

# 論文の内容の要旨

氏名：中村 知世

博士の専攻分野の名称：博士（生物資源科学）

論文題名：*Streptococcus mutans* が生産する membrane vesicles の病原性と免疫抗原としての特徴

## 第1章 緒言

*Streptococcus mutans* は口腔内に存在する通性嫌気性のグラム陽性連鎖球菌で酸生産性、酸耐性に優れており、歯面への高い付着能とバイオフィルム（BF）形成能を有する。よって *S. mutans* はう蝕原性細菌とされ、これら特徴に関連するものは病原因子として広く研究されてきた。BF 形成因子の1つである Gtf はスクロースを基質としてグルカンを形成し、特に非水溶性グルカンを形成する GtfB、GtfC が BF 形成に大きな役割を果たしている。PAc は約 190 kDa の Antigen I/II、P1 などとも呼ばれる線毛様表層タンパク質である。PAc はスクロース非依存性の病原因子であり、唾液ペリクルに結合することから歯面への初期付着に関与している。

ヒト口腔内には多くの細菌が存在しており、現在約 700 種類以上が同定されている。*S. mutans* は上記 BF 形成因子を有することから口腔内で後期に定着する細菌であるが、様々な口腔内細菌の歯表面定着にも寄与している。初期定着菌が歯面に BF を形成し口腔内環境を調節することで、歯周病菌などの後期定着菌が口腔内へ定着することが可能になり、口腔内疾患が生じる。これら疾患は口腔内だけではなく糖尿病や心内膜炎などの全身疾患につながるとされており、口腔内細菌のコントロールが健康的な生活につながると考えられている。

う蝕予防の研究として BF 形成メカニズムについて多くの研究が行われてきた。しかしメカニズムについては現在も未知の部分が多く存在しており、これらについて理解することが効率的なう蝕予防につながると考えられる。そこで今回の研究では新たな BF 形成因子の可能性が示唆される membrane vesicles（MV）について着目することとした。MV は膜小胞と呼ばれ、細菌が生産する 20-500 nm の球状構造体で MV 中には核酸や毒素、脂質、酵素など様々な物質が含まれることから物質の運び屋としての機能をもつ。*S. mutans* は 2014 年に MV を生産することが報告されている。この報告の中で MV 中に Gtf や PAc などの病原因子が含まれていることは明らかとなったが、その活性や役割については未解明の部分が多い。そこで本研究では、*S. mutans* の MV について、主要な病原因子である Gtf 活性、PAc の有無、BF 形成と免疫抗原としての特徴の検討を行った。

## 第2章 *S. mutans* の MV 中に含まれる病原因子に関する検討

本検討では MV における Gtf 活性及びその存在量と PAc の有無について確認を行った。供試菌株は実験室株である *S. mutans* UA159 株とその変異株である *gtfB* 株、*gtfC* 株、GtfB 及び GtfC を含まない *gtfBC* 株である。それぞれの菌を 1 L の Brain Heart Infusion 液体培地で培養し、上清を 50 kDa で限外濾過後、超遠心分離(150,000 x g)を行い、その沈殿を 200  $\mu$ L の PBS で懸濁し MV とした。

まず MV が BF 形成に関与するのかが確認を行うため野生株と BF 形成能が欠落した *gtfBC* 株の MV を用いて BF 形成量の評価を行った。BF 形成量の評価はプレート上で *gtfBC* 株に MV を加える BF 形成実験を用いて行った。野生株の MV では濃度依存的に BF 形成促進効果がみられたが、*gtfBC* 株の MV では BF 形成効果がみられなかった。このことから MV に含まれる GtfB と GtfC は BF 形成促進効果を有することが示唆された。そこでこれら MV 中の Gtf の活性を確認するために Zymography、Western-blotting を用いて検討を行った。野生株では活性のある Gtf を多く含んでいたが、*gtfBC* 株の MV では Gtf が検出されなかった。したがって MV 中の活性のある Gtf が BF 形成に関与していることが明らかとなった。

活性のある Gtf が BF 形成促進効果をもつことが明らかとなったが、MV による BF 形成に重要な因子は GtfB、GtfC のどちらであるか明らかではない。そこで各変異株の MV を用いて BF 形成促進効果を評価した。*gtfB* 株の MV は野生株の MV と同程度の BF 形成促進効果を有していたが、*gtfC* 株の MV は野生株

のMVと比較してBF形成能が低下した。SDS-PAGE及びGtf抗体を用いたWestern-blottingにてGtf量の確認を行ったところ、野生株のMVと比較して*gtfB*<sup>-</sup>株のMVでは80%、*gtfC*<sup>-</sup>株のMVでは31%のGtf量であった。したがってMVに含まれているGtfはGtfCが主であることが明らかとなり、BF形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

MVによって細菌を歯面に定着させるためにはMVが歯面に付着し、MVに含まれるGtfCが歯表面でグルカンを形成する必要がある。そこで付着因子としてPAcが知られていることからMV中でのPAcの存在量について検討を行うこととした。Western-blottingにて*S. mutans*野生株及び各Gtf変異株のMVにおいてPAcの存在が確認されたが、各Gtf変異株でのPAc量は野生株に比べて減少していた。このことからMV中のPAcの量はGtfの存在に依存することが明らかとなった。またPAcがMVに含まれていることから、MVはPAcにより歯面に付着しBF形成に重要な役割を果たすことが考えられた。そこでMVを先にプレートに接種しグルカン合成の基質であるスクロースを加えて培養後、定着しなかったMVを洗浄により除去、その後同じ培地と*gtfBC*株を加えることでMVの先の付着及びグルカン形成がBF形成能に影響を与えるかについて検討を行った。野生株のMVを加えて2時間以上経過することでBF形成量が上昇することが明らかとなった。MVが表面に付着することでGtfCが誘導され、2時間以上培養することでグルカンが合成されBF形成を誘導すると考えられた。このことからMVはPAcにより歯面に付着し、その後形成されたグルカンがBF形成を誘導することが示唆された。

