

氏名	森川 優子
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5330号
学位授与の日付	平成28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	口腔バイオフィーム形成における <i>Streptococcus mutans</i> グルタミン代謝 関連遺伝子の機能とその役割の解明
論文審査委員	大原 直也 教授 友藤 孝明 准教授 仲野 道代 教授

学位論文内容の要旨

【目的】

ヒト齲蝕の主要な病原性細菌 *Streptococcus mutans* は、口腔内のバイオフィーム形成において重要な役割を担うことが知られている。この菌の細胞膜には、膜輸送体と呼ばれる膜タンパク質が存在し、これらを介して、栄養素の取り込みや不要物の排出などを行っている。さらに、ABC 膜輸送体の1つであるアンモニア輸送体がバイオフィームの形成中の菌の生育に関連していることがこれまでに報告されている。本研究では、*S. mutans* の ABC 膜輸送体タンパク遺伝子からグルタミン膜輸送体と推定される遺伝子 *SMu0732 (glnP)* について機能解析を行い、バイオフィーム形成への関与を検討した。

【方法】

(1) 供試菌株

S. mutans MT8148 株、*glnP* 遺伝子にエリスロマイシン耐性遺伝子を挿入することにより *glnP* を欠失させた *glnP* 欠失変異株 (GEMR 株)、および GEMR 株において *glnP* 遺伝子の発現を回復させた相補株 (comp-GEMR 株) を使用した。

(2) オペロンの解析

S. mutans UA159 株の全アミノ酸配列のデータベースから細胞膜輸送に関連するグルタミン ABC トランスポーター (*glnP*) と推定される遺伝子 *SMu0732* を抽出した。ノーザンブロットイングおよび Polymerase chain reaction (PCR) アッセイを用いて *glnP* 遺伝子のオペロンを調べた。

(3) *SMu0731* および *glnP* 遺伝子の発現

供試菌を低濃度のグルタミン添加あるいは無添加の Todd Hewitt (TH) 液体培地で培養後、全 RNA を回収し cDNA を得た。得られた cDNA を用いて、作製した各株における *SMu0731* および *glnP* の発現を Real-time qRT-PCR 法によって比較した。

(4) 増殖能の比較

培養した供試菌液を 1/100 量になるように最終濃度 10 mM のグルタミンを添加あるいは無添加の TH 液体培地に播種し、波長 600 nm の吸光度を、1 時間毎に経時的に測定した。

(5) 細胞膜輸送解析

供試菌を 37°C で対数増殖期初期まで培養した。遠心分離により得られた菌体を塩化ナトリウムリン酸緩衝液に懸濁し、遠心分離にて菌体を回収し、蛍光プローブ N-Phenyl-1-naphthylamine と反応させた。その後、遠心分離し、上清を取り除いた。反応後の菌体は同緩衝液で 2 回洗浄し、96 穴蛍光測定用プレートに分注し、蛍光偏光度を、励起光 355 nm/ 蛍光 460 nm で測定した。

(6) バイオフィーム構造の観察

培養した供試菌を TH 液体培地で 37°C、18 時間培養後、遠心分離により菌体を回収し、ヘキシジウムイオジンにより菌体を染色した。その後、0.5% スクロース含有化学合成培地にて、菌液を波長 600 nm が 0.1 になるように調整した。

この菌液を 8 穴 Lab-Tek チャンバースライドシステムの各ウェルに 200 μ l ずつ播種し、嫌気下で、37°C、24 時間培養した。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 により、バイオフィームの構造を解析した。

(7) バイオフィーム破碎試験

6 穴細胞培養用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 寒天培地に播種して培養し、培地上のコロニー数を測定した。

【結果および考察】

SMu0731 と *glnP* がオペロンとして機能することが明らかとなった。さらに *SMu0731* の発現は GEMR 株で減少が認められ、一方で *comp-GEMR* 株では発現が戻っていた。このことから *glnP* 遺伝子の欠失は *SMu0731* 遺伝子の発現に影響を与えることがわかった。また、MT8148 株およびグルタミンを添加した TH 液体培地で培養した各株における *SMu0731* および *glnP* の発現を Real-time qRT-PCR 法によって比較したところ、グルタミンを添加した TH 液体培地で培養した MT8148 株における *SMu0731* および *glnP* の発現量は有意に上昇した。

