

氏名	宮 城 淳		
学位(専攻分野)	博 士(歯 学)		
学位授与番号	博 甲 第 1013 号		
学位授与の日付	平成 4 年 3 月 28 日		
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻 (学位規則第 4 条第 1 項該当)		
学位論文題目	Streptococcus rattusの低pH適応		
論文審査委員	教授 下野 勉	教授 加藤慶二郎	教授 谷口 茂彦

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

齲蝕の主要病原菌である mutans streptococci (MS) は、脱灰pHより低いpHでも増殖できる低pH適応能を有する点で、他の口腔連鎖球菌と区別される。事実、齲蝕活性が高く、pHが低い歯垢からはMSが高頻度で分離される。

これまで、低いpHで増殖したMSについて、糖代謝系の変化、 H^+ を細胞外に排出する H^+ -ATPaseの活性上昇などが観察されている。しかし、低pH適応におけるこれらの生化学的な変化の系統的な意義づけはほとんど行われていない。

本研究では、MSの低pH適応能の本質を明らかにするために、ケモスタット培養法を中心に、増殖時の外部pHが増殖エネルギー代謝、 H^+ -ATPase活性、細胞内pH調節機能および解糖活性に与える影響を検討した。

【材料・方法】

Streptococcus rattus FA-株を供試菌株として、嫌気条件下、グルコース制限下でケモスタット培養を行った。希釈速度およびpHを調整し、各定常状態での菌体乾燥重量の測定、グルコース代謝産物の分析を行った。洗浄菌体の解糖活性は、pHスタットを用いて測定した。ATPase活性は、超高圧細胞破碎器で処理した菌体の膜画分についてKodamaらの方法に従って測定した。細胞内pHの測定は、Kashketらの方法に従って ^{14}C -アセチルサリチル酸を用いて行った。

【結果】

I 増殖エネルギー代謝

培養pH7.0から6.2までは、グルコース1モルあたりの代謝産物は、蟻酸2モルおよび酢酸、エタノール各1モルであり、乳酸は殆ど産生されない。また、グルコース1モルあ

たりの菌体形成量（モル増殖収率， Y_{glc} ）はほとんど低下しない。しかし，培養pHが6.2以下になると，乳酸・酢酸・エタノールの産生量がモル比一定のまま徐々に低下し，代償的に乳酸の産生量が上昇する。このような代謝パターンの変化にともない， Y_{glc} は顕著に低下する。

生成ATP1モルあたりの最大菌体形成エネルギー効率は，培養pHにかかわらずほぼ一定であるが，細胞維持のためのエネルギー消費速度は，培養pH7.0から5.0への低下によって，約4倍に増加する。

II ATPase活性

培養pH5.0菌（低pH適応菌）のATPase活性は， H^+ 特異的イオノホアであるFCCPによって顕著に促進され，最大活性を示すpH6.2では，FCCP非存在下の活性の約2倍となる。一方，培養pH7.0菌（非適応菌）のATPase活性は，低pH適応菌と比べて著しく低く，FCCPによる活性の促進もみられない。

低pH適応菌の膜画分にはSDS-PAGE分析およびウエスタンブロットによって， F_1F_0 型ATPaseのサブユニットと同じ抗原性を有する蛋白質が検出された。しかし，非適応菌の膜画分には，これらの蛋白質はほとんど検出されなかった。

III 細胞内pH

低pH適応菌と非適応菌の両菌ともに細胞内pHは細胞外pHよりも高くなり，また，細胞外pH（pH5.0～7.5）に対する細胞内pHの応答にも有意な差は認められなかった。細胞内外のpH差（ ΔpH ）は細胞外pHが低くなるに従い大きくなりpH5.0では1.2となる。また両菌ともFCCP存在下では ΔpH が形成されなかった。

IV ATP消費系による解糖活性の調節

反応液pH7.0において，低pH適応菌の解糖活性は，FCCPによって，約2.3倍に促進された。一方，非適応菌のFCCPによる解糖活性の促進は，1.4倍程度であった。また，低pH適応菌の解糖活性は，反応液pH7.5から5.0の範囲で，トリプチケースペプトンと酵母エキスの添加によって促進された。しかし，非適応菌においては，反応液pHが6.0以下では認められなかった。

【考察】

低pH（<6.2）に適応したMSの Y_{glc} 低下は，1）ピルビン酸代謝経路の変化によるグルコース1モルあたりのATP生成効率低下および2）細胞維持ATP消費速度の増加に起因すると考えられる。

ピルビン酸代謝経路の変化は，グルコース1モルあたりの酸生成量の減少を伴っているもので，細胞外pH低下の緩和効果とみなすことができる。また，細胞維持エネルギー消費速度の増加は，低pHで機能する H^+ -ATPaseが誘導されたためと考えられる。

これまで， H^+ -ATPaseは主として細胞内pHの調節に携わると考えられてきた。しかし，1） ΔpH 形成能と H^+ -ATPase活性との間には，相関がみられないこと，2）低pH適応菌の解糖活性が，ATP消費の増大に対応して，顕著に促進されることから， H^+ -ATPase

は、低pHにおけるエネルギー代謝系の動的共役に重要な役割を果たしていることが示唆される。

【まとめ】

低pHに適応したmutans streptococciでは、1) ピルビン酸代謝経路の変化によって酸産生量が低下し、2) 低pHで活発に機能し、増殖時のエネルギー代謝に重要な役割を果たしているH⁺-ATPaseが誘導されていることが示唆される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、mutans streptococci (MS) の低pH適応能の本質を明らかにするために、*S.rattus* の低pH環境に対する応答をケモスタット培養を中心にして調べたものである。

S.rattus は、低pH環境で増殖すると、中性pHで増殖する場合と比較して、1) H⁺-ATPaseレベルが上昇する。2) 広いpH範囲でトリプチケースペプトンと酵母エキスの添加によって解糖活性が促進される。3) 最大菌体形成エネルギー効率は変わらないが、細胞維持エネルギー消費速度は上昇する。4) ピルビン酸の代謝経路が変わり、グルコース1モルあたりのATP形成量の減少とひきかえに、酸生成量が減少して環境pH低下を軽減している。これらの成績から、MSの低pH環境への適応は、細胞維持のためのエネルギー消費の増大とH⁺-ATPase酵素の誘導によって特徴づけられることが明らかとなった。

本研究では、齧触と密接に関係していると考えられるMSの低pH適応を細胞レベルで詳細に解析したものであり、本論文を博士(歯学)学位論文として価値あるものと認めた。