

ABC 膜輸送体の口腔バイオフィーム形成における機能解析
Functional analysis of ABC transporter in oral biofilm formation

○後藤 花奈, 仲野 道代
Kana Goto, Michiyo Matsumoto-Nakano

(岡大・医歯薬・小児歯)
Dep. Pediatric Dent., Okayama Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Pharm.

【目的】

Streptococcus mutans は、菌体表層に発現する病原性の高いタンパクにより口腔内のバイオフィームを形成する。*S. mutans* は、環境に応じて様々なタンパクを菌体表層に発現させることにより、あらゆる環境に対応し生育し続け、バイオフィームを形成し続けることが可能である。これらのタンパクの1つに ABC トランスポーターがあり、必要な栄養の取り込み、不要な物質の侵入 阻害と排出などの機能を発揮し、強固なバイオフィームを形成し続けることを可能にしている。本研究では、*S. mutans* のバイオフィーム形成に 関与すると推測される ABC 膜輸送体をコードする *SMU_1519* および *SMU_1521* の機能解析を行った。

【対象と方法】

1. 欠失変異株の作製: *S. mutans* UA159 株のデータベースから、バイオフィーム形成に関連すると推定される ABC 膜輸送体をコードする *SMU_1519* および *SMU_1521* を抽出した。それぞれの遺伝子上流および下流領域、スペクチノマイシンまたはカナマイシン耐性カセット断片を PCR にて増幅した。オーバーラップ PCR で 3 つの DNA 断片を連結させ、精製した。PCR 産物を MT8148 株に形質転換することにより *SMU_1519* 欠失変異株 ($\Delta 1519$ 株) および *SMU_1521* 欠失変異株 ($\Delta 1521$ 株) を作製し、実験に供試した。

2. 遺伝子発現量の解析

MT8148 株に硫酸亜鉛七水和物を添加または非添加し、対数増殖期まで培養した後、全 RNA 抽出を行った。DNase 処理後、cDNA 合成を行い、*SMU_1519* および *SMU_1521* 特異的プライマーを用いて、各遺伝子の発現を Real-time RT-PCR 法を用いて確認した。

3. 硫酸亜鉛七水和物存在下における細胞生存率

MT8148 株、 $\Delta 1519$ 株および $\Delta 1521$ 株を 37°C で 18 時間培養後、遠心分離を行い菌体を回収した。

0~250 μM の硫酸亜鉛七水和物を添加した 1% スクロース含有化学合成培地で菌体を懸濁し、吸光度 600 nm が 0.02 となるよう調整した。次いで、25% ヒト唾液でコーティングしたチャンバースライドに調整した菌液を分注し、嫌気条件下で 18 時間、37°C で培養した。Hank 平衡塩類溶液 (HBSS) で洗浄を行った後、LIVE/DEAD® Bac Light™ Bacterial Viability Kit を使用して、生細胞を SYTO9®、死細胞を Propidium iodide で染色し、遮光で 15 分静置した。HBSS で洗浄を行い、4% グルタルアルデヒドで固定した後、蛍光顕微鏡で観察し、ImageJ にて生存率を解析した。

【結果】

硫酸亜鉛七水和物を添加した場合では、*SMU_1519* および *SMU_1521* の遺伝子発現量は有意に上昇した。また、硫酸亜鉛七水和物存在下における生存率は、MT8148 株は硫酸亜鉛七水和物の濃度に関わらず一定であった。一方、 $\Delta 1519$ 株および $\Delta 1521$ 株は、硫酸亜鉛七水和物の濃度依存的に低下した。

【考察】

以上の結果より、*SMU_1519* および *SMU_1521* がコードする ABC 膜輸送体は、亜鉛の細胞膜輸送に関連する遺伝子であることが示された。また、硫酸亜鉛七水和物の濃度依存的に $\Delta 1519$ 株および $\Delta 1521$ 株の生存率が低下したことから、*SMU_1519* および *SMU_1521* は亜鉛の排出に関与することが示唆された。今後は、バイオフィーム形成における *SMU_1519* および *SMU_1521* の役割について詳細なメカニズムを検討する予定である。

サイクロデキストランのバイオフィルム破壊作用の検討
Disruptive effects of cyclisomaltooligosaccharide on biofilm

○浅海春華、仲野道代

Haruka Asaumi, Michiyo Matsumoto-Nakano

(岡大・医歯薬・小児歯)

Dept. Pediatric Dent., Okayama Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Pharm.

