

納豆由来プロテアーゼによる *Streptococcus mutans* の  
制御に関する検討

日本大学大学院 生物資源科学研究科 生物資源利用科学専攻  
博士後期課程

政所 謙吾

2022

## 目次

序論.....	1
1. 本研究の背景.....	2
2. 納豆の水溶性画分の BF 形成抑制効果.....	3
3. 本研究の目的.....	5
材料と方法.....	8
1. 培地.....	9
2. 使用菌株.....	9
3. プライマー.....	9
4. 酵素試薬.....	10
5. プロテアーゼ活性.....	10
6. タンパク質量の測定.....	10
7. 患者情報及び <i>S. mutans</i> の分離.....	10
8. DNA 抽出.....	11
9. PCR 反応.....	11
10. 納豆製造.....	13
11. 納豆抽出液の作製.....	13
12. $\gamma$ -ポリグルタミン酸 (以下、 $\gamma$ -PGA) の定量.....	14
13. BF 形成.....	15
14. 生菌数測定.....	16
15. <i>S. mutans</i> からの粗酵素液の抽出・精製.....	16
16. GTF 活性測定.....	17

17. SDS-PAGE.....	17
18. <i>comC</i> 変異株の作製.....	19
19. バクテリオシンアッセイ.....	20
20. RNA 抽出.....	21
21. RNA-seq.....	21
第1章 納豆の水溶性画分及び Subtilisin NAT による臨床分離 <i>S. mutans</i> の BF 形成への影響 評価.....	25
第1節 緒言.....	26
第2節 ヒト口腔分離株の諸性状の検討.....	26
第1項 ヒト臨床株の取得.....	26
第2項 ヒト臨床株の同定.....	26
第3項 RAPD-PCR による遺伝的多様性評価.....	26
第4項 ヒト臨床株の BF 形成能の評価.....	27
第5項 ヒト臨床株のバクテリオシン生産能の評価.....	27
第3節 ヒト臨床株に対する納豆抽出液、及び Subtilisin NAT の BF 形成抑制効果.....	28
第1項 納豆及び納豆抽出液の作製.....	28
第2項 納豆抽出液による BF 形成抑制効果.....	28
第4節 考察.....	29
第2章 Subtilisin 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.....	44
第1節 緒言.....	45
第2節 Subtilisin NAT による <i>S. mutans</i> へ及ぼす影響評価.....	46

第1項 BF 形成抑制効果のメカニズム解析 .....	46
第2項 Subtilisin NAT によるバクテリオシン生産へ及ぼす影響評価.....	46
第3項 Subtilisin NAT による遺伝子発現への影響評価.....	47
第3節 考察.....	48
総括と展望.....	61
引用文献.....	66
謝辞 .....	76
論文の内容の要旨 .....	77

# 序論

## 1. 本研究の背景

う蝕は、口腔細菌の発酵代謝産物に由来する酸によって歯の硬組織が局所的に脱灰される疾患である (Robert *et al.*, 2007)。う蝕の誘発は多因子疾患であるが、歯面上に形成されるバイオフィーム (以下、BF) の形成と密接に関わる。酸性環境を誘導する BF の構成種は、mutans streptococci (van Houte, 1993)、*Lactobacillus* 属 (Badet and Thebaud, 2008)、*Bifidobacterium* 属 (Mantzourani *et al.*, 2009) 及び *Actinomyces* 属 (van Houte, 1994) など複数の属種である。これら BF 構成種のうち、*Streptococcus mutans* (以下、*S. mutans*) は、う蝕の発症と進行の両方に大きな相関を示す (Marchant *et al.*, 2001; Becker *et al.*, 2002; Gross *et al.*, 2012)。*S. mutans* の競合種である *S. sanguinis* は健全歯上に形成される BF の主要な構成種であり、存在量はいくつかの細菌種と逆相関を示す (Becker *et al.*, 2002)。従って、う蝕の制御には *S. mutans* の存在を抑え、細菌叢を健全な状態に維持することが重要である。

*S. mutans* はグラム陽性の連鎖球菌であり、酸生産性、酸耐性に優れる。また、高い BF 形成能を有する。*S. mutans* はスクロース存在下において、グルコシルトランスフェラーゼ (以下、GTF) の触媒作用によりグルカンを生合成し、これが BF の主要成分となる (Koo *et al.*, 2013)。*S. mutans* の GTF は 3 つに分類される。GTF-B は主に不溶性グルカン ( $\alpha$ -1,3 結合) を合成する。GTF-C は可溶性 ( $\alpha$ -1,6 結合) 及び不溶性グルカン ( $\alpha$ -1,3 結合) を合成し、GTF-D は可溶性グルカン ( $\alpha$ -1,6 結合) の合成に寄与する (Cugini *et al.*, 2019)。このうち BF 形成にとってより重要なのは GTF-B 及び GTF-C に由来する不溶性グルカンである (Narisawa *et al.*, 2011)。よって、GTF を標的とすることは *S. mutans* の制御、及びう蝕の制御にとって有効な戦略の 1 つである。

*S. mutans* は複数のバクテリオシンを合成し、口腔内常在菌に対する抗菌性を示す。バクテリオシンの生産は、口腔内環境でのニッチ獲得にとって重要な役割を果たしている。*S. sanguinis* のような *S. mutans* の競合種は、より早く歯面に定着し、より早く生育し、酸素や酸化ストレスに対して耐性を示す (Kreth *et al.*, 2009)。このような環境下において、*S. mutans* はバクテリオシン生産により優位性を保つことが示されている (Kreth *et al.*, 2005a)。また、バクテリオシン生産の他の役割として、近縁の生物から形質転換 DNA を獲得し、ゲノムの修復や新しい形質の獲得に利用することも近年の研究で明らかになりつつある (Merritt and Qi, 2012)。

*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ーゼを保有することから、株レベルでの遺伝的な多様性もたらされている。遺伝的多様性は *S. mutans* の BF 形成能やバクテリオシン生産性に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 (Zayed *et al.*, 2021)。

う蝕誘発に関連する BF の抑制を目的として様々な薬剤処置が採用されている。その中でクロロヘキシジン、歯垢抑制作用を有し、唾液中に存在する酸性糖タンパクの活性を阻害することで歯垢の付着を減少させる。しかし、嘔吐、下痢、歯の変色などの重大な副作用が報告されている (Deus *et al.*, 2022)。第四級アンモニウム塩は、プラスに帯電した第四級アンモニウム部位がマイナスに帯電した細菌と結合し、その性質バランスを崩すことから、抗 BF 剤として使用されることが提案されている。塩化セチルピリジニウムは、細菌の細胞膜に作用して BF 形成を抑制することが示されている。ポリビニルピロリンジンは、細菌膜に浸透して細菌細胞のタンパク質、脂肪酸、ヌクレオチドの代謝を阻害することにより BF の形成を抑制することが示されている。しかし、これらの第四級アンモニウム塩には昏睡、痙攣、血圧低下作用などの副作用があり、その使用は制限されている (Qiu *et al.*, 2020)。フッ化物は、細菌のエノラーゼを阻害することで *S. mutans* の酸産生を低下させる。フッ化物の高濃度での長期投与は歯や骨格のフッ素症を引き起こす可能性があるため、使用には再検討の必要がある (Hengge *et al.*, 2019)。現在使用されている抗 BF 剤は経済的コストが高く、長期投与により重篤な副作用が発現する可能性があるため、これら以外の代替品の探索が求められている (Qiu *et al.*, 2020)。このような状況の中、食品からの有用成分の探索が進められ、これまでに茶カテキンが抗 BF 剤として有効であることが多数報告されている (Han *et al.*, 2021)。一方で茶カテキンは殺菌メカニズムが明確になっていないことに加え、一般常在菌への殺菌効果も認められること、また高濃度の茶カテキンの摂取が必要となるため利用者の制限が必要となることなど、今後検討しなければいけない課題も多い (徳永ら、2005; Han *et al.*, 2021)。

## 2. 納豆の水溶性画分の BF 形成抑制効果

当研究室ではこれまでに市販納豆の水溶性画分が、*S. mutans* の BF 形成抑制効果を有することを明らかにしている (Fig. 0-1) (Iwamoto *et al.*, 2018)。本論文では、納豆の水溶性画分を納豆抽出液

と表記する。納豆抽出液は *S. mutans* 並びに口腔常在 streptococci に対する生育抑制効果や殺菌効果は認められていない (Fig. 0-2)。納豆抽出液の BF 抑制効果は、プロテアーゼ活性と相関することが明らかとなっている (Fig. 0-1) (Iwamoto *et al.*, 2018)。納豆中の主要なプロテアーゼはスターター *Bacillus subtilis natto* (以下、*B. subtilis natto*) が産生する Subtilisin NAT (通称 ナットウキナーゼ) である。Subtilisin NAT は Sumi ら (1987) によって納豆中から新規のフィブリン溶解活性を有する酵素として単離されている。Subtilisin NAT は 275 アミノ酸残基からなるセリンプロテアーゼ (分子量 27.7 kDa、pI 8.6) で、サブチリシンファミリーに属する酵素である。本酵素はシステインを含まないプロテアーゼであり、その構造にはジスルフィド結合は見られない。Subtilisin NAT はフェニルメチルスルホニルフルオリド (以下、PMSF) により阻害されるが、この事実は Subtilisin NAT がセリンプロテアーゼファミリーに属することを示している (Fujita *et al.*, 1993)。Subtilisin NAT は *aprN* 遺伝子によってコードされている。このタンパク質は、シグナルペプチドとプロペプチドが成熟ポリペプチドの N 末端に結合した前駆体型で合成される (Nakamura *et al.*, 1992)。その構造は *B. subtilis* DB104 株の Subtilisin E の構造と極めて類似する。Subtilisin E と Subtilisin NAT の間には、85 位と 192 位の残基の違いが認められている (Nakamura *et al.*, 1992; Fujita *et al.*, 1993)。Subtilisin NAT はセリンプロテアーゼファミリーの多くのサブチリシンと高い相同性を持つが、本酵素のみがフィブリンに対して高い基質特異性を示す (Peng *et al.*, 2005)。Subtilisin NAT は pH6.0-12.0 で高いフィブリン分解活性を示すが、アルカリ性環境では機能的、構造的に安定性に欠けることが示されている。また、60°C を超える温度では酵素活性が低下する (Fujita *et al.*, 1993; Maeda *et al.*, 2001)。Subtilisin NAT は 5 回の凍結融解後も 95% 以上の活性を保持している (Sumi *et al.*, 1987)。市販される Subtilisin NAT は用量依存的な BF 形成抑制効果を有することが確認された (Narisawa *et al.*, 2014)。また、*B. subtilis natto* の *aprN* 変異株を用いて製造した納豆の抽出液は、BF 形成抑制効果が著しく低下した (Yokoyama *et al.*, 2021)。よって、納豆抽出液中に含まれる BF 形成抑制因子は Subtilisin NAT であるものと考えられる。Subtilisin NAT は *S. mutans* 並びに他の口腔常在菌に対する生育抑制効果を示さなかった (Narisawa *et al.*, 2014)。以上の結果から、納豆抽出液、及び Subtilisin NAT は口腔常在菌に影響することなく、*S. mutans* の BF 形成を抑制することが可能であり、う蝕予防食品として利用できるものと期待される。

### 3. 本研究の目的

これまでに、プロテアーゼはBFに対する制御剤として有効であることが示されている。*S. mutans*においても近年、イチジク (*Ficus carica*)由来のプロテアーゼである Ficin がBF形成を抑制することが報告された (Sun *et al.*, 2021)。また、南極オキアミ (*Euphausia superba*)由来のプロテアーゼに歯垢除去効果があることが *in vitro* 及び *in vivo* で示されている (Berg *et al.*, 2001)。このように、プロテアーゼは口腔BF形成の制御やBF形成を起因とする各種口腔疾患の予防にとって有益な素材であると考えられる。しかし、納豆及び Subtilisin NAT のう蝕予防食品としての利用を目指すうえでいくつかの課題が残されている。具体的には、①ヒト臨床分離株に対する効果が明らかになっていないこと、②Subtilisin NAT の作用機序が明らかになっていないことである。そこで本研究では第1章として、う蝕に罹患した小児より *S. mutans* を取得し、各分離株の特徴評価、並びに納豆抽出液、及び Subtilisin NAT の効果を検討した。第2章においては、*S. mutans* の GTF 活性、バクテリオシン生産性、及び遺伝子発現に対する Subtilisin NAT の影響について解析を行った。

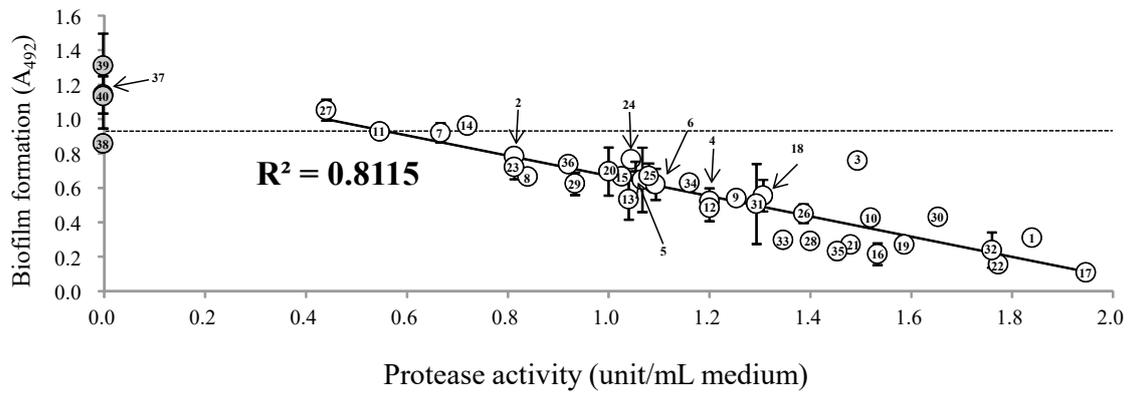


Fig. 0-1. Effects of natto extracts and soybean extracts on biofilm formation by *S. mutans* UA159. Each extract (50%, v/v) was added to the medium. The white circles represent natto extracts (No. 1 to No. 36), and the grey circles represent soybean extracts (No. 37 to No. 40). Regression curves were obtained based on the data for natto extracts. Data represent average values from three independent experiments. Dotted lines indicate the biofilm volume in the control.

