

氏名	松三 友紀		
学位	博士		
専門分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第4941号		
学位授与の日付	平成26年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)		
学位論文題目	<i>Streptococcus mutans</i> によるバイオフィーム構造決定におけるグルカン結合タンパク A の役割		
学位論文審査委員	大原 直也 教授	前田 博史 准教授	仲野 道代 教授

## 学位論文内容の要旨

### 【目的】

齧蝕病原性細菌 *Streptococcus mutans* の菌体表層には、その病原性に深く関与するタンパク構成成分が存在し、グルコシルトランスフェラーゼ (Glucosyltransferase; GTF) およびグルカン結合タンパク (Glucan binding protein; Gbp) が知られている。

Gbp はこれまでに GbpA, B, C および D の 4 種類が報告されているが、そのうち GbpA は菌体遊離型であり、その欠失変異株では、デキストラン結合能だけでなく、スクロース依存性平滑面付着能の低下が認められることから、*S. mutans* のバイオフィーム形成に深く関与していると考えられている。

本研究では、バイオフィーム形成における GbpA タンパクの果たす役割について Gbp 欠失株を用いて検討した。さらに、GbpA はバイオフィーム形成に深く関わっていると考えられるため、GbpA がバイオフィーム形成に関連する他の表層タンパクの発現に及ぼす影響を分子生物学的手法により検討を行った。

### 【方法】

#### (1) 供試菌株

臨床分離株 *S. mutans* MT8148 株を用い、MT8148 株の GbpA を欠失させた AD1 株、GbpB を欠失させた BD1 株、GbpC を欠失させた CD1 株を使用した。さらに、*S. mutans* UA159 株、NG8 株、および GS5 株も実験に供試し、それぞれの GbpA 欠失株である UA159 AD1 株、NG8 AD1 株、GS5 AD1 株を作製して用いた。

#### (2) バイオフィーム形成量の測定

供試菌を Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地にて培養後、0.25 %スクロースを添加した Todd Hewitt (TH) 培地に希釈し、96 穴平底マイクロタイタープレートに分注して 37°C で 2 日間嫌氣的に培養した。浮遊菌液を取り除き、平底に付着した菌体をクリスタルバイオレット溶液にて染色し、波長 570 nm における吸光度を測定した。

#### (3) バイオフィーム構造の観察

24 穴マルチウェルプレートの各ウェルにガラス製丸型カバーガラスを挿入した。あらかじめ培養した供試菌を各ウェルに分注し、37°C で 2 日間培養した。培養後、カバーガラス上に形成されたバイオフィームを LIVE/DEAD Kit を用いて染色し、共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) にて観察した。

#### (4) GTF の産生量と活性の測定

ウェスタンブロッティングにより、GTF タンパクの発現を視覚化し、発現量を NIH Image により数値化した。また活性染色により、ゲル上に存在する GTFB および GTFC により産生されたグルカンをパラノースアニリン溶液により染色し、染色されたグルカン量を NIH Image により数値化した。

#### (5) *gtf*, *dnaK* および *groEL* 遺伝子の発現

供試菌の全 RNA 抽出を行った後、cDNA を作製した。作製した cDNA を用いて、各遺伝子の発現を Real-time

RT-PCR 法により調べた。

#### (6) 2次元電気泳動

各供試菌より抽出したタンパクを用いて2次元電気泳動を行った。泳動後、銀染色を行いタンパクを可視化した。

#### (7) バイオフィーム中の菌体および菌体外多糖の検出

SYTO 9 green fluorescent nucleic acid stain により菌体を染色し、その後 Alexa Fluor 647-labeled dextran を添加した1%スクロース含有化学合成培地にて菌液を調整した。その菌液をチャンバースライド上で培養した。形成されたバイオフィームを CLSM にて観察した。

#### (8) バイオフィーム破碎試験

マイクロタイタープレート内で形成されたバイオフィームを超音波で破碎した後、破碎された菌体を取り除き、残存した菌体を Trypticase Soy 寒天培地に播種後培養し、培地上のコロニー数を測定した。

