

Streptococcus mutans における細胞外シグナルに応答した
細胞死誘導の解析

2021 年 1 月

永沢 亮

Streptococcus mutans における細胞外シグナルに応答した細胞死誘導の解析

筑波大学大学院
生命環境科学研究科
生物機能科学専攻
博士 (農学) 学位論文

永沢 亮

論文概要	4
第 1 章 序論	6
1-1 バイオフィルム	6
1-2 細胞外 DNA (eDNA)	6
1-3 <i>Streptococcus mutans</i>	7
1-4 <i>S. mutans</i> における細胞間コミュニケーション	8
1-5 本研究の目的	9
第 2 章 方法	10
2-1 菌株及び材料	10
2-2 培養条件	10
2-3 遺伝子欠損株、相補株及びプロモーターレポーター株の作製	10
2-4 マイクロ流体デバイスの作製	11
2-5 2D チャンバー内における細菌の培養及び観察	11
2-6 死菌率の定量	11
2-7 eDNA の定量	12
2-8 蛍光顕微鏡観察	12
2-9 フローサイトメトリーによる <i>lytF</i> 発現細胞の定量	12
2-10 バイオフィルム形成	13
2-11 CLSM 観察と画像解析	13
2-12 バイオフィルムの DNase I 処理	13
2-13 付着細胞量の測定	14
第 3 章 結果	15
3-1 2D チャンバー内における細菌の増殖と eDNA 産生の観察	15
3-2 sCSP 存在下における細胞死誘導と eDNA 産生メカニズムの解析	15
3-3 バイオフィルム内における <i>lytF</i> 発現細胞、死菌、eDNA の局在解析	16
3-4 <i>lytF</i> 発現細胞の局在メカニズムの解析	18
3-5 バイオフィルム内における局在性の意義	19
第 4 章 考察	20
第 5 章 総括	24
参考文献	53
謝辞	58

表目次

表 1	本研究で使用した菌株	25
表 2	本研究で使用したプラスミド	26
表 3	欠損株作製に使用したプライマー	27
表 4	相補株作製に使用したプライマー	29
表 5	プロモーターレポーター株作製に使用したプライマー	30

図目次

図 1	<i>S. mutans</i> の Com system の概略	32
図 2	2D チャンバー内における細菌の増殖と細胞死の観察	33
図 3	2D チャンバー内における細胞死と eDNA 産生の観察	34
図 4	2D チャンバー内における細胞死の観察	35
図 5	フローサイトメトリーによる死菌率の定量	36
図 6	PicoGreen assay による eDNA の定量	37
図 7	<i>lytF</i> 発現細胞と死菌の解析	38
図 8	正立 CLSM による <i>lytF</i> 発現細胞の局在観察	39
図 9	倒立 CLSM による <i>lytF</i> 発現細胞の局在観察 (sCSP 存在下)	40
図 10	倒立 CLSM による <i>cipB</i> 発現細胞の局在観察	41
図 11	倒立 CLSM による <i>lytF</i> 発現細胞の局在観察 (sCSP 非存在下)	42
図 12	倒立 CLSM による死菌及び細胞外核酸の局在観察	43
図 13	バイオフィームにおける細胞死及び eDNA 産生に対する <i>lytF</i> の影響の解析	44
図 14	浮遊菌とバイオフィーム細菌の <i>lytF</i> 発現細胞比較	45
図 15	バイオフィーム内三次元構造が <i>lytF</i> 発現細胞の局在に与える影響の解析	46
図 16	唾液コート表面バイオフィームにおける <i>lytF</i> 発現細胞の局在観察	47
図 17	バイオフィーム内における <i>lytF</i> 発現細胞局在の画像解析	48
図 18	AI-2 を介した QS が <i>lytF</i> 発現細胞の局在に与える影響の解析	49
図 19	DNase I によるバイオフィーム形成阻害の定量	50
図 20	形成済みバイオフィームに対する DNase I の効果	51
図 21	細胞の付着性の比較解析	52

本論文は下記の文献で発表されている。

Ryo Nagasawa, Tatsuya Yamamoto, Andrew S. Utada, Nobuhiko Nomura, Nozomu Obana. Competence-Stimulating-Peptide-Dependent Localized Cell Death and Extracellular DNA Production in *Streptococcus mutans* Biofilms. Applied and Environmental Microbiology. 86(23):e02080-20. doi: 10.1128/AEM.02080-20.

論文概要

自然環境中において、細菌は物質表面に付着したバイオフィームと呼ばれる集団を形成して生活している。バイオフィームは微生物と微生物が産生する細胞外マトリクスから成る構造体であり、バイオフィーム状態の細胞は物理的ストレスや薬剤に対する抵抗性が増大することから、病原性細菌によるバイオフィーム形成は感染症の難治化の要因として問題視されている。細胞外マトリクスの構成要素の一つである細胞外 DNA (eDNA) は主として、溶菌した細胞から遊離したゲノム DNA であると考えられ、バイオフィームの形成と構造安定性に寄与するとされる。つまり、細菌は集団中の一部の細胞を犠牲にして安定なバイオフィームを形成すると考えられる。本研究では、バイオフィーム感染症のモデルとして主要な歯周病原細菌 *Streptococcus mutans* を対象にバイオフィーム内における細胞死誘導及び eDNA 産生の解析を行い、eDNA を標的としたバイオフィーム制御につながる細菌の集団的挙動の理解を目指した。*S. mutans* は、自身が産生し、細胞外に分泌するペプチド性シグナル competence-stimulating peptide (CSP) を介した細胞間コミュニケーションによって、集団中の一部の細菌の細胞死を誘導することが明らかになっている。しかし、細胞死の過程を直接観察した例はなく、どのようにして eDNA が放出されるのかは不明である。また、バイオフィーム内における eDNA の局在についても明らかになっていない。

本研究ではまず、増殖過程の細菌集団の一部で起きる細胞死及び eDNA 産生を一細胞レベルで観察するため、チャンバー内で二次元的に増殖する細胞の一細胞レベルタイムラプス観察を行った。細胞外の核酸は蛍光試薬 SYTOX Green を用いることで可視化し、合成 CSP (sCSP) 存在下において死菌から eDNA が遊離する過程を直接的に観察することに成功した。eDNA の遊離は、sCSP 存在下でのみ観察されたことから、CSP 依存的な現象であると考えられた。*S. mutans* は CSP に応答して、集団中の一部の細菌でオートリシンをコードする *lytF* の発現を誘導することが明らかになっている。そこで、*lytF* 欠損株を作製し、sCSP 存在下における死菌率と eDNA 量を定量したところ、どちらも野生株と比較して有意に減少した。よって、eDNA は *lytF* 発現を介した細胞死誘導の結果として産生されることが示された。また、フローサイトメトリ解析や蛍光顕微鏡観察の結果から、*lytF* を発現した細胞は生細胞と死細胞に分かれることが明らかになった。

次に、*lytF* 発現細胞のバイオフィーム内局在を明らかにするため、*lytF* プロモーターレポーター株を用いて、共焦点レーザー顕微鏡によるバイオフィームの 3D イメージングを行ったところ、*lytF* 発現細胞はバイオフィーム内の底部に多いことが示された。また、*lytF* 発現細胞の局在と一致して、死菌及び細胞外核酸もバイオフィーム底部に局在した。さらに、バイオフィーム内の死菌及び細胞外核酸は *lytF* 欠損株において減少し、*lytF* の相補株において回復した。これらのことから、バイオフィーム底部において *lytF* 発現を介した細胞死、eDNA 産生が高頻度で起きることが示された。*lytF* 発現細胞のバイオフィーム内局在がどのようなメカニズムで生じるのかを調べるために、薄く平坦なバイオフィームを形成し、バイオフィーム上部と底部の環境の差異が小さいと予測される *gtfB* 欠損株のバイオフィームを

解析したが、*lytF* 発現細胞は野生株と同様に底面部に多く観られた。従って、バイオフィルム上部と底部の環境不均一性よりも、細胞と物質表面との相互作用が *lytF* 発現に影響すると予測された。

lytF 発現の局在化の集団形成における意義は、細胞のポリスチレン表面への付着性を比較することによって評価した。sCSP 存在下で培養した野生株、*lytF* 欠損株、*lytF* 相補株の well plate 底面への付着性を比較したところ、*lytF* 欠損株は付着性が有意に低下することが示された。よって、*lytF* 発現及び eDNA 産生のバイオフィルム内局在は、バイオフィルム細胞の物質表面への接着性の増大に寄与していると考えられた。

以上のことから、*S. mutans* は sCSP に応答した *lytF* 依存性の細胞死及び eDNA 産生をバイオフィルム底部で誘導することで安定な集団を形成すると考えられた。eDNA 産生は、集団中の一部の細菌を犠牲にする必要があるため、過剰な誘導は種の生残の観点から不利に働くと予測される。*S. mutans* は、*lytF* 発現をバイオフィルム底部の限られた範囲でのみ誘導することにより、必要な場所で必要な量の eDNA を産生すると考えられる。また、CSP は eDNA 産生だけでなくバクテリオシン産生や外来 DNA の取り込み能も誘導することを考慮すると、バイオフィルム底部では生態的ニッチをめぐる他菌種との競合や種間での DNA の授受が起きことが推察された。

第1章 序論

1-1 バイオフィルム

自然環境において多くの細菌はバイオフィルムと呼ばれる三次元構造体を形成し、集団として棲息している。バイオフィルムは固相表面に付着した微生物と微生物が産生する細胞外マトリクスからなる複合体と定義される。バイオフィルムを形成した状態の細菌は、遺伝的に同一な細菌であっても浮遊状態とは異なる特性を示すことが明らかになっており、ヒト感染症の原因細菌である *Streptococcus pneumonia*、*Haemophilus influenza*、*Staphylococcus aureus* などでは、浮遊状態のときと比較してバイオフィルム状態では抗生物質に対する高い抵抗性を示すことが明らかになっている (1)。また、バイオフィルム状態の細菌は宿主の免疫系から逃避できることも示され、医療分野では細菌性感染症の難治化の要因として問題視されている (2)。

ヒトの身体に形成されるバイオフィルムの一つとして口腔バイオフィルムが知られている。口腔内には 700 種以上の細菌が存在し、互いに影響を及ぼし合いながら常在細菌叢を形づくっている。通常、常在細菌は外来の病原性細菌の定着を阻止するバリア機構としてヒトの健康維持に貢献している (3)。しかし、口腔環境の変化によって適切なバランスが崩れるとう蝕や歯周病といったバイオフィルム感染症が引き起こされる (4)。実際に、う蝕原性バイオフィルムには、*mutans streptococci* のような酸産生能、酸抵抗性が高い細菌が多いことが示されている (5,6)。こうした感染症の予防と制御のため、バイオフィルムの形成メカニズムの理解及び、制御が必要とされている。

近年、アイソジェニック (遺伝的に同質) な集団であっても、遺伝子発現の揺らぎや個々の細胞を取り巻く微小環境の違いなどによって、個々の細胞が異なる挙動を示すことが明らかになっている。遺伝子発現のノイズは遺伝子ごとに異なり、必須遺伝子では不均一性が小さく、ストレス応答や糖代謝に関わる遺伝子では不均一性が大きい傾向にある (7)。また、大腸菌や *Streptococcus mutans* ではラクトース代謝に関わる遺伝子群が二峰性の発現パターンを示す (8,9)。こうした遺伝子発現の不均一性は、変動する環境下での種の生存に有利に働くことに加え、集団レベルでの費用対効果の増大をもたらすと考えられている (10)。こうしたことから、細菌集団の解析には一細胞レベルまたは、亜集団レベルでの解析が必要となる。

1-2 細胞外 DNA (eDNA)

eDNA はバイオフィルムの細胞外マトリクスを構成する一つの高分子としてその存在は古くから知られていたが、機能的な役割については 2002 年の Whitchurch CB. et al.による報告まで明らかでなかった (11)。緑膿菌バイオフィルムにおける eDNA の役割が報告されて以降、DNase によるバイオフィルムの形成阻害や脱離誘導がグラム陽性、陰性を問わず様々な細菌種で報告され、現在ではバイオフィルム制御のターゲットの一つとして認識されている (12)。eDNA はバイオフィルム形成初期の物質表面への付着や成熟バイオフィルムの

構造安定性に寄与すると考えられ、熱力学的な解析からも eDNA が物質表面-細胞間の相互作用、細胞同士の接着に重要であることが示されている (13)。

eDNA の最もよく知られた産生メカニズムは溶菌を介した細胞内ゲノム DNA の放出である。溶菌には、集団中の一部の細菌が自らの溶菌を誘導する利他的な細胞死に加え、ある細胞亜集団が別の細胞亜集団を攻撃するメカニズムも存在する (14, 15)。グラム陽性細菌において、これらの eDNA 産生は分泌性のシグナル分子を介した細胞間コミュニケーションや溶原性ファージなどによって調節される。*Enterococcus faecalis* では、quorum sensing によって制御されるプロテアーゼ発現が自己溶菌を介した eDNA 産生に必要であることが示されており (16)、*S. pneumoniae* では、溶原性ファージの活性化による宿主細菌の溶解がバイオフィーム形成を促進することが明らかになっている (17)。このようにして細菌は、一部の細胞を犠牲にすることで産生した eDNA を使ってバイオフィームを形成し、集団として振る舞うことが明らかになってきている。

1-3 *Streptococcus mutans*

グラム陽性通性嫌気性レンサ球菌である *S. mutans* は、ヒトの口腔内に存在する主要な歯原因細菌である。う蝕は歯表面に付着したバイオフィーム内に細菌の代謝産物が蓄積し、pH が低下することで引き起こされる感染症である。*S. mutans* は歯面に付着性の高いバイオフィームを形成することで増殖する。バイオフィーム内は乳酸などの蓄積により酸性環境となるが、低 pH ストレスに対して抵抗性がある *S. mutans* は生存が可能である (18)。また、他のグラム陽性細菌と比較して、多種の糖代謝遺伝子を持っているため、バイオフィーム内での長期生存にも有利である (19)。このように、*S. mutans* の病原性は、バイオフィーム形成能、酸抵抗性、酸産生能に起因し、毒素を産生しないため、実験室内での取り扱いに際しての危険性は低い (20)。また、野生株である UA159 株は 2002 年に全ゲノム配列が解読された後、遺伝子操作の技術開発も進み、バイオフィーム感染症のモデルとして研究が進められている (21-24)。

S. mutans バイオフィームの主要な細胞外マトリクスは、ポリサッカライドと eDNA である。*S. mutans* は 4 つの細胞外ポリサッカライド合成酵素を持ち、その全てがスクロースを基質としてグルカンまたは、フルクタンを合成する (25)。特に、*gtfB* にコードされる GtfI 及び、*gtfC* にコードされる GtfSI によって合成される不溶性グルカンは、*S. mutans* バイオフィームにおいて特徴的な歯面への強固な付着に不可欠である。GtfI と GtfSI は分泌性のタンパク質であり、細胞外でスクロースを基質にしてグルカン合成を行う。GtfI によって合成されるグルカンは細菌の凝集体 (マイクロコロニー) 形成に寄与し、GtfSI によって合成されるグルカンは細菌及びマイクロコロニーの物質表面への結合に寄与することが明らかになっている (26)。

S. mutans のバイオフィーム研究はスクロース存在下におけるグルカン依存のメカニズムが中心的に解析されてきたが、亜致死量の抗菌剤やオリゴ糖の存在下では eDNA 依存性の

バイオフィルムが形成される (27, 28)。 *S. mutans* における主な eDNA 産生メカニズムは、オートリシン発現による自己溶菌であると考えられている (29, 30)。しかしながら、実際に eDNA 産生を観察した例はなく、その産生過程は不明である。オートリシンをコードする遺伝子の一つである *lytF* は、ストレプトコッカス属細菌に保存されている。LytF は、B 群レンサ球菌分泌タンパク質 (Bsp) ドメインとシステイン・ヒスチジン依存性アミドヒドロラーゼ/ペプチダーゼ (CHAP) ドメインを有する (30)。LytF が細胞死を引き起こすことは明らかであるが、バイオフィルム形成にどのように寄与しているかは明らかになっていない。

1-4 *S. mutans* における細胞間コミュニケーション

lytF 発現は、分泌性のペプチドシグナルである competence stimulating-peptide (CSP) と *sigX*-inducing peptide (XIP) を介した Com system によって制御される (図 1)。CSP の前駆体をコードする *comC* の発現は酸性環境や subinhibitory concentration のスペクチノマイシン存在下など、特定のストレス環境下で誘導されることが明らかになり、CSP はストレスに応答して産生される警告分子 (alarmone) であると考えられている (29)。CSP 前駆体は ABC トランスポーターである ComAB によって細胞外へと分泌される。分泌された CSP は 21 アミノ酸から成り、細胞外プロテアーゼ SepM により C 末端の 3 アミノ酸が切断されて活性型 CSP となる (31)。活性型 CSP は二成分制御系 ComDE によって受容され、バクテリオシン産生関連遺伝子等を含む ComE レギュロンの発現が誘導される。ComE レギュロンに含まれ、バクテリオシン mutacin V をコードする遺伝子 *cipB* は、ComE レギュロンの発現に続く、ComRS-SigX system の活性化に必須である (32)。ComE レギュロンには mutacin V (CipB) に対する免疫タンパク質である CipI も含まれている (29)。ComRS-SigX system は *lytF* 発現やコンピテンスに関わる遺伝子を含む SigX レギュロンの発現を誘導する制御系である。XIP の前駆体は *comS* にコードされている。XIP の分泌機構は明らかになっていないが、トランスポーターによる分泌と細胞死を介した細胞外への放出が示唆されている (33, 34)。また、分泌を介さない細胞内シグナリングの存在についても報告されている (35)。細胞外の XIP は oligopeptide permease (Opp) によって細胞内に取り込まれ、細胞内の ComR に結合する。ComR-XIP 複合体は、シグマ因子である SigX の発現を誘導することで SigX レギュロンが発現誘導される。また、ComR-XIP 複合体は *comS* 発現を、SigX は *comR* 発現を誘導するポジティブフィードバックが存在することも明らかになっている (36)。

Com system は、合成 CSP (sCSP) や合成 XIP (sXIP) によっても誘導可能であり、CSP や XIP に対する細胞の応答システムは、合成ペプチドを利用した実験によって明らかにされてきた。*S. mutans* を天然培地で培養したとき、sCSP は Com system を活性化できる一方で、sXIP では活性化しないことが明らかになっている (37, 38)。また、sCSP は ComE レギュロンの発現を unimodal に誘導し、SigX レギュロンの発現を bimodal に誘導する (39)。こうした Com system の解析は浮遊状態の細菌を対象とした研究により明らかになってきており、バイオフィルム中での応答については知見が少ない。2019 年に Wang C. et al. はバイオフィル

ム底面部付近で *comDE* 発現が高いことを示したが、実際に Com system の下流遺伝子が活性化しているかどうかは明らかになっていない (40)。

1-5 本研究の目的

これまでの研究から、*S. mutans* のバイオフィルム形成に eDNA が寄与することは明らかになっている。しかしながら、eDNA がいつ、どこで、どのようにして産生されるかは不明である。本研究では、*S. mutans* の細胞間コミュニケーションを介した細胞死誘導に着目し、顕微鏡観察によるイメージングやフローサイトメトリーによる定量実験から、細菌の集団形成を一細胞レベルで空間的かつ、経時的に解析することを目的とした。はじめに、マイクロ流体デバイスを用いたライブセルイメージングにより eDNA がどのように産生されるかを解析し、続いて、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) による 3D イメージングによりバイオフィルム内における *lytF* 発現及び、eDNA 産生を解析する。

第2章 方法

2-1 菌株及び材料

本研究で用いた菌株を表1に、プラスミドを表2に示した。

2-2 培養条件

S. mutans の固体培地上での培養には Mitis Salivarius agar (MS agar, Difco Laboratories, Detroit, MI) を使用し、37°C、5% CO₂ 条件下で静置培養した。液体培養は 4 ml の Brain Heart Infusion (Difco Laboratories, Detroit, MI) に植菌し、37°C、5% CO₂ 条件下で静置培養した。

2-3 遺伝子欠損株、相補株及びプロモーターレポーター株の作製

遺伝子欠損株、相補株及び、プロモーターレポーター株は、Overlap extension PCR によって調製した DNA fragment を用いたダブルクロスオーバーによって作製した。各 DNA 断片の増幅には Prime STAR Max DNA Polymerase (Takara, Shiga, Japan) を使用した。