【目的】

Streptococcus mutans は、グラム陽性通性嫌気性細菌であり、ヒト口腔内に存在する齲蝕の原因菌であり、その表層には、グルコシルトランスフェラーゼ (Glucosyltransferase ; GTF)、高分子タンパク抗原 c、グルカン結合タンパクなどの病原性に関与するタンパクが多数存在する。これらのタンパクが機能することにより、強固なバイオフィルムが形成され、齲蝕が発症する。齲蝕の予防法のひとつとして、代用糖の利用が挙げられ、そのひとつである環状イソマルトオリゴ糖であるサイクロデキストラン (Cyclisomaltooligosaccharide ; CI) は、7 ~ 12 個のグルコースが α -1,6 結合で環状に連結した構造を示す。これまでの研究において、CI は主として GTF の活性を阻害することにより、齲蝕の発生を抑制することが明らかとなっている。本研究では、すでに形成されたバイオフィルムに対する CI の影響を、バイオフィルムの形成量とバイオフィルムの構造を観察し、検討したのでこれを報告する。

【対象と方法】

1. 供試菌

日本人小児由来の *S. mutans* MT8148 株 (血清型 c) を実験に用いた。

2. バイオフィルム形成能

供試菌を 1% スクロース含有化学合成培地に播種し、細胞培養用マルチタイタープレートにて 37°C で 48 時間培養した。形成されたバイオフィルムに CI を最終濃度が 0 ~ 10% となるように段階希釈し添加した後、3 時間、6 時間、12 時間反応させた。底面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. バイオフィルム構造の観察

ヘキシジウムイオダイドを用いて染色した供試菌を、1% スクロース含有化学合成培地に懸濁した後、

波長 600 nm が 0.1 になるように菌液を調整した。その菌液を 25% ヒト唾液タンパクでコーティングしたチャンパーズスライドに分注し、嫌気下で 37°C 24 時間培養した。CI を最終濃度が 0 ~ 10% となるように段階希釈し添加し、3 時間反応させた後、共焦点走査型レーザー顕微鏡にて観察し、さらに ImageJ® を用いて密度を算定した。

【結果】

バイオフィルムの形成量は CI を添加しない場合と比較して濃度依存的に減少しており、CI を 1% 添加した場合は 3 時間後は約 40%、6 時間後は約 30%、12 時間後は約 40% のバイオフィルム形成量の減少が認められた。また CI を 3 時間反応させた場合のバイオフィルムの構造は、厚みが減少しており、密度は疎であった。さらに CI を添加しない場合と 10% 添加した場合とを比較して、厚みは約 50% 減少しており、密度は約 55% 低下していた。

【考察】

以上の結果より CI には、形成されたバイオフィルムの結合を脆弱化し、形成されたバイオフィルムを剥離する効果が認められた。CI は歯面のバイオフィルム形成量を減少させ、その構造を変化させるだけでなく、バイオフィルムを破壊することにより、齲蝕の発生を抑制する効果があることが示唆された。

【会員外共同研究者】

山本 美桜 (日新製糖株式会社)

日野 志朗 (日新製糖株式会社)

本研究の発表に際し、開示すべき利益相反はない。

非アルコール性脂肪肝炎患者口腔内の *Streptococcus mutans* のタンパク発現動態の解析
Analysis of protein expression by *Streptococcus mutans* in non-alcoholic steatohepatitis patients

○田畑佳子, 仲 周平, 仲野道代
Keiko Tabata, Shuhei Naka, Michiyo Matsumoto- Nakano

(岡大・医歯薬・小児歯)
Okayama Univ. Dept. Pediatric Dent.

