



Title	バイオフィルム形成におけるStreptococcus mutans recA遺伝子の機能解析
Author(s)	稲垣, 暁子
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/49789">https://hdl.handle.net/11094/49789</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	稲垣 暁子
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 22850 号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学位論文名	バイオフィーム形成における <i>Streptococcus mutans recA</i> 遺伝子の機能解析
論文審査委員	(主査) 教授 大嶋 隆 (副査) 教授 川端 重忠 准教授 永田 英樹 講師 野杢由一郎

## 論文内容の要旨

## 【研究目的】

う蝕の主要な病原細菌である *Streptococcus mutans* は、口腔内のバイオフィーム形成において最も重要な菌である。この *S. mutans* は、口腔内において大きな環境の変化や外来物質の侵入といった過酷な生育環境にさらされている。このため、*S. mutans* は、菌を取り巻く様々な環境ストレスに対応するための様々なタンパクを保有していると考えられる。*recA* 遺伝子にコードされる RecA タンパクは、*S. mutans* における細胞間のシグナル伝達システムにおいて、周囲に順応するように作動し、遺伝子発現の調節を行っていることが報告されている。本研究では、RecA 欠失変異株を作製し、RecA がバイオフィーム形成および GTF の発現にどのように関与するかについて分子生物学的検討を加えた。

## 【実験方法】

- 1) *S. mutans* MT 8148 株における RecA 欠失変異株の作製: *S. mutans* MT 8148 株の *recA* 遺伝子に抗生物質耐性遺伝子を挿入し、遺伝子を不活化することにより、RecA 欠失変異株 (RAD) を作製した。
- 2) 増殖能の測定: 供試菌を pH 7.5、6.5、5.5 に調整した Todd Hewit 培地 (THB) 中に播種し、その増殖能を波長 550 nm の吸光度として一時間毎に測定した。

3) 耐酸性実験: 供試菌を pH 5.0 に調整した培地に播種し、37°C で 2 時間培養後、pH 3.5 に調整した培地に播種し、2 時間培養した。培養後、それぞれを pH 3.5 および 5.0 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求め、耐酸性を調べた。

4) バイオフィーム形成能: 供試菌体を TH 培地に播種し、96 穴マイクロテストプレートに分注した後、37°C で 2 日間嫌気下で培養後、クリスタルバイオレット溶液にて染色を行い、吸光度 570 nm で測定した。さらに、24 穴マルチウェルプレート各ウェルに丸型カバーガラスを挿入し、各供試菌を播種した TH 培地を分注し、37°C で 2 日間嫌気条件下にて培養後洗浄し、カルセイン AM でバイオフィーム中の生存菌体を、エチジウムホモダイマー 1 により死菌体の染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いてそれぞれの菌によるバイオフィームの構造を調べた。また、スクロース依存性バイオフィーム形成能を調べるため、各濃度のスクロースを添加した TH 培地を用いて、上記と同様の方法で実験を行った。

5) *recA*、*brpA*、*ffh* 遺伝子の発現、および *gtf* 遺伝子の発現: 供試菌を TH 培地で OD600=0.7 になるまで培養後、集菌し、全 RNA 抽出を行った。全 RNA を用いて、Reverse transcription-PCR (RT-PCR) 法を行い、cDNA を作製した。この cDNA を鋳型として、MT8148 株および RAD 株における *gtf* 遺伝子の発現を Real-time RT-PCR 法を用いて調べた。また、pH 5、6、7 に調整した TH 培地での、MT8148 株における *recA* 遺伝子の発現を調べた。

6) リコンビナント RecA (rRecA) のタンパク精製: *recA* 遺伝子をタンパク発現用ベクター pET42a (+) に挿入したプラスミドを作製し、GST 融合タンパク質精製用アフィニティーゲルを用い、タンパク精製を行った。

7) ゲルシフトアッセイ: *gtfB*、*C*、*D* 遺伝子の各プロモーター領域をジゴキシゲニンでラベルした後、精製した rRecA とを混和し、電気泳動、エレクトロブロットティングを行い、120°C で 30 分クロスリンクし、化学発光検出を行った。

## 【結果および考察】

RAD 株では、MT8148 株と比較し、低 pH において、菌の増殖速度が遅延し、耐酸性も低下した。また、MT8148 株では低 pH 下の場合、*recA* 遺伝子の発現が上昇し、耐酸性に関与する *brpA* や *ffh* 遺伝子の発現が MT8148 株では上昇したのに対し、RAD 株では両遺伝子の発現に変化が認められなかった。さらに、バイオフィーム形成能の低下、死菌体の増加、スクロース含有バイオフィームにおける細菌凝集の減少、*gtfB*、*D* の発現低下が認められ、ゲルシフトアッセイの結果から、*gtfB*、*C*、*D* の各プロモーターと RecA タンパクが直接的に結合している事が示唆された。

以上の結果より、RecA が *S. mutans* において低 pH のような特定のストレス環境下において誘導され、細胞の生存やバイオフィーム形成に必要なタンパクであり、バイオフィームの形成に重要な役割を持つとされる *gtf* 遺伝子の発現制御にも関与している可能性が示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、う蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* における細菌細胞間のシグナル伝達において遺伝子発現の制御を行うとされている RecA タンパクが、バイオフィーム形成および GTF 発現にどのように関与するかを、分子生物学的に検討を加えたものである。その結果、RecA タンパクが細菌細胞の生育および *gtf* 遺伝子の発現に関与する重要なタンパクであり、RecA タンパクの欠失がバイオフィーム形成能の低下を引き起こすことが示された。以上のことから、本研究は *S. mutans* の生物学的意義を明らかにする上で重要な示唆を与えるものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。