*S. mutans*のMVがBF形成能を有することから、他の口腔内細菌においても同様にBF形成を誘導することが考えられたため、様々な口腔内細菌と*S. mutans*の野生株及び*gtfBC*株のMVを用いてBF形成実験を行った。歯表面への初期定着細菌と考えられている*Streptococcus mitis*, *Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*と*Actinomyces naeslundii*, *Actinomyces oris*において野生株のMVによりBF形成量が増加した。このBF形成量の増加は*gtfBC*株のMVでみられなかったことから、これらもGtfによる効果であると考えられた。また*Streptococcus salivarius*や*Streptococcus anginosus*などの歯表面初期定着菌ではない口腔内細菌は、MVによるBF形成が誘導されなかった。よってMVは初期定着菌の能力を利用してBFを形成させることが考えられた。

### 第3章 *S. mutans* MVの抗体生産性に関する検討

近年ワクチン開発研究において、MVは菌体よりもサイズが小さく、加えて病原因子を多く含むことから粘膜免疫による病原因子に対する抗体誘導が可能であり、様々な細菌で粘膜ワクチン抗原として注目されている。髄膜炎菌である*Neisseria meningitidis*のouter membrane vesicles (OMV: グラム陰性菌のMV)はキューバ、ノルウェー、フランスなどですでにワクチンとして使用されている。歯周病の原因菌である*Porphyromonas gingivalis*はアジュバントであるpoly(I:C)とともにOMVを鼻腔粘膜に免疫すると病原因子に対するIgA抗体が唾液中に誘導され、マウス口腔内の*P. gingivalis*量を減少させることが明らかとなっている。*S. mutans*も同様に、唾液や口腔粘膜上で*S. mutans*に対するIgA抗体を誘導することがう蝕の予防につながると考えられる。

これまでに*S. mutans*のGtfやPAcはワクチン抗原として報告されており、ワクチン開発において有効な因子となることが考えられた。その一方で、可溶性タンパク質の免疫原性は低く、*S. mutans*の菌体ではサイズが大きく粘膜免疫では抗体が誘導されないことが明らかとなっている。以上のことからGtfとPAcを含む*S. mutans*のMVであれば粘膜免疫を活性化し、GtfとPAc抗体を誘導できることが考えられる。そこで*S. mutans* MVとアジュバントである合成二本鎖RNAのpoly(I:C)を鼻腔粘膜に接種することで*P. gingivalis*同様、抗体を誘導するかについて検討を行った。

野生株及び各変異株のMV1 µgとpoly(I:C)10 µgを10 µLのPBSに懸濁し、6週齢のメスBALB/cマウスの鼻に5 µLずつ粘膜免疫した。その3週間後とさらに2週間後、同様に合計3回の粘膜免疫を行い、2週間後に唾液、血清、鼻腔洗浄液の採取を行った。野生株MVを抗原としてELISAを行ったところ、全てのサンプルにおいてMVに対する唾液、鼻腔洗浄液でIgA、血清でIgA、IgGが誘導された。特に野生株及び*gtfB*<sup>-</sup>株のMVにおいて抗体産生能が高かった。この抗体は何と反応しているのか確認を行うため、野生株及び*gtfBC*株のMVを用いてSDS-PAGE、Western-blottingを行った。Western-blottingでは唾液IgAと血清IgGの反応性の検討を行った。野生株及び*gtfB*<sup>-</sup>株のMVではGtfに対する抗体が誘導されていたが、*gtfC*<sup>-</sup>株及び*gtfBC*株のMVではGtfに対する抗体が誘導されなかった。以上のことから、MVによるGtf抗体

産生には主に GtfC が関与していることが考えられた。よって野生株と *gtfB* 株の MV は粘膜ワクチン抗原として有用である可能性が示唆された。

#### 第4章 総括

本研究において、*S. mutans* の MV には GtfB に比べ GtfC が多く含まれていることが明らかとなった。この Gtf は BF 形成能力を有しており、*S. mutans* だけでなく他の初期定着菌に対しても BF 形成促進効果があることが明らかとなった。また MV の歯表面への付着には PAc が関与していることが示唆された。以上のことから、*S. mutans* の MV は *S. mutans* の歯表面における BF 形成及び初期定着細菌の BF 形成促進に大きな役割を果たしていることが示唆された。よって MV をターゲットとしたう蝕予防が重要な意味を持つことが考えられる。今後本因子をターゲットとした新たなう蝕予防剤の開発について検討していく。

*S. mutans* の MV は粘膜免疫により Gtf に対する抗体を誘導することができ、その抗原性に GtfC が関与していることが示唆された。唾液中に Gtf に対する抗 IgA 抗体が誘導されたことから、*S. mutans* 及び他の口腔内細菌の定着を抑制することが予想される。よって MV を用いた口腔内細菌に対するワクチン開発も可能ではないかと考えられる。また、Gtf に対する抗体が強く誘導されたことから Gtf の抗原部分を遺伝子工学的技術により異なる細菌やウイルスの抗原部分に組換えて、その組換えた菌株から MV を回収、その MV を免疫抗原とすることで様々な病原細菌やウイルスに対する IgA 抗体の誘導も可能になると考えられる。以上のことから、*S. mutans* の MV は新しいワクチンの開発の一助になるのではないかと考えられる。