

氏 名	松岡 大貴
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第7033号
学位授与の日付	令和6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 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Cnm of <i>Streptococcus mutans</i> is important for cell surface structure and membrane permeability (<i>Streptococcus mutans</i> の Cnm は細胞表面構造と膜透過性に重要である)
論文審査委員	大原 直也 教授 高柴 正悟 教授 江草 正彦 教授

学位論文内容の要旨

【目的】

齲蝕の主要な病原細菌である *Streptococcus mutans* は、グルカン合成酵素（Glucosyltransferases : GTFs）、グルカン結合タンパク（Glucan-binding proteins : Gbps）およびコラーゲン結合タンパク（Cnm）を保有している。GTFs および Gbps は菌体の凝集と歯面への付着力を高め、バイオフィルムの形成に重要な役割を担っている。一方、Cnm は感染性心内膜炎などの全身疾患の発症や病態の増悪化に関与していることが報告されている。また、*S. mutans* の細胞膜には多くの膜輸送体が存在し、様々な分子の菌体内外の輸出入に関与しており、これらの菌体表面タンパクや膜輸送体の発現の変化は、付着力やバイオフィルム形成の障害に加え、*S. mutans* の病原性に変化を引き起こす可能性がある。本研究では、IgA 腎症患者由来の Cnm 陽性 *S. mutans* 株を用いて Cnm の局在と機能の解析を行い、Cnm がどのように *S. mutans* の病原性に関与するかを検討した。

【方法】

(1) 供試菌の由来

重症 IgA 腎症患者（60 歳、男性）の唾液から分離した Cnm 陽性 *S. mutans* SN74 株を用いた。

(2) *cnm* の変異株の作製

Polymerase Chain Reaction (PCR) 法にて増幅した *cnm* を pGEMT-Easy Vector に挿入したプラスミドを作製し、エリスロマイシン耐性カセット遺伝子を *cnm* の中央付近に挿入したプラスミドを作製した。これを制限酵素 *Pst*I で切断した後、*S. mutans* SN74 株に形質転換して相同組換えにより *cnm* 遺伝子破壊株を作製した。さらに、PCR 法で増幅した *cnm* をシャトルベクター pDL278 に挿入して作製したプラスミドを遺伝子破壊株に形質導入することによって *cnm* 相補株を作製した。

(3) 抗 Cnm 抗血清の調製

S. mutans TW871 株の *cnm* を PCR 法にて増幅し、大腸菌発現ベクター pGEX6p-1[®] に挿入した後、*Escherichia coli* BL21 株に形質転換した。大量培養し、集菌後、リン酸緩衝生理食塩水を添加し、超音波破碎した。遠心分離後、グルタチオンセファロース 4B カラムで精製し、組換え体 Cnm (rCnm) を得た。また、精製した rCnm に Titer-Max Gold[®] を加えて乳化し、2 週間毎に 4 回、ウサギ (New Zealand White、

雌) の筋肉内に注射した。8 週間後に採血し、血清を分離して抗 Cnm 抗血清を得た。

(4) Cnm の局在の解析

各供試菌を培養後、集菌し、グルタルアルデヒドで固定した。t-ブチルアルコール添加後、凍結乾燥し、走査型電子顕微鏡 (SEM) にて観察した。さらに、各供試菌を培養後、集菌し、パラホルムアルデヒドで固定した。抗 Cnm 抗血清と反応後、ヤギ抗ウサギ IgG 抗体と結合させた金コロイドを添加した。洗浄後、グルタルアルデヒドで固定し、透過型電子顕微鏡 (TEM) にて観察した。

(5) 遺伝子発現の解析

各供試菌から通法を用いて RNA を抽出し、cDNA ライブラリを作製後、*S. mutans* UA159 株の既知の配列をもとにマッピングして、RNA シークエンスによって各遺伝子の発現量を定量化した。さらに、各供試菌から得られた RNA を用いて、逆転写にて cDNA を合成し、各供試菌のバイオフィーム関連遺伝子の発現量をリアルタイム RT-PCR 法で測定した。

(6) 膜透過性と抗菌薬耐性の解析

膜透過性を測定するために、各供試菌を培養後、集菌し、波長 600 nm での吸光度が 0.2 となるように調製した。細胞膜染色用蛍光プローブである 2-N-フェニルアミノナフタレン (NPN) 添加後、遠心分離し、96 穴プレートの各ウェルに分注した後、励起波長 355 nm、蛍光波長 460 nm で脂質二重層に取り込まれた NPN の蛍光強度を測定した。また、各供試菌の最小発育阻止濃度 (MIC) の測定は、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) 標準法に基づいて行った。

(7) バイオフィームの形成量と構造の解析

バイオフィームの形成量を測定するために、各供試菌を培養後、0.1%スクロース含有 Todd-Hewitt 培地に添加し、96 穴プレートの各ウェルに分注した。37°C で 48 時間嫌気培養して染色後、洗浄、固定し、波長 570 nm での吸光度を測定した。また、バイオフィームの構造解析のために、各供試菌をヨウ化ヘキシジウムで染色し、0.5%スクロース含有化学合成培地にて濁度を調製した。チャンバースライドの各ウェルに播種し、24 時間培養した後、共焦点レーザー顕微鏡でバイオフィームの構造を観察した。ImageJ® を用いて断面の赤色面積を数値化し、評価した。

【結果】

(1) Cnm の局在

SEM 画像では、SN74 株および相補株では表層に突起様構造を観察できたが、遺伝子破壊株では消失していた。TEM 画像では、SN74 株および相補株の表層には金コロイド粒子が沈着しており、遺伝子破壊株では沈着していなかった。

