指　導　教　授　氏　名	指　　導　　役　　割
仲野　道代　　印	研究の総括指導
印	
印	

学　位　論　文　要　旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野　小児歯科学分野	身分　大学院生	氏名　吉田　衣里

論　文　題　名 *Streptococcus mutans* における分子シャペロンDnaKの分子生物学的解明

論文内容の要旨（2000字程度）

【目的】

口腔内は温度変化，唾液分泌量，唾液 pH などの因子により環境が大きく変化する。このような環境の中で口腔内細菌が生存し続けるために，種々のタンパクが発現し機能することが報告されている。これらのタンパクはストレス応答タンパクといわれ，その一つに熱ショックタンパクである DnaK が報告されており，このタンパクは分子シャペロンとしても機能することが知られている。

グラム陽性細菌 *Streptococcus mutans* は，口腔内でバイオフィルムを形成し，齲蝕の発生に重要な役割を担っている。*S. mutans* の特性の一つに耐酸性があり，DnaK が関与している可能性が示唆されている。

本研究では，*S. mutans* における分子シャペロン DnaK が生物学的特性に与える影響について DnaK 過剰発現株と DnaK 発現抑制株を作製し検討した。

【方法】

（1）供試菌株

日本人小児の口腔より分離された *S. mutans* MT8148 株を用い，MT8148 株の DnaK を過剰発現株 DnaK-o，DnaK の発現抑制株 DnaK-s をシャトルベクターpDL278 を用いて作製した。さらに，pDL278 のみを MT8148 株に形質転換した MT-pDL も作製し実験に供試した。

（2）*dnaK* 遺伝子の発現

各変異株を Todd Hewitt (TH) 液体培地にて培養後，全 RNA を回収し cDNA を得た。得られた cDNA を用いて，作製した各変異株における *dnaK* の発現を Real-time qRT-PCR 法によって比較した。

（3）コロニー形態の比較

各変異株を Brain Heart Infusion (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 日間嫌気的に培養後，実体顕微鏡下にてコロニー形態を観察した。

（4）各変異株の pH 5.5 と pH 7.0 における増殖速度

各変異株を TH 液体培地にて培養後，pH 7.0 および pH 5.5 に調整した TH 液体培地に菌液を 1/100 量になるように継代した。波長 600 nm で菌液の濁度を 1 時間毎に経時的に測定した。

（5）耐酸性

各変異株を BHI 液体培地にて培養後，Yeast Extract 含有 TH (THYE) 液体培地に継代した。濁度が波長 600 nm で 0.4~0.5 まで培養後，pH 5.0 に調整した THYE 液体培地に播種し，37℃で 2 時間培養した。さらに pH 3.5 に調整した THYE 液体培地に播種し，3 時間培養した。培養後，それぞれを同 pH の寒天培地に播種して，pH 5.0 の寒天培地上のコロニー数に対する pH 3.5 の寒天培地上のコロニー数の割合を算出し，耐酸性能とした。

論文内容の要旨（2000字程度）

（6）酸性状態における凝集試験

各変異株を TH 液体培地培養後，遠心分離で菌体を回収した。スクロース添加，非添加リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を添加し, 吸光度が 0.2 になるまで調整し, 37℃で培養した。培養開始後，1.5 時間，6 時間，10 時間後の凝集の状態を観察した。

（7）バイオフィルム構造の観察

培養した各変異株を TH 液体培地で培養後，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，菌体を波長 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 µl ずつ播種し，嫌気下で 37℃，24 時間培養した。形成されたバイオフィルムを共焦点走査型レーザー顕微鏡にて観察し，Image J により，バイオフィルムの構造を解析した。

（8）リアルタイム PCR による定量的遺伝子解析

各変異株を TH 液体培地にて培養後，全 RNA を回収し cDNA を得た。得られた cDNA を用いて，各株における *gtfB*, *gtfC*, *gtfD*, *gbpA*, *gbpB*, *gbpC* の発現を Real-time qRT-PCR 法によって比較した。

（9）*S. mutans* の表層タンパクであるグルコシルトランスフェラーゼ (Glucosyltransferase; GTF) の産生量と活性の測定

ポリアクリルアミド電気泳動により，GTF タンパクの発現を視覚化した。また活性染色により，ゲル上に存在する GTF により産生されたグルカンをパラノースアニリン溶液により染色し，染色されたグルカン量を Image J により数値化した。

【結果および考察】

DnaK-o 株のコロニー形態は, 他変異株と比較して構造が異なっていた。DnaK-s 株の増殖能は, MT-pDL 株と DnaK-o 株と比較して pH 5.5 および pH 7.0 ともに減少していた。MT-pDL 株と比較して DnaK-o 株において耐酸性能が上昇し，DnaK-s 株では耐酸性能は有意に低下していた。共焦点走査型レーザー顕微鏡の画像から，MT-pDL 株や DnaK-s 株と比較して，DnaK-o 株のバイオフィルム構造が著しく異なっていることが明らかとなった。DnaK-o 株では，MT-pDL 株と比較して，*gtfB*, *gtfD*, *gbpC* 遺伝子の発現の上昇が認められた。また，ポリアクリルアミド電気泳動の結果より, DnaK-o 株の GTF の産生量は著しく上昇していた。これらの結果から, DnaK はストレス応答に関与すると同時に，*S. mutans* の表層タンパクの発現を変化させることが示された。また，バイオフィルム構造に変化を及ぼし，バイオフィルム形成を制御する遺伝子の発現にも影響を与えることから，DnaK は口腔バイオフィルム形成においても大きく関与していることが示唆された。