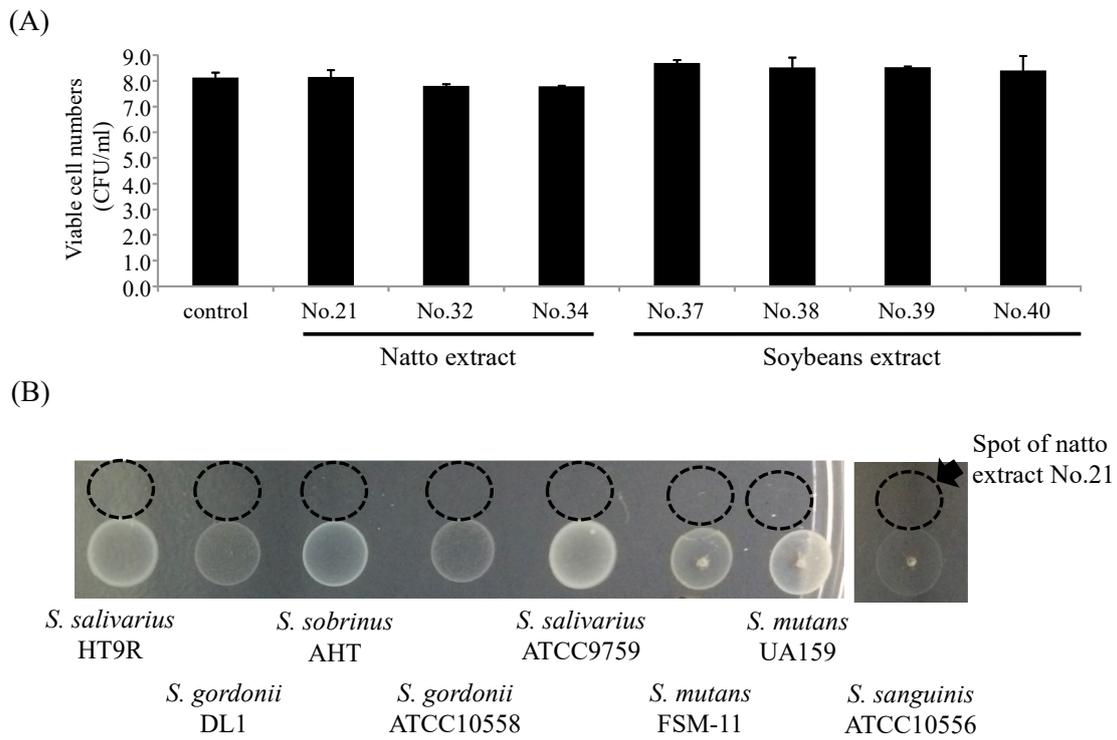


Figure 0-2. Effects of natto and soybean extracts on the viability of streptococci. (A) Each extract (50%, v/v) was added to the growth medium. Data represent average values from three independent experiments. (B) The dotted circles represent spots of cell-free natto extract No. 21.

## 材料と方法

## 1. 培地

### (a) Brain Heart Infusion 培地 (以下、BHI 培地) (BD Difco™ Bacto™社製)

好気性微生物及び非好気性微生物の培養に使用される汎用培地である。本研究では口腔細菌及び納豆菌の前培養を含む各種試験に使用した。寒天平板培地作製の際は、終濃度 1.5%の寒天 (w/v) (富士フィルム和光純薬社製)を添加した。

### (b) Tryptic soy broth without dextrose 培地 (以下、TSB 培地) (BD Difco™ Bacto™社製)

好気性微生物及び非好気性微生物の培養に使用される汎用培地である。本研究では BF 形成量の評価、及び RNA 抽出のための培養液として用いた。BF 形成量の評価では、2 倍濃度の TSB 培地に 0.5% (w/v)のスクロース (富士フィルム和光純薬社製)を加えて使用した (以下、2×TSB+0.5%スクロース培地)。生菌数測定には 2 倍濃度の TSB 培地に 0.5% (w/v)のグルコース (富士フィルム和光純薬社製)を加えて使用した (以下、2×TSB+0.5%グルコース培地)。

### (c) Mitis-Salivarius Bacitracin 培地 (以下、MSB 培地)

Mitis-Salivarius 培地 (以下、MS 培地) (BD Difco™ Bacto™社製)は、選択的に *S. mitis*、*S. salivarius* 及び enterococci を分離するための培地であり、主に口腔内細菌の分離に使用される。本培地にバシトラシンを添加し、*S. mutans* の選択性を高めることが可能である。本研究では MS 培地に 0.2 unit/mL のバシトラシン (Sigma-Aldrich 社製)を添加し、MSB 培地とした。本研究ではヒト口腔からの *S. mutans* の分離培地として使用した。

## 2. 使用菌株

本研究で用いた菌株は Table 0-1 に示した。

## 3. プライマー

本研究で用いたプライマーは Table 0-2 に示した。

#### 4. 酵素試薬

Subtilisin NAT はナットウキナーゼ (富士フイルム和光純薬社製)を使用した。10 mg を秤量し、蒸留水にて 10 mL に定容した。溶液はΦ0.22 μm シリンジフィルター (酢酸セルロース膜、Sartorius 社製)により除菌した。プロテアーゼ溶液は 4 °C で 5 日間、もしくは-30 °C で数ヶ月間保存した。

#### 5. プロテアーゼ活性

##### (a) 試薬

プロテアーゼ活性はアゾカゼイン法により評価した。基質となる 2% (w/v)アゾカゼイン溶液は、リン酸緩衝生理食塩水 (以下、PBS) (pH7.4) (ニッポン・ジーン社製)に 4% (v/v)のエタノール (富士フイルム和光純薬社製)を加えた溶液に、アゾカゼイン (Sigma-Aldrich 社製)を 2% (w/v)量溶解した。

##### (b) 活性測定

1.5 mL 容マイクロチューブに、100 μL の酵素試料と 2% (w/v)アゾカゼイン溶液を混合し、37°C のウォーターバスにて 10 分反応させた。急冷後、600 μL の 2.5% (w/v)トリクロロ酢酸 (以下、TCA) (富士フイルム和光純薬社製)溶液を加えた。18,000 g · 4°C · 10 分で遠心分離後、150 μL の上清を 96 well titer plate (住友ベークライト社製)に分注しプレートリーダー (SH-1000、コロナ電気社製)にて吸光度 440 nm を測定した。活性は pH7.4 で 1.0 mL の試料が 1 分あたりに 440 nm の吸光度を 0.0001 上昇させる活性を 1.0 unit と定義した。

#### 6. タンパク質量の測定

粗酵素液のタンパク質量は BCA タンパク質アッセイキット (ThermoFisher Scientific 社製)を使用し、プロトコルに従った。タンパク質はアルブミン相当量として算出した。

#### 7. 患者情報及び *S. mutans* の分離

ヒト臨床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付

属病院小児歯科を受診した3歳から6歳のう蝕患者9名から採取した。歯垢を0.9% (w/v)塩化ナトリウム溶液 (富士フイルム和光純薬社製)に懸濁し、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。

## 8. DNA 抽出

培養液からのゲノムDNAの取得はDNA抽出キット ISOPLANT (ニッポン・ジーン社製)を使用し、プロトコルに従った。

## 9. PCR 反応

本研究でのPCR反応は、いずれもサーマルサイクラーGeneAtlas E02 (ASTECC社製)を使用した。

### (a) *htrA* の増幅

*S. mutans*の同定は、*S. mutans*の特異的配列である*htrA*遺伝子領域の増幅により確認を行った (Chen *et al.*, 2007)。PCR反応液の組成を以下に示す。6  $\mu$ LのPrimeSTAR Max Premix (2 $\times$ ) (タカラバイオ社製)、10 ngのゲノムDNA、forwardプライマー及びreverseプライマー (それぞれ終濃度0.2  $\mu$ M)を混合し、滅菌水で総量12  $\mu$ Lに調製した。PCR条件は98°Cで10秒の変性、55°Cで10秒のアニーリング、72°Cで6秒の伸長を30サイクルとした。PCR産物はキャピラリー電気泳動システム MultiNA (MCE-202、株式会社島津製作所社製)に供し、増幅の確認を行った。

### (b) Random Amplified Polymorphic DNA-PCR (以下、RAPD-PCR)及び系統樹の作成

RAPD-PCRは11種類のランダムプライマーを用いてPCR増幅を行った。6  $\mu$ LのPremix Taq<sup>TM</sup> (Ex Taq<sup>TM</sup>Version 2.0) (タカラバイオ社製)、10 ngのゲノムDNA、及びプライマー (終濃度1  $\mu$ M)を混合し滅菌水で総量12  $\mu$ Lに調製した。PCR条件は94°C・3分45秒の初期加熱後、94°C・15秒の変性、36°C・15秒のアニーリング、72°C・2分の伸長を40サイクル行い、72°C・4分の最終伸長を行った。

PCR産物をキャピラリー電気泳動システム MultiNA に供し増幅の確認を行った。PCR及び泳動は少なくとも3回繰り返し、バンドが存在する場合を「1」、存在しない場合を「0」とスコア化し、解析は「R」 (バージョン4.2.1)を使用した。「Vegan」パッケージによりサンプル間のJaccard距離

を算出し、群平均法 (UPGMA 法)により系統樹を作成した。

(c) *mut I/III* region

Mutacin I 及び III は、それぞれ 23 及び 24 のアミノ酸残基からなるランチビオティックであり、両者は類似の遺伝子群によってコードされる。それらの合成は、*ats* 遺伝子とアラニル tRNA 合成酵素に隣接する 16 kb 領域にある一連の *mut* 遺伝子によって決定される (Qi *et al.*, 1999a; Qi *et al.*, 2000)。本研究では、*mut I/III* 合成遺伝子の有無について、*ats* (SMU.650) と *mut* 遺伝子の 3' フランキンク領域である SMU.659 の配列に基づき設計したプライマーを用いて遺伝子領域の増幅の確認を行った (Waterhouse and Russell, 2006)。PCR 反応液組成、及び反応条件は *htrA* の増幅と同様とした。PCR 産物は 1.5% (w/v) アガロースゲル (アガロース ME; 岩井化学薬品社製) で電気泳動を行った後、エチジウムブロマイドで染色しバンドの確認を行った。

(d) *mut II* region

Mutacin II をコードする *mut II* 遺伝子は *S. mutans* UA159 株には存在しないが、*S. mutans* T8 株では *pyrG* と *fbaA* に相当する配列に挟まれている (Chen *et al.*, 1999; Qi *et al.*, 1999b)。そこで、これら *pyrG* 及び *fbaA* の配列に基づきプライマーを設計し、*mut II* の挿入を確認した。PCR 反応液組成、及び反応条件は *htrA* の増幅と同様とした。PCR 産物は 1.5% (w/v) アガロースゲルで電気泳動を行った後、エチジウムブロマイドで染色しバンドの確認を行った。

(e) *smb* 領域の増幅

*smb* 遺伝子はランチビオティックバクテリオシン Smb をコードし、*S. mutans* UA159 株には存在しないが、*S. mutans* GS-5 株において存在が明らかとなっている。*S. mutans* GS-5 株では *smb* 遺伝子はいくつかのトランスポザゼを含む 9.5 kb 断片上の遺伝子群によってコードされ、*S. mutans* UA159 株ゲノムの SMU.1942c と *syf* 遺伝子領域間に相当する位置に存在している (Yonezawa and Kuramitsu, 2005)。本研究では、SMU.1942c と *syf* 遺伝子の配列に基づきプライマーを設計した。PCR 反応液組成、及び反応条件は *htrA* の増幅と同様とした。PCR 産物は 1.5% (w/v) アガロースゲルで電気泳動を行った後、エチジウムブロマイドで染色しバンドの確認を行った。

(g) 非ランチビオティック合成遺伝子の増幅

*S. mutans* ではこれまでに少なくとも 3 種類の非ランチビオティックの存在が報告され、それぞれ *nmlAB*、*nmlC*、及び *nmlD* 遺伝子にコードされる。本研究では、*S. mutans* UA159 株のゲノム配列 (GenBank accession number NC\_004350.2) に基づき、各合成遺伝子の配列から Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) を用いてプライマーを設計した。PCR 反応液組成、及び反応条件は *htrA* の増幅と同様とした。PCR 産物はキャピラリー電気泳動システム MultiNA に供し増幅の確認を行った。

## 10. 納豆製造

### (a) 浸漬・蒸煮条件

納豆製造の原料大豆は北海道産の”スズマル”(すずや穀物社より購入)を使用した。この大豆は小粒として納豆加工適性に優れた品種である。乾燥大豆を水道水にて洗浄し、2.5 倍量の蒸留水で 4°C・20 時間浸漬した。浸漬後、湿重量 40 g を秤量し、121°C・15 分の条件にて蒸煮した。

### (b) 納豆菌スターター菌の調製

納豆菌スターターは納豆菌宮城野株を使用した。本菌は納豆製造に用いられる一般的な株であり、(有)宮城野納豆製造所より孢子液を購入した。孢子液を BHI 寒天培地に塗布し、37°C・好気条件にて一晚培養した。得られたコロニーを釣菌し、BHI 液体培地に植菌した。37°C・振とう条件にて定常期まで (およそ 16 時間) 培養を行った。その後、培養液は 8,000 g・5 分で遠心分離を行い、上清を取り除き、菌体を滅菌水に懸濁した。細胞懸濁液は  $OD_{600}=0.6$  程度になるよう調整し、これをスターター菌液とした。

### (c) 発酵条件

蒸煮大豆 40 g を納豆トレー (本体素材 PSP、サイズ 226 × 111 × 24 mm、中央化学株式会社製) に入れ、500  $\mu$ L のスターター菌液を無菌的に接種し、納豆菌が大豆に均一に行き渡るよう混合した。発酵は 37°C・44 時間、湿度 >90% の条件にて行った。発酵後、-30°C で冷凍保存した。

## 11. 納豆抽出液の作製

納豆抽出液の作製には、冷凍させた納豆を解凍せずに用いた。ストマッキング袋 (栄研化学社製)

に、40 g の冷凍納豆と 90 mL の蒸留水を加えてストマッカー (BagMixer 400、interscience 社製) にて 3 分ストマッキングした。その後、抽出液は吸引濾過 ( $\Phi 0.22 \mu\text{m}$ 、Millipore 社製) にて除菌した。

## 12. $\gamma$ -ポリグルタミン酸 (以下、 $\gamma$ -PGA) の定量

納豆中の  $\gamma$ -PGA の定量は、ヘキサデシルトリメチルアンモニウム=ブロミド (CET) 法 (菅野・高松、1995) を一部改変して行った。

### (a) 試薬

CET 溶液は、3.64 g の CET (富士フィルム和光純薬社製) を秤量し、1.0 M 塩化ナトリウム溶液に溶解し、100 mL に定容した。

### (b) $\gamma$ -PGA の抽出

良く攪拌した納豆 25 g を 200 mL 容ビーカーに秤量し、75 mL の 2.5% (w/v) TCA 溶液を加え、50°C のウォーターバスにて 3 分攪拌した。攪拌にはマグネチックスターラー (RCN-7、東京理器械社製) を用いて、300~350 回/分の回転数とした。その後、抽出液を茶こしと漏斗でこしながら、100 mL 容メスフラスコに移し、2.5% (w/v) TCA 溶液で定容した。混合後、40 mL を遠沈管に測りとり、9,200 g $\cdot$ 4°C $\cdot$ 10 分で遠心分離した。上清 25 mL を 1.0 M 水酸化ナトリウム溶液 (富士フィルム和光純薬社製) で pH7.0~7.2 に調整した。この試料を蒸留水にて 50 mL に定容した。2 mL 容マイクロチューブに、300  $\mu\text{L}$  の試料と 1,200  $\mu\text{L}$  のエタノールを加えて攪拌し、室温で 5 分放置後、7,600 g $\cdot$ 4°C $\cdot$ 10 分で遠心分離した。上清を除去し、1,200  $\mu\text{L}$  の 80% (v/v) エタノール加えて攪拌し、7,600 g $\cdot$ 4°C $\cdot$ 10 分で遠心分離した。再び上清を除去し、沈殿を 80% エタノールで精製し遠心分離した。その後、上清を除去し 1,200  $\mu\text{L}$  の滅菌水を加えて沈殿を溶解し、15 mL 容チューブに移した。さらに 1,800  $\mu\text{L}$  の滅菌水を加えた。これを  $\gamma$ -PGA 精製液とした。

### (c) $\gamma$ -PGA の検出

2 mL 容マイクロチューブに、200  $\mu\text{L}$  の  $\gamma$ -PGA 精製液と 800  $\mu\text{L}$  の滅菌水、200  $\mu\text{L}$  の CET 溶液を加えて混合し、室温で 20 分反応させた。この際、精製液を滅菌水に置き換えたブランク 1 (1,000  $\mu\text{L}$  の滅菌水+200  $\mu\text{L}$  の CET 溶液)、CET 溶液を滅菌水に置き換えたブランク 2 (200  $\mu\text{L}$  の精製液 + 1,000  $\mu\text{L}$  の滅菌水) も同様に反応させた。反応後、400 nm にて濁度を測定し、以下の式に従い、