遺伝子欠損株は、標的遺伝子座にエリスロマイシン耐性遺伝子 *ermBP* または、スペクチノマイシン耐性遺伝子 *aad9* を挿入することで欠失させた。使用したプライマーは表3に示した。標的遺伝子の上流及び下流の DNA 配列は *S. mutans* UA159 野生株 (WT) のゲノム DNA を鋳型として増幅した。*ermBP* は pJIR418 から、*aad9* は pDL278 からそれぞれ増幅した (41, 42)。PCR 産物は、溶媒を交換するためにエタノール沈殿後、TE buffer に溶いた。3断片を連結させるためにプライマーなしの PCR 反応を行った後、全長を増幅する PCR を行った。調整した DNA 断片は電気泳動で確認した後、形質転換に用いた。

遺伝子相補株は、ネイティブプロモーターから目的遺伝子が発現するよう設計し、ゲノム上の *SMU_437c* (pseudogene) locus に挿入することで作製した。使用したプライマーは表4に示した。*SMU_437c* の上流及び下流の DNA 配列、目的遺伝子のプロモーター配列及び open reading frame は *S. mutans* UA159 WT のゲノム DNA を鋳型として増幅した。薬剤耐性マーカーとして目的遺伝子の下流には、*Bacillus subtilis* TAY3203 から増幅したカナマイシン耐性遺伝子 (*aph3*) を付加した (43)。PCR によって増幅した各 DNA 断片はプライマーなしの PCR 反応により連結させた後、全長を増幅する PCR を行った。調整した DNA 断片は電気泳動で確認した後、形質転換に用いた。

プロモーターレポーター株は、目的遺伝子のプロモーター制御下に蛍光タンパク質をコードする *mScarlet-I* または *mNeonGreen* を導入することで作製した。使用したプライマーは表5に示した。レポーターカセットは、ゲノム上の *SMU_437c* locus または、バイオフィルム形成などの特徴的な表現型に影響を与えない *SMU_1405c* locus に挿入した (44)。*SMU_437c* と *SMU_1405c* の上流及び下流の DNA 配列、目的遺伝子のプロモーター配列は *S. mutans* UA159 WT または、*S. mutans* YN102 のゲノム DNA を鋳型として増幅した (44)。常発現プロモーターレポーターには *ldh* プロモーターを使用した (45)。薬剤耐性マーカーとして目的遺伝子の下流には、*aph3* または、*ermBP* を付加した。PCR によって増幅した各 DNA

断片はプライマーなしの PCR 反応により連結させた後、全長を増幅する PCR を行った。調整した DNA 断片は電気泳動で確認した後、形質転換に用いた。

S. mutans の形質転換には、合成 CSP (sCSP, 18 アミノ酸) を用いた。前培養液を 4 ml の BHI に植え継ぎ、37°C、5% CO₂ 条件下で 3 時間静置培養した。終濃度 1 μ M の sCSP と形質転換のための DNA 断片を 1/10 容加え、37°C、5% CO₂ 条件下で 3 時間静置培養した。形質転換体のセレクションには、10 μ g/ml のエリスロマイシン、200 μ g/ml のスペクチノマイシンまたは、900 μ g/ml のカナマイシンを添加した MS agar 培地を使用した。

2-4 マイクロ流体デバイスの作製

デバイスは Kunoh T. et al. の論文で作製された KMPR (Microchem) の型に polydimethylsiloxane (PDMS) を流し込むことで作製した (46)。PDMS は Sylgard 184 silicone elastomer kit (Dow Chemical Company, Midland, MI) を使用し、基剤と硬化剤を 10:1 の割合で混合した。脱気後、型に流し込み 70°C で 12 時間保温した。硬化した PDMS を型から切り出し、流路チューブをつなげるための穴を開けた。PDMS とカバーガラス (Matsunami, Osaka, Japan) をプラズマクリーナー (Cute, Femto Science, Gyeonggi, South Korea) を用いて 50 W で 20 秒間 O₂ プラズマ処理した後、処理面同士を結合させ 70°C で 12 時間保温した。作製したデバイスはオートクレーブ後、実験に使用した。

2-5 2D チャンバー内における細菌の培養及び観察

S. mutans の前培養液を fresh な 4 ml BHI に optical density at 600 nm (OD₆₀₀) = 0.05 となるよう植菌し、対数増殖期中期まで 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。2D チャンバー内での培養には BHI または BHI に sCSP を 1 μ M 加えた培地 (BHI sCSP) を使用した。死菌と細胞外核酸を可視化するために、培地には 1.25 μ M の SYTOX Green (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を添加した。チャンバー内は予め培地で満たしておき、各チャンバーに付着菌が数菌が入るように植菌した。培地はシリンジポンプを用いて一定の流速 (150 μ l/h) で供給し、37°C で培養した。観察には Axio observer Z1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を使用し、10 分毎に明視野像と蛍光像を取得した。対物レンズは Plan-Apochromat 100 \times /1.46 oil-immersion を用いた。

2-6 死菌率の定量

S. mutans の前培養液を fresh な 4 ml BHI または、BHI sCSP に OD₆₀₀ = 0.05 となるよう植菌し、37°C、5% CO₂ 条件下で 6 時間培養した。培養終了後、1 ml の培養液を 1.5 ml マイクロチューブに移し、終濃度 500 nM の SYTOX Green で 15 分間室温で染色した。フローサイトメトリー解析を行うために、培養液はフィルター濾過した phosphate-buffered saline (PBS) で適宜希釈した。解析には cell sorter (SH800Z, Sony, Tokyo, Japan) を使用した。SYTOX Green は 488 nm のレーザーで励起し、525 \pm 25 and 487.5 LP filters で検出した。10 万イベントのデ

ータを取得し、得られたデータは FlowJo (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) で解析した。ゲーティングは未染色サンプルのデータに基づいて設定した。

2-7 eDNA の定量

S. mutans の前培養液を fresh な 4 ml BHI または、BHI sCSP に $OD_{600} = 0.05$ となるよう植菌し、37°C、5% CO₂ 条件下で 6 時間培養した。培養終了後、1 ml の培養液を 1.5 ml マイクロチューブに移して、4°C、12,000 g で 5 分間遠心分離した。500 μ l の上清を等量の 1% cetyltrimethylammonium bromide (CTAB, 50 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, 1% CTAB) と混和し、65°C で 15 分間インキュベートした。1 ml の phenol-chloroform-isoamyl alcohol (Nippon Gene, Tokyo, Japan) を添加し、ボルテックスで混和した後、4°C、12,000 g で 10 分間遠心分離した。水層を新しいマイクロチューブに移し、1/10 容の 3 M 酢酸ナトリウムと等量の 2-プロパノールを加え、転倒混和した。4°C、12,000 g で 10 分間遠心分離した後、ペレットを 70% エタノールで wash し、TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) に溶いた。eDNA の定量には Quant-iT PicoGreen dsDNA assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) を使用した。蛍光値は、6 時間培養液の OD_{600} で補正した。

2-8 蛍光顕微鏡観察

S. mutans の前培養液を fresh な 4 ml BHI または、BHI sCSP に $OD_{600} = 0.05$ となるよう植菌し、37°C、5% CO₂ 条件下で 6 時間培養した。培養終了後、1 ml の培養液を 1.5 ml マイクロチューブに移して、終濃度 500 nM の SYTOX Green で 15 分間室温で染色した。4°C、12,000 g で 5 分間遠心分離した後、900 μ l の培養液を除き再び懸濁した。観察時に細胞が動くことを防ぐために、シリコンアイソレーター (Sigma-aldrich, St. Louis, MO) を用いて、0.8% アガロース上に乗せた細胞を観察した。観察には、Axio observer Z1 (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) を使用し、対物レンズは Plan-Apochromat 63 \times /1.40 oil-immersion を使用した。

2-9 フローサイトメトリーによる *lytF* 発現細胞の定量

S. mutans の前培養液を fresh な 4 ml BHI または、BHI sCSP に $OD_{600} = 0.05$ となるよう植菌し、37°C、5% CO₂ 条件下で 6 時間培養した。浮遊菌とバイオフィーム細菌の比較では、前培養液を BHI にスクロースを 1% (w/v) 加えた培地 (BHIs) または、BHIs sCSP に $OD_{600} = 0.05$ となるよう植菌し、6 well-plate を用いて 37°C、5% CO₂ 条件下で 6 時間培養した。浮遊菌は培養液から回収した。バイオフィーム細菌は培養液を捨てたのち PBS で 2 回洗浄後、セルスクレーパーを用いて物理的にはがして回収した。細胞懸濁液はフィルター濾過した PBS で適宜希釈して解析に使用した。SYTOX Green 染色による死菌判定を同時に行う際には、1 ml の培養液を 1.5 ml マイクロチューブに移し、終濃度 500 nM の SYTOX Green で 15 分間室温で染色した。解析には cell sorter を使用し、10 万イベント分のデータを取得した。SYTOX Green と mScarlet-I の励起には、それぞれ 488 nm と 561 nm のレーザーを使用し、

検出には、それぞれ 525/±25 and 487.5 LP フィルターと 600/±30 and 561 LP フィルターで検出した。得られたデータは FlowJo を用いて解析した。2D プロットにおけるゲーティングは無染色サンプル及び、単染色サンプルのデータに基づいて設定した。

2-10 バイオフィーム形成

S. mutans の前培養液を BHIs または、BHIs sCSP に $OD_{600}=0.05$ となるよう植菌し、37°C、5% CO₂ 条件下で 6 時間培養した。培養終了後、浮遊細菌を除去するために培養液を取り除き、PBS で 2 回洗浄し、残存したものをバイオフィームとした。

2-11 CLSM 観察と画像解析

正立 CLSM (LSM880, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) での観察には、6-well plate 底面に形成させたバイオフィームを用いた。全菌を検出するために、バイオフィーム細胞を 5 µM の SYTO 59 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) で 30 分間染色した。PBS で 2 回 wash した後、水浸レンズで観察するために PBS を適量添加した。対物レンズは IR-Achroplan 40×/0.8 water-immersion を使用した。mScarlet-I と SYTO 59 の励起には、それぞれ 543 nm と 633 nm のレーザーを使用し、それぞれ 589-624 nm と 642-695 nm の蛍光を検出した。Z-stack は 0.5 µm 間隔で画像取得した。得られた各二次元画像をもとに fiji 及び image J を用いて、各高さにおける mScarlet-I が検出された面積と SYTO 59 が検出された面積をそれぞれ算出し、mScarlet-I 発現細胞の割合 (mScarlet-I/SYTO59 比) を調べた。

倒立 CLSM (LSM780, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) での観察には、ガラスボトムディッシュ底面に形成させたバイオフィームを用いた。P_{ldh} (常発現) レポーター以外は、5 µM の SYTO 59 で 30 分間染色することにより蛍光標識した。経時観察を必要としない解析では、500 nM の SYTOX Green で死菌及び細胞外核酸を染色し、タイムラプス観察時には培地に 1.25 µM の SYTOX Green を添加して培養した。対物レンズは Apochromat 40×/1.1 water-immersion を使用し、Z-stack は 0.5 µm 間隔または、0.55 µm 間隔で画像取得した。SYTOX Green、mNeonGreen、mScarlet-I、SYTO 59 はそれぞれ 488 nm、488 nm、543 nm、633 nm レーザーで励起し、それぞれ 508-543 nm、481-570 nm、589-624 nm、642-695 nm の蛍光を検出した。得られた各二次元画像をもとに fiji 及び image J を用いて、各高さにおける SYTOX Green、mNeonGreen、mScarlet-I、SYTO 59 が検出された面積をそれぞれ算出し、画像解析を行った (47, 48)。

2-12 バイオフィームの DNase I 処理

DNase I によるバイオフィーム形成の阻害効果を調べるために、培地に DNase I を添加した状態で *S. mutans* を培養した。*S. mutans* の前培養液を BHIs または、BHIs sCSP に $OD_{600}=0.05$ となるよう植菌した。DNase I (Roche Diagnostics GmbH, Germany) は、終濃度 50 U/ml で培地に添加し、37°C、5% CO₂ 条件下で 6 時間培養した。培養終了後、浮遊菌を除去する

ために培養液を取り除き、PBS で 2 回洗浄した。バイオフィームはクリスタルバイオレット (CV) を用いて定量した。各 well に 50 μ l の 0.1% (w/v) CV を添加し、室温で 15 分間静置した。染色後、余剰の CV を取り除き、PBS で 2 回洗浄した。100 μ l の 70%エタノールで CV を溶出し、595 nm の吸光度 (A_{595})をプレートリーダー (Varioskan Flash, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) で測定した。

形成済みのバイオフィームに対する DNase I の効果は、上記 2-10 に記した方法で 96-well plate に形成させた 6 時間バイオフィームを材料にして調べた。バイオフィームを形成させた各 well に DNase I のインキュベーションバッファー (40 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 6mM MgCl₂, 1 mM CaCl₂, pH 7.9)と 50 U/ml の DNase I を加え、37°Cで 6 時間インキュベートした。DNase I 溶液を除去した後、上記の CV を用いた定量法により、バイオフィーム量を測定した。

2-13 付着細胞量の測定

S. mutans の前培養液を fresh な 4 ml BHI または、BHI sCSP に $OD_{600} = 0.05$ となるよう植菌し、37°C、5% CO₂ 条件下で 6 時間培養した。100 μ l の培養液を 96-well plate に移し、4°C で 6 時間静置した。付着細胞は、バイオフィーム定量と同様に CV を用いた手法で定量した。 A_{595} は、6 時間培養液の OD_{600} で補正した。

第3章 結果

3-1 2D チャンバー内における細菌の増殖と eDNA 産生の観察

S. mutans において、eDNA は死菌内部のゲノム DNA が細胞外へと遊離することで産生されることが示唆されている (28, 49)。しかし、eDNA 産生過程を直接的に観察した例はない。*S. mutans* は寒天培地上で培養すると立体的なコロニーを形成する。また、死細胞から遊離する eDNA は三次元的に拡散すると予測されるため、eDNA 産生過程を一細胞レベルで解析することは難しい。そこで本研究では、2D チャンバー内で細胞を培養することにより垂直方向への生育を制限し、二次元的に増殖する細胞のタイムラプス観察を試みた。細胞外の核酸は、培地に SYTOX Green を加えることで可視化した。BHI で培養したところ、細菌の増殖と集団中の一部の細菌で起きる細胞死が確認された (図 2)。しかしながら、細胞内の核酸が細胞外へと放出される様子は観察されなかった。そこで、*S. mutans* の細胞死誘導システムの一つである CSP を介した細胞死誘導に着目した。CSP は *S. mutans* 自身が細胞外へと分泌するペプチド性シグナルであり、sCSP を培地に添加することにより応答を誘導することができる。BHI sCSP で細菌を培養し同様の観察を行ったところ、集団中の一部の細胞において、細胞死を表す SYTOX Green の強い蛍光が検出され、その蛍光が次第に細胞外へと拡散していく様子が観察された (図 3)。よって、これまで間接的な実験データから示唆されてきた細胞死を介した eDNA 産生を直接的な観察によって実証することに成功した。また、SYTOX Green によって蛍光標識される細胞の中には、細胞外へと核酸を放出せずに内包したままの細胞も観られた (図 4)。この結果は、細胞内容物を細胞外へと放出しない細胞死の存在を示唆しており、細胞死が必ずしも eDNA 産生に直結しないと考えられた。

sCSP による細胞死誘導と eDNA 産生を定量的に解析するために、死菌率の定量と eDNA の定量を行った。死菌染色剤 SYTOX Green を用いた蛍光標識を指標に死細胞比率をフローサイトメトリーにより定量したところ、sCSP によって細胞死頻度が有意に増加することが示された (図 5)。また、細胞死の増加と一致して、sCSP 存在下で eDNA 産生量も有意に増加することが示された (図 6)。従って、sCSP が集団中の一部の細菌の細胞死と eDNA 産生を誘導することがイメージングと定量的解析の両面から示された。

3-2 sCSP 存在下における細胞死誘導と eDNA 産生メカニズムの解析

CSP は二成分制御系 ComDE によって認識され、*cipB* の発現を介して、下流の ComRS-SigX system の発現を誘導する。そこで、Com system 遺伝子の各種欠損株を作製し、死菌率と eDNA 産生量を WT 株と比較した。sCSP 存在下における細胞死誘導と eDNA 産生は $\Delta comDE$ 、 $\Delta cipB$ 、 $\Delta comR$ 、 $\Delta comS$ 、 $\Delta sigX$ において完全に消失した (図 5, 6)。このことから、sCSP に応答した細胞死誘導と eDNA 産生には SigX レギュロンの遺伝子が必要であることが示された。SigX レギュロンにはオートリシンをコードする *lytF* が含まれる。*lytF* 欠損株 ($\Delta lytF$) を作製し、細胞死誘導と eDNA 産生を定量したところ、WT 株と比較して有意に減少した (図 5, 6)。また、*lytF* 遺伝子をゲノム上の別の遺伝子座に相補したところ、細胞死誘

導と eDNA 産生は回復した (図 5, 6)。この結果から、sCSP 存在下における細胞死誘導と eDNA 産生は主に *lytF* に依存していることが示された。

天然培地で *S. mutans* を培養したとき、過剰量の sCSP が存在しても *lytF* 発現は集団中の一部の細菌でのみ誘導される (39)。また、*S. mutans* の LytF は、発現した細胞自身が細胞死を起こす self-acting 型のオートリシンであることが示唆されている (49)。そこで、細胞死が *lytF* 発現細胞で起きているのかどうかを *lytF* プロモーター (P_{lytF}) レポーター株を用いて調べた。sCSP 存在下で培養した P_{lytF} レポーター株を SYTOX Green で染色し、蛍光顕微鏡観察を行ったところ、*lytF* 発現細胞中の一部の細菌が細胞死を起こしていることが明らかになった (図 7A)。また、フローサイトメトリーによる定量解析から、集団中の約半数の細胞が *lytF* を発現しており、*lytF* 発現細胞中の約 1/5 が死菌であることが示された (図 7B)。従って、*lytF* は発現した細胞自身が細胞死を起こす self-acting 型のオートリシンであることが強く示唆された。また、*lytF* 発現細胞のうち約 4/5 は生菌であったことから、*lytF* を発現した細胞は生残菌と死菌に分かれると考えられた。

3-3 バイオフィーム内における *lytF* 発現細胞、死菌、eDNA の局在解析

バイオフィーム内における遺伝子発現の空間的不均一性が細菌の集団的挙動を可能にすることが明らかになりつつある。*S. mutans* は口腔内において、バイオフィームを形成した状態で存在する。そのため、バイオフィーム内部における現象を理解することが重要である。そこで、CLSM を用いた 3D イメージングによるバイオフィーム内の局在解析を行った。*S. mutans* はスクロースを基質に細胞外ポリサッカライドを合成することでバイオフィームを形成する。本研究では、1% (w/v) スクロースを培地に加えることで、バイオフィーム形成を誘導した。*lytF* 発現細胞を観察するために、 P_{lytF} レポーター株を使用し、6-well plate の底面にバイオフィームを形成させた。SYTO 59 を用いて全菌を蛍光標識し、正立 CLSM でバイオフィームを観察したところ、sCSP 存在下において集団中の一部の細菌で *lytF* 発現が誘導されることが確認された (図 8A)。sCSP 非存在下において形成されたバイオフィーム内において *lytF* 発現細胞が観察されたが、その数は少なかった (図 8B)。*lytF* 発現細胞の局在を詳しく解析するために、image J 及び Fiji を使用して各 2D イメージにおける mScarlet-I (*lytF* 発現細胞)と SYTO 59 (全菌)のシグナルが検出された面積を算出した。mScarlet-I 検出面積と SYTO 59 検出面積の比から、バイオフィームの各高さにおける *lytF* 発現細胞の割合を調べたところ、sCSP 存在下で形成されたバイオフィームでは底面部付近に *lytF* 発現細胞が多いことが示された (図 8C)。一方で、sCSP 非存在下では *lytF* 発現細胞の高さによる特徴的な分布は観られなかった (図 8D)。

正立顕微鏡による観察では、バイオフィーム底面部付近に励起レーザーが届きにくく、底面部付近の詳細な観察が難しいため、以降の解析では、倒立 CLSM を使用した。倒立 CLSM 解析では、ガラスボトムディッシュ底面に形成されたバイオフィームを観察した。*lytF* 発現細胞と併せて、全菌を染色剤による蛍光標識なしで観察するために P_{lytF} reporter 株に常発現

