

論文の要約

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

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。*S. mutans* の BF 形成メカニズムについて多くの研究が行われてきたが、現在も未知の部分が多く存在している。先行研究により *S. mutans* の membrane vesicles（MV）中には BF 形成因子であるグルコシルトランスフェラーゼ（Gtf）と菌体表層線毛様抗原（Pac）を含む病原因子が存在することが明らかとなっており、新たな BF 形成メカニズムであることが示唆されている。しかし、その活性や役割については未解明の部分が多い。そこで *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。

S. mutans の Gtf は 3 種類存在しており、BF 形成に重要なものは GtfB、GtfC の 2 種類である。そこで MV における GtfB 及び GtfC の活性及びその存在について検討を行った。Gtf 活性は BF 形成能が欠落した *gtfBC* 株に MV を加えた BF 形成促進効果の評価を行った。野生株、*gtfB* 株の MV では濃度依存的な BF 形成促進効果がみられたが、*gtfC* 株の MV は野生株の MV と比較して BF 形成能が低下し、*gtfBC* 株の MV では BF 形成効果がみられなかった。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* 株の MV では 80%、*gtfC* 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 は活性を持ち、GtfC を多く含む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。また、MV を取り除いた上清部分では BF 形成促進効果が低下したことから、Gtf の多くは MV に含まれていることが示唆された。

MV による歯面への細菌定着メカニズムとして、MV が歯面に付着した後に GtfC によりグルカンを形成することが考えられる。歯面への付着因子として Pac が知られており、MV にも含まれていることから Pac の存在量について検討を行うこととした。Pac 抗体による Western-blotting において、野生株と比較して各 Gtf 変異株での Pac 量は減少していた。よって MV 中の Pac 量は Gtf の存在に依存することが明らかとなった。また MV に含まれている Pac が初期付着因子として歯面に付着し、BF 形成に重要な役割を果たすことが考えられたため MV 単独での付着後に菌体を加えて BF 形成量への影響を検討した。MV を単独で付着させて 2 時間以上経過することで BF 形成量が上昇することから、MV が表面に付着し GtfC により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により BF 形成を誘導することが示唆された。

これまでの検討で用いた Gtf 変異株は全て *gtf* 遺伝子内に抗生物質耐性遺伝子を組込むことで作製した。抗生物質耐性遺伝子が何らかの影響を及ぼすことが考えられたため、Gtf 量の減少が確認されている株である *rgpH*、*rgpI* 変異株と非水溶性グルカン合成能が欠落した *gtf* 自然変異株を用いて上記同様の検討を行った。*rgpH*、*rgpI* 変異株は Gtf 量の低下と BF 形成促進効果の低下がみられた。*gtf* 自然変異株は活性の持たない Gtf 様のタンパク質を有していたが、BF 形成促進効果の低下がみられた。以上のことから、活性のある Gtf が多く存在することで BF 形成促進効果がみられることが明らかとなった。

MV には多くの病原因子が含まれているが、この存在量の違いが粒子サイズに影響を及ぼしているのではないかと考え、SEM（Scanning electron microscopy）にて観察を行った。野生株と Gtf 変異株の MV のサイズを比較したところ、野生株の MV が最も大きく、次いで *gtfB* 株、*gtfC* 株、*gtfBC* 株の MV と小さくなった。Gtf の含まれている量とサイズの大きさが一致したことから、Gtf の量に依存してサイズに変化が現れることが示唆された。また、Gtf 様のタンパク質を含む *gtf* 自然変異株の MV は野生株 MV のサイズと同一であった。MV の Pac 量も Gtf の存在に依存していることから、Gtf は菌体表層構造に影響を与える可能性がある。よって、MV のサイズは Gtf の活性の有無にかかわらず、Gtf の存在に依存することが明らかとなった。

これまでの検討において *S. mutans* の MV は付着能を持ち、BF 形成能を有することが明らかとなった。そこで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。野生株の MV は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 BF 形成量を増加させた。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、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強固な BF を形成させることが考えられた。

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るが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。一方で 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。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唾液、鼻腔洗浄液、血清に IgA 抗体や IgG 抗体を誘導できるかについてマウスを用いた検討を行った。MV は野生株と Gtf 変異株のものを使用した。野生株 MV を抗原として ELISA を行ったところ、全ての免疫サンプルにおいて MV に対する IgA 抗体、血清で IgG 抗体が誘導された。特に野生株及び *gtfB* 株の MV において抗体産生能が高かった。この結果は poly(I:C) をアジュバントとしたものの結果であり、MV のみでは抗体が誘導されなかった。この抗体は野生株及び *gtfB* 株の MV では Gtf に対するものであることが明らかとなったが、*gtfC* 株及び *gtfBC* 株の MV では Gtf に対する抗体を誘導できなかった。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。

本研究において、*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。また、*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。また、唾液中に Gtf に対する抗 IgA 抗体が誘導されたこと、初期定着細菌が *S. mutans* MV による BF 形成促進効果を有していることから、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。