

研究者：安永 愛（所属：九州歯科大学保健医療フロンティア科学分野）

研究題目：う蝕細菌 *Streptococcus mutans* と口腔レンサ球菌 *Streptococcus gordonii* を共培養した際に *S. mutans* に発現するタンパク質の解析

目的：

う蝕の起因菌である *Streptococcus mutans* は、口腔内でバイオフィルムを形成する際、最初に歯面に付着した初期定着菌と凝集することが知られている。これまで、*S. mutans* 単独でバイオフィルム形成時に発現するタンパク質については解析されてきたが、歯面での初期定着菌である *Streptococcus gordonii* と共培養した際に同菌に発現するタンパク質については報告されていない。そこで、歯面での *S. mutans* の初期バイオフィルム形成機構について詳細に解析する目的で、*S. gordonii* と共培養したときに *S. mutans* に発現するタンパク質について解析した。

対象および方法：

ポリスチレン製プレートを用い、0.5%スクロースを添加した最少培地で *S. mutans* UA159 株と *S. gordonii* DL1 株の共培養を行った（図1）。また同時に *S. mutans* 単独の培養を行い、それぞれ *S. mutans* のバイオフィルムを回収し、二次元電気泳動法による比較解析を行った（図2A）。同法で最も発現増強が認められたタンパク質スポットについて LC-MS/MS による質量分析を行ったところ、共培養により最も発現が上昇したのは抗酸化ストレスタンパク質の1つ、Dpr であった（図2B）。次に *S. gordonii* による *S. mutans* 抗酸化ストレス遺伝子欠失株への影響の解析を行った。THB 寒天培地上に *S. gordonii* を 37°C で一晩培養し、そこから一定距離に *S. mutans dpr, sod, ahpC* 遺伝子欠失株をそれぞれ滴下し、37°C で一晩培養してその生育阻害について検討した。また、*S. gordonii* 過酸化水素産生遺伝子欠失株や、その他の歯面への初期定着菌である *S. oralis, S. mitis, S. sanguinis, A. naeslunsii* についても同様に寒天培地を用いた阻害実験を行った。更に、ウエスタンブロット法による *S. gordonii* と共培養時の *S. mutans* Dpr タンパク質の発現の検討と、*S. gordonii* 菌液に *S. mutans, dpr* 遺伝子欠失株を液体培地と共に

