Fold change (+bacitracin / -bacitracin)
SMU.302		Conserved hypothetical protein	4.52
SMU.862		Conserved hypothetical protein	7.88
SMU.863		ABC transporter (ATP-binding protein)	8.68
SMU.864		ABC transporter (permease protein)	7.24
SMU.1006	<i>mbrA</i>	ABC transporter (ATP-binding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

\*The highly expressed genes, which show more than four-fold of intensity ratio (+bacitracin / -bacitracin), are listed.



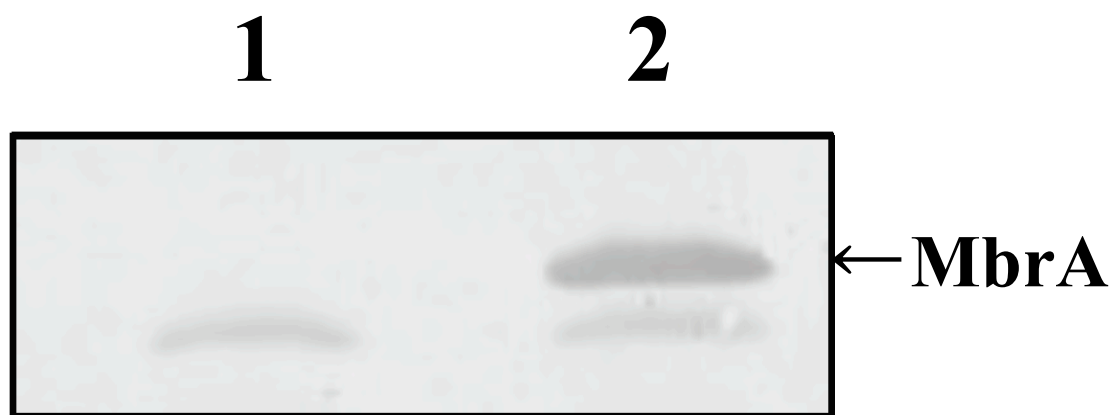
**Fig. 1.** *mbr* 遺伝子クラスター及び隣接する遺伝子

*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。



**Fig. 3. UA159 中の MbrA 蛋白質のウェスタンプロット解析.**

抗 MbrA ペプチド抗体 (1:500 希釈) を用いてウェスタンプ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

