

氏 名	柳田 可奈子
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5134号
学位授与の日付	平成27年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合学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	<i>Streptococcus mutans</i> グルカン結合タンパク B の発現に影響を与える 形態決定遺伝子の機能解析
論文審査委員	大原 直也 教授 高柴 正悟 教授 仲野 道代 教授

学位論文内容の要旨

【目的】

齲蝕病原性細菌 *Streptococcus mutans* の菌体表層には、グルカン結合タンパク (Glucan-binding protein ; Gbp) が存在し、齲蝕の発生と強く関与している。そのうち、グルカン結合タンパク B (GbpB) は、細胞の分裂や維持に関係していることが示されている。これまでに他のグラム陽性細菌において、細胞分裂には形態決定遺伝子が関与していることが報告されている。本研究では、*S. mutans* の全遺伝子配列において、GbpB をコードする *gbpB* の上流に存在する形態決定遺伝子 *mreC* および *mreD* を抽出し、これらの遺伝子の *gbpB* の発現への影響および細胞分裂ならびに形態決定への関与について検討を行った。

【方法】

(1) 供試菌株

S. mutans MT8148 株, GS5 株, および小児の口腔内から分離された臨床分離株を用いた。また、GS5 株の *MreC* を欠失させた GPEC 株 ($\Delta mreC$ 株) および *MreD* を欠失させた GPKD 株 ($\Delta mreD$ 株) を作製し、実験に供試した。

(2) GbpB の発現様式別に比較した *mreC* および *mreD* の発現量

抗 GbpB 抗体を用いたウェスタンブロット法で、1 本のバンドが検出される S type, 数本のバンドが検出される M type, および上清にバンドが検出される N type の 3 タイプからそれぞれ 15 株ずつランダムに選択した。これらの供試菌を Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地にて培養後、全 RNA を抽出した。逆転写反応を行い作製した cDNA を用いて、Real-time PCR 法を行い、各臨床分離株における *mreC* および *mreD* の発現量を MT8148 株と比較した。

(3) 増殖速度

供試菌を Todd Hewitt (TH) 液体培地を用いて培養後、菌液を 1/100 量になるように TH 液体培地に継代した。波長 570 nm で菌液の濁度を 1 時間毎に経時的に測定した。

(4) レンサの長さ

供試菌を TH 液体培地で 18 時間培養後、スライドガラスに塗抹し、メタノールで固定した後、ギムザ染色を行い生物顕微鏡下にて観察した。

(5) コロニー形態の観察

供試菌を BHI 液体培地で培養後、Mitis-Salivarius 寒天培地にそれぞれ播種した。37℃, 2 日間嫌氣的に培養後、実体顕微鏡下にてコロニー形態を観察した。

(6) オペロンの解析

GS5 株から抽出した全 RNA を電気泳動し、メンブレンに転写した。固定後、PCR DIG Probe Synthesis Kit®を用いて作製した *mreC* および *gbpB* の一部と相補的な DNA プローブを用いて、55℃で一晩ハイブリダイゼーション後、免疫検出を行い、 α 線フィルムに露光させた。

(7) 各欠失変異株における *mreC*, *mreD* および *gbpB* の発現量

各供試菌の cDNA を鋳型として、各遺伝子の発現量を Real-Time RT-PCR 法により比較した。

(8) バイオフィーム形成量の測定

培養した供試菌液を 0.1%および 0.25%スクロース添加した TH 液体培地に播種し、96 穴細胞培養用マイクロタイタープレートの各ウェルに分注して、37℃で 2 日間嫌氣的に培養した。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、バイオフィーム形成量とした。