【目的】

非アルコール性脂肪性肝疾患 (Non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) は、予後が良好な非アルコール性脂肪肝 (Non-alcoholic fatty liver; NAFL) と進行することがある非アルコール性脂肪肝炎 (Non-alcoholic steatohepatitis; NASH) からなり、これまでに齧蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* のうち菌体表層にコラーゲン結合タンパク (Cnm) および高分子タンパク抗原 (PA) を保有する株が、NAFL から NASH への増悪化に関与している可能性を報告してきた。本研究では、NAFLD 患者から分離した *S. mutans* を用いて、これら2つのタンパクの発現動態を分子生物学的に解析することにより、NASH への増悪化にどのように関連しているかを検討したので報告する。

【対象と方法】

1. 対象：市立奈良病院で NAFLD と診断され肝生検を行った 40 名の患者 (NASH: 20 名, NAFL: 20 名) を対象とした。なお本研究は、同病院倫理委員会 (番号 32) および岡山大学病院倫理委員会 (研 1707-021) の承諾を得た後、同意の得られた対象から唾液を採取し研究に用いた。

2. NAFLD 患者唾液中の *S. mutans* の分離と同定：唾液サンプルを Bacitracin 含有 Mitis-Salivarius 寒天培地に播種し、分離したコロニーを Brain Heart Infusion (BHI) 液体培地にて 37°C で 18 時間培養後、遠心分離して回収し、細菌 DNA を抽出した。その後、*S. mutans* の特異的プライマーを用いた polymerase chain reaction (PCR) 法により菌を同定した。*S. mutans* と同定された菌の Cnm の発現を Cnm をコードする遺伝子 *cnm* に特異的なプライマーを用

いた PCR 法によって確認し、PA の発現の有無を Western blotting 法にて調べた。

3. *cnm* および *pac* の発現量：各供試菌を BHI 液体培地にて吸光度 550 nm で対数増殖期後期まで培養後、通法を用いて全 RNA を回収し、逆転写により cDNA を合成した。作製した cDNA を鋳型として各供試菌の *cnm* および PA をコードする遺伝子 *pac* の発現量を Real-time Reverse transcription-PCR (RT-PCR) 法により調べた。

【結果】

NASH および NAFL 患者における *S. mutans* の検出率はそれぞれ 90.0% と 80.0% で有意差は認められなかった。一方、Cnm および PA を保有する Cnm⁺/PA⁺ *S. mutans* の割合は、NASH 患者において有意に高い値を示した (27.3% vs. 10.7%, $P < 0.05$)。また、NASH 患者から分離された Cnm⁺/PA⁺ *S. mutans* の *cnm* の発現量は、NAFL 患者のものと比較して有意な差は認められなかった。しかしながら、Cnm⁺/PA⁺ *S. mutans* の *pac* の発現量は、NAFL 患者と比較して有意に高い値を示した (1.72 vs. 0.93, $P < 0.05$)。

【考察】

本研究の結果から、NASH 患者から高頻度に検出された Cnm⁺/PA⁺ *S. mutans* は、*pac* の発現量が多いことが明らかとなった。これらの菌株が、*S. mutans* が引き起こす NASH の増悪化に関与している可能性が示唆された。今後は、これまで確立したマウスモデルを用いて、病理組織学的な観点から、これらの菌株の NASH 発症への関与を検討していきたいと考えている。

【会員外共同研究者】

殿村修一 (市立奈良病院神経内科)

Streptococcus mutans コラーゲン結合タンパク Cnm の病原性に関する検討
Analysis of *Streptococcus mutans* pathogenic factor collagen-binding protein Cnm