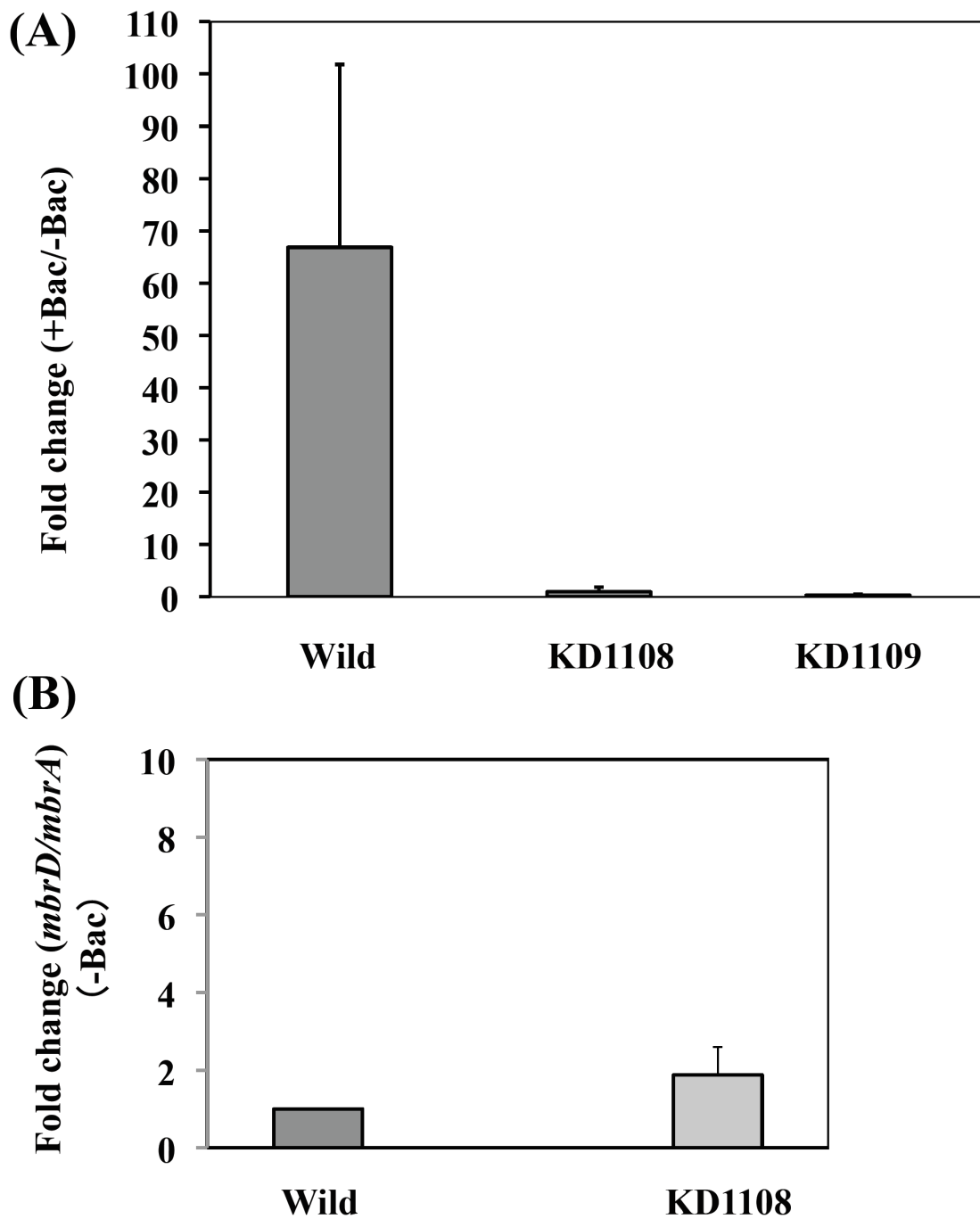
抗 MbrA ペプチド抗体を用いて UA159 の MbrA 蛋白質の発現をウェスタンブロットにより調べた (Fig. 3)。バシトラシン非存在下ではほとんど MbrA の発現は検出できなかったのに対して、バシトラシン存在下では MbrA 蛋白質の発現が見られた。これまで、*S. mutans* の *mbr* 遺伝子群がメッセンジャーレベルでバシトラシンにより誘導されるという報告はあったが、蛋白質発現に関する報告はなく、本研究で、バシトラシンによる MbrA 蛋白質の発現がはじめて確認された。