納豆 100 g 中の  $\gamma$ -PGA 量を算出した。

納豆中の  $\gamma$ -PGA 量 (mg/ 100 g natto)

$$= 400 \text{ nm の吸光度} * \times 0.125 \times 0.8776 \times \frac{3}{1} \times \frac{50}{0.3} \times \frac{100}{25} \times \frac{100}{S}$$
$$= 440 \text{ nm の吸光度} * \times \frac{21940}{S}$$

\* : 試料反応の吸光度 - ブランク 1 - ブランク 2

0.125 :  $\gamma$ -PGA 量の吸光係数

0.8776 : グルタミン酸  $\rightarrow$   $\gamma$ -PGA 量換算係数

S : 納豆試料重量 (g)

### 13. BF 形成

BF 形成量は Narisawa らの報告に従い (2011)、断りが無い限り、ヒト唾液をコートしたマイクロタイタープレート底部への細胞付着量をグラムサフラニンで染色し、被色量を測定することで評価した。

#### (a) ヒト唾液の調製

ヒト唾液は Saliva-Normal, Pooled Donors (コスモバイオ社製) を使用した。本製品は少なくとも 3 名以上の健常者より得られた唾液の混合物である。ヒト唾液を  $4,000 \text{ g} \cdot 4^{\circ}\text{C} \cdot 10$  分の遠心分離を行い、上清を得た。上清は  $\Phi 0.22 \mu\text{m}$  のシリンジフィルターにて除菌を行い、使用まで  $-30^{\circ}\text{C}$  で保存した。

#### (b) 唾液コートプレートの作製

96 well titer plate の 1 ウェルあたりに  $25 \mu\text{L}$  のヒト唾液を添加し、 $4^{\circ}\text{C}$  で一晩インキュベートした。その後、唾液を取り除き、 $150 \mu\text{L}$  の PBS (pH7.4) でウェルを 2 回洗浄した。風乾後、以下の BF 形成量の評価に用いた。

#### (c) 培養

*S. mutans* の菌液は  $1.0 \text{ mL}$  の前培養液を  $7,200 \text{ g} \cdot 5$  分で遠心分離により集菌し、培地と等量の滅菌水に溶解させた ( $\text{OD}_{600}=0.5$ )。これを BF 形成の菌液とした。BF 培養液の組成は以下の通りを行った。1 ウェルあたり、 $100 \mu\text{L}$  の  $2 \times \text{TSB}+0.5\%$  スクロース培地、 $2 \mu\text{L}$  の菌液、及び各種試料を添

加し滅菌水にて 200  $\mu\text{L}$  に定容した。培養は  $37^{\circ}\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2 \cdot 20$  時間とした。必要に応じてプロテアーゼインヒビターである PMSF (Sigma-Aldrich 社製)、*N*-*p*-トシル-L-フェニルアラニンクロロメチルケトン (以下、TPCK) (Sigma-Adrich 社製)、及び Leupeptin (ペプチド研究所社製)をそれぞれ終濃度 0.1 mM 加えた。

#### (d) 染色及び吸光度測定

培養後、培地を取り除き、ウェル底部に付着した細胞を 150  $\mu\text{L}$  の蒸留水で 2 回洗浄した。50  $\mu\text{L}$  の 4% (w/v) グラムサフラニン溶液 (BD 社製) で室温・10 分の染色を行った。染色液を取り除き、150  $\mu\text{L}$  の蒸留水で 2 回洗浄した。70% (v/v) エタノールで 30 分色素抽出し、吸光度 492 nm の測定を行った。

### 14. 生菌数測定

*S. mutans* の生育に及ぼす納豆抽出液の影響について、生菌数を計測することで評価した。培養には  $2 \times \text{TSB} + 0.5\% \text{グルコース}$  培地を使用した。*S. mutans* の菌液調製、及び培養液組成は「13. BF 形成」に示したものと同様とした。培養後、滅菌水にて適宜段階希釈し、BHI 寒天培地に塗布した。 $37^{\circ}\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$  で 2 日間培養後、コロニー数を計測し、Colony forming unit (以下、CFU) として評価した。

### 15. *S. mutans* からの粗酵素液の抽出・精製

BHI 液体培地に *S. mutans* の前培養液を 1% (v/v) 植菌し、 $37^{\circ}\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 、20 時間条件で培養した。得られた 120 mL の培養液を  $8,000 \text{ g} \cdot 5^{\circ}\text{C} \cdot 10$  分で遠心分離し、上清を取得した。上清は 60% 飽和で硫酸アンモニウム沈殿法により  $4^{\circ}\text{C} \cdot 3$  時間塩析を行った。塩析後、 $10,000 \text{ g} \cdot 4^{\circ}\text{C} \cdot 30$  分で遠心分離を行い、沈殿したタンパク質を 0.1 M PBS (pH7.4) に溶解した。セルロース透析膜 (分子量 12,000~14,000) (Viskase Companies Inc.社製) を用い、試料溶液に対して >100 倍量の 0.1 M PBS にて 3 時間透析した。透析後の試料は 100 kDa の限外ろ過フィルター (Amicon® Ultra-100K、Merck 社製) にて限外ろ過を行った。得られた >100 kDa 画分は 2.0 mL の 0.1 M PBS (pH7.4) に懸濁し、これを粗酵素液とした。

## 16. GTF 活性測定

*S. mutans* 培養液より得られた粗酵素液の GTF 活性は、スクロースを基質として 37°C・1 時間反応後に得られる不溶性糖量を測定することで評価した。反応組成を次に示す。300 µg protein 相当の粗酵素液を滅菌水にて 400 µL に定容した。これに 5% (w/v) スクロース溶液を 100 µL 加え、37°C で 1 時間反応した。反応後、90°C・10 分の加熱処理により酵素を失活させた。試料を 18,000 g・4°C・10 分で遠心分離し、沈殿を 500 µL の蒸留水で 2 回洗浄した。さらに 70% (v/v) エタノールで洗浄及び乾燥させ、不溶性画分を取得した。不溶性画分に 500 µL の 0.5 M 水酸化ナトリウム溶液を加え、37°C・1 時間インキュベートした。その後 18,000 g・4°C・10 分の条件で遠心分離を行い、上清画分を得た。

不溶性糖量はフェノール硫酸法にて評価した。100 µL の上清画分とこれと等量の 5% (w/v) フェノール (富士フィルム和光純薬社製)、及び 500 µL の濃硫酸 (富士フィルム和光純薬社製) を混合し、室温で 20 分放置した。その後吸光度 490 nm を測定した。得られた吸光度値は、グルコース溶液にて作成した検量線に代入し、グルコース相当量として評価した。GTF 活性は pH7.4 で 1 分当たりグルコースを 1 mg 生成する値を 1.0 unit と定義した。

Subtilisin NAT による GTF 活性への阻害効果を評価するにあたり、あらかじめ粗酵素液と Subtilisin NAT の混合溶液を 37°C・1 時間反応させ、これを活性測定に用いた。Subtilisin NAT の終濃度は 0.1 mg/mL、0.5 mg/mL、1.0 mg/mL の 3 条件とした。

## 17. SDS-PAGE

### (a) 試薬

#### 30% (w/v) アクリルアミド溶液 (A 液)

58.4 g のアクリルアミド (富士フィルム和光純薬社製) と、1.6 g の N,N'-メチレンビスアクリルアミド (富士フィルム和光純薬社製) を秤量し、200 mL 容フラスコを使用して蒸留水で定容した。本研究ではこれを A 液とした。

#### 1.5 M トリス塩酸緩衝液 (pH8.8) (B 液)

36.4 g のトリスヒドロキシルアミノメタン (Thermo Fisher Scientific 社製) と、0.8 g のドデシル硫酸ナトリウム (以下、SDS) (富士フィルム和光純薬社製) を秤量し、150 mL の蒸留水を加え混合した。塩酸 (富士フィルム和光純薬社製) で pH8.8 に調製後、200 mL 容メスフラスコを使用して蒸留水で定容した。本研究ではこれを B 液とした。

#### 0.5 M トリス塩酸緩衝液 (pH6.8) (C 液)

12.2 g のトリスヒドロキシルアミノメタンと 0.8 g の SDS を秤量し、150 mL の蒸留水を加え混合した。塩酸で pH6.8 に調製後、200 mL 容メスフラスコを使用して蒸留水で定容した。本研究ではこれを C 液とした。

#### 4×サンプルバッファー (D 液)

10 mL の 0.5 M トリス塩酸緩衝液、4 mL の 2-メルカプトエタノール (富士フィルム和光純薬社製)、1.6 g の SDS、4.0 g のスクロース、及び少量のプロモフェノールブルー (富士フィルム和光純薬社製) をそれぞれ秤量し、20 mL 容フラスコを使用して蒸留水で定容した。本研究ではこれを D 液とした。

#### 10 ×泳動バッファー

15.2 g のトリスヒドロキシルアミノメタンと 5.0 g の SDS、72.0 g のグリシン (富士フィルム和光純薬社製) を秤量し、500 mL 容フラスコを使用して蒸留水で定容した。必要に応じて、蒸留水で希釈して使用した。

#### CBB 染色液

2.5 g の CBB-R250 (富士フィルム和光純薬社製)、50 mL のエタノール、及び 75 mL の酢酸 (富士フィルム和光純薬社製) を秤量し、1,000 mL 容メスフラスコを使用して蒸留水で定容した。

#### 脱色液

500 mL のエタノールと 150 mL の酢酸を秤量し、2,000 mL 容メスフラスコを使用して蒸留水で定容した。

#### (b) ゲル作製

分離ゲルの作製では 3.0 mL の A 液、2.25 mL の B 液、3.75 mL の蒸留水、及び小さじ 1 の過硫酸アンモニウム (富士フィルム和光純薬社製) を混合し、10  $\mu$ L の N.N.N.N-テトラメチルエチレン

ジアミン (以下、TEMED) (富士フイルム和光純薬社製) を加え、ゲル板の 7 分目まで満たした。その後蒸留水を上から流して気泡を消し、固まるまで静置した。濃縮ゲルの作製では、1.35 mL の A 液、2.25 mL の C 液、5.4 mL の蒸留水、及び小さじ 1 の過硫酸アンモニウムを混合し、10  $\mu$ L の TEMED を加え、蒸留水を捨てた分離ゲルのゲル板に満たし固まるまで静置した。

#### (c) サンプル調製

SDS-PAGE に使用する各サンプルと D 液を 4:1 で混合し、100°C・5 分の加熱を行った。1×泳動バッファーで満たした泳動槽にゲル板をセットし、10  $\mu$ L のマーカー (Precision Plus Protein™ Standards、BIO-RAD 社製)、及び 20  $\mu$ L のサンプルをウェルにアプライした。

#### (d) 泳動

泳動はサンプルが分離ゲルに入るまでは 300 V・15 mA、分離ゲルは 300 V・20 mA とした。泳動後ガラス板からゲルを取り外し、CBB 染色液に 1 時間浸漬した。蒸留水で数回洗浄した後、一晚脱色液中に浸漬し、ゲルの観察を行った。

## 18. *comC* 変異株の作製

*S. mutans* UA159 株の *comC* 変異株は、エリスロマイシン (以下、Erm) 耐性遺伝子を相同組換えにより導入することで作製した。遺伝子組換え実験は本学生物資源科学部で承認済みである (承認 No. 2020-生物-030)。配列情報は、*S. mutans* UA159 株のゲノム配列 (GenBank accession number NC\_004350.2) より取得した。*S. mutans* UA159 株のゲノム DNA から *comC* 遺伝子の 5' フランキング領域を PCR 反応により増幅させた。増幅された断片は、クローニングベクター pUC19 (Vieira and Messing, 1989) (タカラバイオ社製) の EcoRI-KpnI 部位に挿入した。次に、*comC* 遺伝子の 3' フランキング領域の PCR 断片を pUC19 の XbaI-HindIII 領域に導入した。得られたプラスミドを BamHI で消化し、pResEmMCS10 (Shiroza and Kuramitsu, 1993) 由来の Erm 耐性遺伝子を導入して、pREScomC を作製した。*S. mutans* への形質転換は既報の通りに実施した (Motegi *et al.*, 2006)。すなわち、BHI 液体培地に *S. mutans* UA159 株の前培養液を 10% (v/v)、及び加熱処理 (90°C・15 分) により不活化した Gibco® Horse Serum (Thermo Fisher Scientific 社製) を 10% (v/v) 加え混合した。37°C・5%CO<sub>2</sub> 条件にて対数期中期 (およそ 4 時間) まで培養し、これをコンピテントセルとし

た。コンピテントセルに等量の BHI 液体培地を加え、これに直鎖化した pREScomC を加えた。37°C・5%CO<sub>2</sub>条件にて1.5時間培養後、終濃度 10 µg/mL の Erm (Sigma-Aldrich 社製)を含む BHI 寒天培地に塗布した。37°C・5%CO<sub>2</sub>条件下で2日間培養後、Erm 耐性株を取得した。得られた形質転換体はシーケンスにより変異の確認を行った。

## 19. バクテリオシンアッセイ

### (a) *S. mutans* 野生株によるバクテリオシン生産性の評価

*S. mutans* 野生株のバクテリオシン生産性について、被検菌への阻止円の有無により評価した。被検菌は、*S. sobrius* 6715、*S. sanguinis* ATCC10556、*S. gordonii* DL1、*S. mitis* ATCC6249、*S. salivarius* ATCC9759、*S. oralis* NBRC113011 を用いた (Table 0-1)。*S. mutans* の培養液を BHI 寒天培地に穿刺し、37°C・5%CO<sub>2</sub>にて一晩培養した。その後、1% (v/v)の被検菌培養液を含む BHI 寒天培地を重層し、37°C・5%CO<sub>2</sub>にて一晩培養した。培養後、被検菌に対する阻止円の直径を計測した。必要に応じて、*S. mutans* の培養液に Subtilisin NAT 溶液 (終濃度 1.0 mg/mL)を加え、穿刺した。

### (b) *S. mutans comC*-変異株によるバクテリオシン生産性の評価

*S. mutans* の *comC*-変異株はバクテリオシン生産性が失われ、Competence stimulating peptide (以下、CSP)の添加により生産性が回復する (Tamura *et al.*, 2009)。この特徴を利用し、Subtilisin NAT で CSP を処理をすることで、Subtilisin NAT がバクテリオシン生産性へ及ぼす影響評価が可能になると考えた。CSP は受託 (ユーロフィンゲノミクス株式会社)にて合成を行った (NH<sub>2</sub>-SGSLSTFFRLFNRSFTQALGK-COOH)。合成された CSP の純度は 98.41% (HPLC)であった。CSP は滅菌水にて溶解し、適宜希釈して使用した。9 µL の CSP (1mg/mL)に 1 µL の Subtilisin NAT (10 mg/mL)を加え、37°C・1時間反応させた。コントロールは Subtilisin NAT 溶液の代わりに滅菌水を使用した。5 µL の先の反応液と 10 µL の BHI 液体培地、10 µL の *comC*-変異株の前培養液を混合し、BHI 寒天培地に穿刺した。培養は 37°C・5%CO<sub>2</sub>条件で一晩行った。その後、1.0% (v/v)の被検菌前培養液を含む 10 mL の BHI 寒天培地を重層し、37°C・5%CO<sub>2</sub>条件で一晩培養した。得られた阻止円の直径を計測した。

## 20. RNA 抽出

### (a) 培養条件

BHI 液体培地にて一晩培養した菌液を 8,000 g・5 分の遠心分離にて集菌し、菌体ペレットを培地と等量の滅菌水に溶解して、これを菌液とした。15 mL の TSB+0.25% (w/v) グルコース培地に菌液を 1% (v/v) 植菌し、37°C・5%CO<sub>2</sub> 条件にて対数期中期 (およそ 6 時間) まで培養した。必要に応じて、10 mg/mL の Subtilisin NAT を培地の 10% (v/v) 量添加し、培養を行った。