プロモーター (P_{ldh}) reporter (mNeonGreen)を導入した P_{ldh} & P_{lytF} dual reporter 株を用いて解析を行った。BHIs sCSP 培地において3時間培養したところ、30 μm から 40 μm 程度の厚さのバイオフィルムが観察されたが、 $lytF$ 発現細胞は少なく、目立った局在性も観られなかった (図 9AB)。培養6時間では、3時間のときと比べて、密なバイオフィルムとなり、 $lytF$ 発現細胞が検出され始めた (図 9A)。画像解析により各高さにおける $lytF$ 発現細胞の比率を算出したところ、正立顕微鏡での観察結果と一致して、バイオフィルムの底面部付近に $lytF$ 発現細胞が多いことが示された (図 9B)。培養9時間では細菌の増殖が進み、より密なバイオフィルムが観察されたが (図 9A)、 $lytF$ 発現細胞が多く観られるエリアはバイオフィルム底面部付近に留まった (図 9B)。これらの実験では、バイオフィルム内の全ての細胞が sCSP を受容できているかどうかは不明である。そこで、CSP シグナルの受容をレポートできる P_{cipB} reporter 株を用いた解析を行った。sCSP 存在下で P_{cipB} reporter 株を培養し、形成されたバイオフィルムを倒立 CLSM で観察したところ、ほぼ全ての細胞が sCSP を受容していることが確認された (図 10AB)。従って、sCSP 存在下で培養したとき、バイオフィルム中のほぼ全て細胞が sCSP を感知しているにもかかわらず、 $lytF$ 発現は底面部の限られた範囲の細胞でのみ誘導されることが明らかになった。さらに、sCSP 非存在下でも同様の観察を行ったところ、培養6時間及び9時間のバイオフィルム底面部において、 $lytF$ 発現細胞の存在が確認されたことから、sCSP の外部添加なしでもバイオフィルム底面部付近で $lytF$ 発現が誘導されることが示された (図 11)。

$lytF$ 発現細胞がバイオフィルム底面部付近に多いことが示されたので、死菌及び eDNA の局在も一致するかどうかを調べた。培地に SYTOX Green を添加することで死菌及び細胞外核酸を可視化し、ガラスボトムディッシュ底面に形成されるバイオフィルムを経時的に観察したところ、sCSP 存在下において死菌及び細胞外核酸はバイオフィルム底面部に多いことが明らかになった (図 12A)。また、sCSP 非存在下でもバイオフィルム底面部付近に死菌及び eDNA が観察された (図 12B)。このことから、バイオフィルム内部における死菌及び細胞外核酸の局在は $lytF$ 発現細胞の局在と一致することが示された。

バイオフィルム内部における $lytF$ 発現細胞、死菌、eDNA の局在の一致が確認されたが、バイオフィルム底面部における細胞死誘導と eDNA 産生が実際に $lytF$ を介したメカニズムで誘導されているのかは明らかでない。そこで、 $lytF$ 欠損株 ($\Delta lytF P_{ldh}$ reporter)と $lytF$ 相補株 ($lytF$ comp. P_{ldh} reporter)を作製し、バイオフィルムの観察と画像解析を行った。sCSP 存在下で6時間培養して形成されたバイオフィルムを観察したところ、 $lytF$ の欠損によって死菌と細胞外核酸が減少し、 $lytF$ の相補によって回復することが明らかになった (図 13AB)。従って、バイオフィルム底面部における細胞死と eDNA 産生は、 $lytF$ 発現を介したメカニズムで誘導されることが示された。

3-4 *lytF* 発現細胞の局在メカニズムの解析

バイオフィーム内における *lytF* 発現細胞の局在が明らかになったが、どのようなメカニズムで局在性が生まれるのかは不明である。そこで本研究ではメカニズムの解明に向け、まず初めに浮遊状態とバイオフィーム状態で *lytF* 発現細胞の割合に変化があるかどうかを調べた。sCSP 存在下において P_{lytF} reporter 株を培養し、バイオフィームを形成させ、同じ培養区画内の浮遊菌とバイオフィーム細菌をそれぞれ回収した。フローサイトメトリーにより *lytF* 発現細胞の割合を調べたところ、バイオフィーム細胞において *lytF* 発現細胞が多いことが示された (図 14)。この結果から、バイオフィーム内特有の環境が *lytF* 発現に寄与していると予測された。

バイオフィームは三次元構造体であるため、その内部は酸素濃度や pH 等の勾配が生じる。特に、バイオフィームの底面部付近は代謝産物が蓄積していることに加え、栄養源へのアクセスは良くないと考えられる。そこで、三次元構造に由来する環境不均一性が *lytF* 発現に影響すると予測し、その仮説を検証することとした。*S. mutans* は、多数のマикроコロニーから構成される分厚いバイオフィームを形成する。一方で、細胞外ポリサッカライド合成酵素をコードする *gtfB* の欠損株 ($\Delta gtfB$) はマクロコロニーを形成できないため、薄く平坦なバイオフィームを形成する (26)。薄く平坦なバイオフィームでは上部と底部の環境の勾配が少ないと考えられるため、仮説が正しければ、 $\Delta gtfB$ 株が形成するバイオフィームにおいて、*lytF* 発現細胞の割合や局在性に変化があると予測される。まず、*gtfB* の欠損が *lytF* 発現に影響を与えないことをフローサイトメトリーにより確認した (図 15A)。次に P_{lytF} reporter 株が形成したバイオフィームと $\Delta gtfB$ P_{lytF} reporter 株が形成したバイオフィームを CLSM で観察した。 $\Delta gtfB$ は Xiao J. et al. の報告と一致して (26)、薄く平坦なバイオフィームを形成したが、*lytF* 発現細胞は依然として底面部付近に多く観られた (図 15B)。画像解析によって、ガラス表面から 5 μ m の範囲に存在する細胞の中の *lytF* 発現細胞の割合を算出したところ、WT 株と $\Delta gtfB$ 株で有意な差がなかった (WT 株, $80.62 \pm 8.35\%$; $\Delta gtfB$ 株, $79.2 \pm 1.28\%$)。従って、バイオフィームの三次元構造由来の内部環境の不均一性は *lytF* 発現に影響しないと考えられた。

バイオフィームの三次元構造が *lytF* 発現に影響しなかったことから、細胞と物質表面と相互作用が *lytF* 発現に影響している可能性を考えた。しかしながら、*S. mutans* の表面認識メカニズムは明らかになっていない。そこで、表面の性質が *lytF* 発現細胞の局在に影響するかどうかを検証した。図 8A と図 9A の結果から、ポリスチレン表面とガラス表面で *lytF* 発現細胞のバイオフィーム内局在に違いがないことが既に明らかである。*S. mutans* を用いた研究では、無菌唾液をコートしたガラス表面のバイオフィームを解析することがある。そこで、唾液コートしたガラス表面上のバイオフィームを観察したところ、唾液コート表面でも *lytF* 発現細胞は底面部付近に多く観られた (図 16)。唾液コートなしのときの顕微鏡画像 (図 15B) と唾液コートしたときの顕微鏡画像 (図 16) を使用した画像解析の結果からも唾液コートの有無が *lytF* 発現細胞の局在に影響しないことが示された (図 17)。従って、*lytF* 発

現細胞のバイオフィーム内局在に表面の性質が影響する可能性は低いと考えられた。

2019 年に Wang C. et al. は *S. mutans* を用いた研究において、物質表面への付着が遺伝子発現の変化をもたらすことを報告した (40)。この遺伝子発現の変化は、表面に直接接触した細胞だけでなく、付着細胞に隣接する細胞でも起こる。表面に付着した細胞と隣接する細胞との間のシグナル伝達は、autoinducer-2 (AI-2) による quorum sensing によって媒介されることが示されている。そこで、AI-2 を産生しない $\Delta luxS$ 株を作製し、*lytF* 発現細胞のバイオフィーム内局在を調べることにした。*luxS* 欠損を P_{lytF} reporter 株に導入しバイオフィームを解析したが、*lytF* 発現細胞の分布は WT 株のときと比較して変化はなく、底面部付近に多く観察された (図 17, 18)。従って、AI-2 を介した quorum sensing もバイオフィーム内における *lytF* 発現細胞の局在を生み出す要因ではないと考えられた。

3-5 バイオフィーム内における局在性の意義

eDNA は細菌の物質表面への付着に寄与し、DNase I による eDNA の分解はバイオフィーム形成を阻害することが多くの細菌種で示されている (12)。sCSP 存在下におけるバイオフィーム形成も培養開始前に培地に DNase I を添加しておくことで有意に低下した (図 19)。一方で、予め形成されたバイオフィームに対する DNase I 処理は、バイオフィーム量を減少させなかった (図 20A)。この原因として、分厚く成長した成熟バイオフィームでは、不溶性グルカンを主成分とする細胞外マトリクスが、底部の eDNA を DNase I による攻撃から保護していることを考えた。この可能性を検証するために、予め形成されたバイオフィームを DNase I で処理し、バイオフィーム内の死細胞および細胞外核酸を CLSM で観察したところ、バイオフィーム内の SYTOX Green シグナルは減少した (図 20BC)。このことから、*S. mutans* 成熟バイオフィームの構造安定性には eDNA が必ずしも必要ではなく、eDNA はバイオフィーム形成の初期段階に必要であると考えられた。

次に、バイオフィーム底部における *lytF* 発現が、物質表面への付着性に貢献しているかどうかを検証した。細菌の物質表面への接着性を比較するために、予め BHI または、BHI sCSP で培養した WT 株、 $\Delta lytF$ 株、*lytF* 相補株を 96-well plate に移し、付着細胞量を定量した。WT 株及び *lytF* 相補株は、sCSP によって付着細胞量が有意に増加したのに対して、 $\Delta lytF$ 株では有意な増加は認められなかった (図 21)。このことから、sCSP によって誘導される *lytF* 発現がバイオフィーム形成の初期段階における物質表面への細胞接着に寄与していると考えられた。

第4章 考察

本研究では、2D チャンバーを用いた一細胞レベルタイムラプスイメージングにより eDNA 産生を観察することに成功した。*S. mutans* では、random amplified polymorphic DNA 法によるゲノム DNA と eDNA の比較から、eDNA は死細胞から遊離したゲノム DNA であることが示唆されてきたが (28)、eDNA 産生を観察した例はなかった。直接的な観察が可能になり、eDNA が集団中の一部の細菌で起きる細胞死によって供給されることが実証された点は非常に重要なことである。さらに、SYTOX Green で染色され死菌と判定された細胞の中には細胞外に核酸を放出しない細胞も観られた。この結果から、すべての死菌が eDNA を放出するわけではないと考えられる。哺乳類細胞のピロトーシスでは、細胞死を起こした細胞が必ずしも溶解しないことが示唆されており (50)、細菌においても、細胞死が必ずしも eDNA 産生に直結しない可能性がある。*S. mutans* は厚い細胞壁を持っているため、死菌からのゲノム DNA の放出を細胞壁が妨げることが考えられる。

lytF の欠損は、sCSP 存在下における細胞死誘導と eDNA 産生を有意に減少させたが、完全には消失させなかった。この結果は、*lytF* 以外にも細胞死及び eDNA 産生に関わる因子が存在ことを示唆している。CSP により発現誘導される遺伝子は 100 遺伝子程度あり、細胞死に関与する遺伝子は *lytF* の他に、*cipB* が報告されている (29)。*cipB* の欠損は sCSP に応答した細胞死誘導と eDNA 産生を完全に消失させたが、*cipB* 欠損株では SigX レギュロンの発現が不可能になる (32)。従って、*cipB* 欠損による細胞死及び eDNA 産生の消失は *cipB* 遺伝子単独の影響ではなく、下流の遺伝子群による影響が大きいと思われる。実際に *comS*、*comR*、*sigX* のいずれかを欠損させると、sCSP に応答した細胞死と eDNA 産生が完全に消失したことから SigX レギュロンの遺伝子群が細胞死と eDNA 産生に重要であり、SigX レギュロンに *LytF* とは別の細胞死関連因子が存在することが考えられる。

フローサイトメトリー解析により、*lytF* 発現細胞の一部で細胞死が起こることが明らかになった。この結果は、*S. mutans* の *lytF* が self-acting 型オートリシンをコードしているという考えを強く支持するものである (49)。CSP を介した細胞間コミュニケーションはストレプトコッカス属細菌に保存されており、いくつかのコンピテンス関連オートリシンが報告されている (51–55)。*S. pneumoniae* では、コンピテントセルが分泌する CbpD が非コンピテントセルを攻撃し溶菌させる (14, 15)。溶菌した細胞からは DNA が遊離するため、コンピテントセルは新たな遺伝子を獲得しやすくなると予測されている (56)。*S. mutans* のように CbpD を持たないストレプトコッカス属細菌は、*lytF* 遺伝子を持っている (57)。しかし、*S. mutans* の *LytF* は CbpD と異なり、発現した細胞自身に作用するようである。また、*Streptococcus sanguinis* も *S. mutans* と同様に Bsp ドメインと CHAP ドメインからなる *LytF* を持っているが、*S. sanguinis* の *LytF* タンパク質一分子の Bsp ドメインの数は、*S. mutans* の *LytF* タンパク質一分子に含まれる数とは異なっている。また、*S. sanguinis* の *LytF* は自身のペプチドグリカンだけでなく、*Streptococcus gordonii* や *S. mutans* のペプチドグリカンも分解可能であることから、*LytF* が他菌種を溶菌させ、eDNA 産生を誘導することが考えられてい

る (54)。以上のことから、コンピテンスに関連するオートリシンの生理学的役割は種によって異なる可能性がある。

S. mutans において、集団中の一部の細胞で *lytF* が発現することは明らかになっていたが、*lytF* 発現細胞が生残菌と死菌に分かれることは本研究で初めて示された。これは、*lytF* 発現細胞の生死を決定する他の因子の存在を示唆している。LytF の活性に影響を及ぼす因子はこれまでに報告がないが、*lytF* の mRNA は安定性が低い、もしくは、プロセッシングを受ける可能性が指摘されている (58)。よって、LytF は転写後に何らかの制御を受ける可能性がある。

lytF は細胞の物質表面への付着に重要であることが示され、*lytF* 発現細胞と eDNA はバイオフィルムの底部付近に多いことが明らかになった。これらの結果から、*lytF* 発現とそれによる eDNA 産生の局在は、バイオフィルムの物質表面への接着に貢献していると考えられた。sCSP 存在下で形成されたバイオフィルム内部の *lytF* 発現細胞は時間経過に伴って増加したが、その存在範囲は底面部付近の一定の範囲内に留まっていた。*lytF* 発現細胞の一部は細胞死を起こすため、多くの細胞で *lytF* を発現すると過剰な細胞死を誘導し、生存戦略上不利に働く可能性がある。そのため、バイオフィルム底面部付近に限定した *lytF* 発現の誘導は、細胞死による犠牲と生残菌によるバイオフィルム形成のバランスを保つために重要であると思われる。実際に *S. sanguinis* では、*lytF* の過剰発現がバイオフィルム形成の低下をもたらすことが示されていることから (54)、バイオフィルム内における *lytF* 発現の空間的制御が安定なバイオフィルム形成に必要であると推察される。

また、本研究では sCSP の外部添加なしでも、6 時間バイオフィルムにおいて *lytF* 発現細胞が観察された。これまで、CSP に対する細胞の応答機構の研究は、浮遊状態の細菌に対して sCSP を外部添加した条件で進められてきた。本研究で得られた結果は、バイオフィルム内において、sCSP の外部添加なしでも CSP を介した細胞間コミュニケーションが機能していることを示す重要なデータである。*lytF* のプロモーター活性は、ヒートショック、低 pH、酸化ストレスによって増加する (49)。また、CSP の前駆体をコードする *comC* の発現が特定のストレスによって誘導されることが明らかになっている (29)。これらのことから、CSP を介した細胞間コミュニケーションの解析は、バイオフィルムを非破壊的に解析することが重要であると考えられる。

バイオフィルムの深部に位置する細胞は、低 pH、栄養源の制限、代謝物の蓄積などの様々なストレスにさらされる。*S. mutans* バイオフィルム内における pH 勾配の形成には、細胞外ポリサッカライドが必要であることが示されている (59)。このことから、マイクロコロニー形成に必要な不溶性ポリサッカライドを産生できない $\Delta gtfB$ 株が形成する薄いバイオフィルム内は pH 勾配が少ないと予測されるが、*lytF* 発現細胞は WT 株と同様にバイオフィルム底面部に局在した。従って、*lytF* 発現細胞の局在性はバイオフィルムの三次元構造に由来する pH などの化学的勾配よりも物質表面への付着がトリガーになっていると予測された。*S. mutans* がどのようにして物質表面への接着を認識しているのかは明らかでないが、接着

による遺伝子発現変化が報告されている (40)。物質表面に接着した細胞とその細胞に隣接する細胞との間では AI-2 を介したシグナル伝達が起きることによって、バイオフィルムの高さによる遺伝子発現の勾配が生じると考えられている。しかしながら、本研究では、バイオフィルム内における *lytF* 発現の不均一化に AI-2 が影響する可能性は否定された。さらに、ポリスチレン、ガラス、唾液コートガラスといった異なる性質の表面でも、同様の *lytF* 発現細胞の局在が観察されたことから、バイオフィルム内における *lytF* の不均一な発現は、物質表面の性質に依存しないと思われた。細菌細胞と物質表面の物理的な接触が遺伝子発現に影響を与えることは他の細菌種で報告がある (60)。緑膿菌では、アルギン酸生合成に関与する遺伝子である *algC* の発現は、表面付着によって誘導される (61)。*S. aureus* では、表面接着がバイオフィルムマトリクスの生産を制御することが示唆されている (62)。*S. mutans* における表面認識機構の報告はないが、細胞表面の SpaP と GbpC は、歯表面ペリクルの唾液アグルチニンと結合し細胞を歯表面に付着させる (63, 64)。本研究において、唾液コートの有無がバイオフィルム内の *lytF* 発現細胞と eDNA 産生の局在化に影響しないことが示されたので、SpaP および GbpC が媒介する物質表面への付着が局在化のトリガーである可能性は低いと考えられる。また、Wang C. et al. は、基質表面への付着と AI-2 を介した quorum sensing が、バイオフィルム底部付近での *comDE* と *brpA* の発現増加を誘導することを報告している (40)。BrpA は細胞表面ストレスに対する応答に関与しているが、*S. mutans* UA159 と *brpA* 変異株の DNA マイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的比較から、*lytF* を含むほとんどの SigX レギュロン遺伝子の発現に変化がないことが示されている (65)。従って、バイオフィルム内での *lytF* 発現細胞の局在化には表面認識が関与している可能性があるが、その詳細なメカニズムについては今後の研究で明らかにする必要がある。

表面認識に加えて、バイオフィルム底部付近は細菌密度が高く、細菌同士が近接して存在することも *lytF* 発現に影響するかもしれない。*Streptococcus pyogenes* では、分泌性ペプチドシグナルを介した細菌密度依存的な遺伝子発現制御が報告されている (66)。また、*S. pneumoniae* の CSP を介したシグナリングには細胞同士の接触が必要であることも明らかになっている (67)。従って、*S. mutans* バイオフィルム内における細胞密度の不均一性が *lytF* 発現細胞のバイオフィルム内局在に関わる一つの環境因子である可能性も考えられる。

eDNA は *S. mutans* のバイオフィルム形成において、初期段階の付着に寄与すると考えられている (68)。*lytF* 発現細胞の局在と一致して、eDNA もバイオフィルム底面部付近に局在していたことから、eDNA がバイオフィルム形成の初期段階である物質表面への付着に寄与することが強く示唆された。一方で、成熟したバイオフィルムから eDNA を除去してもバイオフィルムの脱離、分解は観られなかった。本研究におけるバイオフィルム形成は、1% スクロースを含む培地で誘導したため、成熟バイオフィルムには多量の不溶性グルカンが含まれると考えられる。これらのことから、バイオフィルム形成の初期段階では、付着に必要な eDNA を局所的に産生することで、細菌の物質表面への付着を促進、増強する一方で、バイオフィルムの成長及び成熟段階では、スクロースを基質にして合成された不溶性グル

カンなどの細胞外ポリサッカライドが構造維持の主要な担い手となると予測される。こうした細胞外マトリクスの産生や合成を時空間的にコントロールすることで、細菌は構造的に安定なバイオフィルムを形成していると考えられる。

第5章 総括

本研究において、細菌集団中の一部の細胞が細胞死を誘導し、eDNA を産生することが実証された。また、一細胞レベルでのタイムラプス観察が可能になったことで、細胞内容物を細胞外へと放出する細胞死と放出しない細胞死の存在が確認された。このことから、真核細胞に様々な様式の細胞死が存在するように、細菌においても複数の細胞死様式が存在すると考えられる。実際に、*S. mutans* UA159 株のゲノムには、推定のもを含めて 10 種類の細胞壁分解酵素が存在する。これら各々の発現制御機構、細胞死の形態的・生理学的特徴、集団形成に与える影響などを明らかにしていくことが今後の課題である。

