

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | Streptococcus mutans におけるABC膜輸送タンパクの役割  |
| Author(s)    | 永山, 佳代子   |
| Citation     | 大阪大学, 2011, 博士論文  |
| Version Type |   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/58453">https://hdl.handle.net/11094/58453</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">〈a href="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">〈/a〉</a> をご参照ください。 |

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

|            |  |
|------------|--|
| 氏名         | ながやま かほこ   |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(歯学)   |
| 学位記番号      | 第 24496 号  |
| 学位授与年月日    | 平成 23 年 3 月 25 日                                       |
| 学位授与の要件    | 学位規則第 4 条第 1 項該当<br>歯学研究科分子病態口腔科学専攻                    |
| 学位論文名      | <i>Streptococcus mutans</i> における ABC 膜輸送タンパクの役割        |
| 論文審査委員     | (主査)<br>教授 大嶋 隆<br>(副査)<br>教授 川端 重忠 准教授 永田 英樹 講師 野村由一郎 |

## 論文内容の要旨

## 【研究目的】

う蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* は、口腔内における様々な外来物質の侵入に対応しながら生育し、バイオフィルムを形成し続けることによりその病原性を発揮する。この細菌が産生する膜輸送タンパクは、抗生物質や水素イオンなどを菌体外に排出することにより、菌の生育環境を維持するという重要な働きをもっている。ゲノム解析では、*S. mutans* においては膜輸送タンパクの 1 つである ATP-binding cassette (ABC) 膜輸送タンパクが約 60 種類存在している可能性が指摘されている。本研究の目的は、*S. mutans* における ABC 膜輸送タンパクの抗生物質の取り込みに関する分析を行い、これらのタンパクの機能を明らかにすることである。

## 【実験方法】

供試菌として、ヒト小児口腔由来の *S. mutans* MT8148 株を用いた。*S. mutans* のゲノム解析よりその機能がそれぞれ ABC 膜貫通タンパク、ATP 結合タンパクと推定される *SMu0836* および *SMu0837* 遺伝子を抽出し、さらにそれらの上流に存在する response regulator と推定される *SMu0835* 遺伝子に着目し、解析を行った。まずはじめに、目的遺伝子の中央付近にエリスロマイシン耐性遺伝子を挿入することにより、*S. mutans* MT8148 株を親株として欠失変異株を作製した。これらの欠失変異株の抗生物質に対する感受性を調べるために、各種抗生物質を添加した Todd-Hewitt (TH) 液体培地に播種し、37℃で 18 時間培養後、その濁度を測定した。次に、抗生物質存在下での目的遺伝子の発現状態を調べるために、供試菌を阻害濃度以下のテトラサイクリン添加 TH 液体培地にて対数増殖期まで培養し、全 RNA を抽出し、RT-PCR 法で complementary DNA (cDNA) を作製した。その cDNA を用いて Real-time RT-PCR 法で *SMu0835*、*SMu0836*、および *SMu0837* 遺伝子の発現をテトラサイクリン無添加培養細菌と比較した。同様に、ABC 膜

輸送タンパクと推定される *SMu0215*、*SMu0374*、*SMu0475*、*SMu0986* にも着目し、同様の方法で各遺伝子の発現を調べた。また、バイオフィルム形成菌と浮遊菌における *SMu0835*、*SMu0836*、および *SMu0837* 遺伝子の発現量の比較を行った。さらに、変異株細胞膜の流動性の変化について検討するため、対数増殖期初期まで培養した菌体を緩衝生理食塩水で波長 600 nm で 0.2 になるように調整し、蛍光プローブ N-Phenyl-2-naphthylamine (NPN) を添加し 30 分間室温で反応させた。それらを同緩衝液で再び洗浄し、蛍光分光光度計を用いて NPN の蛍光偏光度を測定した。最後に、これらの遺伝子群の発現を、MT8148 株の全 RNA を用いてノーザンブロットング法によって調べた。

## 【結果】

欠失変異株において、βラクタム系の抗生物質に対する感受性は親株と比較して差は認められなかった。しかし、テトラサイクリンやアミノグリコシド系抗生物質であるカナマイシン、防腐剤として使用されるトリクロサンにおいては感受性が上昇していた。また、阻害濃度以下のテトラサイクリンを添加して培養した時には、*SMu0836* 遺伝子の発現が有意に上昇しており、これらは、ABC 膜輸送タンパクと推定されている他の遺伝子においても同様に認められた。また、バイオフィルム形成菌では浮遊菌と比較してそれぞれ発現量の増加を認めた。一方、細胞膜の流動性においては、MT8148 と比較してすべての欠失変異株において蛍光偏光度が変化していた。最後に、ノーザンブロットングにおいては、*SMu0835*、*SMu0836*、*SMu0837* の全長の総和である約 4000 bp に相当する位置にバンドが検出された。

## 【考察】

*SMu0835*、*SMu0836* および *SMu0837* 各遺伝子の欠失により数種の抗生物質の感受性は上昇しただけでなく、テトラサイクリン存在下においてこれらの遺伝子の発現が上昇した。また、浮遊菌と比較してバイオフィルム形成菌におけるこれらの遺伝子の発現量が高かったことや、細胞膜の流動性が変化したことは、これらの遺伝子にコードされるタンパクの発現が欠失したために細胞膜に何らかの変化が起り、抗生物質の膜輸送に影響していることが示唆された。一方、ノーザンブロットングの結果から、これらの遺伝子群は *SMu0835* を転写開始因子とするオペロンとして機能していると考えられた。一方、ABC 膜輸送タンパクをコードする *SMu0836* 以外の遺伝子も同様の現象を示したことより、*S. mutans* の ABC 膜輸送タンパクが抗生物質の膜輸送に影響していることが示唆された。以上の結果は、ABC 膜貫通タンパクが、菌の抗生物質の輸送に強く関与しており、これらのタンパクの存在が *S. mutans* の抗生物質に対する耐性獲得に関連する可能性の高いことが示唆された。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、*Streptococcus mutans* の ABC 膜輸送タンパクをコードすると推定される遺伝子を抽出し、それらの欠失変異株と野生株との比較検討を行い、ABC 膜輸送タンパクの役割を調べたものである。その結果、変異株においてはテトラサイクリンに対する感受性の上昇と膜輸送の低下が認められた。

またこれらの遺伝子は、阻害濃度以下のテトラサイクリン存在下において発現が上昇し、オペロンとして機能していることが示された。以上の結果は、*S. mutans* の ABC 膜輸送タンパクが数種の抗生物質の膜輸送に関与し、これらのタンパクの存在が抗生物質に対する耐性の獲得に関与している可能性を示唆した。

以上のことから、本研究は *S. mutans* における ABC 膜輸送タンパクの役割を明らかにし、*S. mutans* の病原性を考察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。