

指導教授氏名	指導役割
(自署)	研究の総括指導
(自署)	
(自署)	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

教育研究分野 小児歯科学分野	身分 大学院生	氏名 松浦 沙久矢
論文題名 <i>Streptococcus mutans</i> のバイオフィーム形成における ABC トランスポーターの関与		
論文内容の要旨 (2000字程度) 【目的】 齲蝕病原性細菌 <i>Streptococcus mutans</i> は、口腔内にスクロースが存在すると菌の保有する表層タンパクの働きにより、歯面に強固に付着し菌体外マトリックスを生成し、デンタルプラークであるバイオフィームを形成する。一般的にバイオフィームの形成は、環境ストレス因子に応答した浮遊性細菌と歯面との相互作用によって開始され、そのメカニズムは ATP 結合カセット (ABC) トランスポーターが関与していると考えられている。しかしながら、そのメカニズムの詳細は明らかでない。本研究では、ABC トランスポーター関連遺伝子である <i>SMU922</i> を抽出し、 <i>SMU922</i> 欠失変異株 (<i>Δ922</i> 株) を作製することにより、 <i>SMU922</i> のバイオフィーム形成への関与を検討した。 【方法】 1. 供試菌：日本人小児由来の <i>S. mutans</i> MT8148 株 (血清型 c) を実験に用いた。 2. RNA シーケシング解析 供試菌を Todd-Hewitt (TH) 液体培地に接種し、6穴マイクロタイタープレートの各ウェルに分注し、37°C で 24時間培養後、上清中の浮遊菌を採取した。底面に形成されたバイオフィームをセルスクレーパーにて剥離し、バイオフィーム形成菌を採取した。RNA 抽出後、精製した RNA の断片化を行い、mRNA から cDNA ライブラリーを作製した。次にディープシーケンシングを行い、 <i>S. mutans</i> UA159 株の既知の配列をもとにしたマッピングにより、遺伝子の発現状況を確認した。 3. <i>SMU922</i> 欠失変異株の作製 <i>SMU922</i> をコードする DNA 断片を PCR により増幅し、pGEM®-T Easy Vector に挿入した。得られたプラスミドを制限酵素 KpnI で消化し、 <i>SMU922</i> の遺伝子配列の中央付近にエリスロマイシン耐性カセットを挿入し、制限酵素 SalI で直鎖化した後、 <i>S. mutans</i> MT8148 に形質転換し、 <i>Δ922</i> 株を得た。 4. 増殖能試験 <i>S. mutans</i> MT8148 株および <i>Δ922</i> 株を 10 mL の TH 液体培地に接種し、37°C で 18時間培養し、新たな TH 培地に継代した。増殖の指標として、各培養液の波長 600 nm における光学濃度を 1時間毎に 15時間測定した。 5. バイオフィーム形成量の定量化 TH 液体培地で 37°C で 18時間培養した MT8148 株と <i>Δ922</i> 株を 0.5% または 1% スクロースを含む化学合成培地に懸濁し、96穴ポリスチレン製マイクロタイタープレートに分注した。そして 37°C で 48時間嫌気培養後、上清を除去し Milli-Q で 6回洗浄した。1% クリスタルバイオレットで染色し、Milli-Q で洗浄し 570 nm の吸光度を測定した。		

6. バイオフィーム構造および菌体外多糖の観察

ヘキシジウムイオダイドを用いて染色した MT8148 株および 4922 株を 0.1%、0.25%、および 0.5% のスクロース含有化学合成培地に懸濁し、この菌液を 25% ヒト唾液タンパクでコーティングしたチャンパースライドに分注し、嫌気下で 37°C で 18時間培養した。底面に形成されたバイオフィームを共焦点走査型レーザー顕微鏡にて観察し、ImageJ® を用いて密度を算定した。また、MT8148 株および 4922 株を SYTO® 9 green fluorescent nucleic acid で染色した後、蛍光プローブ Alexa Fluor® 647 を加えた 0.1%、0.25%、および 0.5% スクロース含有化学合成培地にて培養し、形成されたバイオフィームを共焦点走査型レーザー顕微鏡にて観察した。

7. バイオフィーム中の菌体間結合力の評価

MT8148 株と 4922 株を 0.5% または 1.0% のスクロースを含む TH液体培地に接種し、24穴マイクロタイタープレートの各ウェルに分注し、37°C で 24時間培養した。形成されたバイオフィームを超音波破砕機で超音波処理し、浮遊菌を除去後、底面に残ったバイオフィームをクリスタルバイオレット溶液にて染色し、吸光度 570 nm で測定した。

【結果】

バイオフィーム形成菌と浮遊菌における遺伝子発現を RNAシーケシング解析により比較した。バイオフィーム形成菌では、ABCトランスポーター関連遺伝子である SMU922の発現が上昇していた。そこで 4922 株を作製し、その機能を検討した。増殖能では MT8148 株との間に有意な差は認めなかった。一方、スクロース添加条件下では 4922 株のバイオフィーム形成量が有意に減少していた。共焦点走査型レーザー顕微鏡画像より、4922 株によって形成されたバイオフィームの構造は、MT8148株によって形成されたバイオフィームと比較して、密度と厚みが減少していることが明らかになった。さらに、4922 株ではバイオフィーム中のグルカン量が MT8148 株のものと比較して減少していた。また、超音波処理後の4922 株のバイオフィーム残存量は MT8148 株と比較して減少していた。

【考察】

SMU922 を欠失した株では MT8148 株と比較し、バイオフィームの形成量が減少し、密度と菌体間結合力も低下していたことから、物理的強度が低下していると考えられた。これらの結果は、ABC トランスポーターがバイオフィーム形成および維持に関与していることを示唆している。