

論文審査の結果の要旨

氏名：鈴木 雄 祐

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Inhibiting effects of fructanase on competence-stimulating peptide-dependent quorum sensing system in *Streptococcus mutans*

（*Streptococcus mutans* の CSP 依存的 quorum sensing における fructanase の阻害効果）

審査委員：（主査） 教授 小 方 頼 昌
（副査） 教授 落 合 智 子
教授 近 藤 壽 郎

う蝕や歯周病の原因細菌の付着、増殖にバイオフィルムの形成が深く関与している。ミュータンス連鎖球菌は、ヒトのう蝕の主な原因菌の大半を占めており、口腔バイオフィルム形成における重要な細菌群である。特に、*Streptococcus mutans* (*S. mutans*) は、う蝕の主要な原因菌の一つで、細菌性心内膜炎の起因菌でもある。そのため、*S. mutans*によるバイオフィルム形成を阻害することは、う蝕や歯周病といった口腔内疾患だけでなく、これより波及する全身的疾患および口腔外科領域における術後感染の予防においても重要である。

*S. mutans*のバイオフィルム形成には、グルカン依存的および非依存的なバイオフィルム形成が存在する。グルカン依存的なバイオフィルム形成とは、*S. mutans*の産生するグルコシルトランスフェラーゼにより、スクロースを基質として、菌体外に不溶性および水溶性グルカンを形成することで、歯面に強固なバイオフィルムを形成する。この強固なバイオフィルムが、う蝕に関与していると考えられている。

グルカン非依存的なバイオフィルム形成の要因の一つに、細胞間シグナルであるQuorum sensing system (QS) が存在する。QSとは、細菌が一定数を超えた際に、その密度を感知して、シグナル伝達が起こり、細菌の生存に都合のよい活性が起こるシステムで、細菌の生残において重要な機能である。*S. mutans*のバイオフィルム形成もQSにより制御され、遺伝子の転写を調節していることが明らかとなっている。*S. mutans*のQSは、主にオートインデューサーであるcompetence-stimulating peptide (CSP) により調節され、ストレス環境条件下で活性化される。このCSPを介したQSが、バイオフィルム形成、耐酸性獲得、バクテリオシン産生、遺伝子形質転換に関与している。

以前の研究より、*Streptococcus salivarius*の培養上清が、CSPの不活性化を誘発し、*S. mutans*のバイオフィルム形成を阻害することが確認され、その物質がFructanase (FruA) であることが同定された。FruAは、スクロースおよびフルクトースを分解する酵素で、スクロースを分解することにより*S. mutans*のバイオフィルム形成を阻害することが報告された。しかし、本研究にて、糖未添加およびグルコース、フルクトース添加培地で、FruAによる*S. mutans*のバイオフィルムに対する活性を検討したところ、バイオフィルム形成を阻害することが確認された。そこで、FruAがスクロースを分解すること以外にバイオフィルム形成を阻害するメカニズムが存在すると考え、FruAによる*S. mutans*のグルカン非依存的なバイオフィルム形成に対する影響を検討するため、QSに着目した。

本研究では、QSにおけるFruAの効果을明らかにするため、*S. mutans*のバイオフィルム形成、バクテリオシン産生、遺伝子形質転換に対する影響を検討した。

本研究により、以下の結果を得た。

- 1) *S. mutans* において、スクロース存在下でも合成酵素がないと不溶性グルカンが産生されず、グルコースやフルクトースはグルカンを合成する基質にならない。
- 2) FruA は、糖未添加およびスクロース、グルコース、フルクトース添加培地で、*S. mutans* のバイオフィルム形成を阻害した。

- 3) グルカン形成に関与する *gtf* 変異株では、wild type と比べ、糖未添加およびスクロース、グルコース、フルクトース添加培地で、バイオフィーム形成量は減少した。また、FruA による阻害効果を示す傾向を認めた。
- 4) QS に関与する *com* 変異株では、wild type と比べ、糖未添加およびスクロース、グルコース、フルクトース添加培地で、バイオフィーム形成量は若干減少した。また、全ての培地で、FruA による阻害効果を認めた。
- 5) *S. mutans* GS5 *comC* 変異株に CSP を作用させると、*S. mutans* GS5 wild type と同様の大きさのバクテリオシンを形成した。また、CSP を作用させた *S. mutans* GS5 *comC* 変異株に FruA を作用させると、バクテリオシンは濃度依存的に小さくなった。
- 6) CSP に FruA を作用させると、*S. mutans* の CSP により活性化した遺伝子形質転換は、阻害されなかった。
- 7) 直接細菌に FruA を作用させると、終濃度 57 unit/ml 以上で、*S. mutans* の CSP により活性化した遺伝子形質転換は、有意に阻害された。
- 8) 細菌に熱処理した FruA を作用させると、FruA を作用させない場合と同程度まで、遺伝子形質転換の回復を認めた。

以上の結果から、FruA による *S. mutans* のバイオフィーム形成阻害には、グルカン依存のおよび QS が関与するグルカン非依存的なバイオフィーム形成阻害があることが考えられた。また、FruA は、CSP 依存的な QS を阻害することが示唆された。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

平成29年10月26日