

## 論文審査の結果の要旨

氏名：政所 謙吾

博士の専攻分野の名称：博士(生物資源科学)

論文題名：納豆由来プロテアーゼによる *Streptococcus mutans* の制御に関する検討

審査委員：(主査) 教授 竹永 章生

(副査) 教授 川井 泰

教授 細野 朗

准教授 成澤 直規

### 緒言

う蝕とは口腔内細菌に由来する酸により歯の硬組織が脱灰することで生じる口腔疾患である。う蝕の誘発は歯面上での微生物によるバイオフィルム(以下、BF)形成と密接に関連する。近年の研究により、歯面上のBFについて健康部位では *Streptococcus sanguinis* (以下、*S. sanguinis*) や *Neisseria* 属、*Leptotrichia* 属などが主要な構成細菌であったのに対し、う蝕部位では *Streptococcus mutans* (以下、*S. mutans*) や *Scardovia wiggisiae* などの酸生産性や酸耐性に優れた細菌が同定された。う蝕が進んだ病巣では *S. mutans* が優占化することが報告されており、*S. mutans* がう蝕の誘発と進行にとって最も重要な細菌種であると考えられる。

*S. mutans* は通性嫌気性のグラム陽性連鎖球菌であり、グルコシルトランスフェラーゼ(以下、GTF)によりスクロースから不溶性の $\alpha$  (1-3)グルカンを合成し、歯面上に粘着性を有する強固なBFを形成する。また本菌は複数のバクテリオシンを生産し、口腔環境での定着性に影響することが報告されている。これまでに口腔バイオフィルムの制御剤として使用されている抗生物質や薬剤は、耐性菌出現のリスク、人間の味覚の低下や口腔組織の色素沈着などいくつかの副次的作用を伴うため、その適用が制限されている。よって新たなバイオフィルム制御剤の探索が求められている。

当研究室ではこれまでに納豆の水溶性画分が *S. mutans* の生菌数に影響することなくBF形成を抑制することを明らかにしている。さらに、納豆製造のスターターである *Bacillus subtilis* natto(以下、*B. subtilis* natto)により生産される Subtilisin NAT (以下、Sub.NAT) (E.C. 3.4.21.62)でも同様にBF形成抑制効果が認められている。Sub.NATはナットウキナーゼとしても知られるセリン型プロテアーゼである。これまでにSub.NATが高い血栓溶解活性を有することが明らかになり、納豆の摂食は心血管疾患の発生率を低下させるとの報告があることから、機能性食品として注目されている。当研究室では納豆の水溶性画分に含まれるBF形成抑制因子はSub.NATであることを示しているが、BF形成抑制メカニズムについては未解決である。そこで本研究では納豆由来Sub.NATについて、これまで未検討であるヒト臨床分離株への効果を検討した。さらにGTFとバクテリオシン産生への影響を評価し、口腔BF形成制御剤としての利用可能性について検討を行った。

## 第1章 納豆の水溶性画分及び Sub. NAT による臨床分離 *S. mutans* の BF 形成への影響評価

*S. mutans* は高い自然形質転換能を有することや複数のトランスポザゼを保有することから、株レベルでの遺伝的な多様性がもたらされている。遺伝的多様性は *S. mutans* の BF 形成能や酸生産性及び酸耐性にも影響を与えることが示唆されており、菌株間の表現型に大きな差異が見出されている。これまでに行われた、納豆の水溶性画分や Sub. NAT による BF 形成への影響評価は一部の実験室株を対象としたものであり、多様な *S. mutans* に対しての有効性は検討されていない。そこで本章ではヒト口腔内から臨床分離した *S. mutans* を用い、納豆の水溶性画分と Sub. NAT による BF 形成抑制効果について検討を行った。

ヒト臨床分離株の取得は、日本大学松戸歯学部倫理委員会の承認 (EC20-28) を受け実験参加者及びその保護者に実験の目的や内容を説明し同意を得た上で実施した。分離株は日本大学松戸歯学部附属病院小児歯科を受診した 3 歳から 6 歳のう蝕有病患者 9 名から採取した。歯垢を 0.9% NaCl 水溶液に懸濁し、*Streptococcus* 属選択培地である MSB 培地に塗布した。37°C で 40 時間培養後、*S. mutans* 特有のラフ型コロニーを釣菌し、さらに純化操作を行った。この結果、すべての患者から 1 株ずつ計 9 株を候補株とした。属種の推定は Chen ら (2007) の報告をもとに表層プロテアーゼをコードする *htrA* 領域の一部と遺伝子間領域の PCR 増幅の有無による同定法に従い、9 株すべてが *S. mutans* であると判断された。分離株の遺伝的多様性は Random Amplified Polymorphic DNA (以下、RAPD) 法により評価し、得られたバンドパターンから実験室株 3 株と分離株 9 株の計 12 株間で遺伝的な多様性が示された。BF 形成量はヒト唾液でコーティングされた 96 ウェルプレートを用いたマイクロプレート法にて評価した。臨床分離株と実験室株の計 12 株はそれぞれ BF 形成能が大きく異なった。一方で BF 形成能と RAPD 法により得られた遺伝的多様性の間に関連性は認められなかった。