## 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。

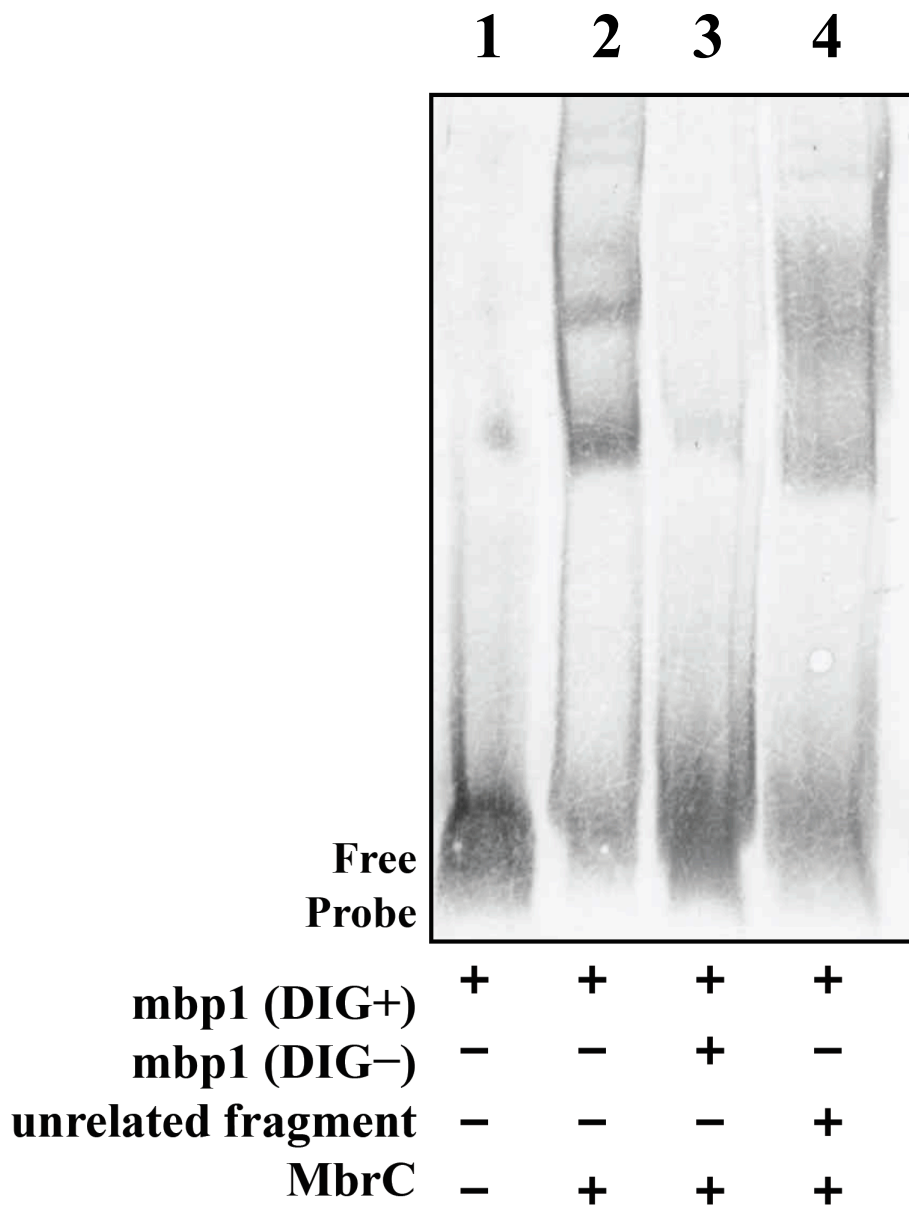
#### 4. MbrC 蛋白質と *mbrA* 発現調節領域間の相互作用の解析

*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分かった。



**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 ( $\Delta mbrC$ ) 及び KD1109 ( $\Delta mbrD$ ) 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。

