

# 近藤 郁理 論文内容の要旨

## 主 論 文

Phylogenetic Analyses and Detection of Viridans Streptococci Based on Sequences and Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of the Rod Shape-Determining Protein Gene.

(*rodA* 遺伝子のシーケンスおよび、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法に基づくビリダンスレンサ球菌の系統学的解析および検出)

Ikuri Konishi, Tomonori Hoshino, Yoshio Kondo, Kan Saito, Miyuki Nishiguchi, Kyoko Sato, and Taku Fujiwara

Journal of Oral Microbiology, accepted, 2009

原稿枚数 17 枚、英語論文による公表。

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻  
(主任指導教員： 藤原 卓 教授)

### 緒言

300種類以上の細菌で構成される口腔細菌叢は、その大部分が臨床上分離頻度の高いことで知られるレンサ球菌によって構成されている。レンサ球菌の中でも、ビリダンスレンサ球菌は、ヒトの口腔内の常在菌で、通常はほとんど病原性を示さないが、齲蝕、菌血症、さらには感染性心内膜炎を引き起こすことが知られている。このことから、ビリダンスレンサ球菌の微生物群集解析を行うことは、カリエスリスクを判定するだけでなく、菌血症や感染性心内膜炎のリスクを判定する上でも重要なことと考えられる。

細菌叢解析は、通常 16S rRNA 遺伝子 (16S rDNA) の多様性に基づいて行われることが多いが、ビリダンスレンサ球菌の 16S rDNA の相同性は非常に高く、この方法では属レベルでの同定は可能であるものの、種レベルでの同定は困難である。そこで我々は、細菌の形態形成、細胞分裂、抗菌薬感受性に関与し、多くのビリダンスレンサ球菌が有する遺伝子である *rodA* (rod shape-determining protein gene) に注目し、*rodA* 遺伝子を遺伝系統学的に解析後、多くの細菌叢解析に応用されている変性剤濃度勾配電気泳動 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis : DGGE) 法に応用して、微生物群集解析を行った。

### 対象と方法

主たるビリダンスレンサ球菌である 21 菌種の基準株を遺伝系統解析に用いた。遺伝子配列のアライメント解析には ClustalX を用い、系統樹の作製は MEGA4 を用いて近隣結合法 (Neighbor-Joining法) で行った。

ビリダンスレンサ球菌を含む代表的なグラム陽性菌における *rodA* の系統学的な関係を決定するために、ゲノムデータベースから *rodA* を保有する菌種を抽出して、系統樹を作成し、*rodA* 遺伝子のユニバーサルプライマーを作成した。このプライマーを用いて主たる口腔レンサ球菌 21 株から *rodA* を増幅後、ダイレクトシーケンスを行った。得られた *rodA* のシーケンスをもとに遺伝系統樹の作成と遺伝系統距離を算出して、16S rDNA との比較を行った。

DGGE 法は、始めに垂直 DGGE 法を行い、口腔内から検出される頻度の高い 9 菌種 (*Streptococcus mitis*, *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. gordonii*, *S. parasanguinis*, *S. salivarius*, *S. vestibularis*, *S. mutans*, *S. sobrinus*) を実際の検出菌として想定し、このなかで T<sub>m</sub> 値が最高と最低の 2 菌種を用いて 9 菌種が検出可能となる変性剤濃度を決定した。決定された変性剤濃度で水平 DGGE 法を行い、9 菌種がリファレンスマーカーとなりうることを確認した。次に臨床応用の可能性をみるために、8 人の被験者の唾液サンプルを水平 DGGE 法で分析した。同時に唾液サンプルは、レンサ球菌の選択培地である Mitis-Salivarius 寒天培地に播種し、分離されたコロニーを分離して、ストレプトグラムによる生化学的性状検査と、16S rDNA およびグルコシルトランスフェラーゼの遺伝子配列に基づく遺伝学的検査で菌種同定を行った。

## 結果

代表的なグラム陽性菌の *rodA* から作成した系統樹は、各菌種を属および種レベルで明確に分類していた。供試した 21 菌種のビリダンスレンサ球菌の *rodA* の遺伝系統距離の平均は、16S rDNA の遺伝系統距離の約 10 倍であることが明らかとなり、DGGE を行うのに十分な遺伝子の多様性があることが示唆された。

垂直 DGGE 法によって、T<sub>m</sub> 値が最高の *S. sobrinus* と最低の *S. mutans* 2 菌種が解離を始める濃度は、それぞれ 22%、34%であったことから、9 菌種を分離するのに最適な変性剤濃度は、28%であることが決定された。

この変性剤濃度による水平 DGGE 法で唾液サンプル中の菌種をマーカーとの比較で同定することができた。検出された菌種のバンドは、同定された菌種のシーケンスと一致することが確認された。培養法でも、DGGE 法で同定された菌種が検出され *rodA* を用いた DGGE 法の信頼性が示された。

## 考察

今回用いた 21 菌種のなかで、*rodA* 単独では分別できなかったものもあった。これらは、16S rDNA では分類可能であったので、2 つ以上の遺伝子を組み合わせることで、より高解像度な同定が可能になると考えられた。

RodA はペニシリン結合タンパクなどと共に、ペプチドグリカン合成や抗菌薬への感受性に関与していることから、本研究でえられた *rodA* の系統学的解析結果は、このような膜タンパク研究の第一ステップになると考えられる。

(備考) ※日本語に限る。2000 字以内で記述。A4 版。