

学位論文内容の要約

愛知学院大学

甲 第 692 号	論文提出者 金野 弘靖
論文題目 口腔レンサ球菌における環状ヌクレオチドの働きについて	

I. 緒言

現在我国は超高齢社会を迎え、それに伴い、高齢者の健康増進に関しては歯科医療も今後より重要な役割を担うことになる。その中でも、部分欠損歯列の修復に伴う口腔内のメンテナンスがより一層必要となってきた。しかし、高齢期は身体機能全般の変調を伴うことが多いため、口腔内環境の悪化を招くことに成り易い。そのことにより、支台歯における齲蝕や歯周病、義歯性口内炎の発症のリスクも増大する。これらの疾患の主要な原因は、バイオフィーム感染症とされているため、口腔バイオフィームの形成過程を理解し、そのメカニズムを解明することは、それらの感染症の制御に繋がるものと考えられる。

近年、バイオフィーム形成には、様々な分子が関与していることが報告されている。その中でも、環状ヌクレオチドが重要な役割をしていると報告されている。cyclic-di-GMP (c-di-GMP) と cyclic-di-AMP (c-di-AMP) は、新規環状ヌクレオチドとして近年注目されている分子である。本研究では、実験 1 として、口腔レンサ球菌のバイオフィーム形成能に対する c-di-GMP の影響、実験 2 として、*Streptococcus mutans* において、c-di-AMP の分解酵素と想定されている SMU-2140c と SMU-1297 に着目し、バイオフィーム形成と分解酵素に関する機序の検討を行った。

II. 材料および方法

実験 1. 培養液に添加した c-di-GMP の口腔レンサ球菌のバイオフィルム形成に与える影響

1) 使用菌株

本研究には、*Streptococcus mutans* XC、*S. gordonii* 38、*S. sobrinus* B13、*S. oralis* ATCC 10557、*S. anginosus* ATCC 33397、*S. sanguinis* ATCC 10556 を用いた。

2) バイオフィルム形成実験

96 穴ポリスチレン製フラット底プレートに、5 μ l のレンサ球菌の培養液、85 μ l BHI (ショ糖非添加または 0.1% 添加) 培地に、10 μ l の滅菌蒸留水、cAMP、cGMP、c-di-GMP の中からいずれか的一种を加え、37 $^{\circ}$ C にて 48 時間嫌気条件下で培養した。培養後、プレート底面に付着した細菌を染色し、染色された色素を 99%メタノールで抽出し、595 nm の波長で各サンプルの吸光度を測定することによって、バイオフィルム形成量として算出した。

3) 定量 PCR 法を用いた *S. mutans* の c-di-GMP による *gtf* 発現量の比較

S. mutans の培養液とショ糖 0.1% 添加培地を加えた試料を、37 $^{\circ}$ C にて 24 時間嫌気下で培養後、上清を除去し、新鮮な培地と最終濃度 400 μ M に c-di-GMP を添加し、10 分間培養後集菌した。得られた菌体から全 RNA を得て、各特異的なプライマーを用いて逆転写反応を行い cDNA を調整し、*gtfB*、*gtfC* および *gtfD* の発現量を定量 PCR 法により検討した。

実験 2. 口腔レンサ球菌での細胞内における c-di-AMP の分解に関する酵素とバイオフィルム形成能に与える影響

1) 使用菌株、培地と培養条件

親株として *S. mutans* XC 株を用いた。

2) 組換えタンパク質の精製方法

S. pneumoniae において c-di-AMP を pApA に分解する SPD-2032 と AMP に直接分解する SPD-1153 を使って、*S. mutans* における相同性タンパク質を検索するために BLAST program (<http://blast.genome.ad.jp>) を使用した。それぞれに高い相同性を示したタンパク質を、大腸菌を用いた組換え DNA 技術により発現ベクターにクローン化し精製した。つまり、特異的なプライマーを用い PCR にて増幅を行った SMU-2140c と SMU-1297 DNA 断片を、pCold ProS2 ベクターに挿入した。このようにして獲得したプラスミドを、タンパク質発現用の大腸菌に形質転換し、タンパク質を過剰発現させた。菌体を破砕、遠心分離を行い、発現タンパク質を含む上清をアフィニティーカラムに吸着させ、溶出用緩衝液を用いて、溶出を行った。このように精製したタンパク質は、SDS-PAGE によって、その純度を確認した。