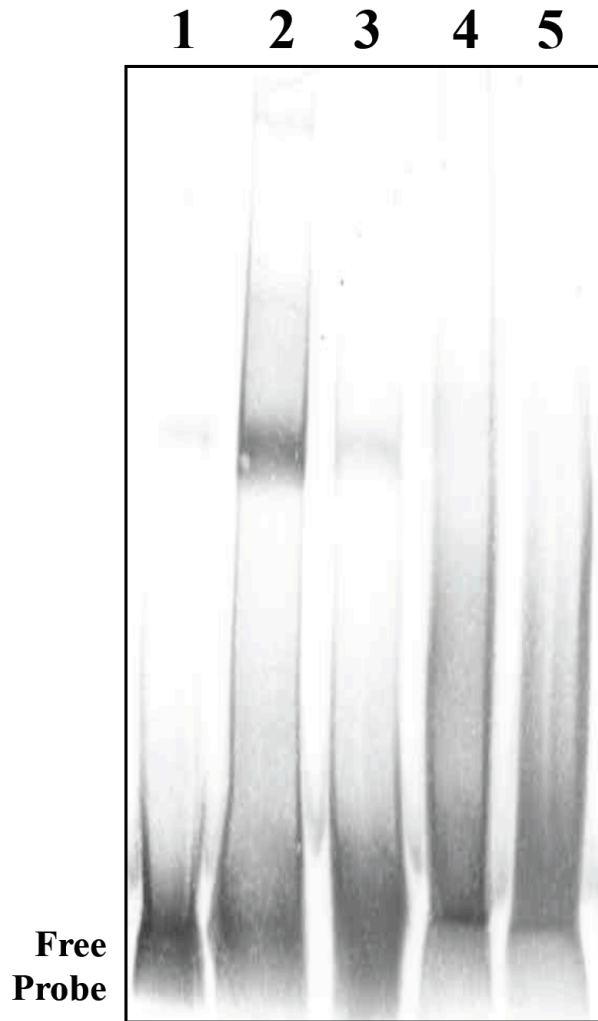
## 5. MbrC のリン酸化部位の検索

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、D<sub>54</sub>N-MbrC と命名した。ゲルシフトアッセイを行ったところ、D<sub>54</sub>N-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* D<sub>54</sub>N 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、バシトラシン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が見られなかった。以上のことから、MbrC は *mbrABCD* 遺伝子群以外にこ