### (b) RNA 抽出

RNA 抽出は ISOGEN II RNA 抽出試薬 (ニッポン・ジーン社製) を使用した。培養後、11,200 g・4°C・15 分で遠心分離し、得られた菌体ペレットを 1.0 mL の ISOGEN II 溶液に溶解した。試料を 2 mL 容スクリーキャップ付きチューブに移し、ビーズ (Φ0.5 mm Zirconia/Silica Beads、BioSpec Products 社製) を適量加え、ビーズクラッシャー (µT-12、タイトック社製) で 3,200 r/min・180 秒の処理に供した。その後、400 µL の RNA フリー水を加え、15 分室温にて放置した。16,200 g・15 分の遠心分離後の上清に、DNA を含む夾雑物の沈殿・除去処理を目的として 5 µL の *p*-プロモアニソール (富士フィルム和光純薬社製) を加え、室温にて 5 分放置した。その後、16,200 g・15 分の遠心分離を行い、上清を得た。上清をイソプロパノール沈殿、及びエタノール沈殿に供し、これを精製操作とした。得られた RNA を RNase フリー水に溶解し、-80°C にて保存した。

## 21. RNA-seq

RNA-seq 解析は生物技研社への委託により実施した。トータル RNA を Quantus Fluorometer (Promega 社製) と QuantiFluor RNA system (Promega 社製) を用いた濃度測定及び 5200 Fragment Analyzer System と Agilent HS RNA Kit (Agilent Technologies 社製) を用いた品質確認を行い、RNA 濃度が 50 ng/µL 以上、かつ純度の指標となる RQN 値が 6.0 以上のサンプルを使用した。次に riboPool (siTOOLS Biotech 社製) を用いて細菌由来の rRNA を除去した後、トータル RNA 300 ng を使用し、MGIEasy RNA Directional Library Prep Set (MGI Tech 社製) を用いてライブラリーを作成した。作成したライブラリーと MGIEasy Circularization Kit (MGI Tech 社製) を用いて環状化

DNA を作製した後、DNBSEQ-G400RS High-throughput Sequencing Kit (MGI Tech 社製)を用いて DNA nanoballs (以下、DNB)を作成した。DNBSEQ-G400 (MGI Tech 社製)を用いて、 $2 \times 100$  bp の条件で作製した DNB のシーケンシング解析を行った。マッピングは Bowtie2 (ver. 2.4.2)により *S.mutans* UA159 株 (GenBank accession number NC\_004350.2)を参照に行い、featureCounts (ver. 2.0.0)を用いて参照配列の遺伝子領域にマッピングされたリード数をカウントした。コントロールサンプルと Subtilisin NAT 添加サンプル間の発現変動解析には「R」 (ver.4.2.1)の「edgeR」パッケージを用い、Volcano Plot を作成し2群間のリードカウント数の変化量 (Fold change)が $|\text{Fold change}| \geq 2$ かつ  $p$ 値 $<0.05$  を基準とし発現変動遺伝子として定義した。

Table 0-1. Bacterial strains.

	Strain	Genotype and Characterizations	Reference
<i>S. mutans</i>	UA159	Wild type	Sp <sup>c</sup> <sup>S</sup> , Erm <sup>S</sup> , Kan <sup>S</sup>
		<i>gtfB</i>	<i>gtfB</i> Erm <sup>R</sup>
		<i>gtfC</i>	<i>gtfC</i> Kan <sup>R</sup>
		<i>gtfBC</i>	<i>gtfB</i> Erm <sup>R</sup> , <i>gtfC</i> Kan <sup>R</sup>
		<i>gtfD</i>	<i>gtfD</i> Erm <sup>R</sup>
		<i>comC</i>	<i>comC</i> Erm <sup>R</sup>
	GS5	Wild type	
	MT8148	Wild type	
	Isolate No. 1		
	Isolate No. 14		
	Isolate No. 19		
Isolate No. 20			
Isolate No. 23			
Isolate No. 25			
Isolate No. 29			
Isolate No. 31			
Isolate No.33			
<i>S. sobrinus</i>	6715	Oral commensal	
<i>S. sanguinis</i>	ATCC10556	Oral commensal	
<i>S. gordonii</i>	DL1	Oral commensal	
<i>S. salivarius</i>	ATCC9759	Oral commensal	
<i>S. mitis</i>	ATCC6249	Oral commensal	
<i>S. oralis</i> subsp. <i>oralis</i>	NBRC113011	Oral commensal	
<i>B. subtilis</i> natto	Miyagino	Natto starter	Miyagino Natto Seisakujo

Table 0-2. Amplicons and oligonucleotide primers used in this study.

Primer	Sequence (5' →3' )	Amplicon	Reference
Sm479-F	TCGCGAAAAAGATAAACAAACA	<i>htrA</i>	Chen <i>et al.</i> , 2007
Sm479-R	GCCCCTTCACAGTTGGTTAG		
smb-F	GTTTTTGATCCGCAAGCAGT	<i>smb</i>	Waterhouse and Russell, 2006
smb-R	GCTCTTGCCAACGACAAAAT		
mutI/III-F	ATGCCGAGCTGAAAGAAAAA	<i>mutI</i> and <i>mutIII</i>	Waterhouse and Russell, 2006
mutI/III-R	CCAGACTAGCATGGTGCTCA		
mutII-F	AGCGGTTGAAAACAGTCAGG	<i>mutII</i>	Waterhouse and Russell, 2006
mutII-R	GCTGAAACGATTGCCATTTT		
nImA-F	TGGACAGCCAAACACTTTCAAC	<i>nImA (mutIV)</i>	In this study
nImA-R	TCGAATGAGTCCCCAAGTGC		
nImB-F	ATTGTCAGAAGTTTTGGTGGAGA	<i>nImB (mutIV)</i>	In this study
nImB-R	ACAGATCCAACCGCACCAAC		
nImC-F	TCCAGCAATAGCCCCAAAGG	<i>nImC (mutV)</i>	In this study
nImC-R	CTTTCAGCTGTTGAAGGTGGG		
nImD-F	CAACTGTTGAGGGTGGTGGTA T	<i>nImD (mutVI)</i>	In this study
nImD-R	CCTAAAGCCGCTCCAGATACT		
comCu-F	cccgaattcAAATCTGAACAAGCAGGGG	<i>comC1</i>	Narisawa <i>et al.</i> , 2011
comCu-R	ccccgggtaccGATAGTGTTTTTTTCATTTTATATCTCC		
comCd-F	ccccctctagaGCCTATCAACATTTTCCGGC	<i>comC2</i>	Narisawa <i>et al.</i> , 2011
comCd-R	cccceaagcttCCACTAAAGGCTCCAATCGC		

\* Synthetic restriction sites added for cloning purposes are in lowercase

## 第 1 章

納豆の水溶性画分及び Subtilisin NAT による臨床分離

*S. mutans* の BF 形成への影響評価

## 第1節 緒言

*S. mutans* は株の違いにより薬剤や抗菌剤に対する感受性が異なる。Järvinen ら (1993)や Grönroos ら (1995)は、ヒト臨床株に対しクロルヘキシジンの殺菌効果を評価した結果、株毎に感受性が異なることを報告している。Zayed ら (2021)は茶カテキンに対する耐性能は株毎に異なることを示している。これまでに当研究室では納豆由来のプロテアーゼである Subtilisin NAT が *S. mutans* の BF 形成を抑制することを報告しているが、これらの検討は実験室株を対象としたものであり、特徴が異なる *S. mutans* への影響は評価されていない (Narisawa *et al.*, 2014; Iwamoto *et al.*, 2018)。本章ではヒト口腔より *S. mutans* の分離を行い、遺伝的評価と BF 形成能、バクテリオシン生産性の特徴を評価した。さらに分離株に対する納豆の水溶性画分、及び試薬として利用される Subtilisin NAT の BF 形成抑制効果について評価した。

## 第2節 ヒト口腔分離株の諸性状の検討

### 第1項 ヒト臨床株の取得

本学松戸歯学部に来院した3歳から6歳の9名の患者から *S. mutans* の分離を試みた。患者情報を Table 1-1 に示した。DFT は Decayed and Filled Tooth の略であり、う蝕の罹患状態を知るために用いられる指標である。*S. mutans* の分離を試みた9名の患者の DFT は >4 であった。本研究では9名の患者全てから1株ずつ計9株の *S. mutans* 候補株を取得した。

### 第2項 ヒト臨床株の同定

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* 遺伝子 (Biswas and Biswas, 2005)領域の PCR 増幅の有無による同定法に従った。その結果、9株いずれも予想される 500 bp 付近に遺伝子領域の増幅が確認された (Fig. 1-1)。よって9株を *S. mutans* と判断し、以降の実験に使用した。

### 第3項 RAPD-PCR による遺伝的多様性評価

RAPD-PCR とは、10 mer 程度のランダムプライマーを用いて低いアニーリング温度条件

PCR 反応を行い、得られる多型バンドのパターンを解析することでゲノムの相違を検出する方法である。PAPD-PCR はこれまでに様々な微生物の遺伝的多様性を評価する手法として広く用いられ (Sarkar *et al.*, 2002; Martín *et al.*, 2003)、*S. mutans* にも用いられている (Redmo Emanuelsson *et al.*, 2003)。本研究では実験室株である UA159 株、GS-5 株、及び MT8148 株の 3 株と、本研究で得られたヒト臨床株 9 株の遺伝型の違いを調べるために、11 種類のランダムプライマーを用いて RAPD-PCR を実施した。

すべてのプライマー (Table 1-2) で増幅が認められ、150~1,500 bp の範囲で 326 本の再現性のある明瞭なバンドが得られた (data not shown)。44 本のバンドのうち 91% に多型が観察された。7 つのプライマー (Primer 5、Primer 6、Primer 7、Primer 11、RI-16、OPH-18、OPH-13) の多型率は 100% であり、Primer 2 及び Primer 9 は 75% の多型率を示した (Table 1-2)。44 本の多型バンドから、遺伝的距離を算出した。この値に基づき作成された系統樹では、遺伝的距離 0.4 の位置で 2 群に分類された (Fig. 1-2)。実験室株 3 株と臨床株 6 株が同一のクラスターを形成した。株間の遺伝的距離は 0.10-0.54 で、平均 0.38 であった。遺伝的距離が最も小さかったのは No.25 株と No. 29 株の間であった。最も遺伝的距離が長かったのは、GS-5 と No.19 株の間であった。以上の結果より、本研究で得られた臨床株は実験室株とは遺伝的に異なり、また分離株間でも遺伝的に多様性であることが示された。

#### 第 4 項 ヒト臨床株の BF 形成能の評価

*S. mutans* の特徴の 1 つはスクロース依存的な BF 形成である。ヒト唾液でコートしたマイクロタイタープレート底部への BF 形成量をサフラニン被色量により評価した。結果を Fig. 1-3 に示す。ここでは比較対象として第 3 項で用いた 3 種類の実験室株を使用した。分離株 No. 31 株を除くすべての臨床株は、実験室株より高い BF 形成量を示した。

#### 第 5 項 ヒト臨床株のバクテリオシン生産能の評価

被検菌として 6 種の口腔常在菌を用いた (*S. sanguinis*、*S. gordonii*、*S. mitis*、*S. oralis*、*S. salivarius*、*S. sobrinus*)。その結果を Fig. 1-4 に示した。実験室株 3 株及び臨床株 9 株の計 12

株の *S. mutans* はいずれも *S. gordonii*, *S. mitis*, *S. salivarius*, *S. oralis* に対する抗菌性が認められた。各株の *S. sobrinus* に対する抗菌性は乏しく、No. 20 株と No. 31 株の 2 株でのみ活性が認められた。No. 20 株はすべての被検菌に対して強い抗菌活性を示した。

実験室株を含む計 12 株のバクテリオシン構造遺伝子の分布を調べた結果、いずれの株においても複数のバクテリオシン構造遺伝子の保有していた。その内訳は、Smb 陽性は 5 株、Mutacin IV 陽性は 10 株、Mutacin V 陽性は 6 株、Mutacin VI はすべての株で陽性であった (Table 1-3)。また、Mutacin I、II、III の陽性株は確認されなかった。

### 第 3 節 ヒト臨床株に対する納豆抽出液、及び Subtilisin NAT の BF 形成抑制効果

#### 第 1 項 納豆及び納豆抽出液の作製

納豆は粘性に富み、またピラジン類と短鎖脂肪酸の存在により独特の香りを持つ (Hara *et al.*, 1984; Tanaka *et al.*, 1998)。本研究で製造した納豆は大豆表面に均一な菌膜を形成し、納豆特有の香りを有し、十分な糸引きと粘性を有していた。製造された納豆の  $\gamma$ -PGA 量は、 $37.44 \pm 2.68$  mg / 100 g (湿重量) であった。納豆抽出液のプロテアーゼ活性は、 $13.1 \pm 1.5$  units/mL であった。 $\gamma$ -PGA 量とプロテアーゼ活性は、過去に報告された市販の納豆とほぼ同じであった (Iwamoto *et al.*, 2018)。

#### 第 2 項 納豆抽出液による BF 形成抑制効果

*S. mutans* の BF 形成に対する納豆抽出液の抑制効果を調べた (Fig. 1-5)。10%、25%、50% (v/v) の納豆抽出液を添加した後の培地中のプロテアーゼ活性は、それぞれ 1.3、3.3、6.5 units/mL medium であった。50% (v/v) の納豆抽出液は、試験したすべての株について BF 形成量を 55% 以上減少させた。25% (v/v) の納豆抽出液は、ほとんどの菌株に対して BF 形成を約 40% 抑制し、No. 14 株に対して BF 形成を 72% 抑制した。10% (v/v) の納豆抽出液は、試験したすべての菌株に対して BF 形成にほとんど影響を及ぼさなかった。Kitagawa ら (2017) は、45 個のアミノ酸残基からなる納豆ペプチドがグラム陽性菌に対して殺菌性を示すことを示した。また、Karygianni ら (2020) は Proteinase K の存在の存在によって *S. mutans* の生育が促進されることを示している。これは培地

中のタンパク質がプロテアーゼによって加水分解され、生育に必要なアミノ酸が十分に供給されるためであると考察されている。しかし本研究では、50% (v/v)の納豆抽出液の存在は、いずれの *S. mutans* の生菌数に影響を与えなかった (data not shown)。この結果は、培地成分を変化させた場合に異なる結果が得られるものと考えられる。

納豆抽出液の BF 形成抑制因子の特徴を明らかにするために、加熱処理及びプロテアーゼインヒビターを添加した際の BF 抑制効果を評価した (Fig. 1-6, Fig. 1-7)。加熱処理 (90°C・15分)を施した納豆抽出液を 25% (v/v)量添加した際、*S. mutans* に対する BF 抑制効果は失われた (Fig. 1-6)。PMSF、TPCK、Leupeptin をそれぞれ終濃度が 0.1 mM 量培地中に添加した。各インヒビターの 0.1 μM 濃度は、BF 形成に影響しないことを確認している (data not shown)。その結果、25% (v/v)の納豆抽出液存在下における BF 形成抑制効果は PMSF の存在により失われ、TPCK と Leupeptin では影響しないことが確認された (Fig. 1-7)。Subtilisin NAT に対し、0.1 mM の PMSF は活性を 20%低下したが、同濃度の TPCK と Leupeptin では活性に影響しないことが確認された (data not shown)。