(2) *cnm* が関連する発現遺伝子

遺伝子破壊株では SN74 株に対して、細胞表層タンパクをコードする遺伝子では、*gtfB*、*gtfC*、*gbpC* の発現量が増加しており、*gtfD*、*gbpB* の発現量が減少していた。また、膜輸送体関連遺伝子では、*ptnC*、*malG*、*mtlA1* の発現量が増加しており、*comF*、*comYB*、*ptcB* の発現量が減少していた。さらに、リアルタイム RT-PCR では遺伝子破壊株のバイオフィーム関連遺伝子の発現量は SN74 株と比較して、*gtfB*、*gtfC*、*gbpC* の発現量が増加し、*gtfD*、*gbpA*、*gbpB* の発現量が減少していた。

(3) 膜透過性と抗菌薬耐性の関連

膜透過性試験において、遺伝子破壊株では SN74 株および相補株と比較して蛍光強度が減少しており、膜透過性が低下していた。また、遺伝子破壊株の MIC 値は SN74 株および相補株と比較して、ドリペネ

ム、オフロキサシンで高値を示し、バシトラシン、クロラムフェニコールにおいて低値となっていた。

(4) バイオフィーム形成への *cnm* の影響

遺伝子破壊株では、SN74 株および相補株と比較して、バイオフィーム形成量は増加しており、バイオフィームの構造は、密度が低下し、疎な構造となり、凝集塊が形成されていた。

【考察】

本研究の結果から、Cnm は菌体表層全体に突起様に存在し、Cnm の発現量の変化は他の菌体表層タンパクの発現量を変化させ、菌の表層構造に変化を及ぼす可能性が示された。また Cnm の発現量の変化は、膜輸送体関連遺伝子の発現量、膜輸送体における分子の輸送、そして各種抗菌薬に対する感受性に影響を及ぼすことが明らかとなった。以上のことから、Cnm が *S. mutans* のバイオフィーム形成を含む病原性に関与している可能性が示された。

論文審査結果の要旨

【緒言】齲蝕の主要な病原細菌である *Streptococcus mutans* は、グルカン合成酵素 (Glucosyltransferases: GTFs)、グルカン結合タンパク (Glucan-binding proteins: Gbps) およびコラーゲン結合タンパク (Cnm) を保有している。菌体表層におけるこれらのタンパクや膜輸送体に関連する遺伝子の発現の変化は、付着力やバイオフィーム形成の障害に加え、*S. mutans* の病原性の変化を引き起こす可能性がある。本研究では、IgA 腎症患者由来の Cnm 陽性 *S. mutans* 株を用いて Cnm の局在と機能の解析を行い、Cnm がどのように *S. mutans* の病原性に関与するかを検討した。

【方法】重症 IgA 腎症患者 (60 歳、男性) の唾液から分離した Cnm 陽性 *S. mutans* SN74 株を使用し、*cnm* 遺伝子破壊株を作製し、作製した遺伝子破壊株を用いて、*cnm* 相補株を作製した。さらに、*S. mutans* TW871 株の *cnm* から組換え体 Cnm (rCnm) を作製し、得られた rCnm を用いて抗 Cnm 抗血清の作製を行った。まず、菌体表層を走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した。次に、金コロイド法を用いた透過型電子顕微鏡 (TEM) で Cnm の局在を調べた。また、RNA シークエンスにて各菌株の遺伝子の発現状況を解析し、リアルタイム RT-PCR にてバイオフィーム関連遺伝子の発現を定量、比較した。さらに細胞膜染色用蛍光プローブである 2-N-フェニルアミノナフタレンを用いた膜透過性試験、最小発育阻止濃度 (MIC)、バイオフィームの形成量およびバイオフィームの構造について検討した。

【結果】SEM 画像では、SN74 株および相補株では表層に突起様構造が観察されたが、遺伝子破壊株では消失していた。TEM 画像では、SN74 株および相補株の表層には金コロイド粒子が沈着しており、遺伝子破壊株ではしていなかった。RNA シークエンスにて SN74 株と遺伝子破壊株の遺伝子発現量を比較したところ、遺伝子破壊株では SN74 株に対して、バイオフィームの形成に関与する細胞表層タンパクをコードする遺伝子および膜輸送体関連遺伝子の発現量が変化していた。バイオフィーム関連遺伝子の発現量をリアルタイム RT-PCR により確認したところ、遺伝子破壊株では SN74 株と比較して、*gtfB*、*gtfC*、*gbpC* の発現量が増加し、*gtfD*、*gbpA*、*gbpB* の発現量が減少していた。膜透過性試験では、遺伝子破壊株は SN74 株および相補株と比較して蛍光強度が低下していた。MIC の検討では、遺伝子破壊株では SN74 株および相補株と比較して一部の抗菌薬への耐性が変化していた。さらに、バイオフィームの形成量は、遺伝子破壊株では SN74 株および相補株と比較して増加していた。また、バイオフィームの構造は、遺伝子破壊株では SN74 株および相補株と比較して密度が低下し、疎な構造となり、凝集塊が形成されていた。

【考察】Cnm は *S. mutans* の菌体表層全体に突起様に存在し、Cnm の発現量の変化は他の菌体表層タンパクの発現量を変化させ、菌の表層構造に変化を及ぼす可能性が示された。また、Cnm の発現量の変化は、膜輸送体関連遺伝子の発現量、膜輸送体における分子の輸送、そして各種抗菌薬に対する感受性に影響を及ぼすことが明らかとなった。以上のことから Cnm が *S. mutans* のバイオフィーム形成を含む病原性に関与している可能性が示された。

本研究の結果は、*S. mutans* の持つ病原性に対する Cnm の寄与を明らかにするための重要な知見と考えられる。本論文は、すでに *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* に掲載されており、国際的にも評価されている。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。