3) 逆相 HPLC を用いた c-di-AMP 分解産物の解析と酵素反応条件の検討

酵素活性の検討には、最終濃度 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、1 mM MnCl₂、50 μM c-di-AMP、上記の各精製酵素をそれぞれ 8.5 μg、計 150 μl の反応液にて 1 時間反応させた後、タンパクを除去したサンプルを用いた。

c-di-AMP の分解産物の検出は、逆相 HPLC を用いた。移動相には 10 mM のギ酸アンモニウムを、また溶出には 99% アセトニトリルを用いた。

酵素の反応条件の検討では、様々な条件下 (時間、pH、温度)、および、この種の反応を促進するといわれている代表的な二価の金属イオンを加えて行った。

4) 遺伝子欠損株、相補株の作製

SMU-2140c、SMU-1297 遺伝子を含む領域内に、特異的プライマーを用いてエリスロマイシン耐性遺伝子マーカーを導入し、pUC19 由来の組換えプラスミドを作製した。直線状化した各プラスミド DNA 2 μg を使用し、形質転換を行い、新鮮な培地に播種し、集菌した。相補株の作製には、SMU-1297 遺伝子を含む領域を特定のプライマーを用いて増幅し、pJY ベクターを用いてプラスミドを作製した。プラスミドを上記と同様の方法にて欠損株に戻した。

5) 増殖曲線

増殖曲線の検討には、野生株、遺伝子欠損株、遺伝子相補株を用いた。各サンプルの増殖を測定時間 (0、2、4、6、8、10、12) 時間、分光光度計 UV-1800 (島津製作所) を用い、波長 595 nm にて測定した。

6) バイオフィルム形成実験

96 穴ポリスチレン製フラット底プレートに、5 μ l のレンサ球菌の培養液および 95 μ l BHI (ショ糖非添加) を加え、37 $^{\circ}$ C にて 24 時間嫌気条件下で培養した。培養後、プレート底面に付着した細菌を染色し、染色された色素を 99 %メタノールで抽出し、595 nm の波長で各サンプルの吸光度を測定することによって、バイオフィルム形成量として算出した。

7) グラム染色法による形態観察

野生株と遺伝子欠損株を、菌液の吸光度を 595 nm の波長で測定して、0.3 まで増殖させた菌液を 0.2% ビクトリア・ブルー液で 1 分間染色した後、システム生物顕微鏡 CX41 (オリンパス) にて観察を行った。

8) 走査型電子顕微鏡による微細形態の観察

カバーガラスを BHI 液体培地を入れたシャーレ内に浸漬し、24 時間嫌気培養後の菌体を走査型電子顕微鏡 (SEM) (JXA-8530F、日本電子) を用いて観察を行った。

III. 結果

実験 1. 培養液に添加した c-di-GMP が口腔レンサ球菌のバイオフィルム形成に与える影響

1) c-di-GMP によるバイオフィルム形成への影響

ショ糖非存在下において培養した際、*S. mutans* と *S. oralis* のバイオフィ

ルム形成量は 400 μM c-di-GMP によって有意に抑制されたが、他の菌では有意な差は認められなかった。0.1% ショ糖存在下において、400 μM c-di-GMP によりバイオフィルム形成量が有意に抑制された。一方、同量の cAMP や cGMP 添加したサンプルでは形成量は、有意な差は認められなかった。

2) c-di-GMP の濃度とバイオフィルム形成への影響

ショ糖非存在下においては、*S. mutans* では 100 μM 以上、*S. oralis* では 200 μM 以上添加した際に、バイオフィルム形成量は有意に抑制された。ショ糖 0.1% 存在下においては、*S. mutans*、*S. oralis* および *S. sobrinus* においては 200 μM 以上、*S. anginosus* では 50 μM 以上添加した際に、バイオフィルム形成量は有意に抑制された。

3) *S. mutans* の *gtf* 遺伝子に対する c-di-GMP による発現量の検討

400 μM c-di-GMP 存在下において、不溶性グルカンの形成に関与する *gtfB* および *gtfC* の発現量は、非存在下と比較し、有意に抑制された。しかし、水溶性グルカンの形成に関与する *gtfD* の発現に関しては有意な差は認められなかった。

実験 2. 口腔レンサ球菌での細胞内における c-di-AMP の分解に関する酵素とバイオフィルム形成能に与える影響

1) 組換え酵素の精製

BLAST による検索において、アミノ酸配列上で SPD-2032 と SMU-2140c が 55%、SPD-1153 と SMU-1297 が 68% の相同性を示した。

精製 SMU-2140c および SMU-1297 を SDS-PAGE にて確認したところ、SMU-2140c については 97 kDa 付近に、SMU-1297 については 54 kDa 付近よりも少し移動速度が遅い場所に明瞭な単一バンドが認められた。精製を確認したタンパク質を His-2140、His-1297 と名付けた。