納豆抽出液の BF 形成抑制効果がプロテアーゼ活性に起因するか確認するために、抽出液中に含まれるプロテアーゼと同等の活性を有する Subtilisin NAT を用いて抑制効果を評価した (Fig. 1-8)。0.12 mg/mL (protease activity; 6.6 units/mL medium)濃度の Subtilisin NAT は、試験したすべての株で BF 形成量を 60%以上減少させた。0.06 mg/mL (protease activity; 3.4 units/mL)濃度の Subtilisin NAT の存在下では、全 12 株の *S. mutans* に対し BF 形成量を 16~75%の範囲で減少させることが明らかとなった。

#### 第4節 考察

これまでにヒト口腔より得られる *S. mutans* の特徴に関する研究が多数報告されている (Zayed, *et al.*, 2021; Lembo *et al.*, 2007; Waterhouse and Russell, 2006; Valdez *et al.*, 2017)。本研究では 9 名の小児う蝕患者の歯垢から *S. mutans* の分離を行い、遺伝学的特徴と BF 形成能、バクテリオシン生産性について調べた。9 株の臨床株の BF 形成量は実験室株よりも高いことが示された。これと同様の結果はほかにも報告されている (Valdez *et al.*, 2017; Zayed *et al.*,

2021)。これまでにヒト口腔から分離した *S. mutans* の BF 形成能について、唾液よりも歯垢を分離源とした場合で BF 形成能が高い株が取得され (Lembo *et al.*, 2007)、またう蝕患者は BF 形成能に優れた株を保有することが報告されている (Mattos-Graner *et al.*, 2000)。厚生労働省 歯科疾患実態調査結果 平成 28 年度統計によると (<https://www.mhlw.go.jp/toukei/list/dl/62-28-02.pdf>)、3 歳、4 歳、5 歳、6 歳の乳歯の DFT スコアはそれぞれ 1.0、0.9、1.7、2.4 である。本研究で協力を頂いた 9 名の DFT スコアは >4 であり、全国平均よりも高いスコアである。本研究ではう蝕患者の歯垢を分離源としていることから、BF 形成能が高い株が取得されたものと考えられる。BF 形成のモデル微生物として研究が進められている枯草菌において、実験室株は富栄養環境への適応が進み、様々な特徴の喪失し、BF 形成能も失われている (McLoon *et al.*, 2011)。本研究においてもこれと同様の理由が当てはまるかもしれない。本研究では、1 患者につき 1 株の *S. mutans* を取得した。一方で、ヒト口腔内には異なる特徴を有する複数の *S. mutans* の存在が予想される。今後、DFT スコアと *S. mutans* の多様性について評価する必要がある。

*S. mutans* の株レベルの特徴を評価にあたり、ある特定の遺伝子での特徴付けは困難であり、ゲノム全体の特徴を評価する必要がある。本研究では 11 種類のランダムプライマーを用いた RAPD-PCR 法により各株間の遺伝的特徴を評価した。RAPD-PCR のバンドパターンから得られた系統樹に基づき、12 株の *S. mutans* は 2 つのクラスターで特徴づけられた。*S. mutans* 遺伝子型と BF 形成量の相関を調べるために、RAPD-PCR で得られた Jaccard 距離と BF 形成量 (Fig. 1-3) に基づく Euclidean 距離の相関係数を求めたが、相関は得られなかった ( $r=0.082$ )。

*S. mutans* の産生するバクテリオシンについて、これまでにランチビオティクス型として 4 種類 (Smb、Mutacin I、Mutacin II、Mutacin III)、及び非ランチビオティクス型として 3 種類 (Mutacin IV、Mutacin V、Mutacin IV) の存在が報告されている (Merritt and Qi, 2012)。一般に、ランチビオティクスは非ランチビオティクスよりも活性スペクトルが広い。一方で非ランチビオティクスは、*S. mutans* の菌株の中でより多く存在し、口腔 BF におけるコミュニティレベル及びポピュレーションレベルの相互作用において重要な役割を担っている。本研究で用

いた 12 株の *S. mutans* は、複数のバクテリオシン構造遺伝子を有することが明らかとなった (Table 1-3)。一方で各バクテリオシン構造遺伝子の陽性パターンと抗菌活性の特徴には関連性が認められなかった (Fig. 1-4, Table 1-3)。ヒト臨床株では、ランチビオティクス合成遺伝子の陽性率は低く、非ランチビオティクスの合成遺伝子の陽性率が高い (Watanabe *et al.*, 2021)。本研究結果においてもこれと同様の傾向が認められた。Mutacin V や Mutacin VI は他の Mutacin と比較して抗菌活性が弱いものと示唆されているが (Watanabe *et al.*, 2021)、本研究結果ではこれと同様の特徴を見出すことができなかった。*S. mutans* のバクテリオシン合成遺伝子は構造遺伝子、及びプロモーター領域に変異が生じていることが報告され、サブタイプの存在が示唆されている (Watanabe *et al.*, 2021)。また、既知のバクテリオシン合成遺伝子をいづれも持たない株においても抗菌活性を有することが報告されている (Watanabe *et al.*, 2021)。バクテリオシン合成遺伝子とトランスポザーゼ遺伝子は共存しており、*S. mutans* 分離株における Mutacin 遺伝子の保有に多様性の駆動力は水平遺伝子移動であることが示唆される (Merritt and Qi, 2012)。今後はより多くの *S. mutans* を対象とした評価し、その特徴の理解が必要であると考えられる。

本研究結果より、納豆の水抽出画分は試験した 12 株の *S. mutans* に対して高い BF 形成抑制効果を有した。特に BF 形成能の高い No. 14 株、No. 23 株、No. 29 株、No. 33 株に対しても有効であった (Fig. 1-5)。これらの結果は、納豆が異なる特徴を有する *S. mutans* に対して BF 形成抑制効果を有し、う蝕予防食品として利用できることを示唆している。納豆製造において、納豆菌スターターに由来するプロテアーゼは糸引き性や香気の生成に関わり、納豆商品の特徴に関与する。納豆菌の近縁種である枯草菌では、少なくとも 8 種類のプロテアーゼの合成遺伝子が存在する。Kada ら (2008) は、納豆中のプロテアーゼの主体は *aprV* 遺伝子にコードされる Subtilisin NAT であることを報告している。これまでに、納豆菌の Subtilisin NAT をコードする *aprV* 遺伝子変異株を用いて製造した納豆より得られた水溶性画分は、プロテアーゼ活性の低下と、BF 形成抑制効果の低下が確認されている (Yokoyama *et al.*, 2021)。Fujita ら (1993) は終濃度 10  $\mu$ M の PMSF は精製ナットウキナーゼの活性を完全に阻害し、同濃度の TPCK や Leupeptin では活性が阻害されないことが示されている。本研究において納豆抽出液の BF 形

成抑制効果は、加熱処理及び 0.1  $\mu\text{M}$  の PMSF の存在により阻害され、同濃度の TPCK と Leupeptin の存在には影響されないことが示された (Fig. 1-6,1-7)。このことから、本研究で作製した納豆の水溶性画分の BF 形成抑制因子は Subtilisin NAT であるものと強く示唆された。この結論を裏付けるように、納豆抽出液に含まれるプロテアーゼ活性に相当する Subtilisin NAT を添加した場合、すべての *S. mutans* に対して BF 形成抑制効果が認められた (Fig. 1-8)。

本研究で得られた No.20 株と No.23 株は、10%の納豆抽出液の存在で BF 形成が促進された (Fig. 1-5)。No. 1 株と No. 25 株を除くすべての菌株は、25% (v/v)の熱処理済 (90°C・15分)納豆抽出液の添加により BF 量が 1.5 倍以上増加した (Fig. 1-6)。同様の促進効果は、PMSF を加えた際でも確認された (Fig. 1-7)。この理由については明らかではないが、納豆抽出液中に熱に安定な BF 促進因子の存在が示唆された。納豆抽出液には BF 形成の基質となるスクロースは検出限界以下であった (<1.0 mg/L) (data not shown)。未発酵の蒸煮大豆より得られる水溶性画分は、BF 形成を促進させる (Iwamoto *et al.*, 2018)。大豆抽出液はスクロースを含む低分子化合物 (<Mw.14,000)を透析により除去した後でも、BF 形成を促進した (未発表データ)。今後、納豆に含まれる BF 形成促進因子を明らかにすることは、納豆のう蝕予防食品への利用性にとって重要な課題である。

BF 形成の最初のステップである担体上への付着は、その後の BF の成熟化にとって重要である (Wen and Burne, 2002)。 *S. mutans* の凝集を誘導すると、歯面への初期付着が妨げられる (Lee and Boran, 2003)。これまでにいくつかの植物アグルチニンが *S. mutans* の歯面への付着を妨害することが報告されている (Yang *et al.*, 2019)。最近の研究では、大豆に含まれるイソフラボンであるゲニステインが *S. mutans* の凝集を誘導し、それによって BF 形成を阻害することが示された (Lee *et al.*, 2014)。本研究では大豆抽出物で *S. mutans* の凝集を誘導できなかったが (data not shown)、最近の研究では大豆中のゲニステイン含量が浸漬や蒸煮によって影響を受けることが示されている (Kasuga *et al.*, 2006)。今後、ゲニステインも BF 抑制因子として有益であると考えられ、納豆発酵過程におけるゲニステインの挙動を明らかにする必要があるだろう。

Table 1-1. Patient Information

Patient No.	DFT *	Ages	Sex
1	7	3Y8M	Male
14	9	4Y9M	Male
19	14	4Y0M	Female
20	12	5Y8M	Female
23	12	4Y0M	Male
25	4	4Y6M	Female
29	15	4Y5M	Male
31	9	3Y6M	Male
33	5	6Y8M	Female

\* DFT; decayed and filled tooth

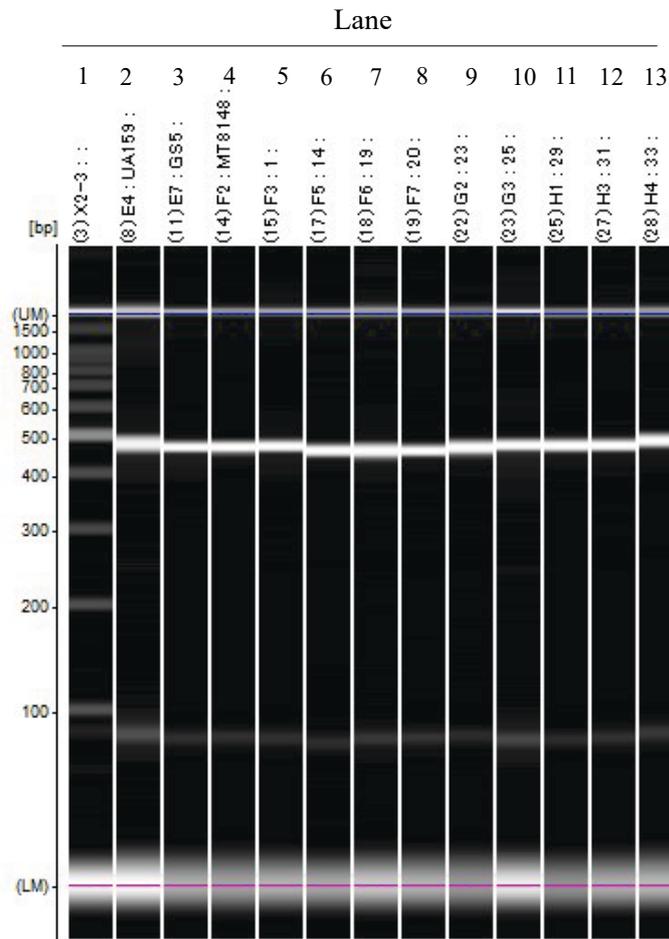


Fig. 1-1. Electrophoresis image of the *S. mutans htrA* gene region. Electrophoresis was performed using MultiNA (Shimazu). Markers were 1,000 bp DNA ladder (TAKARA). Lane 1; Marker, Lane2; UA159, Lane 3; GS-5, Lane 4; MT8148, Lane 5; isolate No.1, Lane 6; isolates No. 14, Lane 7; isolates No. 19, Lane 8; isolates No. 20, Lane 9; isolates No.23, Lane 10; No. 25, Lane 11; No. 29, Lane 12; No. 31, and Lane 13; No. 33.

Table 1-2. List of selected primers and degree description of the polymorphism among twelve *S. mutans*.

Primer Name	Primer Sequence (5'-3')	Band number		Polymorphism ratio
		Pattern	Polymorphism	
Primer2	CCGAGTCCA	4	3	0.75
Primer5	CCGCAGCCAA	4	4	1.00
Primer6	TGCCGAGCTG	3	3	1.00
Primer7	AATCGGGCTG	2	2	1.00
Primer9	GGTGATCAGG	4	3	0.75
Primer11	AGTCGGGTGG	5	5	1.00
RI-3	GTCCTGAAC	7	6	0.86
RI-16	GTCGCCGICA	3	3	1.00
OPH-18	GAATCGGCCA	3	3	1.00
OPH-13	GACGCCACAC	4	4	1.00
OPBB-4	ACCAGGTCAC	5	4	0.80
<b>Total</b>		<b>44</b>	<b>40</b>	<b>0.91</b>

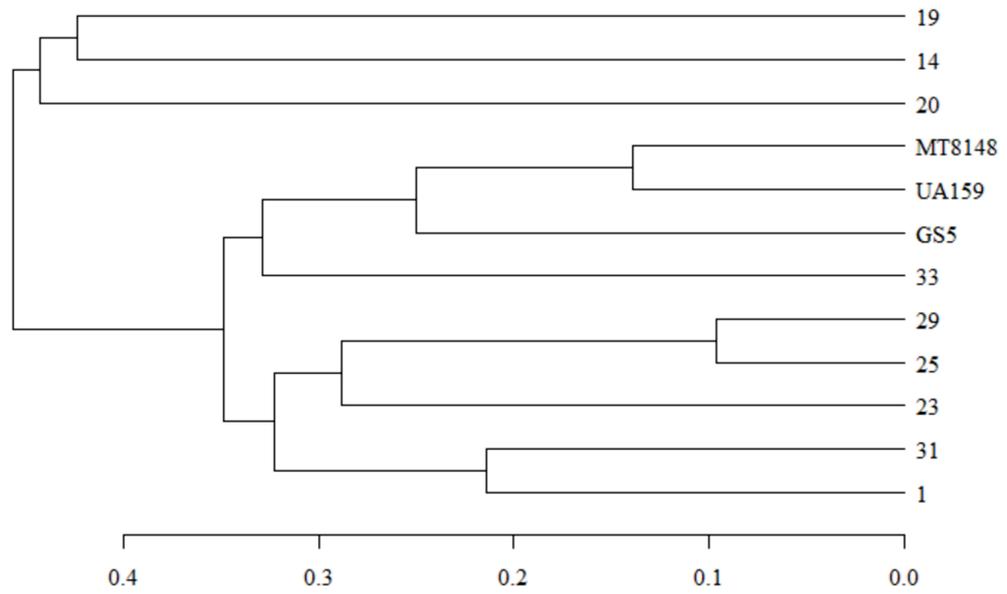


Fig. 1-2. Unweighted pair group method with arithmetic mean dendrogram illustrating the genetic distance of twelve strains based on randomly amplified polymorphic DNA-polymerase chain reaction.