CSP がバイオフィーム底面部における *lytF* 発現を誘導し、産生された eDNA が物質表面への細菌の接着に寄与していることが示された。本研究では、バイオフィーム内における *lytF* 発現細胞の局在メカニズムを明らかにすることはできなかった。しかし、バイオフィームの三次元構造に由来する上部と底部の環境不均一性よりも、細胞と物質表面との物理的な接触が *lytF* 発現の引き金となる可能性が示唆された。*S. mutans* において、浮遊菌とバイオフィーム細菌の遺伝子発現を比較した例はあるが、表面付着による遺伝子発現変化は明らかになっていない。従って、*lytF* 発現の局在メカニズムの解析には表面付着細菌と浮遊菌もしくは、バイオフィーム内細菌の亜集団を空間的に分離・回収することが必要となる。表面付着以外の *lytF* 発現に関わる刺激として、バイオフィームの底部と上部の細胞密度の違いや細胞の近接性などが影響する可能性もあるため、これの影響についても検証が必要である。

さらに、*lytF* 発現細胞の一部が細胞死を経て eDNA を産生する一方で、*lytF* を発現した生残菌も確認された。*lytF* 発現を制御するシグマ因子 SigX は、コンピテンス関連遺伝子の発現も制御しているため、*lytF* を発現した生残菌はコンピテントセルであると予想される。従って、バイオフィームの底部は、豊富な eDNA とコンピテントセルが存在し、遺伝子水平伝播の場となる可能性がある。また、*S. mutans* は CSP に応答してバクテリオシン産生に関連する ComE レギュロンの発現を誘導し競合細菌を攻撃することを考慮すると、実環境中の複合細菌バイオフィームでは種間での DNA の授受も予測される。従って、複合細菌系における CSP 産生と応答を含む Com system 全体像の理解が集団形成及び生存戦略の解明、延いてはバイオフィーム感染症の制御に必要である。

表 1 本研究で使した菌株

Strain	Relevant properties ^a	Source or reference
<i>S. mutans</i>		
UA159	Wild type erm ^S kan ^S spec ^S	(19)
YN102	UA159 <i>SMU_1405c::P_{ldh}-ZsGreen ermBP</i>	(44)
$\Delta comDE$	UA159 <i>comDE</i> deletion mutant; <i>ermBP</i>	This study
$\Delta cipB$	UA159 <i>cipB</i> deletion mutant; <i>ermBP</i>	This study
$\Delta comR$	UA159 <i>comR</i> deletion mutant; <i>ermBP</i>	This study
$\Delta comS$	UA159 <i>comS</i> deletion mutant; <i>ermBP</i>	This study
$\Delta comX$	UA159 <i>comX</i> deletion mutant; <i>ermBP</i>	This study
$\Delta lytF$	UA159 <i>lytF</i> deletion mutant; <i>ermBP</i>	This study
<i>lytF</i> comp. ^b	UA159 <i>lytF</i> deletion mutant; <i>ermBP</i> , <i>SMU_437c::P_{lytF} lytF aph3</i>	This study
<i>P_{lytF}</i> reporter	UA159 <i>SMU_437c::P_{lytF}-mScarlet-I aph3</i>	This study
<i>P_{ldh}</i> reporter	UA159 <i>SMU_1405c::P_{ldh}-mScarlet-I ermBP</i>	This study
<i>P_{cipB}</i> reporter	UA159 <i>SMU_437c::P_{cipB}-mScarlet-I aph3</i>	This study
<i>P_{ldh}</i> & <i>P_{lytF}</i> dual reporter	UA159 <i>SMU_437c::P_{lytF}-mScarlet-I aph3</i> , <i>SMU_1405c::P_{ldh}-mNeonGreen ermBP</i>	This study
$\Delta lytF$ <i>P_{ldh}</i> reporter	UA159 <i>lytF</i> deletion mutant; <i>aad9</i> , <i>SMU_1405c::P_{ldh}-mScarlet-I ermBP</i>	This study
<i>lytF</i> comp. <i>P_{ldh}</i> reporter	UA159 <i>lytF</i> deletion mutant; <i>aad9</i> , <i>SMU_437c::P_{lytF} lytF aph3</i> , <i>SMU_1405c::P_{ldh}-mScarlet-I ermBP</i>	This study
$\Delta gtfB$ <i>P_{lytF}</i> reporter	UA159 <i>gtfB</i> deletion mutant; <i>ermBP</i> , <i>SMU_437c::P_{lytF}-mScarlet-I aph3</i>	This study
$\Delta luxS$ <i>P_{lytF}</i> reporter	UA159 <i>luxS</i> deletion mutant; <i>ermBP</i> , <i>SMU_437c::P_{lytF}-mScarlet-I aph3</i>	
<i>B. subtilis</i>		
TAY3203	<i>trpC2 lysI $\Delta aprE3 nprE18 nprR2 \Delta ydiR-ydjA \Delta yqpP-yodU$ ($\Delta SP\beta$) amyE::nonA- spoVG 3' UTR aph3</i>	(43)

^a erm^S: erythromycin susceptibility, kan^S: kanamycin susceptibility, spec^S: spectinomycin susceptibility

^b complemented strain

表 2 本研究で使⽤したプラスミド

Plasmid	Relevant properties	
pJIR418	<i>ermBP</i>	(41)
pEX-A2J1-mScarlet-I	<i>mScarlet-I</i>	Eurofins genomics
pEX-A2J1-mNG	<i>mNeonGreen</i>	Eurofins genomics
pDL278	<i>aad9</i>	(42)

表3 欠損株作製に使用したプライマー

Primer name	Sequence
comDE up Fw	CTCAAGGCTTTGATAAATTGATGCC
comDE up Rv fuse to ermBP	CTTTTACGTTTCCGGGTACAATTCGGTGGTTTCAAGACGTCCTTG
comDE down Fw fuse to ermBP	GAAATAATTCTATGAGTCGCCAATCATCATCATTTATTCAAGCAACTCC
comDE down Rv	GGCAGTAAGGACAACCTTGACTAG
cipB up Fw	GGTTCAAAATGAGATAATGGCAC
cipB up Rv fuse to ermBP	CTTTTACGTTTCCGGGTACAATTCGGTTAAATTGTTCAAATGCTTGTG
cipB down Fw fuse to ermBP	GAAATAATTCTATGAGTCGCGGAGGAGCTCTTAATTCCTGTG
cipB down Rv	CCATAGGTCACCATATGATTAGATC
comR 5	GCAGATCTGCCTCGTCTCA
comR N5	CCCAGTAGTATCGTTGATGCAAC
comR N3	CAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTAAAACCTTTTCCTATAATCTCTGTCTAAAC
comR C5	GGGAGTGCAGTCGAAGTGGGCAAGTTGAAAGCCTATTGTTAATCTTCTGACATGG
comR C3	AAGGTGTGTATTTATTAGAAATCACACC
comR 3	CCTGGAAACGGAACCCCTCCA
comS 5	CAACCTATGGCGACCAACAAAG
comS N5	CCTGAAGAAGAACAATTGATTATTGATGGC
comS N3	CAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTCCTGTTATTCTCCTTTCTTTTGATATCA
comS C5	GGGAGTGCAGTCGAAGTGGGCAAGTTGAAATAATAGACAGCCCTTATGTCAGATG
comS C3	GCAGATGTAGACTTTGACCATGTTG
comS 3	AAACAAGCTTATATTGCTGCGATTG
comX 5	TTCCGGCATAGCTCAGTTGG
comX N5	AATGAAGCATCTTTACCTAGGTGC
comX N3	CAATTCGTAATCATGTCATAGCTGTTTCCTCTTCTTCCATCTATTACGATGACCTCC
comX C5	GGGAGTGCAGTCGAAGTGGGCAAGTTGAAAGGCAAAGTATGCTGAAAGATTACG
comX C3	CACTTCCAATTTCAAACCAACATCAATTAG
comX 3	AGGTTCTACAATTTACCTTTACCTGA
lytF up Fw	GTGTAGAAGAAGAGGGTTATTATCATG
lytF up Rv fuse to ermBP	CTTTTACGTTTCCGGGTACAATTCCTCAATCGAAATCTCCTTTATTCTTTTTTAC
lytF up Rv fuse to spc	GCCAGTCACGTTACGTTATTAGCTCAATCGAAATCTCCTTTATTCTTTTTTAC
lytF down Fw fuse to ermBP	GAAATAATTCTATGAGTCGCTTATATTTATCCTGACTAAGAGAACAAAAC
lytF down Fw fuse to spc	GATAAAATCCGATTAAGATACTGCCTACTTATATTTATCCTGACTAAGAGAACAAAAC
lytF down Rv	CTGAAAAACAGAGCAAGCTAAC
gtfB up Fw	CATGAAACCAGTTGGTCTGGAATAC

表 3 (continued)

Primer name	Sequence
gtfB up Rv fuse to ermBP	CTTTTACGTTTCCGGGTACAATTCCACTTTCTTGTCCATTAGGAACCTC
gtfB down Fw fuse to ermBP	GAAATAATTCTATGAGTCGCGGAGAACGAGTTCGGATTAACATAATTG
gtfB down Rv	CGAAGTTTGCAGCATCTGTACTATAG
ermBP Fw	AGGAAACAGCTATGACATG
ermBP Rv	TTTCAACTTGCCCACTTCGAC
ermBP Fw 2	GAATTGTACCCGGAAACGTAAAAG
ermBP Rv 2	GCGACTCATAGAATTATTCCTCC
spec Fw	CTAATAACGTAACGTGACTGGCAAG
spec Rv	GTAGGCAGTATCTTAATCGGATTTTATCG

表 4 相補株作製に使用したプライマー

Primer name	Sequence
437 up Fw	GTGAAGCTGTTGTTCCAGATTG
437 up Rv fuse to PlytF	GTACTATTCCTCCCATGCACCGAGAGGCAAAAAAGCCC
lytF Fw fuse to 437 up	GCGGGCTTTTTTGCCTCTCGGTGCATGGGAGGAATAGTACTTTTTG
lytF Rv fuse to Km	ATGGATTTTTATTGTTTATTAGTCAGGATAAATATAAGTTAATCTTCCC
Km-437 Fw fuse to lytF	GATTAAC TTATATTTATCCTGACTAATAACAATAAAAAATCCATAAAAAATACCAAGC
437 down Rv	GGTATAGATGAAGTTTGCGGTC

表5 プロモーターレポーター株作製に使用したプライマー

Primer name	Sequence
SMU438c 5	CAAAACGCTTGGCTAAACTAGG
SMU438c C3-TadhE	CGAGAGGCAAAAAAGCCCGCATAAGCGGGCCTGACTGCTAAACCTCAATCGGAGTTCTCT
SMU436c C5	TGAATTGTTTTAGTACCTAGTTAAGCTCGCTCGTTCAACC
SMU436c 3	CCAATGCCATTATGATGGCAAG
Pldh-TadhE Fw	CCGCTTATGCGGGCTTTTTTGCCTCTCGAAGAGCCCGAGCAACAATAAC
Pldh-mScarlet Rv	CTCTTTAATAACAGCTTCACCTTTAGATACCATGTTCTAAACATCTCCTTA
mScarlet-Cp Fw	ATGGTATCTAAAGGTGAAGCTGTTA
mScarlet-Cp-Tldh	AAGCATTACACAATGCTTGGTATTTTTATGGATTTTTATTGTTTACTTATAAAGTTCATCCATCCCTCCA
Rv	
KanR-Tldh Fw	TCCATAAAAATACCAAGCATTGTGTAATGCTTGGTATTTTTATTAAACGTTGAGGAGGCAGATTGCCTTG
kanR- SMU436c Rv	AACGAGCGAGCTTAACTAGGTACTAAAACAATTCATCCAG
SMU_438c N5	AACCTCCTTGAAAAGCCAATGA
SMU436c C3	GGTATAGATGAAGTTTGC GGTC
SMU438c N5-2	AAGCACTTGAAAAATCGGAACG
SMU436c C3-2	AAATAAAAGAAGGACACCTAGCAG
PlytF-TadhE Fw	CCCGCTTATGCGGGCTTTTTTGCCTCTCGGTGCATGGGAGGAATAGTAC
PlytF-mScarlet Rv	CTCTTTAATAACAGCTTCACCTTTAGATACCATTCTCAATCGAAATCTCCT
1405 up Fw	CAGAAGAAATGGGCAAGGTAGATG
1405 up Rv fuse to	CAAACCACTAACAGTTAAGCAGGATAAATAGTGTGGCCAGCAAGAG
PcomS	
PcomS Fw fuse to	CCTCTTGCTGGCCAACACTATTTATCCTGCTTAACTGTTAGTGGTTTG
1405 up	
PcomS Rv fuse to	CATATTATCCTCTTCACCTTTTGAAACCATCCTGTTATTCTCCTTTCTTTTGATATC
mNeon	
mNeon Fw fuse to	CAAAAAGAAAGGAGAATAACAGGATGGTTTCAAAAGGTGAAGAGGATAATATGG
PcomS	
1405 down Rv	CCGATTGCTATTGCCATCATCAATG
1405_rspD-term 1	GAGCGTGAAGATTTTCTAAGTAATCGTTTTAAAAACCCCT
1405_rpsD-term 2	AGGGGTTTTTAAAAAGATTACTTAGAAAAATCTTCACGCTC
spoVG-term_erm 1	TTTCAAACCTAGTTGCACTCCAGGAAACAGCTATGACATG
spoVG-term_erm 2	CATGTCATAGCTGTTTCCTGGAGTGCAACTAAGTTTGAAA
erm_1405 1	TCGAAGTGGGCAAGTTGAAAAAAGCAACGTACCTTTGACA
erm_1405 2	TGTCAAAGGTACGTTGCTTTTTTCAACTTGCCCACTTCGA
smu_1405 F 1	AAAACCTTACTCTATTGGACTTGATATTGG

表 5 (continued)

Primer name	Sequence
smu_1405 F 2	TGTTGTGACAGATGACTACAAAGTTCCTGC
smu_1405 F 3	CTGGGAAATACAGATAAAAGTCATATCGAG
smu_1405 R 1	AACCGGATGTTCTTTAAGAATTTGACTTCC
smu_1405 R 2	AACCTTTCAAACGTTGCTGTGAATTTTCGTC
smu_1405 R 3	ATTTTCAGGTTGATGTCCCATAATTTTGAC
rspDterm_Pldh_1	CTCTTGCTGGCCAACACTATTTAAAGAGCCCGAGCAACAATAA
rspDterm_Pldh_2	TTATTGTTGCTCGGGCTCTTTAAATAGTGTGGCCAGCAAGAG

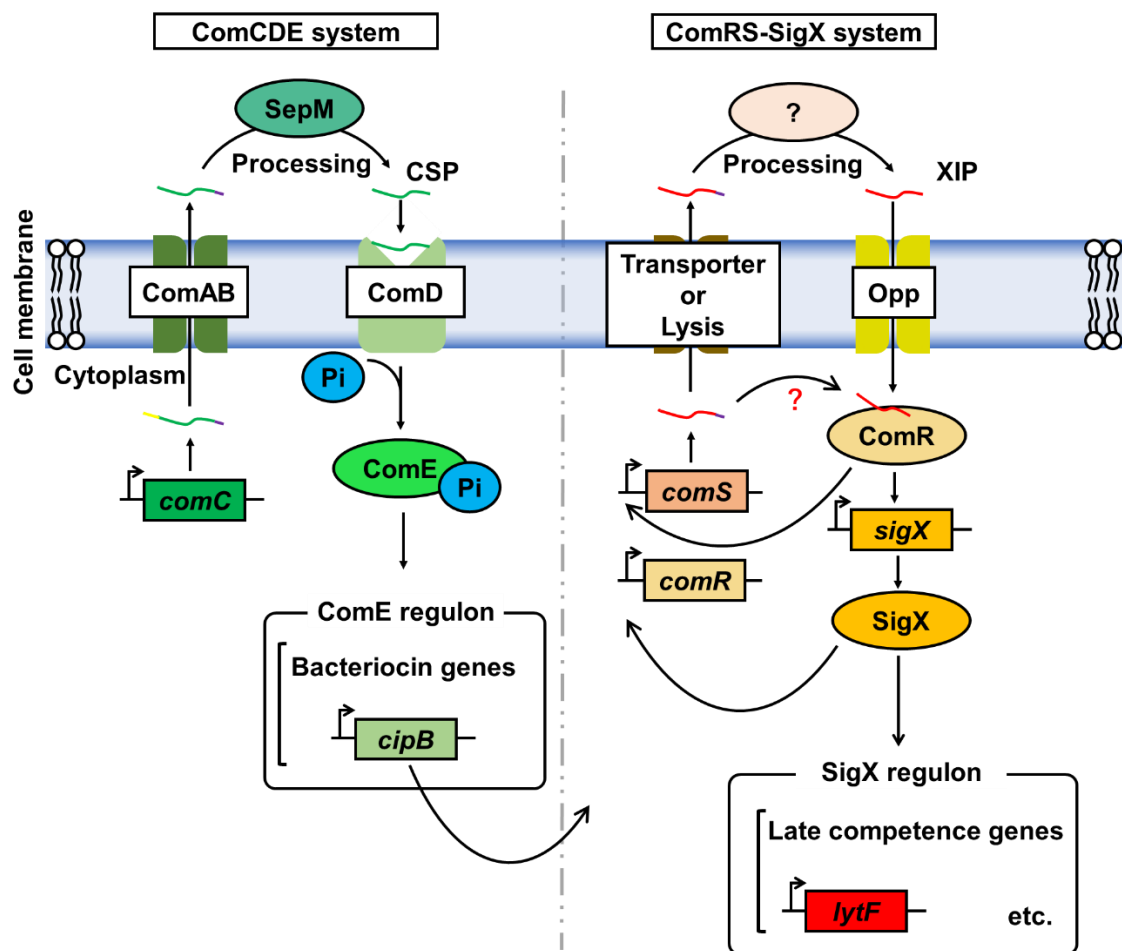


図1 *S. mutans* の Com system の概略

分泌性ペプチドシグナル CSP、XIP を介した細胞間コミュニケーション (Com system) によって、バクテリオシン産生、コンピテンス、細胞死が制御される。CSP の前駆体は *comC* にコードされ、ABC トランスポーター ComAB によって細胞外へ分泌される。細胞外の SepM によるプロセッシングを受けて活性化状態となった CSP は、二成分制御系 ComDE によって感知され、ComE レギュロンの発現が誘導される。ComE レギュロンに含まれる *cipB* は下流の ComRS-SigX system の活性化に必要であることは明らかになっているが、どのようなメカニズムで作用するのかはわかっていない。XIP の前駆体は *comS* にコードされる。分泌機構については明らかになっていないが、トランスポーターによる分泌と細胞死を介した放出が示唆されている。また、分泌を介さないメカニズムの存在も報告されている。細胞外の XIP は oligopeptide permease (Opp) によって細胞内に取り込まれ、ComR と結合する。ComR-XIP 複合体はシグマ因子をコードする *sigX* を発現誘導し、SigX レギュロンが発現する。SigX レギュロンに含まれる *lytF* はオートリシンをコードしている。ComR-XIP 複合体は *comS* 発現を、SigX は *comR* 発現を促進するポジティブフィードバックが存在する。