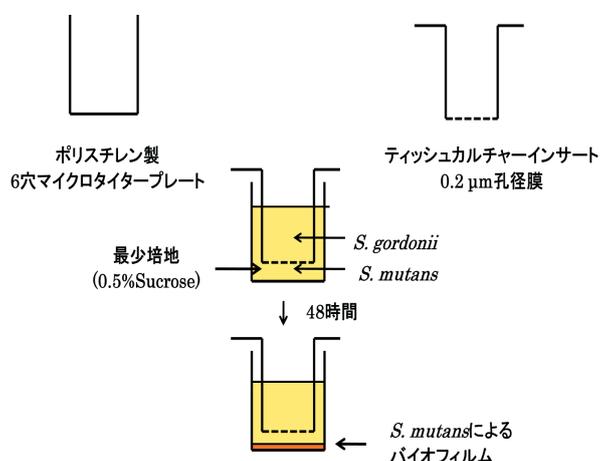


図1 *S. mutans* と *S. gordonii* の共培養

それぞれ混合し、0から24時間後にMSB寒天培地に培養した後、菌数比較を行った。

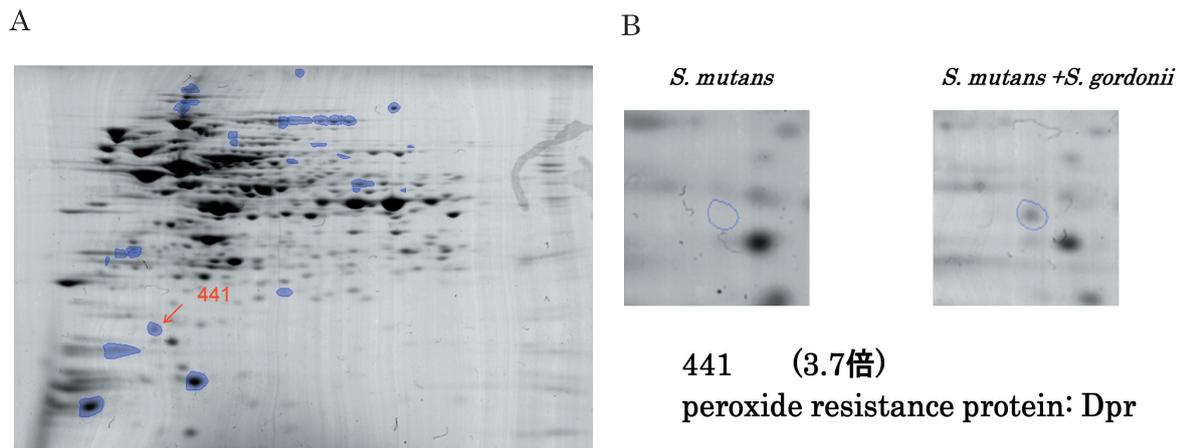


図2 *S. mutans* の二次元電気泳動法

**結果および考察：**

*S. mutans* 抗酸化ストレス遺伝子欠失株に対する *S. gordonii* による生育阻害実験の結果、3つの抗酸化ストレス遺伝子欠失株のうち、*dpr* 遺伝子欠失株のみに生育阻害が確認された(図3)。また、*S. gordonii* 過酸化水素産生遺伝子欠失株では生育阻害は認められず、*S. mitis*, *S. sanguinis* による *dpr* 遺伝子欠失株への生育阻害が確認された。ウエスタンブロット法による *S. gordonii* と共培養時の *S. mutans* Dpr タンパク質の発現を検討した結果、*S. gordonii* との共培養時において *S. mutans* Dpr タンパク質の発現増強が認められた(図4)。更に、液体培地中で *S. gordonii* と混合し、生育させた *S. mutans*, *dpr* 遺伝子欠失株の菌数比較を0, 2, 4, 6, 30時間後に行った結果、6時間後と30時間後において *dpr* 遺伝子欠失株の菌数が *S. mutans* 親株に比べ減少した(図5)。

これらの結果から、*S. mutans* Dpr が、*S. gordonii* 等いくつかの初期定着菌との競合において、必須のタンパク質である可能性が示唆された。

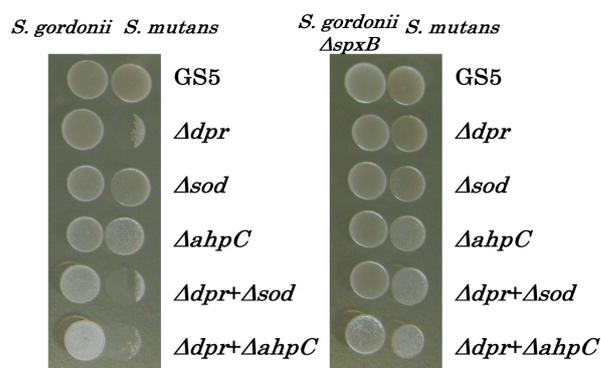


図3 *S. gordonii* による生育への影響

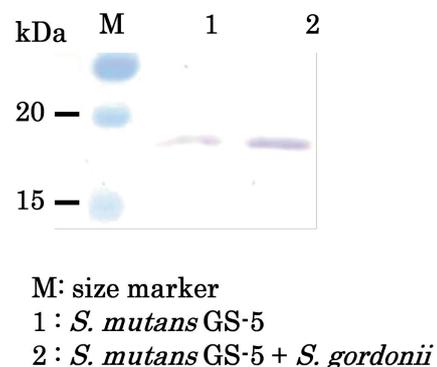


図4 共培養における Dpr の発現

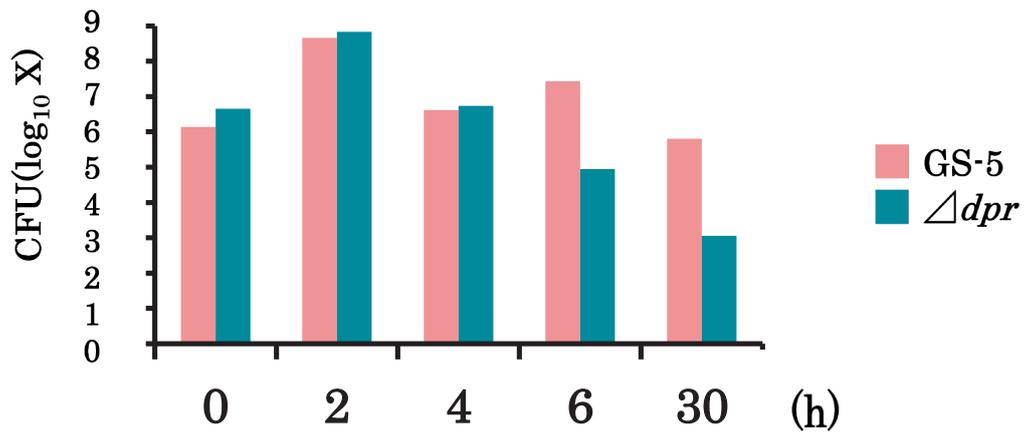


図5 共培養後における *S. mutans* のコロニー数

成果発表：

日本細菌学会地方会，北九州，2011/8/26-27，口頭発表

第54回日本歯科基礎医学会，郡山，2012/9/14-16，口頭発表

2012年度 バイオフィルムと複合微生物系研究会，茨城，2012/10/13-14，ポスター発表