



Title	Streptococcus sanguinisが産生する細胞壁架橋型ヌクレアーゼの機能解析
Author(s)	森田, 知里
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/52338
rights	© 2014 Morita et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名 (森田 知里)

論文題名

*Streptococcus sanguinis*が産生する
細胞壁架橋型ヌクレアーゼの機能解析

論文内容の要旨

*Streptococcus sanguinis*はペリクルを介して歯面に定着し、バイオフィルムの形成開始に寄与する。また、本菌は亜急性感染性心内膜炎の病巣から高頻度に分離されることから、病態形成過程において、宿主の免疫機構を回避し心組織に定着すると考えられる。近年、好中球の細胞外殺菌機構としてNETs (neutrophil extracellular traps) が注目されている。NETsは好中球の細胞死と共に放出される網状の構造物であり、DNA、抗菌ペプチド、およびヒストン等から構成される。本研究では、*S. sanguinis* SK36株が産生する細胞壁架橋型の推定ヌクレアーゼSSA1750に着目し、*S. sanguinis*のNETsによる殺菌への抵抗性やバイオフィルム形成への関与を検討した。

まず、組換えSSA1750タンパクを作製し、酵素活性を検討した。Mg²⁺とCa²⁺の共存下で各種DNAとヒト角化細胞由来RNAを分解したことから、SSA1750はヌクレアーゼであることが示唆された。SSA1750はSK36株の細胞壁表層画分において検出されたことから、SWAN (*Streptococcus sanguinis* wall-anchored nuclease) と名付けた。部分組換え体を用いた解析から、SWANのDNase活性にはヌクレアーゼドメインだけでなくアミノ基末端側も重要であることが推察された。類縁のDNase群で保存されている推定活性アミノ酸残基と推定Ca²⁺・Mg²⁺結合アミノ酸残基に点変異を導入することにより、SWANのDNase活性は消失または減弱した。次に、SK36株を親株として*swan*欠失株と復帰変異株を作製し、各菌株をNETsと反応させ、経時的に生菌数を算出した。その結果、野生株および復帰変異株と比較して、*swan*欠失株の菌体生存率は有意に低下した。同様に、*Lactococcus lactis*の異種発現系を用いて解析したところ、*swan*の発現によりNETs中での菌体生存率が有意に上昇した。さらに、大気中と嫌気条件下での*S. sanguinis*のバイオフィルム形成量に及ぼすSWANの影響を評価した。その結果、野生株や復帰変異株と比較して、*swan*欠失株のバイオフィルム形成量は、大気中において有意に増加した。

以上の結果から、*S. sanguinis*の菌体外に表出されるSWANは、NETsやバイオフィルムの構成成分であるDNAを分解することにより、NETsによる殺菌からの回避に寄与すると共に、バイオフィルム形成量を調節することが示唆された。

本研究は、大阪大学動物実験規程および大阪大学遺伝子組換え実験実施規則に則り実施した（遺伝子組換え実験承認番号: 3365, 動物実験承認番号: 動菌 24-025）。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (森田 知里)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 川端 重忠
	副 査	教授 仲野 和彦
	副 査	准教授 野杵 由一郎
	副 査	講師 久保庭 雅恵
論文審査の結果の要旨		
<p>本研究では、亜急性心内膜炎の病巣より高頻度に分離される <i>Streptococcus sanguinis</i> の細胞壁架橋型推定ヌクレアーゼに着目し、機能を明らかにした。組換えタンパクを用いた解析により DNA と RNA を分解するヌクレアーゼであることが明らかになったことから、このタンパクは SWAN (<i>Streptococcus sanguinis</i> wall-anchored nuclease) と名付けられた。変異株と <i>Lactococcus lactis</i> 発現系を用いた解析から、SWAN は NETs の構成分子である DNA を分解することにより、<i>S. sanguinis</i> の NETs による殺菌からの回避に寄与することが示唆された。また、変異株を用いたバイオフィーム形成試験において、SWAN はバイオフィーム形成に影響する可能性が示された。</p> <p>臨床的に重要である口腔レンサ球菌の免疫回避機構の一端を明らかにしたことから、博士(歯学)の学位論文として価値のあるものと認める。</p>		