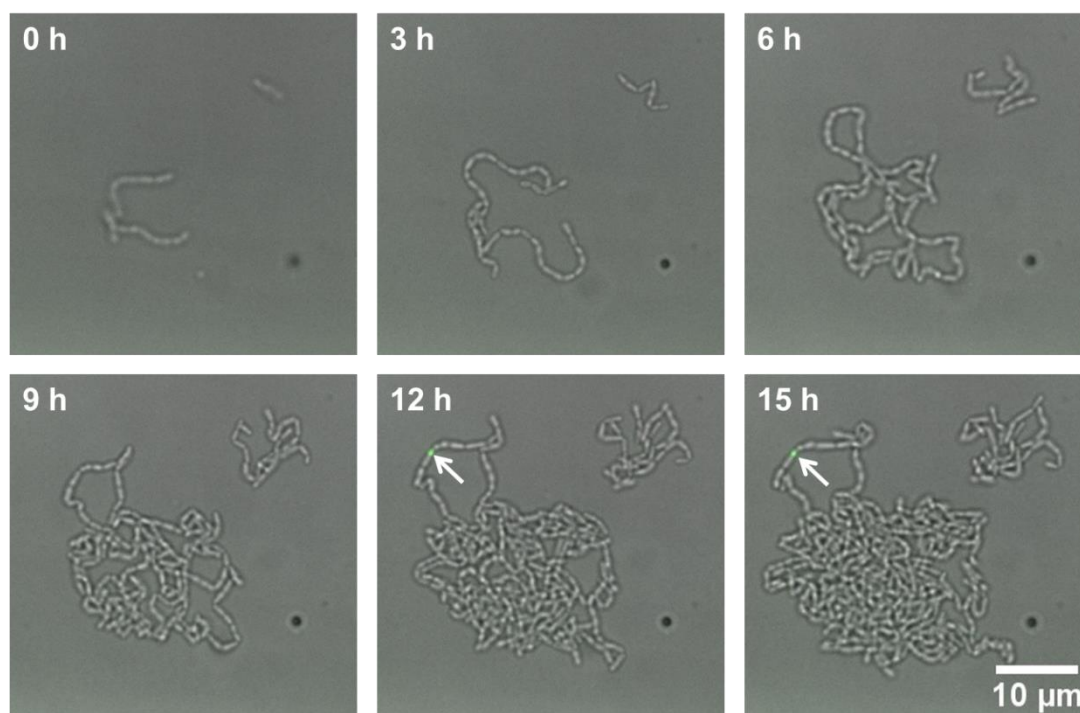


図2 2D チャンバー内における細菌の増殖と細胞死の観察

2D チャンバー内に対数増殖期中期の細菌を植菌した。BHI に SYTOX Green を添加した培地で培養することで、死細胞と細胞外核酸を緑色蛍光として検出した。培養は 37°C で行い、培地を一定の流速で供給するフローセルコンディショニングで観察した。細胞死を起こし、SYTOX Green で染まった細胞を矢印で示した。

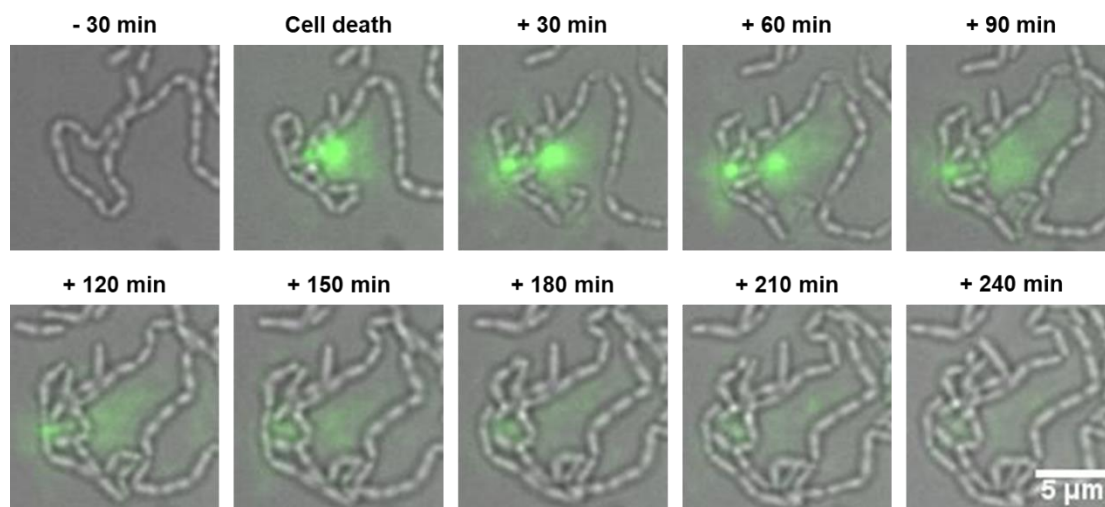


図3 2D チャンバー内における細胞死と eDNA 産生の観察

2D チャンバー内に対数増殖期中期の細菌を植菌した。BHI sCSP に SYTOX Green を添加した培地で培養することで、死細胞と細胞外核酸を緑色蛍光として検出した。培養は 37°C で行い、培地を一定の流速で供給するフローセルコンディションで観察した。細胞死の 30 分前から細胞死の 240 分後までの観察結果を示した。

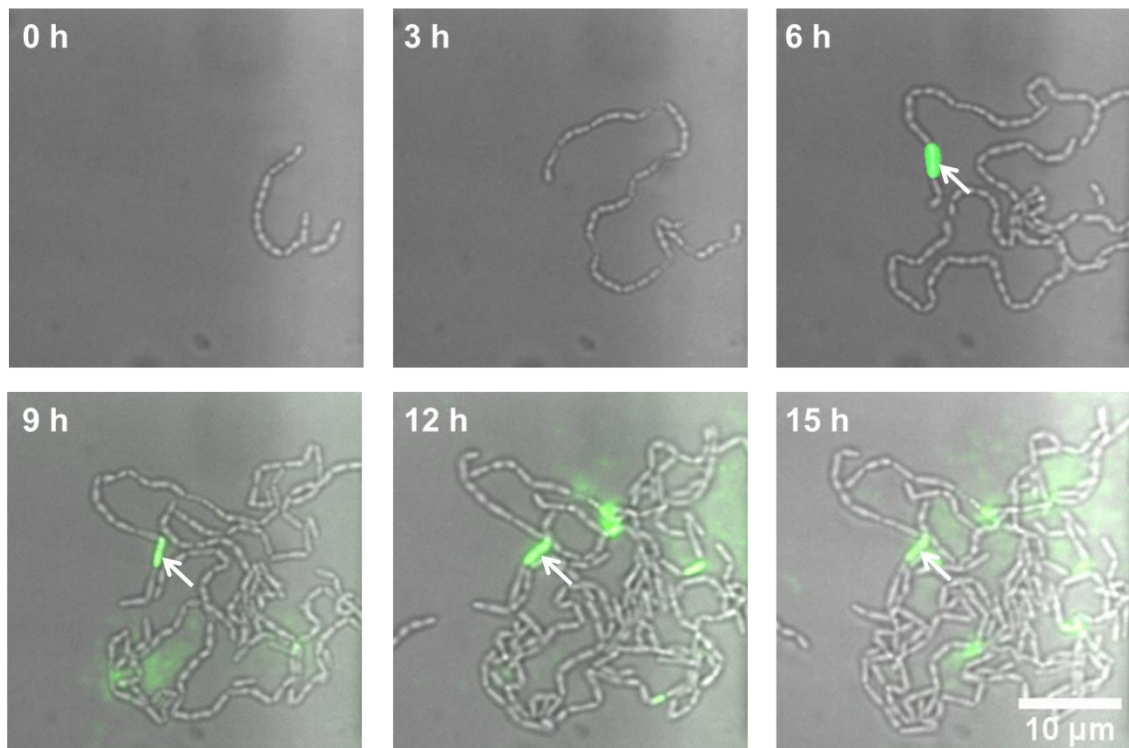


図4 2D チャンバー内における細胞死の観察

2D チャンバー内に対数増殖期中期の細菌を植菌した。BHI sCSP に SYTOX Green を添加した培地で培養することで、死細胞と細胞外核酸を緑色蛍光として検出した。培養は 37°C で行い、培地を一定の流速で供給するフローセルコンディショニングで観察した。細胞死を起こし SYTOX Green で染まったが、細胞外へと核酸を遊離しなかった細菌を矢印で示した。

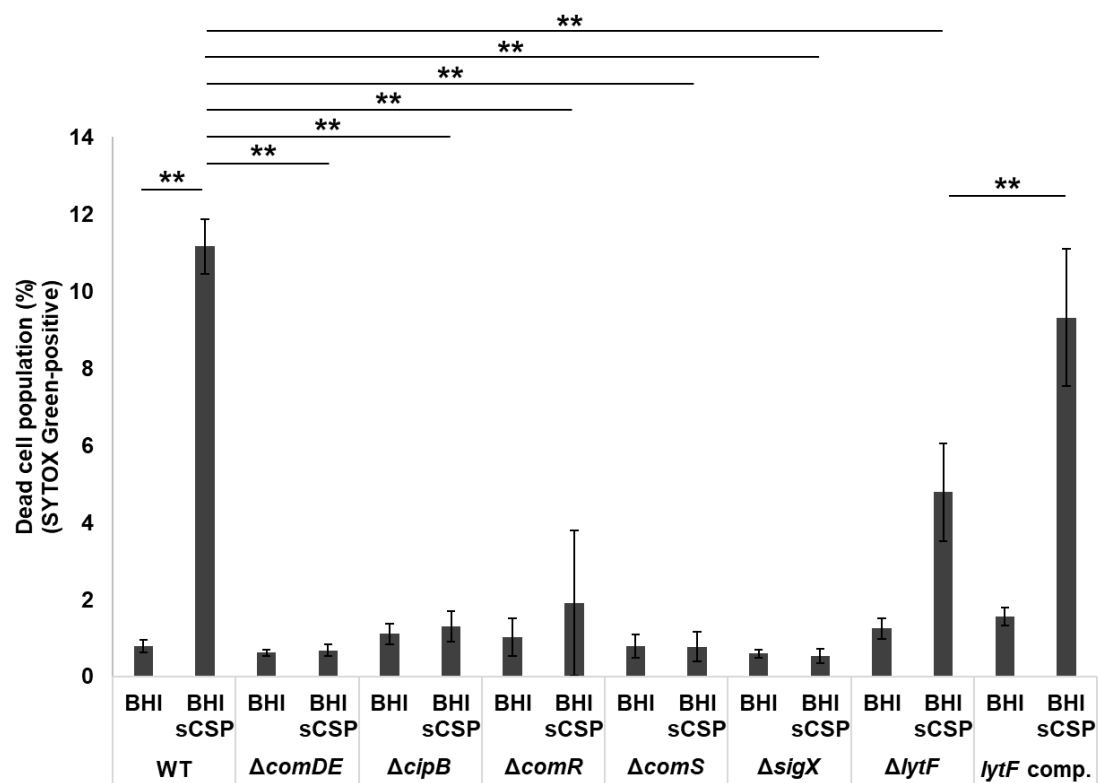


図5 フローサイトメトリーによる死菌率の定量

各株を BHI または、BHI sCSP に植菌し、37°C、5% CO₂ 条件下で 6 時間培養した。SYTOX Green で死菌を染色後、フローサイトメトリー解析により死菌率を算出した。実験は独立に三回行い、結果は平均±SD を表す。**は $p < 0.01$ を示す (*post hoc* Bonferroni test)。

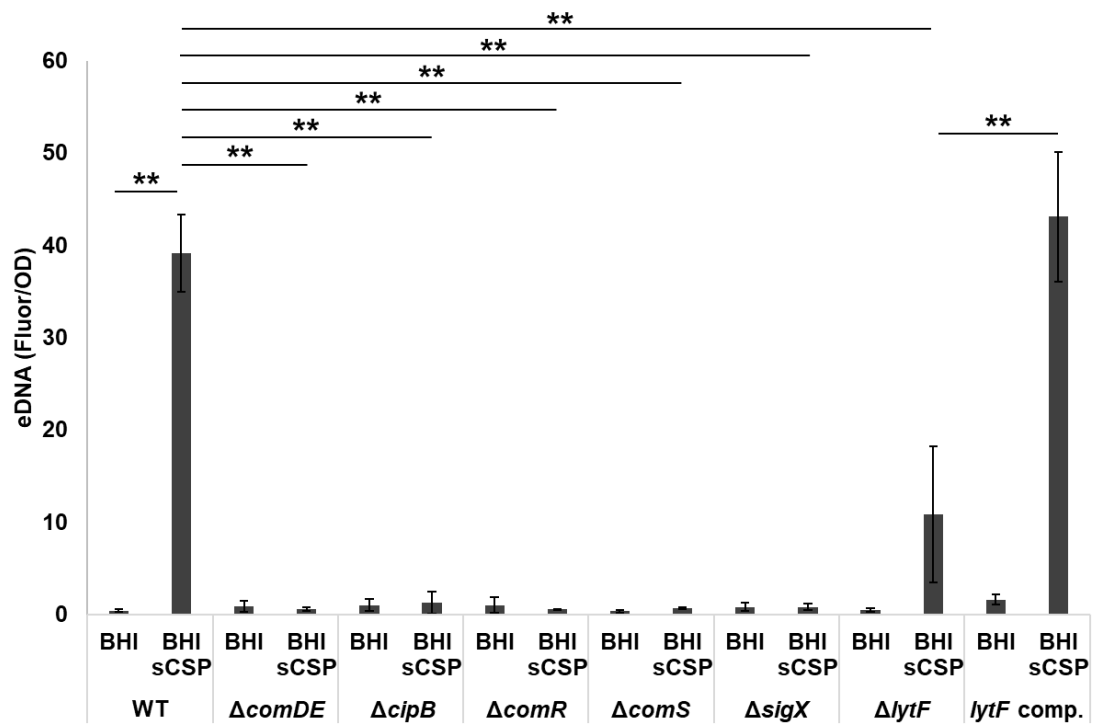


図6 PicoGreen assay による eDNA の定量

各株を BHI または、BHI sCSP に植菌し、37°C、5% CO₂ 条件下で 6 時間培養した。遠心分離により細菌を沈殿させ、培養上清から DNA を抽出した。定量には PicoGreen を用いた。sCSP の有無による生育の違いは 6 時間培養液の OD₆₀₀ で補正した。実験は独立に三回行い、結果は平均±SD を表す。**は $p < 0.01$ を示す (*post hoc* Bonferroni test)。

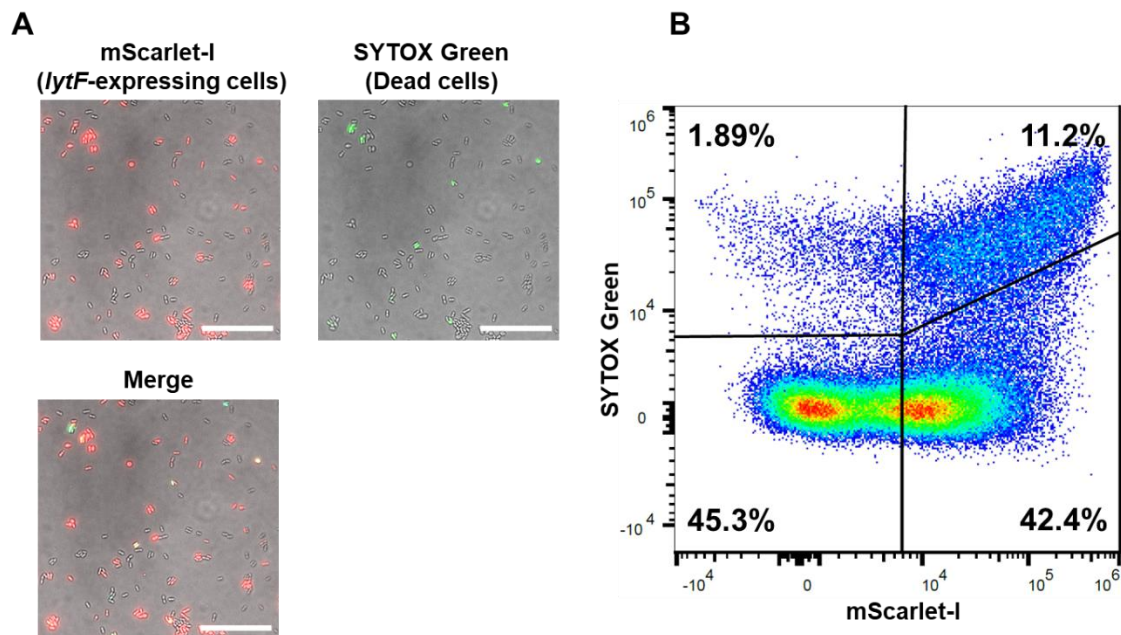


図7 *lytF* 発現細胞と死菌の解析

P_{lytF} レポーター株を BHI sCSP に植菌し、37°C、5% CO₂ 条件下で 6 時間培養した。培養終了後、SYTOX Green により死菌を染色した。(A) Axio observer Z1 を使用し、微分干渉顕微鏡観察と蛍光顕微鏡観察を行った。*lytF* 発現細胞を赤、死菌を緑で示した。スケールバーは 20 μ m を示す。(B) フローサイトメトリーにより *lytF* 発現細胞と死菌を定量した。横軸は *lytF* プロモーターの活性を示す mScarlet の蛍光強度、縦軸は SYTOX Green の蛍光強度を示す。ゲーティングは単一蛍光サンプルを用いて設定し、FlowJo を用いた解析により各ポピュレーションの割合を算出した。

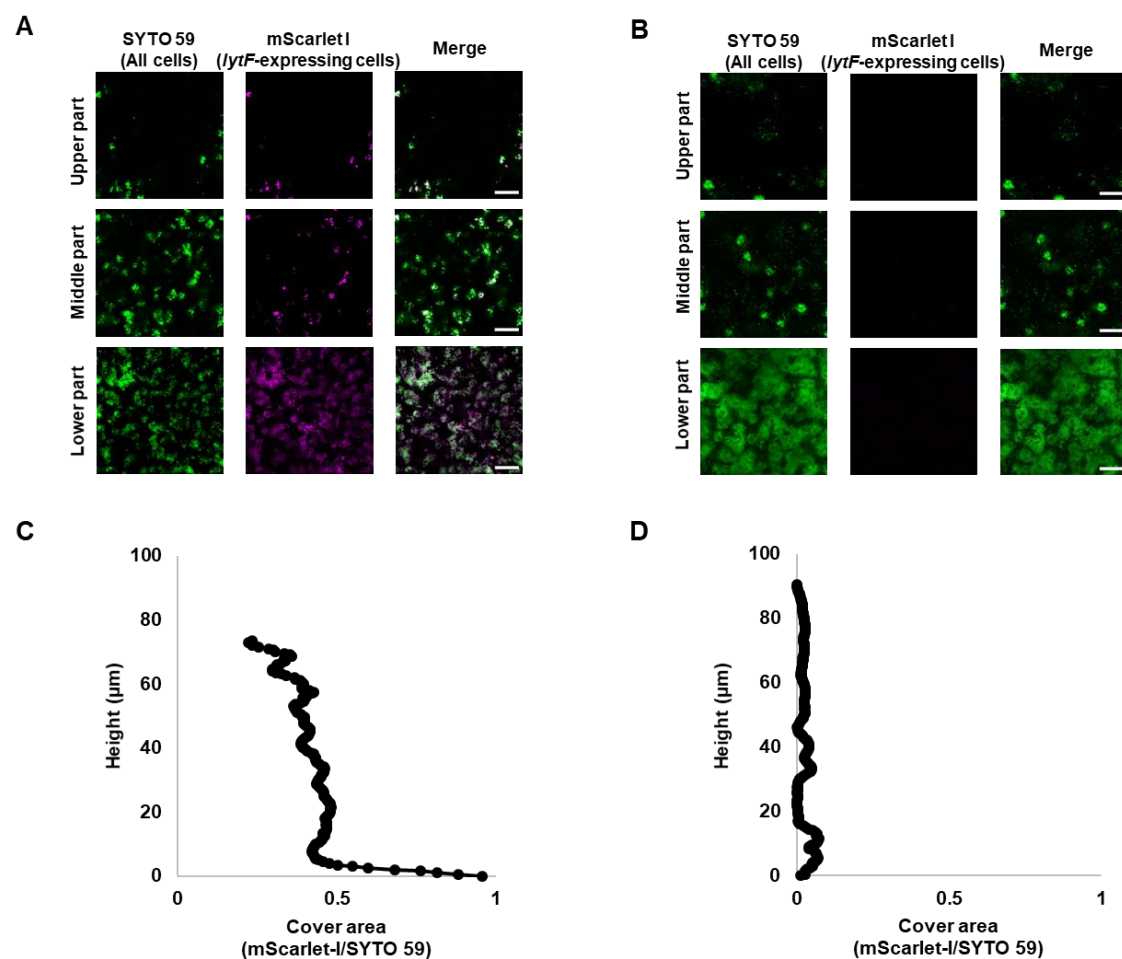


図 8 正立 CLSM による *lytF* 発現細胞のバイオフィーム内局在観察

P_{lytF} レポーター株を BHI-CSP (A, C) または、BHI (B, D) に植菌し、6-well plate を用いて 37°C、5% CO₂ 条件下で 6 時間培養した。PBS で 2 回洗浄することによって浮遊菌を除去した後、SYTO 59 で全菌を染色し、LSM880 で観察した。Z-stack は 0.5 μm 間隔で画像を取得し、well 底面から 2 μm、30 μm、60 μm の高さの二次元画像をそれぞれ lower、middle、upper part とした。全菌を緑、*lytF* 発現細胞をマゼンダで示した。スケールバーは 20 μm を示す。画像解析は、各 Z-stack において、SYTO 59 シグナルと mScarlet-I シグナルの検出面積を Fiji 及び imageJ によって算出し、各高さにおける *lytF* 発現細胞の割合 cover area (mScarlet-I/SYTO 59) を求めた。