【結果および考察】

GbpB は、臨床分離株において、発現様式にバリエーションが存在し、その発現様式の変化が齶蝕原性に影響を与える可能性が示唆されている。本研究では GbpB の発現様式が異なる臨床分離株において、*mreCD* の発現量に差が認められた。このことより、*mreC* および *mreD* の発現が、GbpB の発現様式の違いに関与している可能性が示唆される。そこで、 $\Delta mreC$ 株および $\Delta mreD$ 株を作製し、それらを用いて実験を行ったところ、 $\Delta mreC$ 株では、増殖速度の遅延、コロニー形態の変化および長鎖の形成が認められた。 $\square$ これらは、GbpB 欠失変異株においても同様に認められることから、*mreC* の発現が *gbpB* の発現に直接的に影響を及ぼしている可能性が示唆される。また、転写分析により、*gbpB* 単独と、*mreC*, *mreD* および *gbpB* の 3 つの遺伝子で 1 つのオペロンを形成するものが検出されたため、それらの遺伝子の転写が安定していないことが示唆される。一方で、*mreC* は $\square$ $\Delta mreD$ において発現が増加し、*mreD* は $\square$ $\Delta mreC$ において発現が増加したことから、*mreC* と $\square mreD$ は相補的に発現を調節していることが示唆された。さらに $\Delta mreD$ では、スクロース依存的にバイオフィーム形成量が減少したことから、*mreD* は *gbpB* の遺伝子発現より、むしろ GbpB タンパクの表現型に影響を及ぼす可能性を示唆している。以上の結果より、*mreC* および *mreD* は、GbpB の遺伝子レベルでの発現制御およびタンパク発現に大きく関与することが明らかとなった。さらに *mreC* および $\square$ *mreD* の発現は、*gbpB* 遺伝子と同様に菌の増殖および細胞分裂に関与し、*S. mutans* のバイオフィーム形成に大きな影響を与える因子であることが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

齧蝕病原性細菌である *Streptococcus mutans* の菌体表層に存在する主なタンパクとして、グルカン合成酵素 (Glucosyltransferase : GTF) およびグルカン結合タンパク (Glucan-binding protein : Gbp) が存在する。Gbp は、GTF によって産生されたグルカンとの結合能を有し、*S. mutans* によって産生されるバイオフィルムの堆積に深く関与すると考えられている。Gbp はこれまでに GbpA, B, C, さらに D の 4 種類が報告されているが、GbpB は、他の Gbp とは生物学および免疫学的に異なり、細胞の分裂や維持に関係していることが示されている。また、他のグラム陽性細菌において、細胞分裂には形態決定遺伝子が関与していることが報告されている。

本研究の目的は、*S. mutans* のゲノムにおいて、GbpB をコードする *gbpB* の上流に存在する形態決定遺伝子のホモログである *mreC* および *mreD* を抽出し、*mreC*, *mreD*, そして *gbpB* の転写様式を明らかにするとともに、これらの遺伝子がコードする MreC および MreD の機能、さらに GbpB 産生に対する関与を明らかにすることである。

S. mutans の臨床分離株では GbpB の産生様式が多様であり、その差が齧蝕原性に影響を与える可能性が示唆されている。本研究で用いた GbpB の産生様式が異なる臨床分離株間で、*mreC* および *mreD* の発現量に差があった。このことから、*mreC* および *mreD* の発現が、GbpB 産生における多様性に関与する可能性が示唆された。そこで、これら遺伝子の挿入変異株 ($\Delta mreC$ 株, $\Delta mreD$ 株, および $\Delta mreCD$ 株) を作製し、増殖を調べたところ、 $\Delta mreC$ 株では、増殖速度が遅延し ($p < 0.001$)、コロニー性状が変化し、さらに菌体の連鎖が長鎖化した。これらは、GbpB 欠失変異株においても同様の性状が示されたことから、*mreC* の発現が GbpB の産生に直接的に影響を及ぼしている可能性が示唆された。なお、 $\Delta mreC$ 株では、*gbpB* の発現は低下した ($p < 0.01$)。一方で、転写分析によって GbpB をコードする mRNA は、*gbpB* 単独と、*mreC*, *mreD*, さらに *gbpB* の 3 つの遺伝子で 1 つのオペロンを形成している可能性が示唆された。

また、 $\Delta mreD$ 株ではバイオフィルム形成量が、スクロースの濃度依存的に減少した ($p < 0.01$)。さらに、抗 GbpB 抗体を用いたウェスタンブロット解析では、 $\Delta mreC$ 株, $\Delta mreD$ 株, そして $\Delta mreCD$ 株間で GTFB と GTFC のタンパク量が異なり、 $\Delta mreD$ では GTFB 量が増加する傾向にあった。これらの結果から、*mreC* および *mreD* が関連しながら GTF の産生に影響を与える可能性が示唆された。

以上の結果から、*S. mutans* の GbpB 産生には *mreC* および *mreD* が関与していることが示された。さらに、*mreC* および *mreD* の発現は、GTF の産生に関与し、*S. mutans* のバイオフィルム形成に影響を与える因子の 1 つであることが明らかとなった。

本論文は、口腔内のバイオフィル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。