

研究者：鈴木 到（所属：日本大学松戸歯学部 衛生学講座）

研究題目： *Streptococcus mutans* 産生メンブレンベジクルが初期付着菌群の初期付着・凝集に与える影響について

目 的：

う蝕や歯周病などの口腔感染症は、口腔バイオフィルムが主な原因となって生じる。口腔バイオフィルムは、まず歯面を覆う唾液糖タンパク質に初期付着菌群が付着・凝集し、その後、中期付着菌群や後期付着菌群が付着・凝集することで成熟する。初期付着菌群の1つである *Actinomyces oris* は歯体表面層に存在する2つの型の線毛を介して初期付着・凝集を行う、口腔バイオフィルムの足場となる細菌である。多くの細菌は増殖中にメンブレンベジクル（MVs）を産生することが知られており、う蝕原因菌である *Streptococcus mutans* も産生する。*S. mutans* が産生した MVs には、グルコシルトランスフェラーゼ（Gtf）や細胞外 DNA（eDNA）など様々な病原因子が含まれる。さらに *S. mutans* 産生 MVs は、口腔バイオフィルム形成の促進に寄与することが報告されている。しかしながら、初期付着菌群の付着・凝集に与える影響についてはほとんど明らかとなっていない。そこで、本研究は *S. mutans* 産生 MVs が *A. oris* の初期付着・凝集に与える影響について、*S. mutans* 産生 MVs 由来の Gtf や eDNA、さらに *A. oris* の線毛との関係性について検討することを目的とした。

対象および方法：

1. メンブレンベジクル（MVs）の抽出

Streptococcus mutans UA159 の親株（*S. mutans* WT）、またはバイオフィルム形成に寄与する非水溶性グルカン合成酵素である GtfB および GtfC を欠如する *gtfBC* 遺伝子欠損株（*S. mutans* Δ *gtfBC*）をブレインハートインフュージョン液体培地で 37℃、5% CO₂ 下で一晩培養した後、4℃、3000×g で 10 分間遠心分離した。遠心分離後の上清は、Vivaspin 20（Sartorius, Goettingen, Germany）を用いて 4℃、3000～4000×g で 20 分間遠心分離した。濃縮液を 0.45- μ m および 0.22- μ m Millex-HP Filter Unit（Merck Millipore, Massachusetts, United States）を用いてフィルター滅菌し、4℃、35000×g で 2 時間超遠心分離した。超遠心分離後の沈殿物を回収し、滅菌リン酸緩衝液（PBS）にて溶解し、MVs サンプルとした。それぞれの MVs サンプルは Bradford 法により総タンパク量を定量し、実験で使用するまで -20℃ にて凍結保存した。

2. ヒト唾液の回収

健康な成人 3 名（25～33 歳）から吐唾法により滅菌遠沈管に安静時唾液を採取した。唾液サンプルを 4℃、3000×g で 10 分間遠心分離し、上清を回収し、再度遠心分離を行った。遠心分離後の上清を、0.45- μ m および 0.22- μ m Millex-HP Filter Unit を用いてフィルター滅菌した。回収した滅菌ヒト唾液サンプルは、以下の実験で使用するまで -20℃ にて凍結保存した。

3. 初期付着・凝集体の形成

ガラスベースディッシュ（IWAKI；AGC, Shizuoka, Japan）に滅菌ヒト唾液をコートし、4℃で1時間静置してペリクルを形成した。滅菌 PBS で洗浄し、0.25% スクロース添加トリプチケースソイブローズ（TSBs）と OD₆₀₀=0.4 に調整した *Actinomyces oris* MG1 の親株（*A. oris* WT）、または凝集に寄与する 2 型線毛の線毛軸構成タンパク質である FimA が欠如した *fimA* 遺伝子欠損株（*A. oris* Δ *fimA*）を接種した。37℃、5% CO₂ 下で 3 時間培養してペリクルに付着させた。滅菌 PBS で洗浄し非付着菌を取り除いた後、TSBs と終濃度 3.125 μg/ml の *S. mutans* 産生 MVs を添加し、37℃、5% CO₂ 下で 1 時間培養した。また、培養時に生じる eDNA の影響を除くために、終濃度 100 unit の DNase I（Roche, Basel, Switzerland）を添加した。