次に水で浸漬蒸煮した大豆 (品種：スズマル) に *B. subtilis* natto Miyagino を植菌し 37°C で 40 時間培養し納豆を作製した。この納豆をもとに作製した水溶性画分のプロテアーゼ活性は市販納豆と同程度であった。先の納豆より得られた水溶性画分は全ての *S. mutans* に対して濃度依存的に BF 形成を抑制した。また、納豆の水溶性画分に対し 90°C・15 分の加熱処理、及びプロテアーゼインヒビター PMSF を添加した場合、BF 形成抑制効果は失われた。水溶性画分と同等のプロテアーゼ活性に調製した市販の Sub. NAT を用いた場合においても同様に BF 形成抑制効果を示した。このことから納豆の水溶性画分、並びに Sub. NAT は様々な特徴を有する *S. mutans* に対し、BF 形成抑制効果を有することが示された。

## 第2章 Sub. NAT によるグルコシルトランスフェラーゼ及びバクテリオシン生産へ及ぼす影響

*S. mutans* はスクロースを基質として GTF により非水溶性グルカンを合成し、これが BF 形成に強く影響する。本章では Sub. NAT による BF 形成抑制メカニズムについて、GTF 活性への影響に着目した。GTF 活性は *S. mutans* の培養液より得られた粗酵素液を使用した。粗酵素液とスクロース溶液を 37°C・1 時間反応させ、得られた非水溶性画分の糖量をフェノール硫酸法にて測定し、活性を評価した。Sub. NAT は濃度依存的に GTF 活性を低下させ、1.0 mg/mL 濃度で完全に活性が失われた。この結果は、Sub. NAT の BF 形成抑制効果とよく一致した。また、SDS-PAGE により Sub. NAT が GTF に相当するバンドを分解することが確認された。このことから、Sub. NAT による BF 形成抑制は GTF の加水分解に伴う活性低下に起因するものと考えられた。

*S. mutans* はこれまでに複数のバクテリオシンを生産することが報告されている。実験室株 UA159 では非ランチビオティック型の2種のバクテリオシン(MutacinIV、MutacinV)を生産し、*S. sanguinis* に対する抗菌性を有することが報告されている。これらバクテリオシンの合成遺伝子は、菌体外ペプチド(SGSLSTFFRLFNRSFTQALGK)を介した ComD-ComE 2成分制御系の制御下にある。Sub. NAT は菌体外ペプチドに影響し、バクテリオシン合成能が失われるものと予想された。そこで UA159 をホストとして CSP 合成遺伝子である *comC* 遺伝子の変異株を取得した。得られた *comC* 変異株は口腔常在菌である *S. sanguinis* に対する抗菌性を失ったが、合成されたペプチドを添加することにより抗菌性が回復した。Sub. NAT とペプチドを反応させた場合、抗菌活性は失われた。このことから、Sub. NAT は菌体外ペプチドを不活化し、バクテリオシン生産性を低下させることが明らかとなった。

### 3章 総括

これまでに口腔 BF の制御において各種プロテアーゼの有効性が報告されているが、詳細については不明のままであった。本研究では納豆に含まれる主要なプロテアーゼ Sub. NAT が株レベルで特徴の異なる複数の *S. mutans* に対して BF 形成抑制効果を有することを明らかにした。この抑制効果は *S. mutans* の GTF を阻害することに起因することを明らかにした。また、Sub. NAT は *S. mutans* のバクテリオシン生産性を低下させることを明らかにした。Sub. NAT は *S. mutans* や他の口腔常在菌に対して生育に影響しないことが確認され、また形成された BF への分解活性は認められていない。Sub. NAT は血栓溶解活性を有し、ヒトに対する安全性が担保されている。これら事実から、Sub. NAT は非加熱加工食品や洗口剤などへ利用することでう蝕予防品として利用可能になるものと考えられる。

口腔内にはセリン型プロテアーゼ生産菌の存在が報告されている。特に *S. mutans* と共に歯面上で BF を形成する *S. sanguinis* は複数のプロテアーゼを生産することが報告されている。口腔 BF 内におけるプロテアーゼを介した種間相互作用を理解することで、薬剤に頼らない口腔 BF の制御が可能になるかもしれない。

納豆製造において Sub. NAT は極めて重要な酵素であり、納豆特有の糸引きや香気の生成に強く影響する。納豆の継続的な摂食による口腔 BF への影響やう蝕予防効果は、今後疫学調査や臨床実験の実施が必要となるが、本研究結果は納豆の新たな価値を創造するための一助となることが期待される。

よって本論文は、博士(生物資源科学)の学位を授与されるに値するものと認められる。

以 上

令和5年2月27日