#### 【結果および考察】

AD1 株のバイオフィーム形成量は親株のものと比較して差は認められなかったものの、バイオフィーム性状の違いを検討した結果では、親株である MT8148 株と比較して AD1 株では生存菌体の凝集が認められた。そこで AD1 株における *gtf* 遺伝子の発現を調べたところ、親株と比較して *gtfB* 遺伝子の発現の上昇が認められた。同様に、*dnaK*, *groEL* 遺伝子は、AD1 株において親株と比較して発現が上昇していた。また遺伝子の発現の上昇に伴い、GTFB のタンパク発現量の増加が認められた。

共焦点レーザー顕微鏡から得られた像では、親株は均一なバイオフィームが形成され、AD1 株では、菌体外多糖が増加し、粗造で不均一なバイオフィームが形成されていた。また、バイオフィームの粉碎試験では、超音波による破碎後に残存したバイオフィーム中の菌数は、親株と比較して AD1 株で減少しており、AD1 株ではバイオフィーム内における菌体と菌体外多糖との結合力が弱いことが示唆された。

以上の結果より GbpA タンパクの欠失は、バイオフィームの構造に変化をもたらすことが明らかとなった。そして、*S. mutans* の安定で強固なバイオフィームの形成に GbpA が大きく寄与している可能性が示唆された。

## 学位論文審査結果の要旨

齶蝕病原性細菌 *Streptococcus mutans* の菌体表層には、その病原性に深く関与するタンパク構成成分が存在し、グルコシルトランスフェラーゼ (Glucosyltransferase; GTF) およびグルカン結合タンパク (Glucan binding protein; Gbp) が知られている。Gbp はこれまでに GbpA, B, C および D の 4 種類が報告されているが、そのうち GbpA は、GTF によって産生されたグルカンとの結合能を有するだけでなく、GbpA 欠失株ではスクロース依存性平滑面付着能の低下が認められ、*S. mutans* によるバイオフィーム形成に深く関与すると考えられている。

本研究では、バイオフィーム形成における GbpA の果たす役割を Gbp 欠失株を用いて検討した。さらに、GbpA がバイオフィーム形成に深く関わっていると考えられるため、バイオフィーム形成に関連する他の表層タンパクの発現に及ぼす影響を分子生物学的手法により検討を行った。

臨床分離株 *S. mutans* MT8148 株を用い、MT8148 株の各 Gbp をコードする遺伝子中に抗生物質耐性遺伝子カセットを挿入することにより各 Gbp を欠失させた株を作製し、GbpA を欠失させた AD1 株、GbpB を欠失させた BD1 株、および GbpC を欠失させた CD1 株を使用した。さらに、*S. mutans* UA159 株、NG8 株、GS5 株も実験に供試し、それらを親株とした GbpA 欠失株である UA159 AD1 株、NG8 AD1 株、および GS5 AD1 株をそれぞれ作製して用いた。

バイオフィーム形成において、AD1 株のバイオフィーム形成量は親株のものとは差は認められなかったものの、バイオフィームの性状を検討した結果、AD1 株では親株と比較して生存菌体の凝集が認められた。そこで AD1 株における *gtf* の発現を調べたところ、親株と比較して *gtfB* の発現の上昇が認められた。同様に、*dnaK*、*groEL* は、AD1 株において親株と比較して発現が上昇していた。また遺伝子の発現の上昇に伴い、GTFB の発現量の増加が認められた。共焦点レーザー顕微鏡から得られた像では、親株では均一なバイオフィームが形成され、AD1 株では、菌体外多糖が増加し、粗造で不均一なバイオフィームが形成されていた。また、バイオフィームの粉碎試験では、超音波による破碎後に残存したバイオフィーム中の菌数は、親株と比較して AD1 株で減少しており、AD1 株ではバイオフィーム内における菌体と菌体外多糖との結合力が弱いことが示唆された。

以上の結果より GbpA の欠失は、バイオフィームの構造に変化をもたらすことが明らかとなった。そして、*S. mutans* の安定で強固なバイオフィームの形成に GbpA が大きく寄与している可能性が示唆された。

本論文は、口腔内のバイオフィーム形成のメカニズムを解明する上で、重要な知見である。よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。