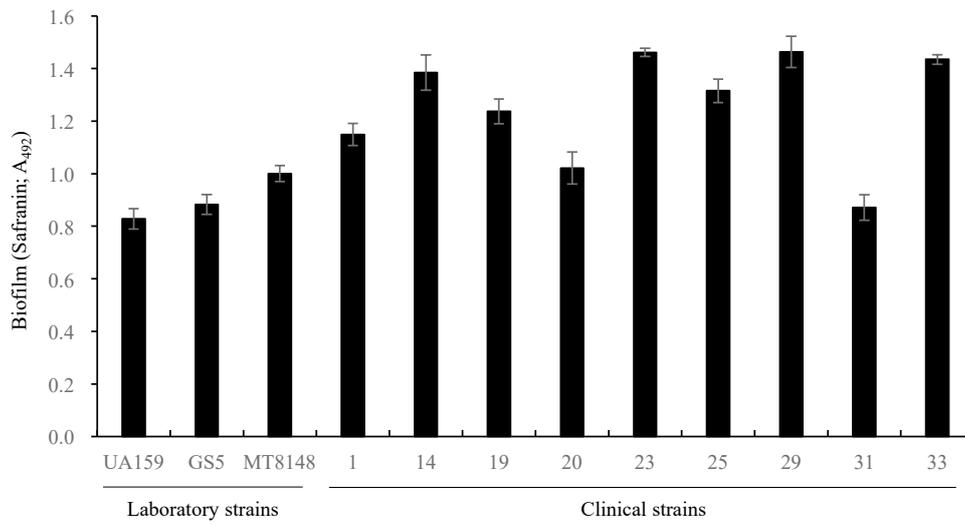


Fig. 1-3. Biofilm formation by twelve *S. mutans* strains. The results are expressed as mean  $\pm$  standard deviations from three independent assays.

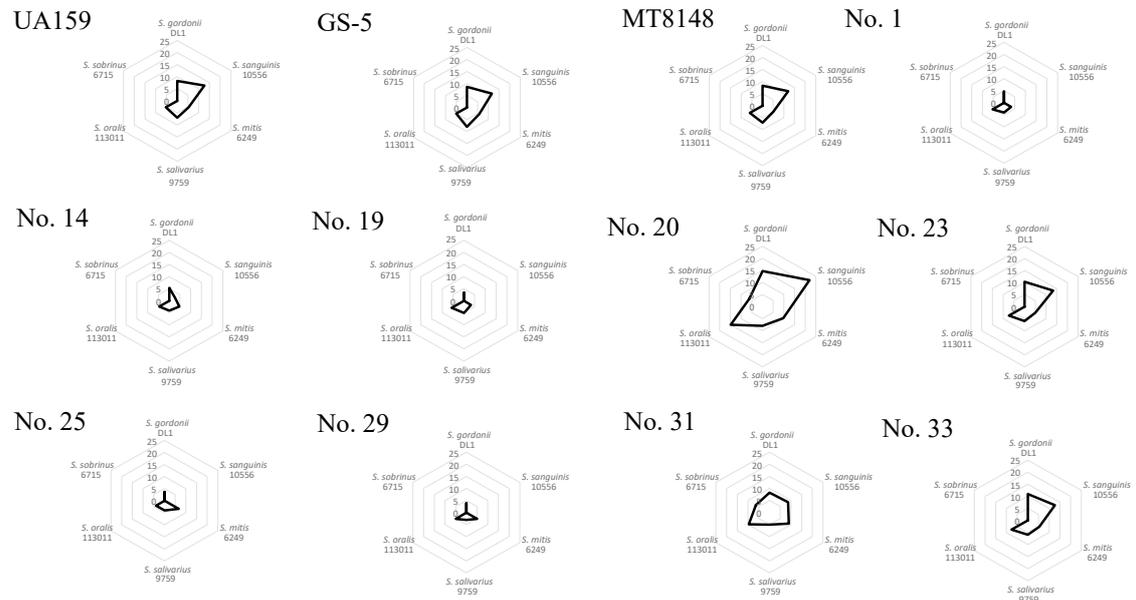


Fig. 1-4. Antibacterial activity of *S. mutans* against 6 oral streptococcal species. To evaluate the antibacterial activity of bacteriocins, a direct assay was performed with the method described in the Materials and Methods section. Three independent experiments were performed, and the average diameter was calculated. The number in each panel represents the diameter of the inhibition zone (mm).

Table 1-3. Investigation of possession of bacteriocin structural genes in *S. mutans*.

Strain	Bacteriocin structural genes							
	<i>smb</i> (Smb)	<i>mutI</i> (Mutacin I)	<i>mutII</i> (Mutacin II)	<i>mutIII</i> (Mutacin III)	<i>nImA</i> (Mutacin IV)	<i>nImB</i> (Mutacin IV)	<i>nImC</i> (Mutacin V)	<i>nImD</i> (Mutacin VI)
UA159	-	-	-	-	+	+	+	+
GS-5	+	-	-	-	+	+	+	+
MT8148	-	-	-	-	-	-	+	+
No. 1	-	-	-	-	+	+	-	+
No. 14	-	-	-	-	+	+	-	+
No. 19	-	-	-	-	+	+	-	+
No. 20	+	-	-	-	-	-	-	+
No. 23	+	-	-	-	+	+	+	+
No. 25	+	-	-	-	+	+	-	+
No. 29	+	-	-	-	+	+	-	+
No. 31	-	-	-	-	+	+	+	+
No. 32	-	-	-	-	+	+	+	+

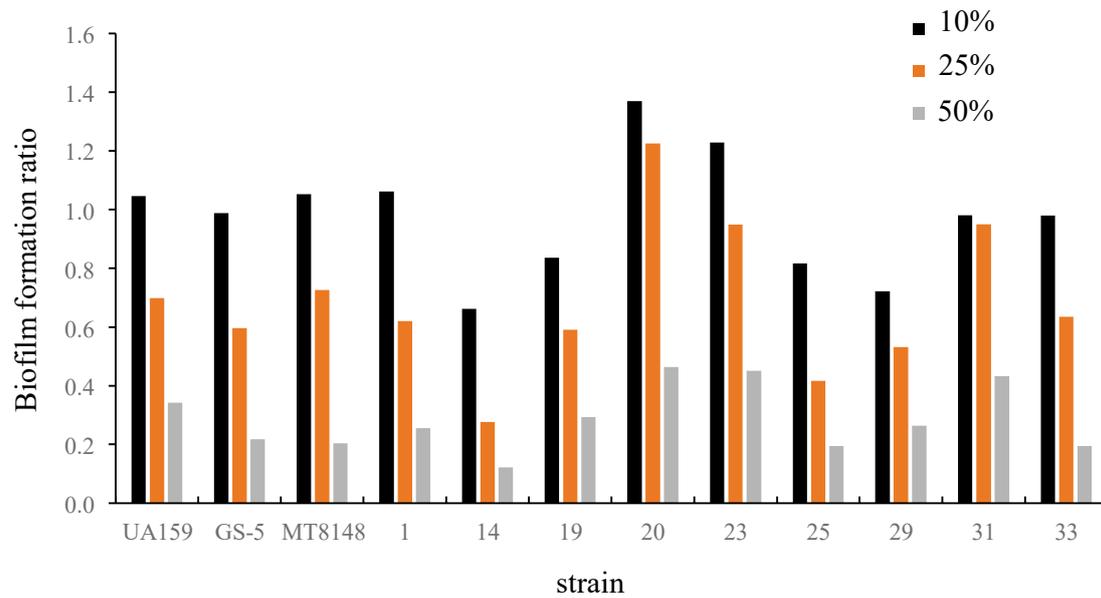


Fig. 1-5. The effect of natto extract on biofilm formation. Black bars; the addition of 10% (v/v) of natto extract, Orange bars; the addition of 25% (v/v) of natto extract, and Silver bars ; the addition of 50% (v/v) of natto extract. Results are expressed as relative values, with the control set as “1.” Data represent the average of three independent experiments.

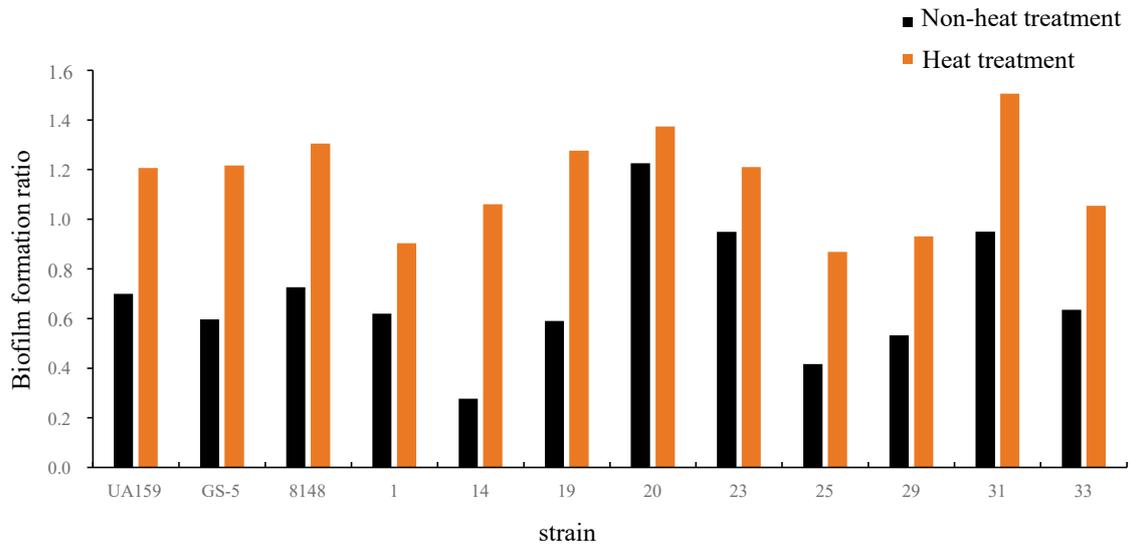


Fig. 1-6. Effects of heat-treated natto extract on BF formation. Black bars; The natto extract was added at 25% (v/v) concentration, Orange bars; the heat-treated natto extract was added at 25% (v/v) concentration Results are expressed as relative values with the BF amount of unheated natto extract added to the culture medium set as “1.” Data represent the average of three independent experiments.

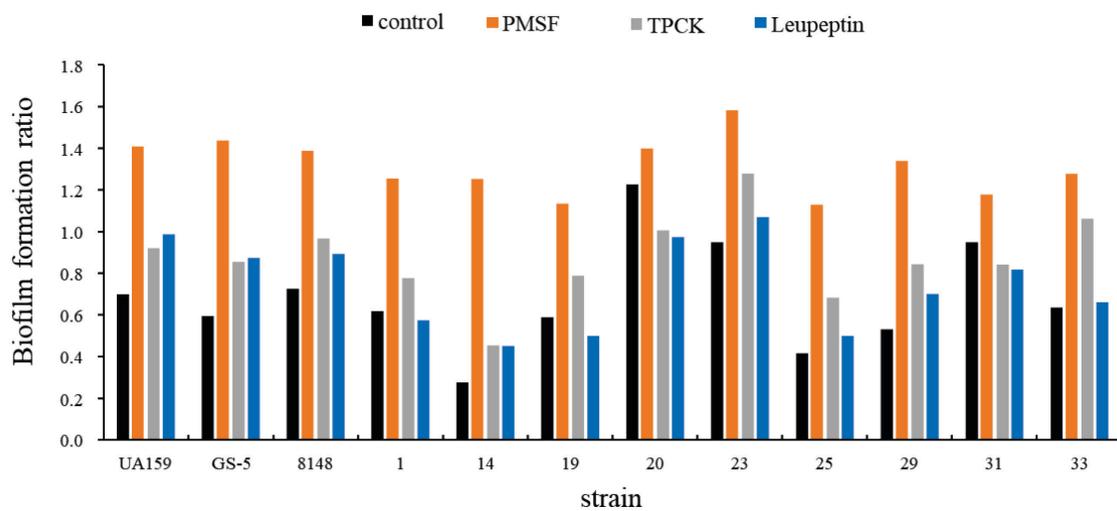


Fig. 1-7. Effects of protease inhibitor on BF inhibitory effects by natto extract. The natto extract was added at 25% (v/v) concentration. Black bars; control, Orange bars; the addition of PMSF (0.1  $\mu$ M), Silver bars; the addition of TPCK (0.1  $\mu$ M), and Blue bars; the addition of Leupeptin (0.1  $\mu$ M). Results are expressed as relative values with the BF amount of unheated natto extract added to the culture medium set as “1.” Data represent the average of three independent experiments.

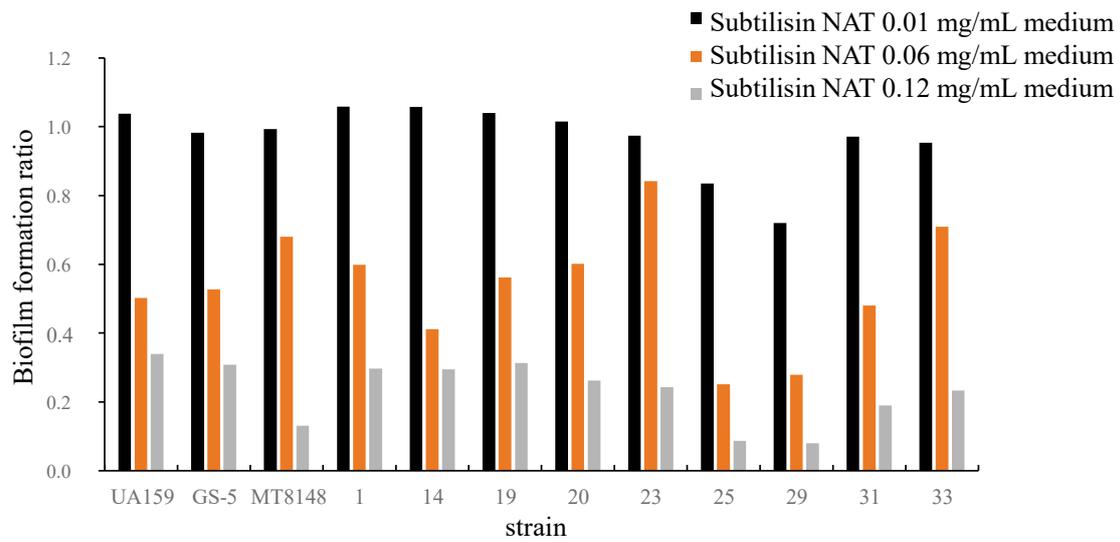


Fig. 1-8. The effect of commercially available Subtilisin NAT on biofilm formation. Black bars; the addition of 0.01 mg/mL of Subtilisin NAT, Orange bars ; the addition of 0.06 mg/mL of Subtilisin NAT, and Silver bars ; the addition of 0.12 mg/mL of Subtilisin NAT. Results are expressed as relative values, with the control set as “1.” Data represent the average of three independent experiments.