4. LIVE/DEAD 染色と共焦点レーザー顕微鏡による観察

ガラスベースディッシュ底面に形成した *A. oris* の初期付着・凝集体は、Filmtracer LIVE/DEAD Biofilm Viability Kit（Invitrogen, Massachusetts, United States）による LIVE/DEAD 染色を行った。初期付着・凝集体は、共焦点レーザー顕微鏡（LSM510 [CLSM]；Carl Zeiss, Oberkochen, Germany）を用いて観察して画像を取得し、ZEN analysis software（Carl Zeiss）を用いて画像の解析を行った。そして、ImageJ 1.53k software（NIH, Maryland, USA）を用いて画像全体に対する生菌および死菌の比を算出した。異なる 3 回の実験を行い、それぞれ少なくとも 3 つの画像を解析した。

結果および考察：

1. *A. oris* の初期付着・凝集に対する *S. mutans* 産生 MVs の影響

A. oris WT の初期付着・凝集において、無添加時に死菌の面積は生菌の面積と比較して有意に多かった。MVs 添加時、無添加時と比較し、生菌および死菌の面積は有意に増加した。*A. oris* Δ *fimA* の初期付着・凝集において、無添加時に生菌と死菌の面積に有意差は認めなかった。MVs 添加時、無添加時と比較し、生菌および死菌の面積は増加した（図 1a, b）。一方、Δ *gtfBC* 産生 MVs を添加時、生菌および死菌は増加しなかった（図 2a, b）。*S. mutans* Δ *gtfBC* 産生 MVs の添加に関わらず、WT および Δ *fimA* の初期付着・凝集は生菌の面積と比較し、死菌の面積が有意に多かった（図 2b）。このことから、*S. mutans* 産生 MVs は *A. oris* の FimA 依存的・非依存的に生菌および死菌を促進させ、MVs 由来の GtfB および GtfC が寄与する可能性が示唆された。

2. *S. mutans* WT 産生 MVs が促進する *A. oris* の初期付着・凝集における eDNA の影響

A. oris WT の培養時に DNase I を添加した時、死菌の面積は生菌の面積と比較して有意に多かった。また、*S. mutans* WT 産生 MVs のみを添加した場合と比較し、初期付着・凝集の生菌および死菌の面積は有意に減少したが、無添加時と比較すると有意に増加した（図 3a, b）。*A. oris* Δ *fimA* の培養時に DNase I を添加した時、死菌の面積は生菌の面積と比較して有意に多かった。*S. mutans* WT 産生 MVs のみを添加した場合と比較し、死菌の面積は有意に減少した。一方、生菌の面積も有意差はないが減少した。このことから、*S. mutans* 産生 MVs 添加に