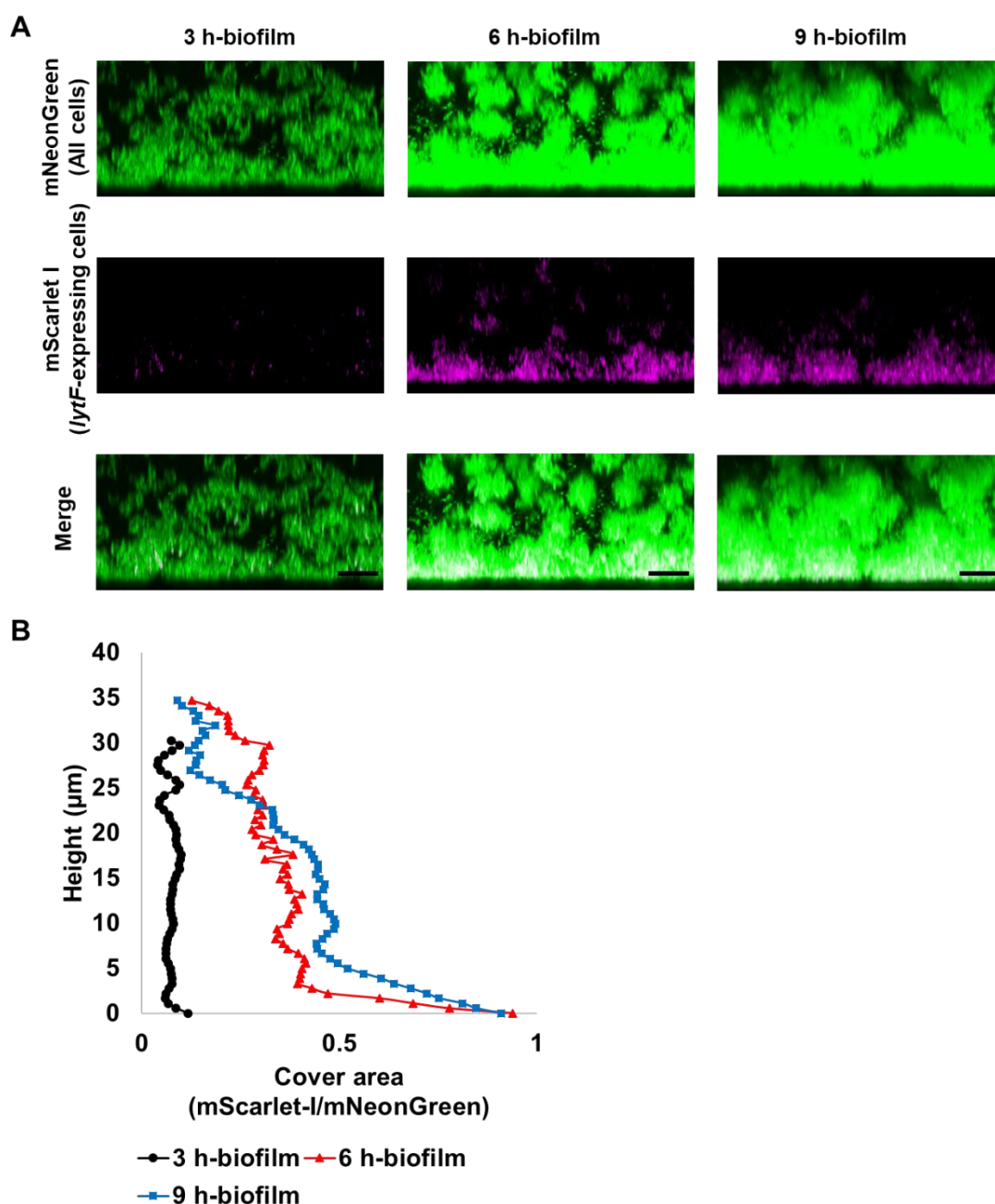


図9 倒立 CLSM による *lytF* 発現細胞のバイオフィーム内局在観察 (sCSP 存在下)

P_{ldh} & P_{lytF} dual reporter 株を BHIs CSP に植菌し、ガラスボトムディッシュを用いて 37°C、5% CO₂ 条件下で培養した。(A) PBS で 2 回洗浄することによって浮遊菌を除去した後、LSM780 で観察した。Z-stack は 0.5 μm 間隔で画像を取得した。各イメージはバイオフィームの side view を示しており、全菌を緑、*lytF* 発現細胞をマゼンダで示した。スケールバーは 10 μm を示す。(B) 画像解析は、各 Z-stack において、mNeonGreen シグナルと mScarlet-I シグナルの検出面積を Fiji 及び imageJ によって算出し、各高さにおける *lytF* 発現細胞の割合 cover area (mScarlet-I/mNeonGreen) を求めた。

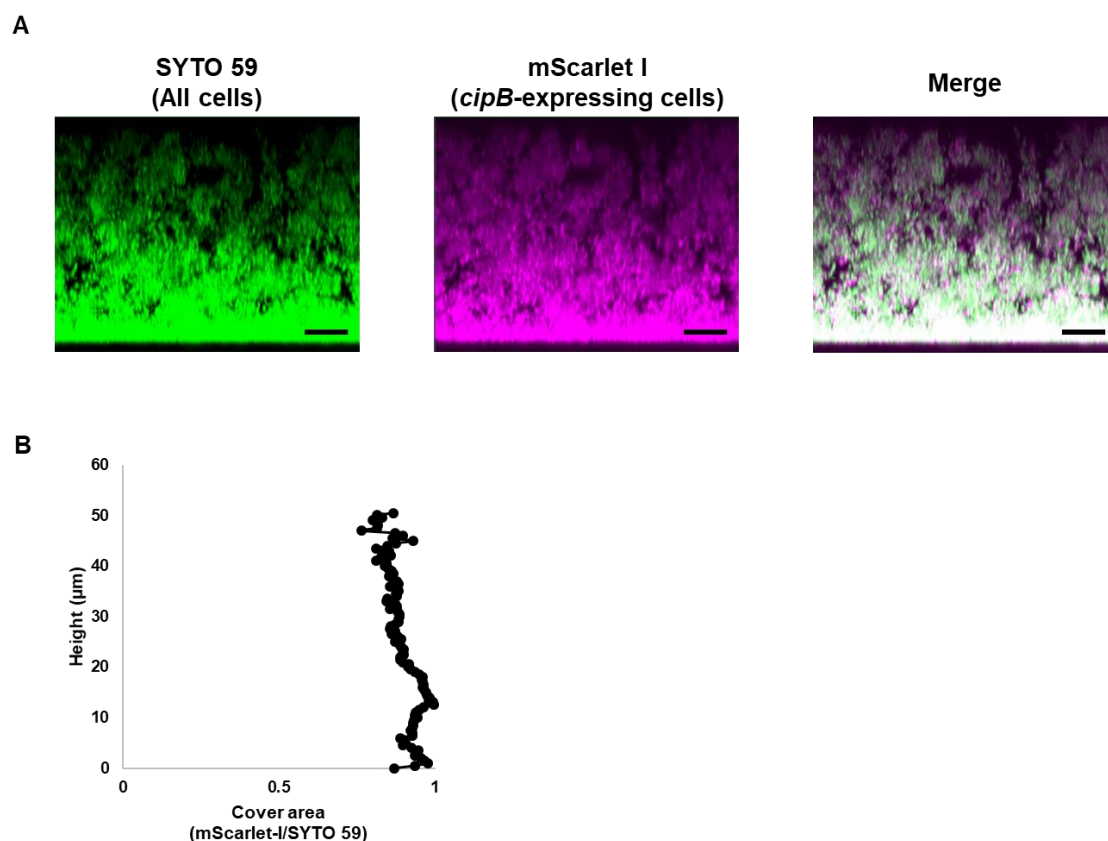


図 10 倒立 CLSM による *cipB* 発現細胞のバイオフィーム内局在観察

P_{cipB} レポーター株を BHIs CSP に植菌し、ガラスボトムディッシュを用いて 37°C、5% CO₂ 条件下で 6 時間培養した。(A) PBS で 2 回洗浄することによって浮遊菌を除去後 SYTO 59 で全菌を染色し、LSM780 で観察した。Z-stack は 0.5 μm 間隔で画像を取得した。各イメージはバイオフィームの side view を示しており、全菌を緑、*cipB* 発現細胞をマゼンダで示した。スケールバーは 10 μm を示す。(B) 画像解析は、各 Z-stack において、SYTO 59 シグナルと mScarlet-I シグナルの検出面積を Fiji 及び imageJ によって算出し、各高さにおける *cipB* 発現細胞の割合 cover area (mScarlet-I/SYTO 59) を求めた。

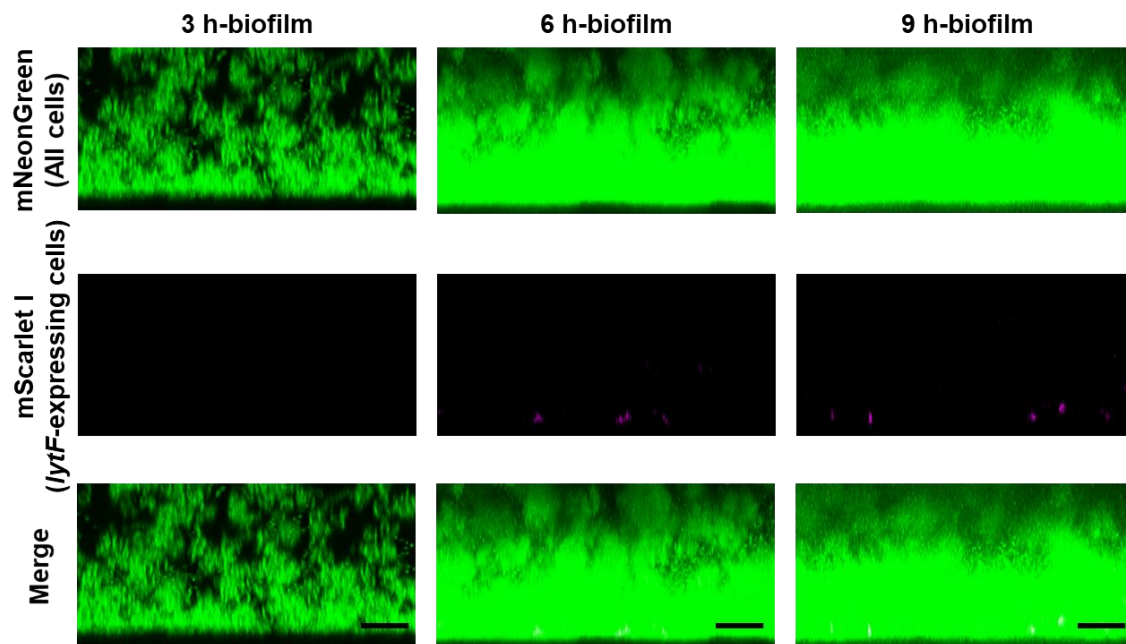


図 11 倒立 CLSM による *lytF* 発現細胞のバイオフィーム内局在観察 (sCSP 非存在下)
 P_{ldh} & P_{lytF} dual reporter 株を BHIs に植菌し、ガラスボトムディッシュを用いて 37°C、5% CO_2 条件下で培養した。PBS で 2 回洗浄することによって浮遊菌を除去後、LSM780 で観察した。Z-stack は 0.5 μm 間隔で画像を取得した。各イメージはバイオフィームの side view を示しており、全菌を緑、*lytF* 発現細胞をマゼンダで示した。スケールバーは 10 μm を示す。

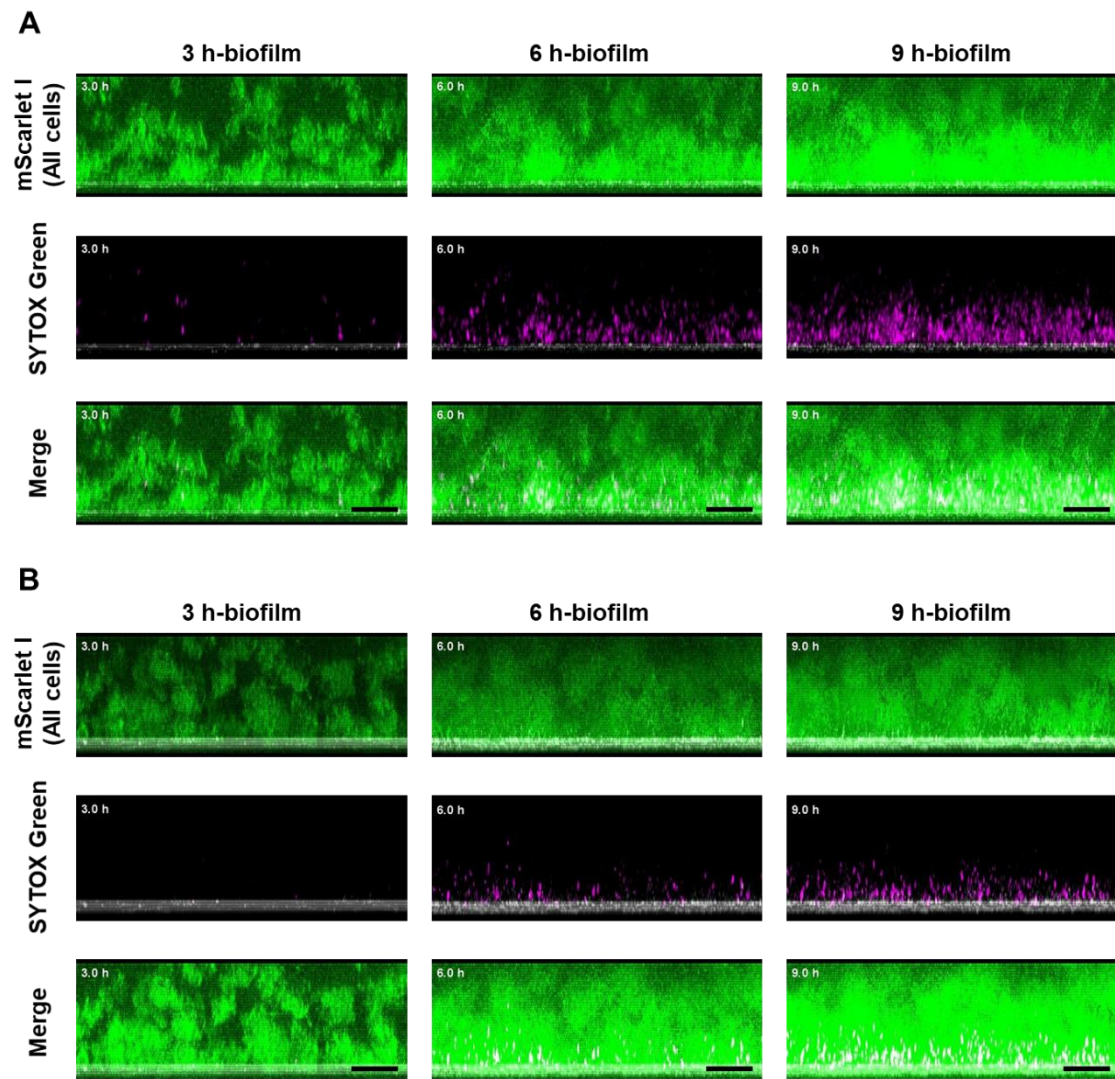


図 12 倒立 CLSM による死菌及び細胞外核酸のバイオフィーム内局在観察

P_{ldh} レポーター株 (mScarlet-I) を BHIs CSP(A)または、BHIs (B)に植菌し、ガラスボトムディッシュを用いて 37°C、5% CO_2 条件下で培養した。死菌及び細胞外核酸の可視化のため、予め SYTOX Green を培地に添加した。観察には LSM780 を使用し、同一視野を経時的に観察した。Z-stack は 0.55 μm 間隔で画像を取得した。各イメージはバイオフィームの side view を示しており、全菌を緑、死菌及び細胞外核酸をマゼンダ、ガラス表面 (反射)を白で示した。スケールバーは 10 μm を示す。

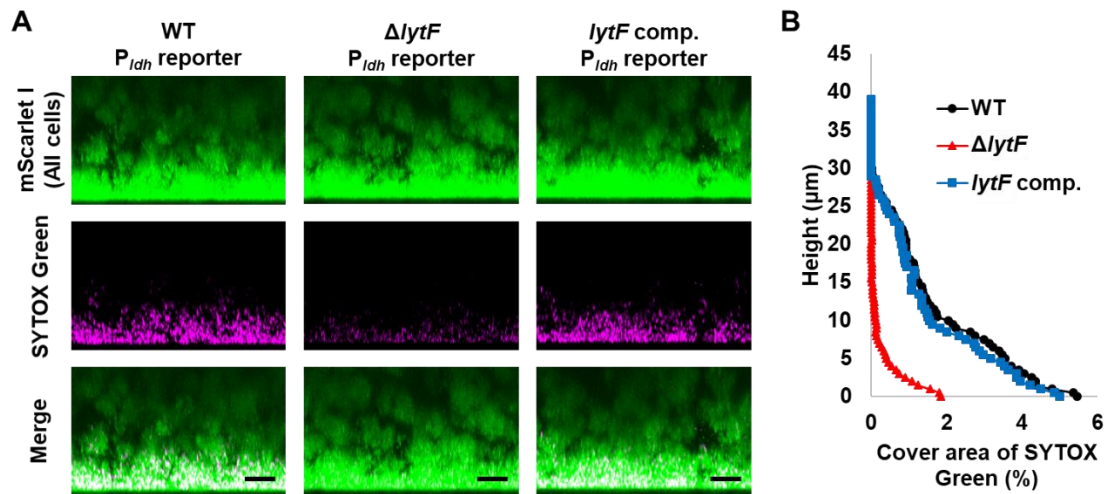


図 13 バイオフィーム内における細胞死及び eDNA 産生に対する *lytF* の影響の解析

P_{ldh} レポーター株 (mScarlet-I)、同レポーター株に *lytF* 欠損を導入した株及び、*lytF* 相補株を BHIs CSP に植菌し、ガラスボトムディッシュを用いて 37°C、5% CO₂ 条件下で 6 時間培養した。(A) PBS で 2 回洗浄することによって浮遊菌を除去後、LSM780 で観察した。Z-stack は 0.5 μm 間隔で画像を取得した。各イメージはバイオフィームの side view を示しており、全菌を緑、死菌及び細胞外核酸をマゼンダで示した。スケールバーは 10 μm を示す。(B) 画像解析は、各 Z-stack において、SYTOX Green シグナルの検出面積を Fiji 及び imageJ によって算出し、各高さにおける cover area を示した。

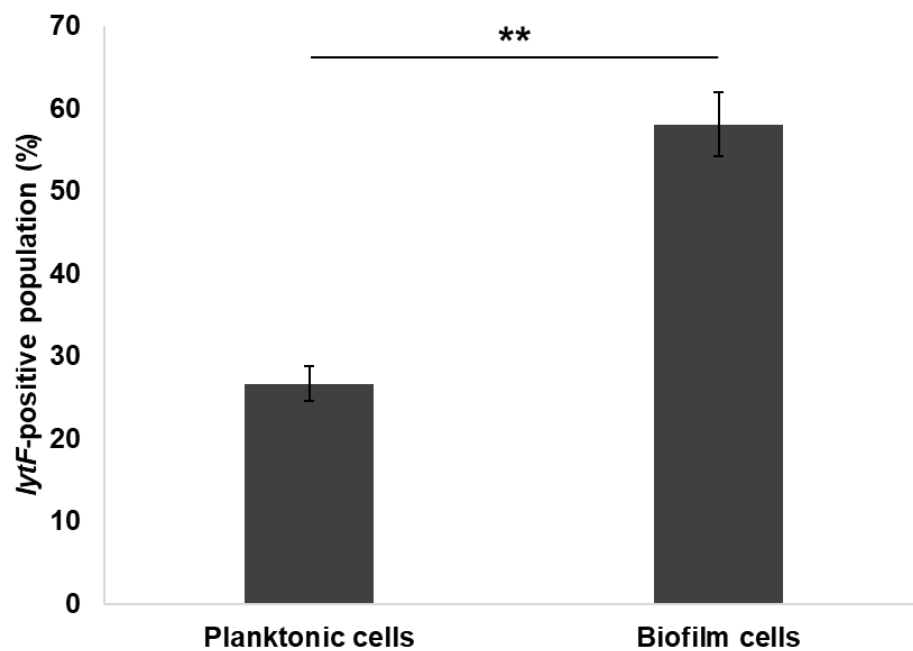


図 14 浮遊菌とバイオフィルム細菌の *lytF* 発現細胞比較

P_{lytF} レポーター株を BHIs CSP に植菌し、6-well plate を用いて 37°C、5% CO₂ 条件下で 6 時間培養した。浮遊菌は培養液から回収し、バイオフィルム細菌は PBS で 2 回洗浄することによって浮遊菌を除去後、セルスクレーパーで物理的にはがして回収した。*lytF* 発現細胞はフローサイトメトリーによって定量した。実験は独立に三回行い、結果は平均±SD を表す。**は $p < 0.01$ を示す (*post hoc* Bonferroni test)。