こ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。

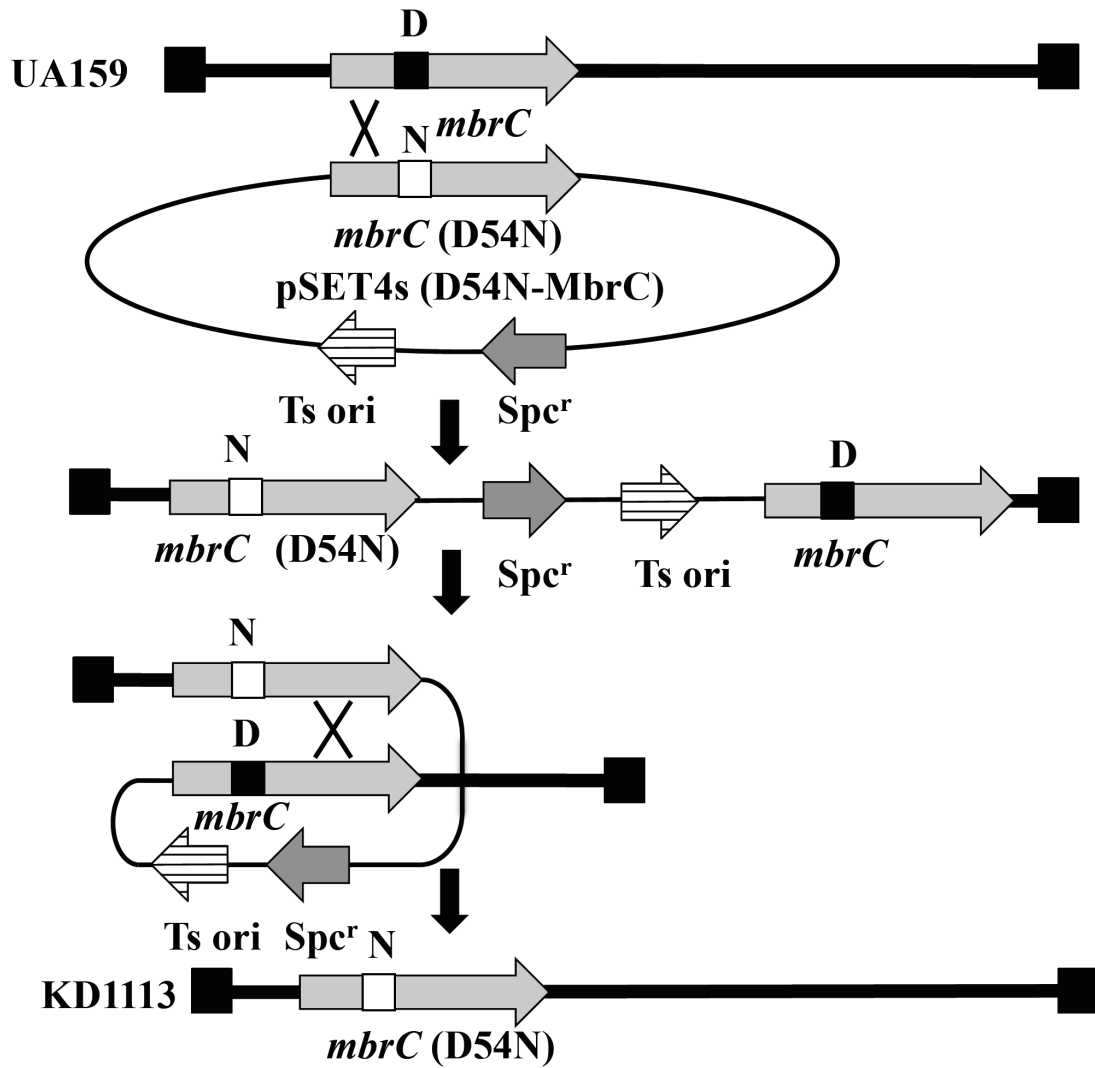




<b>mbp1 (DIG+)</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>MbrC</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>-</b>
<b>D<sub>54</sub>N-MbrC</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>mbp1 (DIG-)</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	<b>+</b>

**Fig. 7. MbrC の D<sub>54</sub>N 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 D<sub>54</sub>N-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。





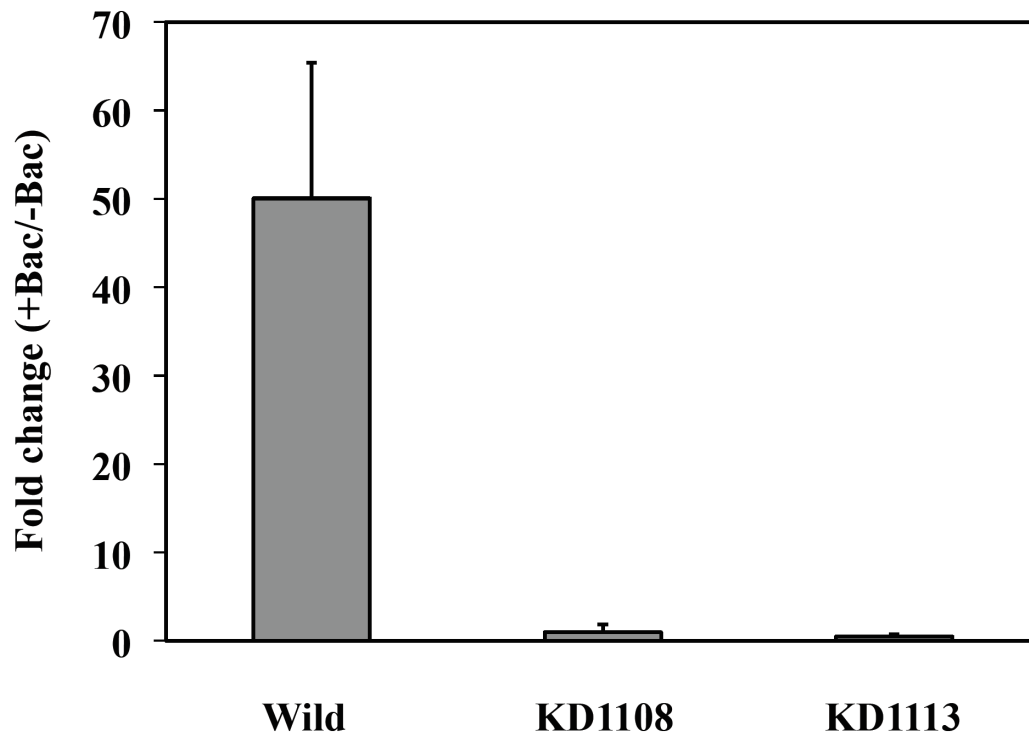
**Fig. 8. 変異株 KD1113 の構築**

UA159 に *pSET4s (D<sub>54</sub>N-MbrC)* を導入し、染色体上の *mbrC* とこのプラスミドの *mbrC (D<sub>54</sub>N)* との相同組み換えにより、スペクチノマイシン耐性 (*Spc<sup>r</sup>*) 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 *Spc<sup>r</sup>* 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<sub>54</sub>N)* に置換されたクローンを得た。