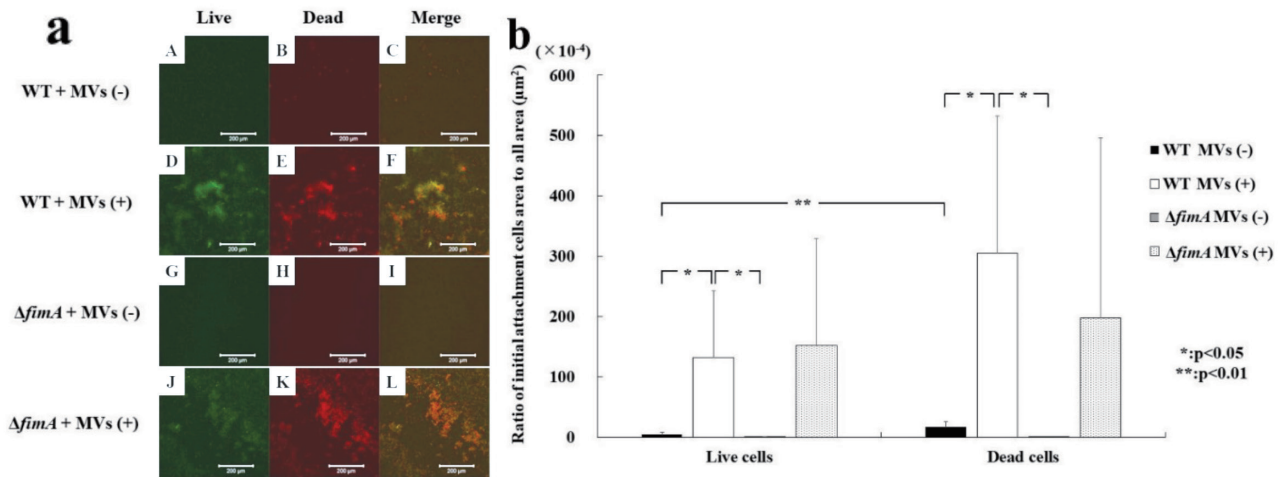


図1 *A. oris* の FimA 依存的・非依存的な初期付着・凝集に対する *S. mutans* WT 産生 MVs による影響
a: CLSM 画像 b: CLSM 画像全体に対する生菌および死菌の比

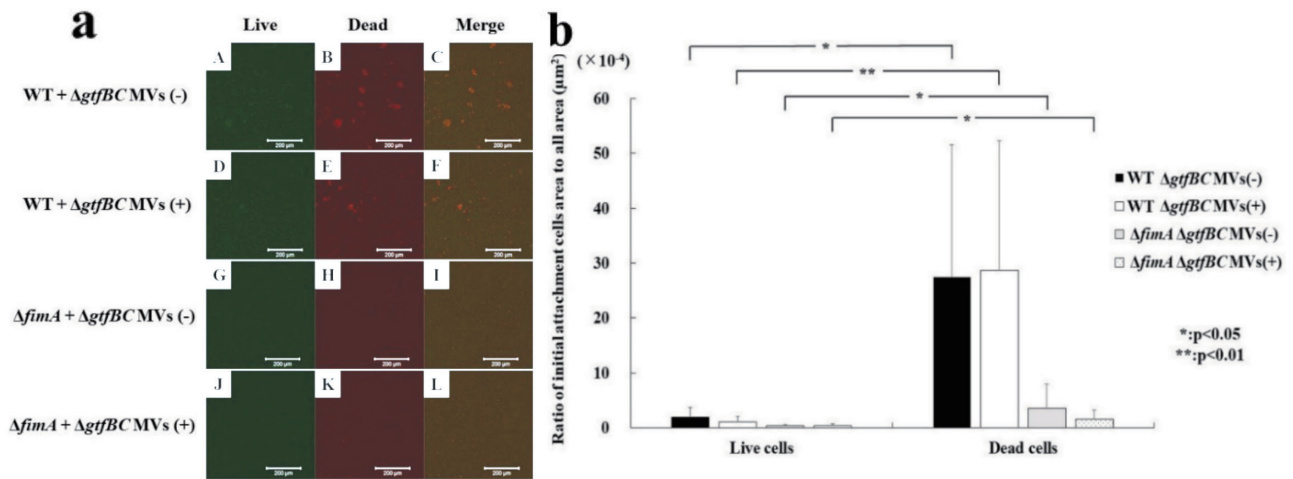


図2 *A. oris* の FimA 依存的・非依存的な初期付着・凝集に対する *S. mutans* $\Delta gtfBC$ 産生 MVs による影響
a: CLSM 画像 b: CLSM 画像全体に対する生菌および死菌の比

より形成した初期付着・凝集において、eDNA が FimA 依存的および非依存的に *A. oris* の生菌および死菌による初期付着・凝集に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

以上の結果より、*S. mutans* 産生 MVs は *A. oris* の FimA 依存的・非依存的に生菌および死菌の初期付着・凝集を促進させることが明らかとなった。このメカニズムには MVs が有する GtfB および GtfC が合成するグルカンや、eDNA が影響している可能性が示唆された。今後は、初期付着・凝集で合成された MVs 依存的なグルカンの定量化や、産生された eDNA の定量化を行うことを検討している。