○松岡大貴¹⁾, 仲 周平¹⁾, 後藤花奈¹⁾, 野村良太²⁾, 仲野和彦²⁾, 仲野道代¹⁾
Daiki Matsuoka¹⁾, Shuhei Naka¹⁾, Kana Goto¹⁾, Ryouta Nomura²⁾, Kazuhiko Nakano²⁾, Michiyo Matsumoto-
Nakano¹⁾

(¹⁾岡大・医歯薬・小児歯,²⁾阪大・院・小児歯)

¹⁾Dep. Pediatric Dent., Okayama Univ. Grad. Sch. Med. Dent. Pharm.

²⁾Dept. Pediatric Dent., Osaka Univ. Grad. Sch. of Dent.

【目的】

齲蝕の主要な病原細菌として知られている *Streptococcus mutans* は、その病原性に関連する数種類の表層タンパクが明らかにされている。そのひとつであるコラーゲン結合タンパク (Collagen-binding protein: Cnm) は *S. mutans* の菌体表層に存在する分子量 120 kDa のタンパクであり、コラーゲンに強固に付着し、IgA 腎症や感染性心内膜炎等、様々な全身疾患に関与していることが報告されているが、その詳細なメカニズムについては明らかにされていない。本研究では、IgA 腎症患者口腔サンプルより分離した Cnm 陽性 *S. mutans* 株を用いて、Cnm の病原性に関して分子生物学的に検討を行った。

【対象と方法】

1. 欠失変異株の作製: IgA 腎症患者の唾液から分離した Cnm 陽性 SN74 株の Cnm をコードする遺伝子の中央部にエリスロマイシン耐性カセットを挿入し、*cnm* 欠失変異株 (SN74CND) を作製した。
2. 相補株の作製: SN74 株の染色体 DNA を鋳型として PCR 法により *cnm* を増幅し、この PCR 産物をシャトルベクターである pDL278 にライゲーションすることで、*cnm* を持つプラスミド (pDL278-*cnm*) を作製した。pDL278-*cnm* と SN74CND 株で組み換えを行い、*cnm* 相補株 (SN74CNDcomp) を作製した。
3. コラーゲン結合能: 96 穴マイクロテストプレートの各ウェルにI型コラーゲンを固定後、供試菌を添加し培養した。コラーゲンに付着した菌体をクリスタルバイオレットで染色後、プレートリーダーにて波長 595 nm で測定した。
4. 菌体表層の観察: 培養した供試菌液を生理食塩水にて調製し、固定後、走査型電子顕微鏡 (SEM) にて観察した。
5. バイオフィーム構造: ヨウ化ヘキシジウムにより蛍光染色した供試菌を、0.25% スクロース含有化学

合成培地で調製後、チャンバースライドプレートに播種し培養後、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より観察した。

【結果】

1. SN74CND 株では *cnm* の発現が消失し、SN74CNDcomp 株では回復していることを RT-PCR 法にて確認した。同様に SN74CNDcomp 株では、SN74CND 株で消失していたコラーゲン結合能の回復が確認された。
2. 菌体表層を SEM にて観察すると、SN74CND 株は表面が滑らかな構造であるのに対して、SN74CNDcomp 株の表層には SN74 株と類似した凹凸構造が確認された。
3. SN74CNDcomp 株のバイオフィームの構造は SN74CND 株と比較すると密で均一な構造であり、SN74 株と類似した構造となっていた。

【考察】

本研究の結果から、Cnm が菌体の表層構造の変化だけでなく、バイオフィームの構造にも影響を及ぼしていることが明らかとなり、これは、生体内に侵入した菌が病原性を発揮するうえで重要な因子となりうる可能性が示唆された。今後は、本研究で得られた、親株、*cnm* 欠失変異株および *cnm* 相補株についてさらに分子生物学的に比較検討を行うことで、Cnm の機能について明らかにしたいと考えている。