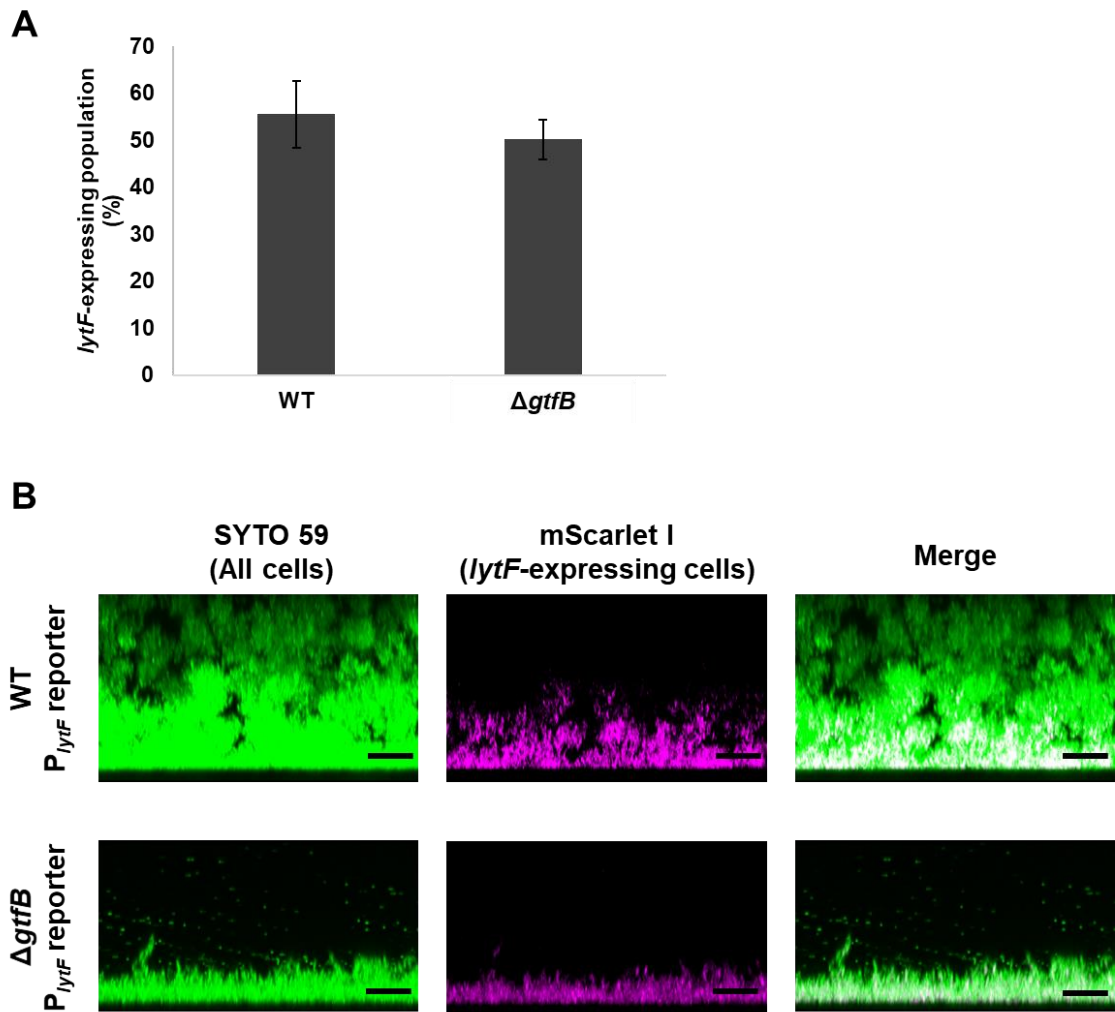


図 15 バイオフィルム内三次元構造が *lytF* 発現細胞の局在に与える影響の解析

(A) *gtfB* の欠損が *lytF* 発現に影響するかどうかをフローサイトメトリーにより検証した。 P_{lytF} レポーター株と *gtfB* 欠損を導入した同レポーター株を BHIs CSP に植菌し、37°C、5% CO₂ 条件下で 6 時間培養した。*lytF* 発現細胞はフローサイトメトリーによって定量した。実験は独立に三回行い、結果は平均±SD を表す。(B) P_{lytF} レポーター株と *gtfB* 欠損を導入した同レポーター株を BHIs CSP に植菌し、ガラスボトムディッシュを用いて 37°C、5% CO₂ 条件下で 6 時間培養した。PBS で 2 回洗浄することによって浮遊菌を除去後、全菌を SYTO 59 で染色し LSM780 で観察した。Z-stack は 0.5 μm 間隔で画像を取得した。各イメージはバイオフィルムの side view を示しており、全菌を緑、*lytF* 発現細胞をマゼンダで示した。スケールバーは 10 μm を示す。

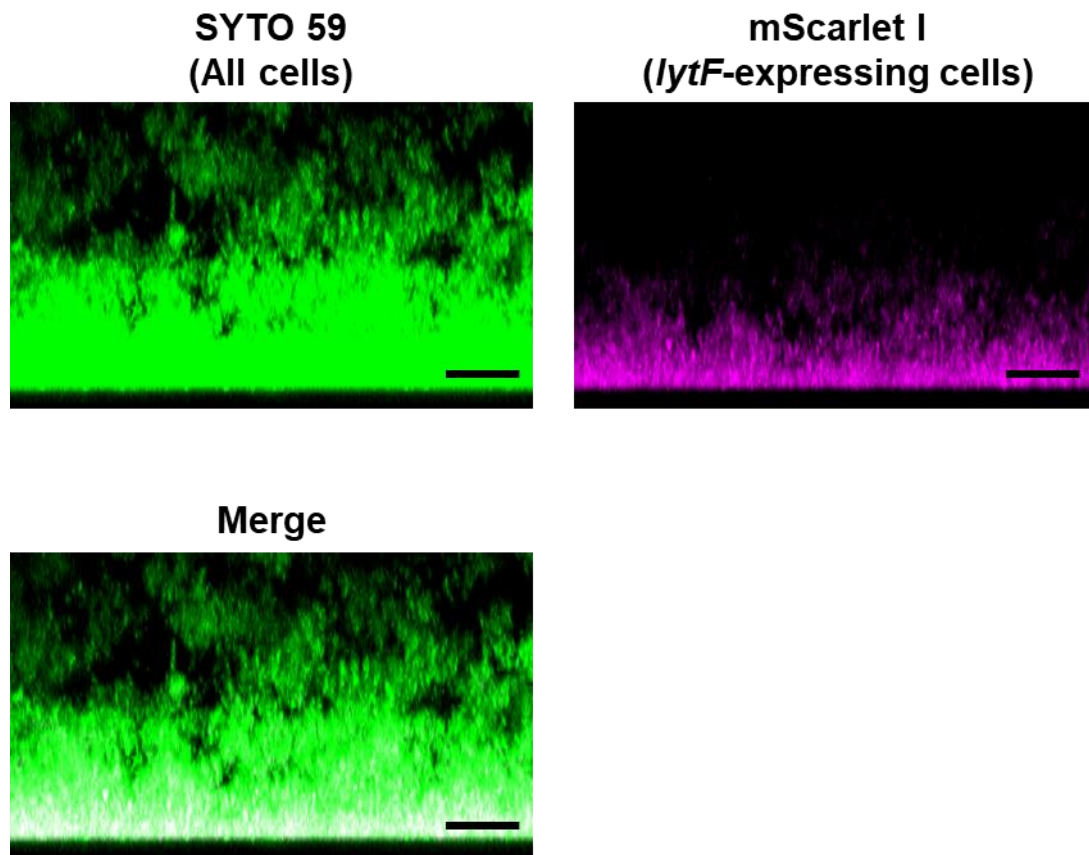


図 16 唾液コート表面に形成されたバイオフィルムにおける *lytF* 発現細胞の局在観察
 P_{lytF} レポーター株を BHIs CSP に植菌し、フィルター滅菌唾液をコートしたガラスボトムデ
 イッシュを用いて 37°C、5% CO₂ 条件下で 6 時間培養した。PBS で 2 回洗浄することによ
 って浮遊菌を除去後、SYTO 59 で全菌を染色し、LSM780 で観察した。Z-stack は 0.5 μm
 間隔で画像を取得した。各イメージはバイオフィルムの side view を示しており、全菌を
 緑、*lytF* 発現細胞をマゼンダで示した。スケールバーは 10 μm を示す。

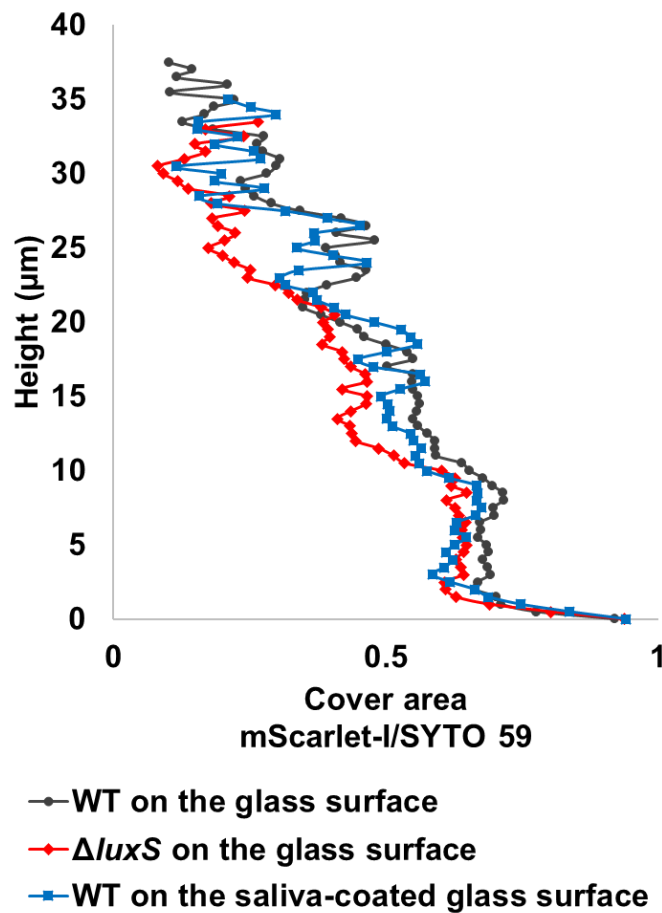


図 17 バイオフィーム内における *lytF* 発現細胞局在の画像解析

P_{lytF} レポーター株または、*luxS* 欠損を導入した同レポーター株が BHIs CSP において形成した 6 時間バイオフィームの CLSM 画像をもとに Fiji 及び imageJ で解析した。全菌を可視化するために SYTO 59 染色を行った。各 Z-stack において、SYTO 59 シグナルと mScarlet-I シグナルの検出面積を Fiji 及び imageJ によって算出し、各高さにおける *lytF* 発現細胞の割合 cover area (mScarlet-I/SYTO 59) を求めた。

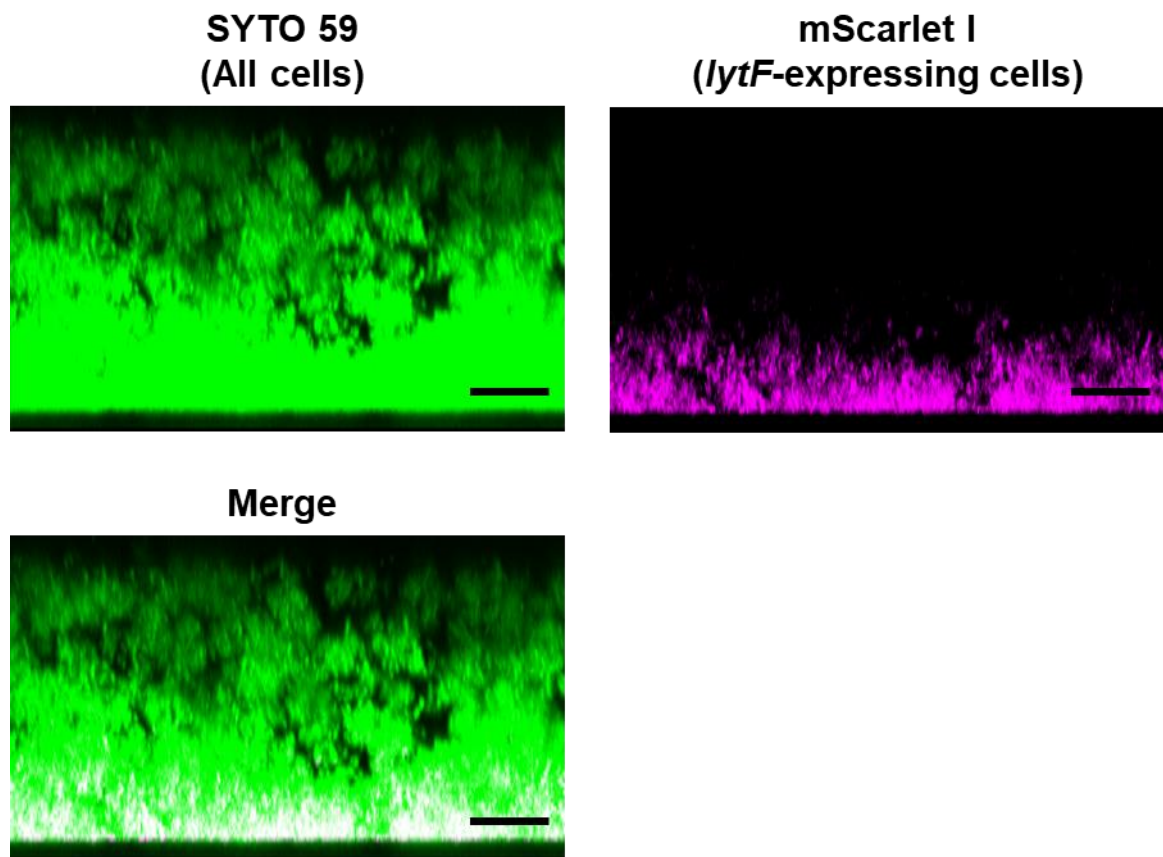


図 18 AI-2 を介した QS が *lytF* 発現細胞の局在に与える影響の解析

luxS 欠損を導入した P_{lytF} レポーター株を BHIs CSP に植菌し、ガラスボトムディッシュを用いて 37°C、5% CO₂ 条件下で 6 時間培養した。PBS で 2 回洗浄することによって浮遊菌を除去後、SYTO 59 で全菌を染色し、LSM780 で観察した。Z-stack は 0.5 μm 間隔で画像を取得した。各イメージはバイオフィルムの side view を示しており、全菌を緑、*lytF* 発現細胞をマゼンダで示した。スケールバーは 10 μm を示す。

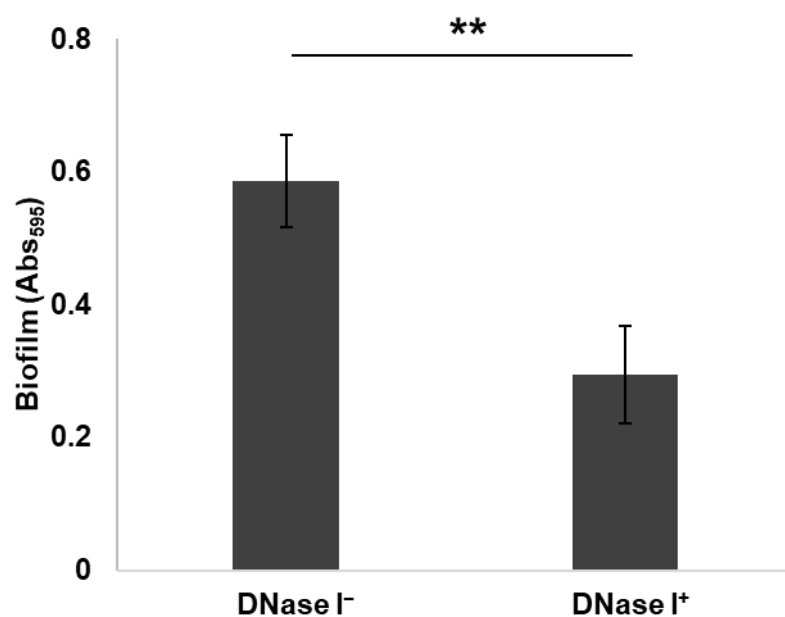


図 19 DNase I によるバイオフィーム形成阻害の定量

UA159 WT を BHIs sCSP (DNase I⁻)または、50 U/ml の DNase I を添加した BHIs sCSP (DNase I⁺)に植菌し、96-well plate を用いて 37°C、5% CO₂ 条件下で 6 時間培養した。バイオフィームは CV によって染色し、A₅₉₅ をプレートリーダーで測定した。実験は独立に三回行い、結果は平均±SD を表す。**は $p < 0.01$ を示す (*post hoc* Bonferroni test)。

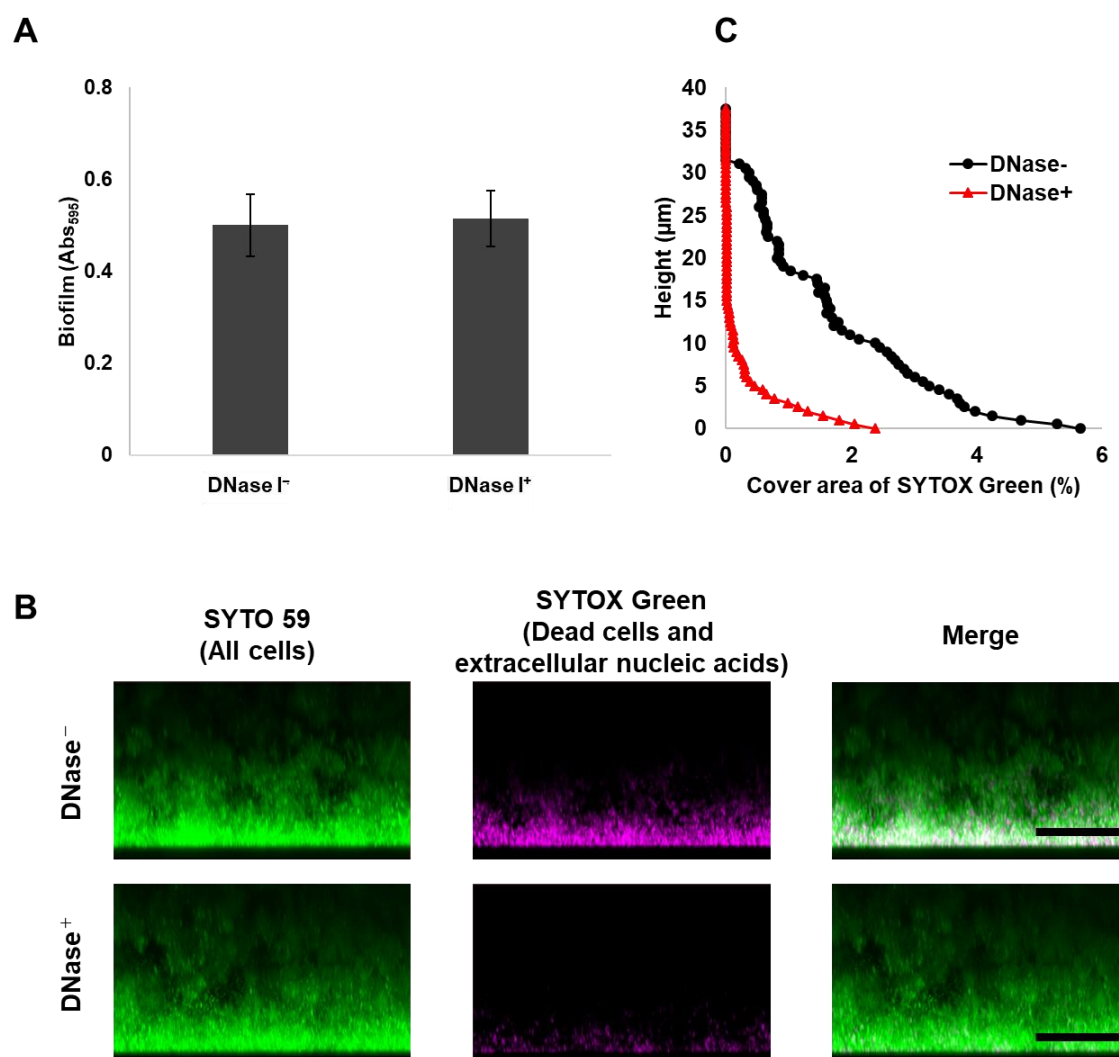


図 20 形成済みバイオフィルムに対する DNase I の効果

UA159 WT を BHIs に植菌し、96-well plate を用いて 37°C、5% CO₂ 条件下で 6 時間培養した。培養液を除去した後、PBS で 2 回洗浄した。残存したバイオフィルムに対して 50 U/ml DNase I 溶液を添加し、37°C で 6 時間処理した (DNase⁺)。コントロールとして DNase I を加えていない incubation buffer で処理したサンプルを用意し比較対象とした (DNase I⁻)。 (A) CV でバイオフィルムを染色し、A₅₉₅ をプレートリーダーで測定した。実験は独立に三回行い、結果は平均±SD を表す。 (B) SYTO 59 で全菌、SYTOX Green で死菌及び細胞外核酸を染色し、LSM780 で観察した。Z-stack は 0.5 μm 間隔で画像を取得した。各イメージはバイオフィルムの side view を示しており、全菌を緑、死菌及び細胞外核酸をマゼンダで示した。スケールバーは 20 μm を示す。 (C) 画像解析は、各 Z-stack において、SYTOX Green シグナルの検出面積を Fiji 及び imageJ によって算出し、各高さにおける cover area を示した。