増殖能の比較において MT8148 株および *comp-GEMR* 株ではグルタミンを添加すると対数増殖期において有意に増殖速度が減少したが GEMR 株においてはグルタミンを添加した場合と無添加の場合ではほとんど変化がみられなかった。

細胞膜輸送解析において、蛍光プローブの濃度が 10 μ g/ml の場合、MT8148 株と *comp-GEMR* 株と比較して、GEMR 株の蛍光偏光度は有意に低下した。

バイオフィーム構造において MT8148 株および *comp-GEMR* 株と比較すると GEMR 株のバイオフィーム構造は粗造であり、密度は粗であった。

菌体間結合力において MT8148 株および *comp-GEMR* 株と比較すると GEMR 株では検出されたコロニーの数が少なく、菌体間結合力が弱いことがわかった。

以上の結果より、*S. mutans* の *glnP* 遺伝子は菌の増殖、菌体内へのグルタミン輸送に関与し、バイオフィーム形成に重要な役割を果たすことが示唆された。今後は *GlnP* をはじめとする ABC トランスポーターのバイオフィームの形成メカニズムについて検討していく予定である。

論文審査結果の要旨

ヒト齲蝕の主要な病原性細菌 *Streptococcus mutans* は、口腔内のバイオフィーム形成において重要な役割を担うことが知られている。この菌の細胞膜には、膜輸送体と呼ばれる膜タンパク質が存在し、これらを介して、栄養素の取り込みや不要物の排出などを行っている。これまでに、ABC 膜輸送体の1つであるアンモニア輸送体がバイオフィーム形成中の菌の生育に関連していることが報告されている。本研究では、*S. mutans* の ABC 膜輸送体のうち、グルタミン輸送体をコードすると推定される遺伝子 *SMu0732 (glnP)* について機能解析を行い、バイオフィーム形成への関与を検討した。

ゲノムデータベースに登録されている *S. mutans* UA159 株のゲノム配列から細胞膜輸送に関連するグルタミン ABC 輸送体 (*glnP*) と推定される遺伝子 *SMu0732* を抽出した。臨床分離株 *S. mutans* MT8148 株のゲノム上の *glnP* にエリスロマイシン耐性遺伝子を挿入することにより *glnP* を破壊した *glnP* 挿入変異株 (GEMR 株)、およびシャトルベクター pDL278 を用いて GEMR 株において *glnP* の発現を回復させた相補株 (comp-GEMR 株) を作製し、実験を行った。

ノーザンブロッティングおよび Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) 法により、*SMu0731* と *glnP* がオペロンを形成していることが明らかとなった。さらに *SMu0731* の転写量は GEMR 株で減少し、comp-GEMR 株では転写量が復帰していた。このことから *glnP* の破壊は *SMu0731* の転写に影響を与えることが明らかとなった。また、MT8148 株およびグルタミンを添加した TH 液体培地で培養した各株における *SMu0731* および *glnP* の転写量を Real-time quantitative RT-PCR 法によって比較したところ、グルタミン添加 TH 液体培地で培養した MT8148 株における *SMu0731* および *glnP* の転写量は、グルタミン非添加 TH 液体培地で培養した場合、あるいは他の株に比し有意に高かった。MT8148 株および comp-GEMR 株ではグルタミンの添加により対数増殖期における増殖速度が有意に減少したが、GEMR 株においてはグルタミン添加の有無で差は認められなかった。細胞膜輸送解析においては、蛍光プローブの濃度が 10 $\mu\text{g/ml}$ の場合、MT8148 株および comp-GEMR 株と比較して、GEMR 株の蛍光偏光度は有意に低下した。また、MT8148 株および comp-GEMR 株と比較すると GEMR 株のバイオフィーム構造は粗造であり、密度は低かった。さらに、バイオフィームを超音波により破碎した場合、MT8148 株および comp-GEMR 株と比較すると GEMR 株では残存した菌数が少なかったことから、GEMR 株によるバイオフィームは、容易に剥離されることが明らかとなった。

以上の結果より、*S. mutans* の *glnP* は菌の増殖および菌体内へのグルタミン輸送に関与し、さらにバイオフィームの形成にも関与することが示唆された。

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。