## 第2章

Subtilisin 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

## 第1節 緒言

*S. mutans* は3種類のGTF (GTF-B、GTF-C、及びGTF-D)を有する。GTFはスクロースのグルコシル基をアクセプターに転移し同時にフルクトースを遊離する触媒作用を行う。この時、グルコース、スクロース、あるいはすでに存在するグルカンなどがアクセプターとなりうる。この転移を順次繰り返すことによりグルコース鎖が延長されグルカンが成長していく。GTF-BとGTF-Cは $\alpha$ -1,3結合の不溶性グルカン、GTF-Dは $\alpha$ -1,6結合の水溶性グルカンの合成に関わる (Table 2-1)。GTF-BとGTF-Cをコードするそれぞれ *gtfB* と *gtfC* 遺伝子変異株では、BF形成能が著しく低下することから、両酵素はBF形成にとって必須である (Fig. 2-1)。GTF-B及びGTF-Cはそれぞれ158 kDaと150 kDaであり、スクロース存在下では細胞表層、スクロース非存在下では菌体外に存在する (Hamada and Torii, 1978)。そこで本章でははじめに、*S. mutans* の培養液より得られたGTF画分を用い、Subtilisin NATによる活性への影響について評価することとした。

*S. mutans* は複数のバクテリオシンを生産することが報告されており、口腔内でのニッチ獲得に影響する。*S. mutans* のバクテリオシンのうち、非ランチビオテックのMutacin IV、Mutacin V、Mutacin VIの合成は菌体外CSP濃度に依存したComCDEと呼ばれるクオラムセンシングシステムに制御される (Kreth *et al.*, 2005a; Kreth *et al.*, 2005b; Khan *et al.*, 2016)。クオラムセンシングシステムは、細菌の細胞密度がある閾値濃度に達すると分泌されたペプチドフェロモンを用いて様々な遺伝子の発現を制御する細菌の主要なコミュニケーション手段である。第1章において、すべてのヒト臨床株は非ランチビオテック陽性であった。*S. mutans* の活性型CSPのアミノ酸配列はSGSLSTFFRLFNRSFTQALGKであり (Hossain and Biswas, 2012)、一般のタンパク質を構成するアミノ酸から成る。よって、Subtilisin NATはCSPを阻害する可能性が高く、これに伴うバクテリオシン合成の低下も期待される。そこで本章ではこの点について評価を行うこととした。

近年、システイン型プロテアーゼであるFicinが*S. mutans*のBF形成を阻害することが報告され、これにはBF形成に関連遺伝子の発現抑制を伴うことが報告されている (Sun *et al.*, 2021)。このことからSubtilisin NATの存在によって、遺伝子発現の変化を伴うことが予想される。RNA-seq法はグローバルなトランスクリプトーム変化をモニタリングするための魅力的な手法であることから (Marioni *et al.*, 2008)、本研究においても採用することとした。

## 第2節 Subtilisin NAT による *S. mutans* へ及ぼす影響評価

### 第1項 BF 形成抑制効果のメカニズム解析

*S. mutans* の培養液より GTF 画分を取得し、これと Subtilisin NAT を反応させた際の活性への影響を評価することとした。結果を Fig. 2-2 に示した。*S. mutans* 親株の培養液より得られた粗酵素画分には、0.11 units/mg protein の GTF 活性が検出された。*S. mutans* UA159 *gtfBC*<sup>-</sup>変異株より得られた粗酵素画分では 0.0006 units/mg protein の GTF 活性が検出され、親株の場合と比較して大幅な活性の低下が認められた。親株由来の粗酵素画分の GTF 活性は、Subtilisin NAT の存在により活性が大幅に減少し、0.5 mg/mL の subtilisin NAT の存在下では 0.007 units/mg protein にまで低下した。このことから、Subtilisin NAT は GTF 活性を阻害することが示された。

Subtilisin NAT が GTF を加水分解するか確認を行った (Fig. 2-3)。*S. mutans* の培養液から得られた粗酵素画分を SDS-PAGE に供した結果、150 kDa 付近に 2 つのバンドが得られた。先行研究から、これらは GTF であると予想される (Nakamura *et al.*, 2020)。粗酵素溶液と Subtilisin NAT の反応物を SDS-PAGE に供したところ、150 kDa 付近のバンドの消失が確認された。このことから、Subtilisin NAT による GTF 活性の低下は、GTF の加水分解によるものと考えられた。

### 第2項 Subtilisin NAT によるバクテリオシン生産へ及ぼす影響評価

Subtilisin NAT 存在下でのバクテリオシン生産へ及ぼす影響について評価するため、以下の実験を行った。*S. mutans* を Subtilisin NAT と共に寒天培地に穿刺した。その後、被検菌培養液を含む寒天培地を重層し、培養後の阻止円のサイズを評価した。Subtilisin NAT のバクテリオシン生産抑制効果は UA159 株、No. 20 株、No. 23 株で顕著であり、No. 1 株、No. 14 株、No. 19 株、No. 29 株では影響は見られなかった (Fig. 2-4)。

Subtilisin NAT のバクテリオシン生産性の低下が菌体外 CSP の阻害によるものか確認を行うため、UA159 株を宿主として *comC*<sup>-</sup>変異株を作製した。*comC*<sup>-</sup>変異株は、*S. gordonii* 及び *S. sanguinis* に対する抗菌性が完全に失われた (Fig. 2-5)。*comC*<sup>-</sup>変異株に終濃度が 1.0 μM となるよう CSP を添加した場合、両被検菌に対する抗菌性が一部回復した。CSP を 0.5 mg/mL、及び 1.0 mg/mL の Subtilisin NAT と反応させた場合、*comC*<sup>-</sup>変異株の抗菌活性は検出限界以下となった。

このことから、Subtilisin NAT は CSP の阻害を介してバクテリオシン生産性を低下させるものと考えられた。

### 第3項 Subtilisin NAT による遺伝子発現への影響評価

*S. mutans* の遺伝子発現に対する Subtilisin NAT の影響を調べるために、1.0 mg/mL の Subtilisin NAT 存在下で培養した UA159 株の対数増殖期中期の細胞から RNA を取得し、RNA-seq を用いた。1.0 mg/mL の Subtilisin NAT はスクロース存在下における BF 形成を完全に抑制する濃度である。本検討における RNA の取得は、スクロースを添加しない BHI 培地での培養液を用いた。生リードをフィルタリングした結果、3 サンプルの繰り返しの平均はコントロールサンプルでは 32,246,224 であり、Subtilisin NAT の存在下では 32,781,194 のクリーンリードがあった。クリーンリードのうち、Q20 は両サンプルで 98.7、Q30 はコントロールサンプルで 95.5、Subtilisin NAT の存在下では 95.4 であり、高品質なデータであることが確認された。本研究では *S. mutans* UA159 株配列を参照ゲノムとして使用した。

Subtilisin NAT の有無について、3 回の独立した実験を行った。主成分分析の結果、無添加区と比較して Subtilisin NAT 添加区において遺伝子発現に変化が認められ、全データセットで観察された分散の 89% が説明された (Fig. 2-6)。

算出した遺伝子発現量と統計的基準 ( $|\text{fold change}| \geq 2, p\text{-value} < 0.05$ ) により、Subtilisin NAT の存在により計 69 個の優位な発現変化が認められ、このうち 13 個はアップレギュレート、56 個はダウンレギュレートであった (Fig. 2-7)。Subtilisin NAT の存在により発現変動した遺伝子は全体の 3.6% であった。ダウンレギュレートされた遺伝子には、バクテリオシンの構造遺伝子やバクテリオシンの免疫タンパク質をコードする遺伝子が含まれていた (Table 2-2)。アップレギュレートを示した遺伝子は、ムタノバクチンの生合成に関わる遺伝子が含まれた (Table 2-3)。

*S. mutans* の BF 形成には先に示した GTF 以外にも様々な因子の関与が示されている。*S. mutans* の接着因子である SpaP やグルカン結合タンパク質 (以下、GBP) は初期付着や BF 形成に重要な役割を果たす。SpaP は細胞表面局在性タンパク質であり、唾液腺アグルチニンと特異的に相互作用することにより歯面へのスクロース非依存的な初期付着に関与する重要なアドヘジンである

(Yang *et al.*, 2019)。 *S. mutans* の GBP は GbpA、 GbpB、 GbpC、 GbpD の 4 種が報告されており、このうち GbpB と GbpC はグルカン結合性を有し、 BF 形成に関与する (Huang *et al.*, 2015)。 細胞表面関連 BF 制御タンパク質 BrpA は、 *S. mutans* の環境ストレス応答と BF 形成に重要な役割を果たすことが報告されている (Feldman *et al.*, 2016)。 RNA-seq 解析の結果より、 GTF を含むこれら各 BF 関連因子をコードする遺伝子発現は、 Subtilisin NAT の影響を受けないことが明らかとなった (Table 2-4)。

### 第3節 考察

*S. mutans* の BF 形成にはスクロースを基質として GTF の触媒作用により合成される不溶性グルカンが必須である (Fig. 2-1)。 Subtilisin NAT は、 *S. mutans* の GTF の加水分解により活性を低下させることが明らかとなった (Fig. 2-2, 2-3)。 SDS-PAGE の結果より、 Subtilisin NAT は *S. mutans* に由来する複数のタンパク質を分解することが示された (Fig. 2-3)。 この結果は、 Subtilisin NAT が様々なタンパク質を非特異的に分解することを示すものである。 *S. mutans* の BF 形成には GTF 以外にも様々な因子の影響をうける。 本研究では消失した各バンドの同定は行われていないが、 Subtilisin NAT は様々なタンパク質に影響することで高い BF 形成抑制効果をもたらすものと予想される。

本研究において、 Subtilisin NAT の存在により複数の *S. mutans* のバクテリオシン活性の低下が認められた (Fig. 2-4)。 *S. mutans* の *comC* 変異株と合成ペプチドを用いたバクテリオシン生産性評価において、 Subtilisin NAT は CSP を阻害することでバクテリオシン生産性を低下させることが強く示唆された (Fig. 2-5)。 CSP は ComCDE システムの活性化に関わる。 ComCDE システムは非ランチビオティックに関連する複数の遺伝子をレギュロンに持つ。 これらレギュロンの特徴は転写開始点のすぐ上流に保存された 9 bp の繰り返し配列を有する。 本研究において、 Subtilisin NAT の存在によりバクテリオシン合成とバクテリオシンに対する免疫タンパク質をコードする遺伝子の発現抑制が認められた (Table 2-2)。 Table 2-2 に示す Subtilisin NAT の存在により発現が低下した遺伝子のうち、 *nlmC*、 *nlmD*、 *immA*、 *bsmB*、 SMU. 152、 SMU. 1909c はいずれも転写開始点の上流に *comE* の認識配列を有していた (data not shown)。 よってこれらは ComCDE システムのレギ

ユロンであると考えられる。これら ComCDE システムのレギュロンが Subtilisin NAT の存在により発現量が低下したことは、CSP の阻害が原因であることを強く示唆するものである。一方で、Subtilisin NAT の存在により *comE* の発現には影響がみられなかった。今後は発現変動が見られた個々の遺伝子について、リアルタイム PCR などで詳細な検討が必要である。

*S. mutans* は複数のバクテリオシンの存在が報告されているが、第 1 章で明らかのように臨床株は非ランチビオティック合成遺伝子の陽性率が極めて高かった。非ランチビオティックは一般のタンパク質に用いられる 20 種のアミノ酸が主な構成成分となっている。よって、Subtilisin NAT は直接的にバクテリオシンを加水分解し、活性を低下させる可能性がある。*S. mutans* はバクテリオシン生産パターンは多岐にわたることが報告され、未知バクテリオシンの存在も強く示唆されている (Watanabe *et al.*, 2021)。今後はより多様な株を対象として、バクテリオシン合成に対する Subtilisin NAT の影響を調べる必要がある。

*S. mutans* のゲノミックアイランド TnSmu2 は、ゲノムの 2%以上を占めている。ゲノミックアイランドは、巨大な DNA 配列 (10~200 kb)の両端に挿入配列が存在し、ゲノムの他の部分とは異なる G+C 比率を示すことで特徴付けられる。TnSmu2 には nonribosomal peptide synthetases、polyketide synthases、nonribosomal peptide、polyketide 生合成に関わるアクセサリタンパク質や制御因子をコードする *mub* 遺伝子クラスターが存在し、酸素耐性、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 耐性、BF 形成に関与していることが明らかになっている (Wu *et al.*, 2010)。TnSmu2 の構成遺伝子のうち、Subtilisin NAT の存在により発現量が亢進した *mubA*、*mubE*、*mubH*、*mubG* はいずれもムタノバクチン合成に関わることが報告されている (Wu *et al.*, 2010)。ムタノバクチンとは環状構造を有するポリペプチドであり、黄色の呈色を示す物質である (Wu *et al.*, 2010; Hansen *et al.*, 2022)。これまでに *mubA*、*mubB*、*mubH*、*mubG* はいずれも同一のプロモーター *mubR* (SMU. 1349) の制御を受けるものと推定されている (Wu *et al.*, 2010)。ムタノバクチンは酸素耐性に関わることが報告されており、*S. mutans* の口腔内での定着性や優占化にとって極めて重要な因子であることが推察されているが、その情報は限りなく少なく、現時点において Subtilisin NAT によるムタノバクチン合成遺伝子への影響について評価が困難である。

これまでにシステイン型のプロテアーゼである Ficin が *S. mutans* の BF 形成を抑制し、既知の

BF 形成関連遺伝子の発現量に影響することが報告されている (Sun *et al.*, 2021)。このことからプロテアーゼの存在は *S. mutans* の幅広い遺伝子発現に影響を及ぼすことが示唆されている。本研究において、Subtilisin NAT の存在によって全遺伝子のうち発現変動が認められたのは 3.6% の遺伝子にすぎず、優位な変動は認められなかった。よって、Subtilisin NAT による *S. mutans* の遺伝子発現レベルへの影響は限定的であるものと考えられた。

Table 2-1. Characterizations of GTF on *S. mutans*.

GTF	M.w. (kDa)	Glucan	Gene
GTF-B	158	Water insoluble ( $\alpha$ -1,3)	<i>gtfB</i>
GTF-C	150	Water insoluble ( $\alpha$ -1,3)/Water soluble ( $\alpha$ -1,6)	<i>gtfC</i>
GTF-D	155	Water soluble ( $\alpha$ -1,6)	<i>gtfD</i>

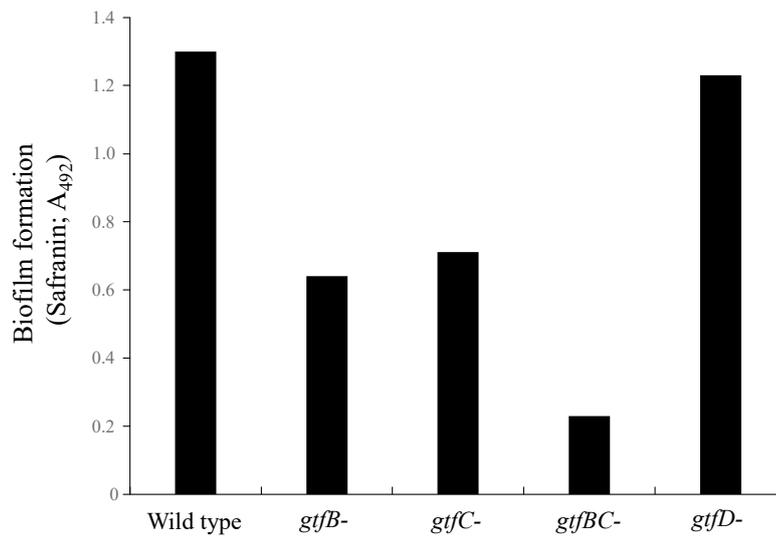


Fig. 2-1. Sucrose dependent biofilm formation by *S. mutans* UA159 wild type, *gtfB*<sup>-</sup> mutant, *gtfC*<sup>-</sup> mutant, *gtfBC*<sup>-</sup> mutant and *gtfD*<sup>-</sup> mutant. Culture for biofilm formation used non-saliva coat plate.