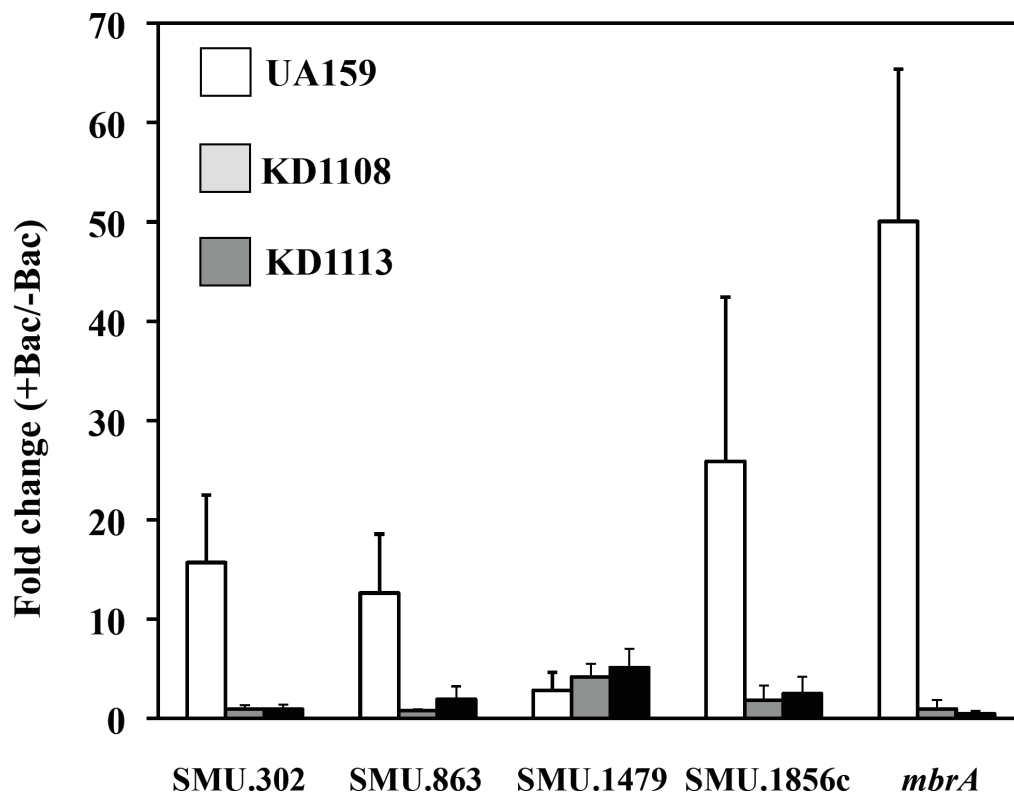
Table 4. Bacitracin MICs of each *S. mutans* strain.