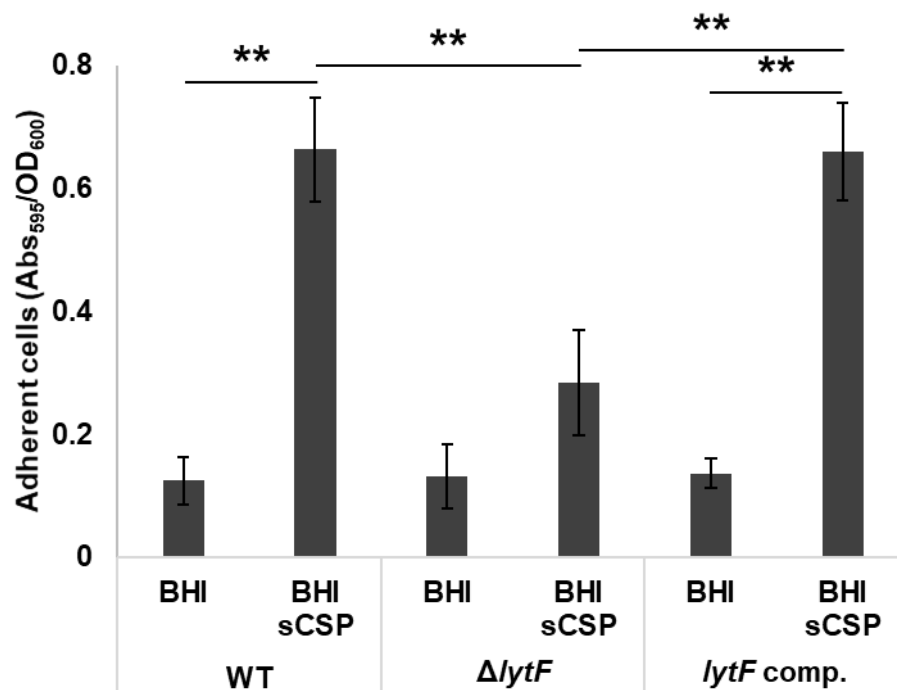


図 21 細胞の付着性の比較解析

UA159 WT を BHI または、BHI sCSP に植菌し、37°C、5% CO₂ 条件下で 6 時間培養した。培養液を 96-well plate に移し、4°C で 6 時間静置した。付着細胞は CV で染色し、A₅₉₅ をプレートリーダーで測定した。実験は独立に三回行い、結果は平均±SD を表す。**は $p < 0.01$ を示す (*post hoc* Bonferroni test)。

参考文献

1. Belfield K, Bayston R, Birchall JP, Daniel M. 2015. Do orally administered antibiotics reach concentrations in the middle ear sufficient to eradicate planktonic and biofilm bacteria? A review. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 79:296–300.
2. Costerton JW, , Stewart PS, Greenberg EP. 1999. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. *Science.* 284:1318–1322.
3. Jenkinson HF. 2011. Beyond the oral microbiome. *Environ Microbiol.* 13:3077–3087.
4. Wade WG. 2013. The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol Res.* 69:137–143.
5. Gross EL, Leys EJ, Gasparovich SR, Firestone ND, Schwartzbaum JA, Janies DA, Asnani K, Griffen AL. 2010. Bacterial 16S sequence analysis of severe caries in young permanent teeth. *J Clin Microbiol.* 48:4121–4128.
6. Richards VP, Alvarez AJ, Luce AR, Bedenbaugh M, Mitchell ML, Burne RA, Nascimento MM. 2017. Microbiomes of site-specific dental plaques from children with different caries status. *Infect Immun.* 85:1–11.
7. Silander OK, Nikolic N, Zaslaver A, Bren A, Kikoin I, Alon U, Ackermann M. 2012. A genome-wide analysis of promoter-mediated phenotypic noise in *Escherichia coli*. *PLoS Genet.* 8:e1002443.
8. Ozbudak EM, Thattai M, Lim HN, Shraiman BI, Van Oudenaarden A. 2004. Multistability in the lactose utilization network of *Escherichia coli*. *Nature.* 427:737–740.
9. Zeng L, Burne RA. 2020. Subpopulation behaviors in lactose metabolism by *Streptococcus mutans*. *Mol Microbiol.* 2020;00:1–12.
10. Ackermann M. 2015. A functional perspective on phenotypic heterogeneity in microorganisms. *Nat Rev Microbiol.* 13:497–508.
11. Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC, Mattick JS. 2002. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science.* 295:1487.
12. Okshevsky M, Regina VR, Meyer RL. 2015. Extracellular DNA as a target for biofilm control. *Curr Opin Biotechnol.* 33:73–80.
13. Das T, Sharma PK, Busscher HJ, van der Mei HC, Krom BP. 2010. Role of extracellular DNA in initial bacterial adhesion and surface aggregation. *Appl Environ Microbiol.* 76:3405–3408.
14. Håvarstein LS, Martin B, Johnsborg O, Granadel C, Claverys JP. 2006. New insights into the pneumococcal fratricide: relationship to clumping and identification of a novel immunity factor. *Mol Microbiol.* 59:1297–1307.
15. Guiral S, Mitchell TJ, Martin B, Claverys J-P. 2005. Competence-programmed predation of noncompetent cells in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*: genetic requirements. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:8710–8715.
16. Thomas VC, Thurlow LR, Boyle D, Hancock LE. 2008. Regulation of autolysis-dependent

- extracellular DNA release by *Enterococcus faecalis* extracellular proteases influences biofilm development. J Bacteriol. 190:5690–5698.
17. Carrolo M, Frias MJ, Pinto FR, Melo-Cristino J, Ramirez M. 2010. Prophage spontaneous activation promotes DNA release enhancing biofilm formation in *Streptococcus pneumoniae*. PLoS One. 5:e15678.
 18. Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, Abranches J, Brady LJ. 2019. The biology of *Streptococcus mutans*. Microbiol Spectr. 7:2019–2020.
 19. Ajdić D, McShan WM, McLaughlin RE, Savić G, Chang J, Carson MB, Primeaux C, Tian R, Kenton S, Jia H, Lin S, Qian Y, Li S, Zhu H, Najar F, Lai H, White J, Roe BA, Ferretti JJ. 2002. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. Proc Natl Acad Sci U S A. 99:14434–14439.
 20. Mitchell TJ. 2003. The pathogenesis of streptococcal infections: From tooth decay to meningitis. Nat Rev Microbiol. 1:219–230.
 21. Xie Z, Okinaga T, Qi F, Zhang Z, Merritt J. 2011. Cloning-independent and counterselectable markerless mutagenesis system in *Streptococcus mutans*. Appl Environ Microbiol. 77:8025–8033.
 22. Zhang S, Zou Z, Kreth J, Merritt J. 2017. Recombineering in *Streptococcus mutans* using direct repeat-mediated cloning-independent markerless mutagenesis (DR-CIMM). Front Cell Infect Microbiol. 7:1–11.
 23. Xie Z, Qi F, Merritt J. 2013. Development of a tunable wide-range gene induction system useful for the study of streptococcal toxin-antitoxin systems. Appl Environ Microbiol. 79:6375–6384.
 24. Lemos JA, Quivey RG, Koo H, Abranches J. 2013. *Streptococcus mutans*: A new Gram-positive paradigm? Microbiol (United Kingdom). 159:436–445.
 25. Bowen WH, Koo H. 2011. Biology of *Streptococcus mutans*-derived glucosyltransferases: Role in extracellular matrix formation of cariogenic biofilms. Caries Res. 45:69–86.
 26. Xiao J, Klein MI, Falsetta ML, Lu B, Delahunty CM, Yates JR, Heydorn A, Koo H. 2012. The exopolysaccharide matrix modulates the interaction between 3D architecture and virulence of a mixed-species oral biofilm. PLoS Pathog. 8:e1002623.
 27. Nagasawa R, Sato T, Nomura N, Nakamura T, Senpuku H. 2020. Potential risk of spreading resistance genes within extracellular DNA-dependent biofilms of *Streptococcus mutans* in response to cell envelope stress induced by sub-MICs of bacitracin. Appl Environ Microbiol. 86:1–20.
 28. Nagasawa R, Sato T, Senpuku H. 2017. Raffinose induces biofilm formation by *Streptococcus mutans* in low concentrations of sucrose by increasing production of extracellular DNA and fructan. Appl Environ Microbiol. 83:1–15.
 29. Perry JA, Jones MB, Peterson SN, Cvitkovitch DG, Lévesque CM. 2009. Peptide alarmone

- signalling triggers an auto-active bacteriocin necessary for genetic competence. *Mol Microbiol.* 72:905–917.
30. Senadheera DB, Cordova M, Ayala EA, Chávez de Paz LE, Singh K, Downey JS, Svensäter G, Goodman SD, Cvitkovitch DG. 2012. Regulation of bacteriocin production and cell death by the VicRK signaling system in *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 194:1307–1316.
 31. Hossain MS, Biswas I. 2012. An extracellular protease, SepM, generates functional competence-stimulating peptide in *Streptococcus mutans* UA159. *J Bacteriol.* 194:5886–5896.
 32. Dufour D, Cordova M, Cvitkovitch DG, Lévesque CM. 2011. Regulation of the competence pathway as a novel role associated with a streptococcal bacteriocin. *J Bacteriol.* 193:6552–6559.
 33. Chang JC, Federle MJ. 2016. PptAB exports Rgg quorum-sensing peptides in *Streptococcus*. *PLoS One.* 11:e0168461.
 34. Kaspar J, Underhill SAM, Shields RC, Reyes A, Rosenzweig S, Hagen SJ, Burne RA. 2017. Intercellular communication via the *comX*-inducing peptide (XIP) of *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 199:1–19.
 35. Hagen SJ, Son M. 2017. Origins of heterogeneity in *Streptococcus mutans* competence: interpreting an environment-sensitive signaling pathway. *Phys Biol.* 14:015001.
 36. Khan R, Rukke H V, Høvik H, Åmdal HA, Chen T, Morrison DA, Petersen FC. 2016. Comprehensive transcriptome profiles of *Streptococcus mutans* UA159 map core streptococcal competence genes. *mSystems.* 1:e00038-15.
 37. Reck M, Tomasch J, Wagner-Döbler I. 2015. The alternative sigma factor SigX controls bacteriocin synthesis and competence, the two quorum sensing regulated traits in *Streptococcus mutans*. *PLoS Genet.* 11:e1005353.
 38. Son M, Ahn SJ, Guo Q, Burne RA, Hagen SJ. 2012. Microfluidic study of competence regulation in *Streptococcus mutans*: Environmental inputs modulate bimodal and unimodal expression of *comX*. *Mol Microbiol.* 86:258–272.
 39. Lemme A, Gröbe L, Reck M, Tomasch J, Wagner-Döbler I. 2011. Subpopulation-specific transcriptome analysis of competence-stimulating-peptide-induced *Streptococcus mutans*. *J Bacteriol.* 193:1863–1877.
 40. Wang C, Hou J, van der Mei HC, Busscher HJ, Ren Y. 2019. Emergent properties in *Streptococcus mutans* biofilms are controlled through adhesion force sensing by initial colonizers. *mBio.* 10:1–13.
 41. Sloan J, Warner TA, Scott PT, Bannam TL, Berryman DI, Rood JI. 1992. Construction of a sequenced *Clostridium perfringens*-*Escherichia coli* shuttle plasmid. *Plasmid.* 27:207–219.
 42. LeBlanc DJ, Lee LN, Abu-Al-Jaibat A. 1992. Molecular, genetic, and functional analysis of the basic replicon of pVA380-1, a plasmid of oral streptococcal origin. *Plasmid.* 28:130–145.
 43. Yamamoto T, Obana N, Yee LM, Asai K, Nomura N, Nakamura K. 2014. SP10 infectivity is

- aborted after bacteriophage SP10 infection induces *nonA* transcription on the prophage SP β region of the *Bacillus subtilis* genome. *J Bacteriol.* 196:693–706.
44. Nakanishi Y, Yamamoto T, Obana N, Toyofuku M, Nomura N, Kaneko A. 2018. Spatial distribution and chemical tolerance of *Streptococcus mutans* within dual-species cariogenic biofilms. *Microbes Environ.* 33:455–458.
 45. Merritt J, Kreth J, Qi F, Sullivan R, Shi W. 2005. Non-disruptive, real-time analyses of the metabolic status and viability of *Streptococcus mutans* cells in response to antimicrobial treatments. *J Microbiol Methods.* 61:161–170.
 46. Kunoh T, Morinaga K, Sugimoto S, Miyazaki S, Toyofuku M, Iwasaki K, Nomura N, Utada AS. 2019. Polyfunctional nanofibril appendages mediate attachment, filamentation, and filament adaptability in *Leptothrix cholodnii*. *ACS Nano.* 14:5288–5297.
 47. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. 2012. NIH image to imageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods.* 9:671–675.
 48. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, Tinevez JY, White DJ, Hartenstein V, Eliceiri K, Tomancak P, Cardona A. 2012. Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods.* 9:676–682.
 49. Dufour D, Lévesque CM. 2013. Cell death of *Streptococcus mutans* induced by a quorum-sensing peptide occurs via a conserved streptococcal autolysin. *J Bacteriol.* 195:105–114.
 50. DiPeso L, Ji DX, Vance RE, Price J V. 2017. Cell death and cell lysis are separable events during pyroptosis. *Cell death Discov.* 3:17070.
 51. Moscoso M, Claverys J-P. 2004. Release of DNA into the medium by competent *Streptococcus pneumoniae*: kinetics, mechanism and stability of the liberated DNA. *Mol Microbiol.* 54:783–794.
 52. Eldholm V, Johnsborg O, Haugen K, Ohnstad HS, Håvarstein LS. 2009. Fratricide in *Streptococcus pneumoniae*: contributions and role of the cell wall hydrolases CbpD, LytA and LytC. *Microbiology.* 155:2223–2234.
 53. Wei H, Håvarstein LS. 2012. Fratricide is essential for efficient gene transfer between pneumococci in biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 78:5897–5905.
 54. Cullin N, Redanz S, Lampi KJ, Merritt J, Kreth J. 2017. Murein hydrolase LytF of *Streptococcus sanguinis* and the ecological consequences of competence development. *Appl Environ Microbiol.* 83:1–15.
 55. Xu Y, Kreth J. 2013. Role of LytF and AtlS in eDNA release by *Streptococcus gordonii*. *PLoS One.* 8:e62339.
 56. Johnsborg O, Eldholm V, Bjørnstad ML, Håvarstein LS. 2008. A predatory mechanism dramatically increases the efficiency of lateral gene transfer in *Streptococcus pneumoniae* and related commensal species. *Mol Microbiol.* 69:245–253.

57. Berg KH, Ohnstad HS, Håvarstein LS. 2012. LytF, a novel competence-regulated murein hydrolase in the genus *Streptococcus*. *J Bacteriol.* 194:627–635.
58. Okinaga T, Xie Z, Niu G, Qi F, Merritt J. 2010. Examination of the *hdrRM* regulon yields insight into the competence system of *Streptococcus mutans*. *Mol Oral Microbiol.* 25:165–177.
59. Hwang G, Liu Y, Kim D, Sun V, Aviles-Reyes A, Kajfasz JK, Lemos JA, Koo H. 2016. Simultaneous spatiotemporal mapping of in situ pH and bacterial activity within an intact 3D microcolony structure. *Sci Rep.* 6:32841.
60. Carniello V, Peterson BW, van der Mei HC, Busscher HJ. 2018. Physico-chemistry from initial bacterial adhesion to surface-programmed biofilm growth. *Adv Colloid Interface Sci.* 261:1–14.
61. Davies DG, Geesey GG. 1995. Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl Environ Microbiol.* 61:860–867.
62. Harapanahalli AK, Chen Y, Li J, Busscher HJ, van der Mei HC. 2015. Influence of adhesion force on *icaA* and *cida* gene expression and production of matrix components in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 81:3369–3378.
63. Jenkinson HF, Demuth DR. 1997. Structure, function and immunogenicity of streptococcal antigen I/II polypeptides. *Mol Microbiol.* 23:183–190.
64. Mieher JL, Larson MR, Schormann N, Purushotham S, Wu R, Rajashankar KR, Wu H, Deivanayagam C. 2018. Glucan binding protein C of *Streptococcus mutans* mediates both sucrose-independent and sucrose-dependent adherence. *Infect Immun.* 86:1–18.
65. Bitoun JP, Liao S, Yao X, Ahn S-J, Isoda R, Nguyen AH, Brady LJ, Burne RA, Abranches J, Wen ZT. 2012. BrpA is involved in regulation of cell envelope stress responses in *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol.* 78:2914–2922.
66. Do H, Makthal N, VanderWal AR, Rettel M, Savitski MM, Peschek N, Papenfort K, Olsen RJ, Musser JM, Kumaraswami M. 2017. Leaderless secreted peptide signaling molecule alters global gene expression and increases virulence of a human bacterial pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 114:E8498–E8507.
67. Prudhomme M, Berge M, Martin B, Polard P. 2016. Pneumococcal competence coordination relies on a cell-contact sensing mechanism. *PLoS Genet.* 12:1–24.
68. Kawarai T, Narisawa N, Suzuki Y, Nagasawa R, Senpuku H. 2016. *Streptococcus mutans* biofilm formation is dependent on extracellular DNA in primary low pH conditions. *J Oral Biosci.* 58:55–61.

謝辞

本研究を遂行するにあたり終始丁寧にご指導いただいた筑波大学生命環境系 野村暢彦教授に心から感謝いたします。

研究の設計からまとめに至るまで多大なご教示をいただきました筑波大学医学医療系トランスボーダー医学研究センター 尾花 望助教に心から感謝、御礼申し上げます。また、平素より貴重なご助言をいただきました筑波大学生命環境系 豊福雅典准教授、Andrew S. Utada 准教授、久能 樹准教授に感謝申し上げます。

筑波大学生命環境系 山本達也博士研究員には、実験操作の細部までご指導いただきました。加えて、技術職員の古川理恵様、ERATO 事務室の皆様には、研究が円滑に進むようご支援賜りました。この場をお借りして厚く御礼申し上げます。

本研究をまとめるにあたり、ご指導いただきました筑波大学生命環境系 中村幸治教授、高谷直樹教授、橋本義輝准教授に深く感謝いたします。

資金面で援助いただきました日本学術振興会特別研究員制度に感謝いたします。

最後に、研究勉学に専念できるよう日頃から支えてくださいました家族に厚く御礼申し上げます。