なお、本研究で用いた *A. oris* の遺伝子欠損株を供与していただいた、現・University of California, Los Angeles の Dr. Hung Ton-That に厚く御礼申し上げます。

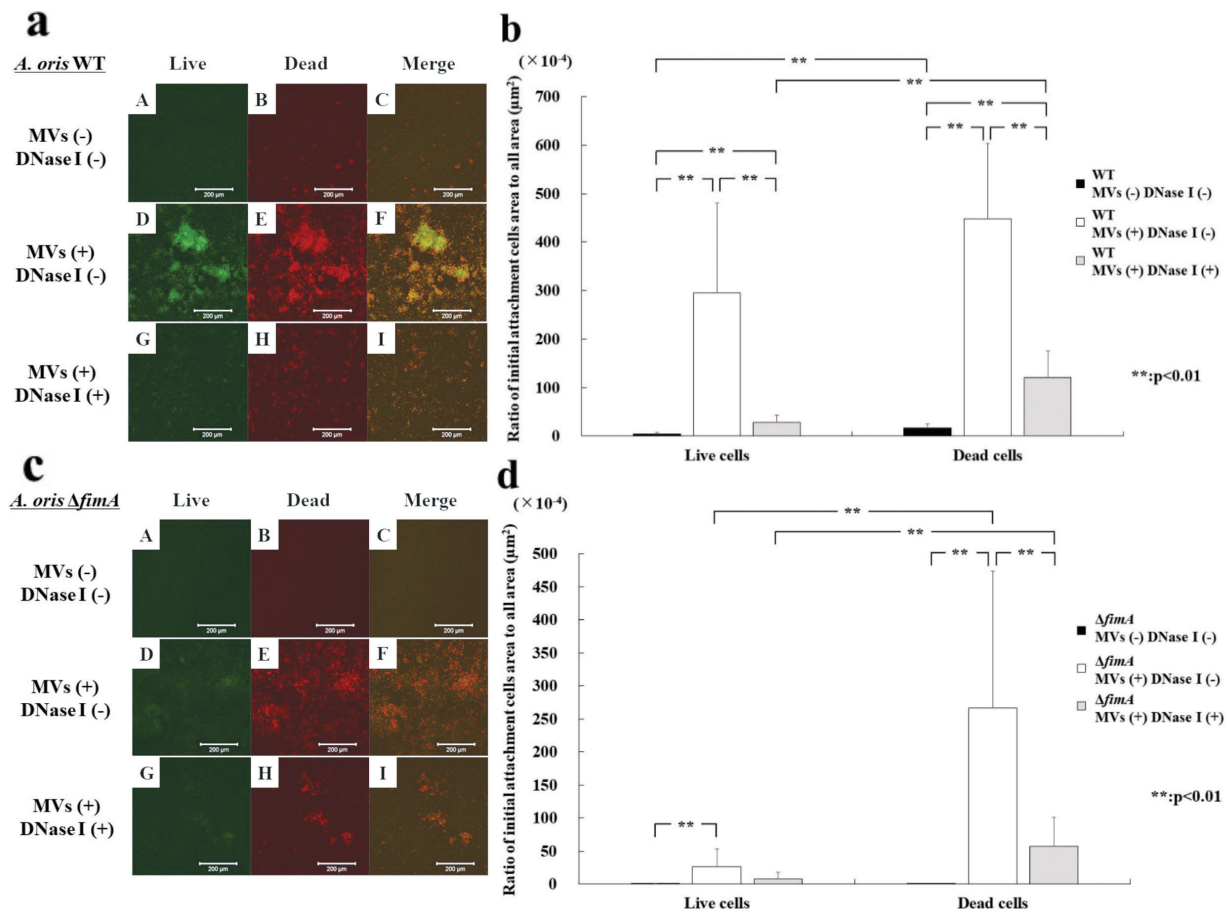


図3 *S. mutans* WT 産生 MVs が促進する *A. oris* の FimA 依存的・非依存的な初期付着・凝集に対する DNase I の影響
a, c : CLSM 画像 b, d : CLSM 画像全体に対する生菌および死菌の比

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

第 61 回日本小児歯科学会大会（2023 年 5 月開催）にて発表予定としている。