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

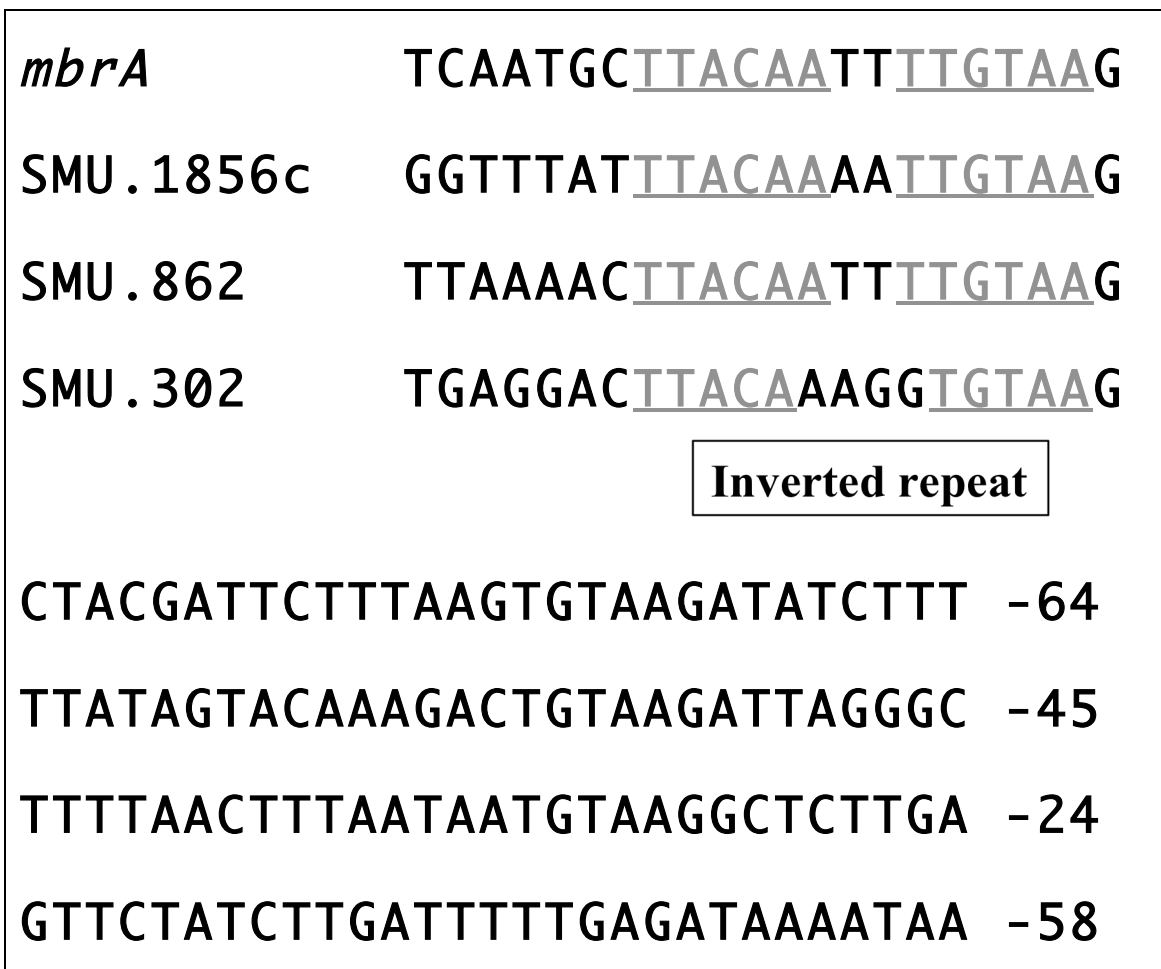
\*Results are expressed in international units per milliliter.



**Fig. 9.** バシトラシン存在下における、KD1113 ( $D_{54}N$ -MbrC)、KD1108 ( $\Delta mbrC$ )  
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 ( $D_{54}N$ -MbrC)、KD1108 ( $\Delta mbrC$ )、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。



**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。

## 考察

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 ( $\Delta mbrC$ )、KD1109 ( $\Delta mbrD$ ) 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* D<sub>54</sub>N 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、 $\alpha$ -ディフェンシン、上皮系の細胞により産生される  $\beta$ -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はいまだに解明されていない。バシトラシンと  $\alpha$ 、 $\beta$  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  $\alpha$ 、 $\beta$  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、犬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

1. *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。
2. 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 (D<sub>54</sub>N-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. D<sub>54</sub>N-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。
8. 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。

## 謝辞

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、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 & Roterling 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 & Uden 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance. *Appl Environ Microbiol* **76**: 5815-5826.