2) 逆相 HPLC を用いた c-di-AMP 分解産物の解析および酵素活性の検討

His-1297 を酵素として用いた反応液では、約 5.0 分の位置にピークが検出され、標準サンプルの AMP と同じ時間に検出された。一方、His-2140 を酵素として用いた反応液からは c-di-AMP の分解産物が認められなかった。酵素としての His-1297 の性質を検討結果は以下の通りである。反応は、24 時間でほぼ最大となった。His-1297 非添加では反応が認められなかった。至適 pH は 8.0、至適温度は 40°C であった。二価の金属イオンの要求性を検討したところ、MnCl₂ のみに酵素活性が認められた。MnCl₂ の濃度は、1 mM で反応が最大となった。

3) *S. mutans* XC 株から遺伝子欠損株の作製

設計したプライマーを使って、欠損株に導入されていると考えられるエリスロマイシン耐性遺伝子断片が増幅され、元の野生株においては増幅さ

れなかった事から、目的の遺伝子が薬剤耐性マーカー遺伝子によって置き換わっている事が確認できた。

4) 欠損株の増殖曲線

SMU-2140c、SMU-1297 遺伝子欠損株、SMU-1297 遺伝子相補株における増殖は野生株と比較し、著明な違いは認められなかった。

5) バイオフィルム形成実験

SMU-1297 欠損株のバイオフィルム形成量は野生株と比較し、有意に増加した。また、遺伝子相補株では、野生株と比較し、バイオフィルム形成量に有意な差は認められなかった。一方、SMU-2140c 欠損株においては、野生株と比較し、バイオフィルム形成量に有意な差は認められなかった。

6) 形態学的観察

光学顕微鏡を用いて観察した結果、SMU-1297 欠損株は野生株と比較して、多くの菌体凝集塊が認められた。SEM により観察すると、野生株ではバイオフィルムが平坦に定着しているが、SMU-1297 欠損株では起伏があるバイオフィルムとなっていることが認められた。

IV. 考察

実験 1 の結果より、ショ糖 0.1% を含む培地に 400 μ M c-di-GMP を添加した際、用いた全ての菌においてバイオフィルム形成が抑制された。

c-di-GMP 添加により *S. mutans* の不溶性グルカンの形成に関与する *gtfB*、*gtfC* の発現が抑制され、バイオフィルム形成が抑制されたことが裏付けら

れた。*S. sobrinus* も不溶性グルカンを合成するので、その合成が抑制されると推測される。一方、その他の菌種は、不溶性グルカンを合成しない。**c-di-GMP** は菌体外グルカンの合成を抑制すると共に、付着因子等の産生を抑制していると推測される。ショ糖 0.1% 存在下培地を使用し、**c-di-GMP** の濃度とバイオフィーム形成抑制効果の関係を検討したところ、200 μM 以上の濃度でバイオフィーム形成量は有意に抑制された。しかし、加えた 200 μM **c-di-GMP** は本来菌体内で合成される濃度より高く、過剰量だと考えられる。これらの所見から、**c-di-GMP** が菌体内の遺伝子の発現に与えた効果は、ある種の制限下にて、菌体内に取り込まれた濃度による効果かもしれないと考える。

実験 2 の結果より、SMU-2140c には、**c-di-AMP** を分解する酵素活性が検出されなかった。従って、**c-di-AMP** から pApA に分解するタンパク質は別の形で存在していることが示唆された。一方、SMU-1297 組換えタンパク質では、**c-di-AMP** から AMP の分解活性が検出された。バイオフィーム形成実験を行ったところ、SMU-1297 遺伝子欠損株は野生株と比較して、有意に形成量が増加した。SEM 観察により、多数の凝集塊を形成しているのが認められた。**c-di-AMP** の分解酵素を抑制させることで、同分子の濃度が菌体内で上昇すると予測され、その結果、菌体凝集塊を形成し、バイオフィーム形成量が増加と考えられる。このように、**c-di-AMP** の分解酵素を抑制することで、細菌の存在状態に変化を引き起こし、バイオフィ

ルム形成を促進したという知見は初めて得られた事である。分解の抑制がバイオフィルム形成を増加させたことは、分解をより促進させることで、バイオフィルム形成を抑制することも可能であると予測できる。

V. 結論

1. 細胞外で **c-di-GMP** を口腔レンサ球菌に添加することにより、バイオフィルム形成が抑制された。さらに *S. mutans* においては、不溶性グルカン形成に関与する遺伝子の発現が抑制された。
2. 細胞内における **c-di-AMP** の分解には、**SMU-1297** が関与し、その欠損株においてバイオフィルム形成が促進された。

このような事から、バイオフィルム形成にはこれらの環状ヌクレオチドが深く関与していることが明らかになった。