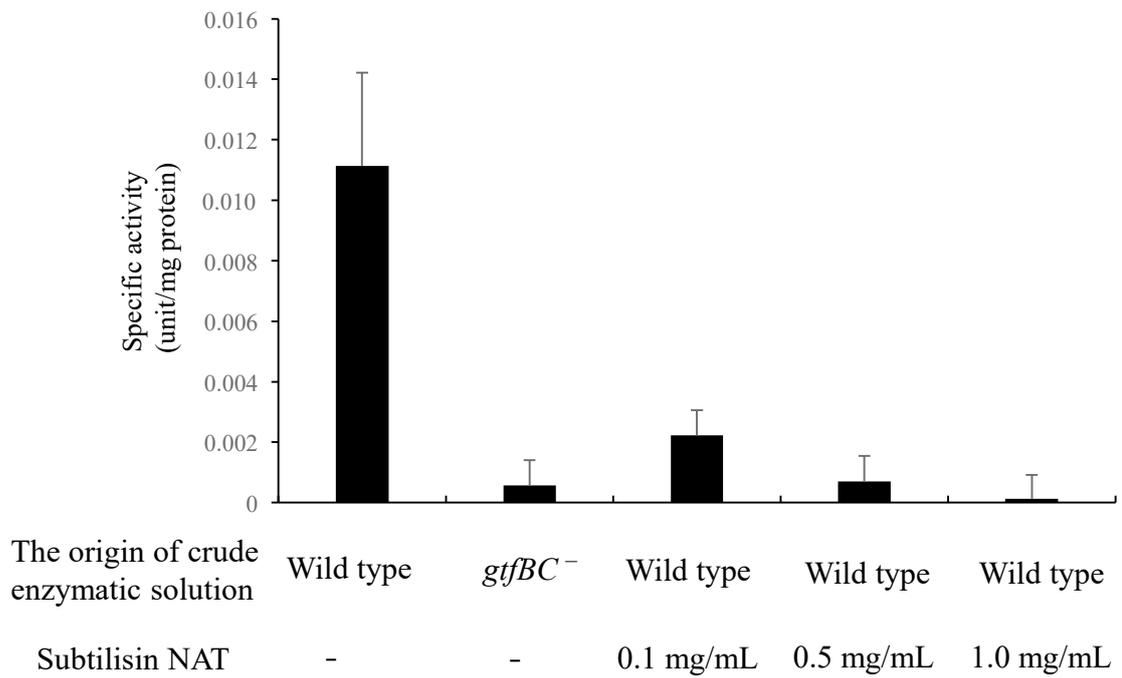


Fig. 2-2. Effect of Subtilisin NAT on GTF activity. The results are expressed as mean  $\pm$  standard deviations from three independent assays.

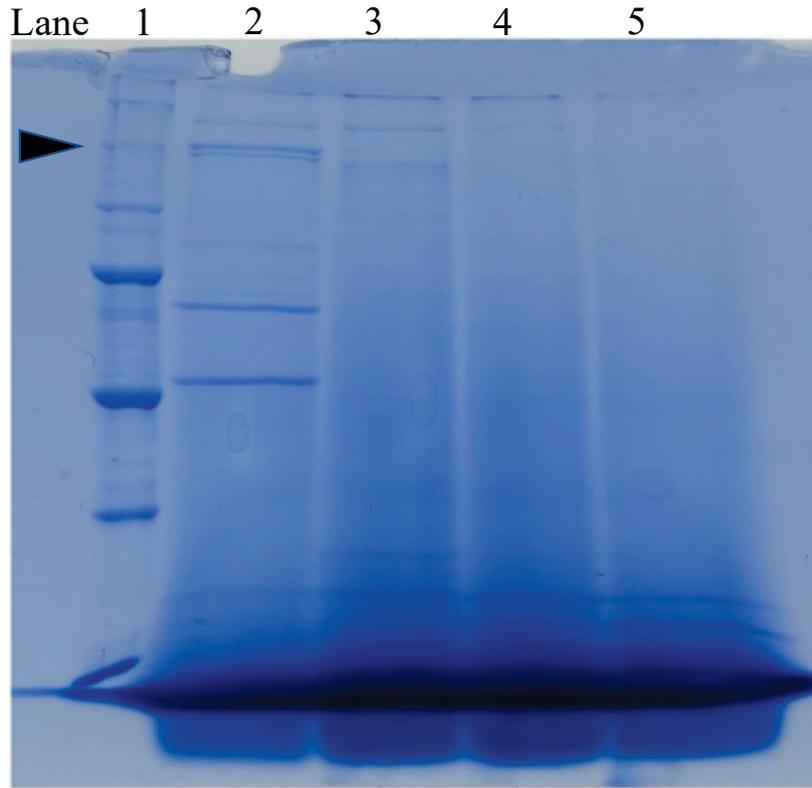


Fig. 2-3. CBB-stained SDS-PAGE gels of crude protein fraction obtained from culture supernatant of *S. mutans* UA159 wild type. Lane 1; Size standards, Lane 2; Control, Lane 3; Subtilisin NAT (0.1 mg/mL) treatment, Lane 4; Subtilisin NAT (0.5 mg/mL) treatment, Lane 5; Subtilisin NAT (1.0 mg/mL) treatment. The arrow indicates 150 kDa molecular weight.

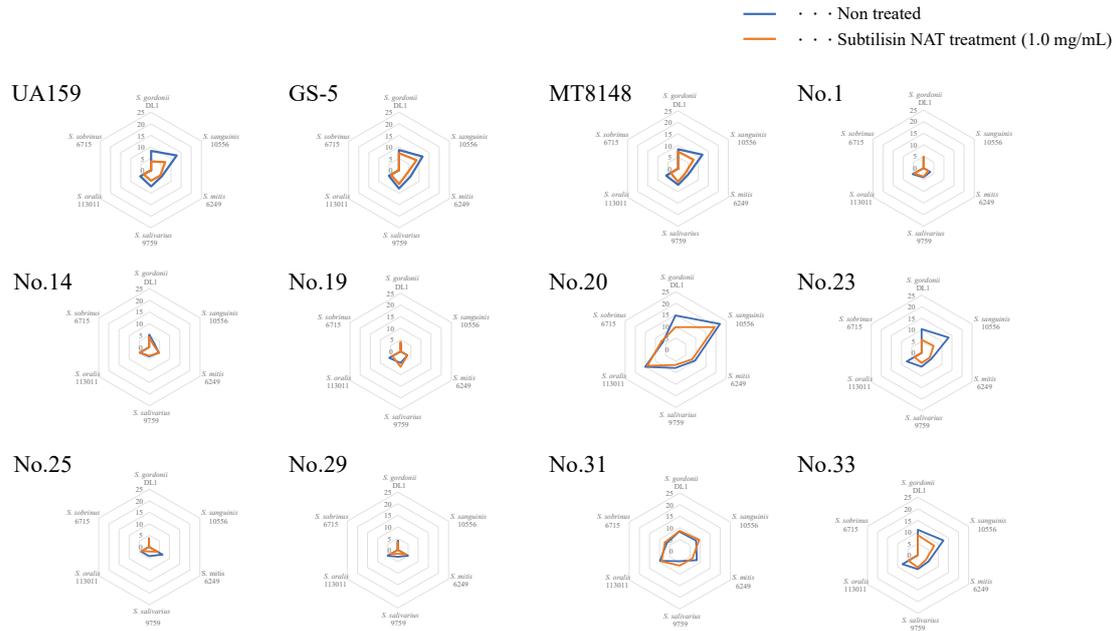


Fig. 2-4. Effect of Subtilisin NAT on antibacterial activity of *S. mutans* against 6 oral streptococcal species. To evaluate the antibacterial activity of bacteriocins, a direct assay was performed with the method described in the Materials and Methods section. Three independent experiments were performed, and the average diameter was calculated. The number in each panel represents the diameter of the inhibition zone (mm). Blue lines indicate control (absence of Subtilisin NAT); Red lines indicate Subtilisin NAT (1.0 mg/mL) treatment.

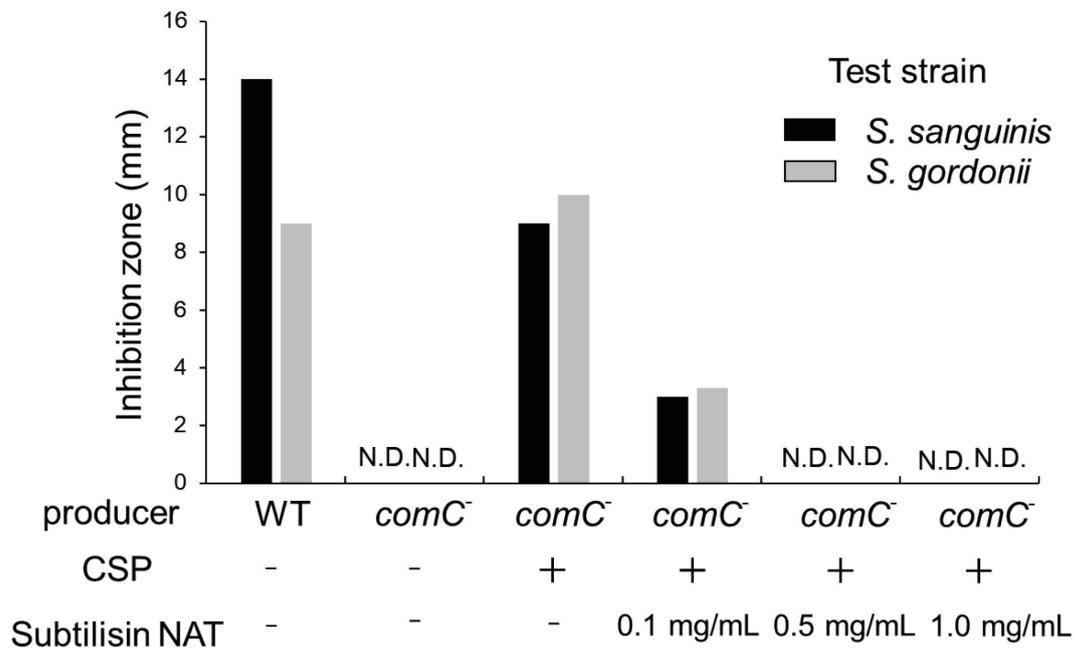


Fig. 2-5. Effect of bacteriocin production by *S. mutans* UA159 *comC*<sup>-</sup> mutant. CSP was added at a final concentration of 1.0 μM. *S. gordonii* DL1 and *S. sanguinis* ATCC10556 were used as test strains. If necessary, CSP was treated with a Subtilisin NAT of 0.1, 0.5, and 1.0 mg/mL, respectively. 'N.D.' indicates not detected. Three independent experiments were performed, and the average diameter (mm) was calculated.

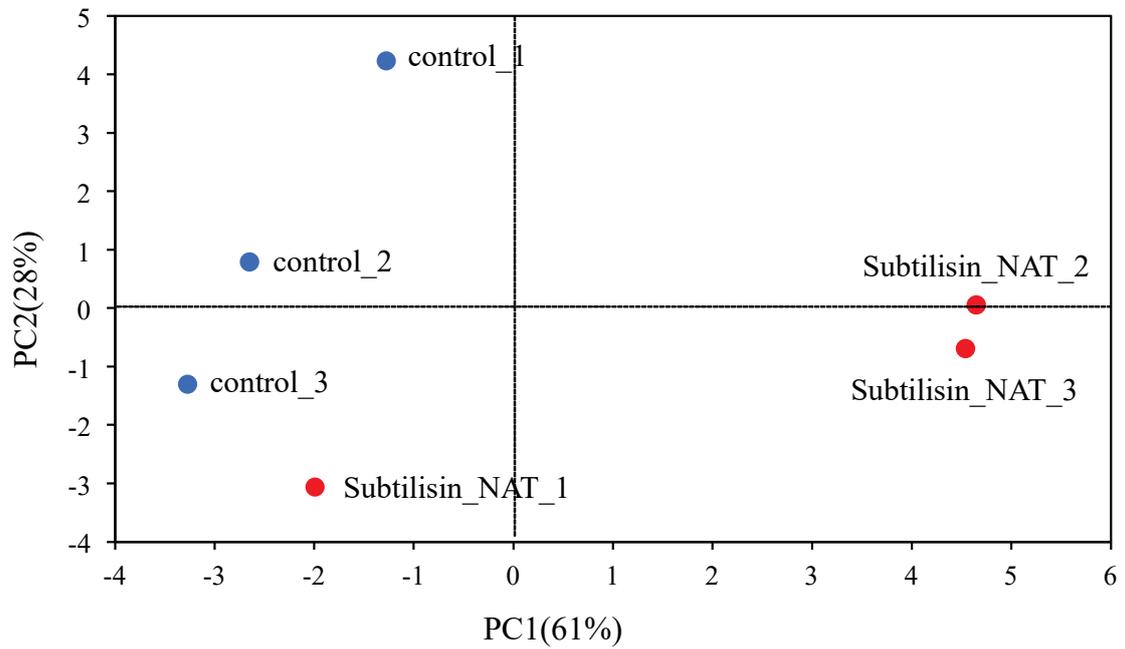


Fig. 2-6. Principal component analysis (PCA) of gene expression in *S. mutans* control or presence of Subtilisin NAT (1.0 mg/mL). The plots show the first two principal components (PC1 and PC2), which account for 61% and 28% of the total variation of the data, respectively.

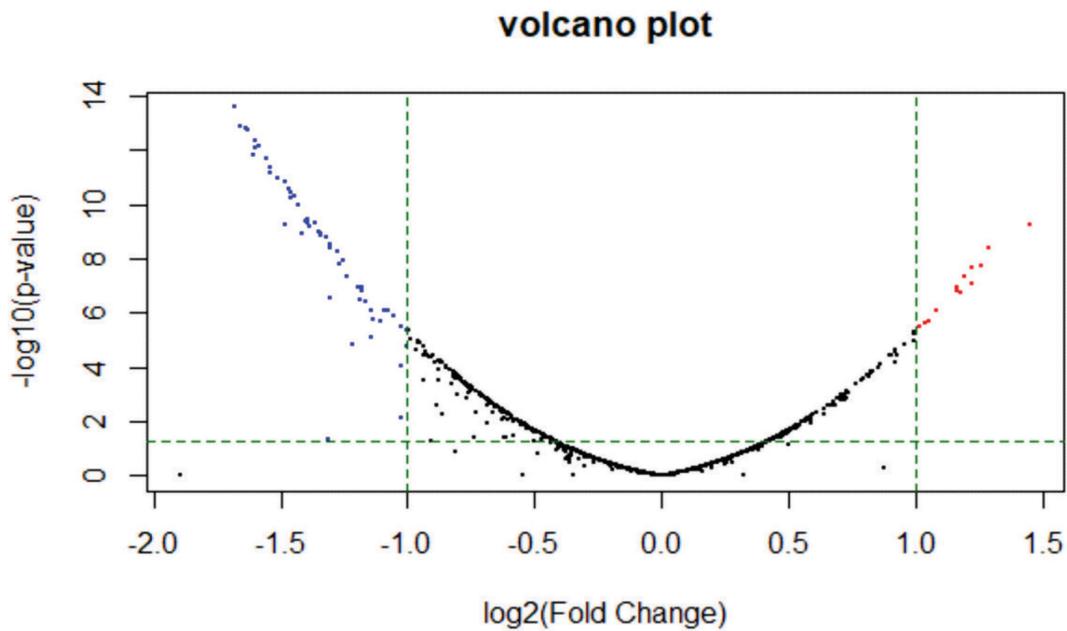


Fig. 2-7. Volcano plot of differential gene expression of *S. mutans* presence of Subtilisin NAT (1.0 mg/mL) versus absence of Subtilisin NAT. Each point represents the average value of one transcript in three replicate experiments. The expression difference is considered significant for a multiple (FDR-based) adjusted  $p$ -value of 0.05 (green broken horizontal line). The list of DE genes was then further filtered for biological relevance by filtering on a  $\log_2$  fold change of  $\geq 1$  and  $\leq -1$  (red points, outer blue broken vertical lines).

Table 2-2. Downregulated genes in *S. mutans* upon Subtilisin NAT.

Gene id	Gene	log FC	$-\log_{10}(p)$	Product
SMU_RS00745	<i>tnpA</i>	-1.079	6.081	IS200/IS605 family transposase
SMU_RS00760		-1.001	4.769	hypothetical protein
SMU_RS00900		-1.000	5.372	metal ABC transporter ATP-binding protein
SMU_RS01015		-1.242	7.376	DUF3173 domain-containing protein
SMU_RS01020		-1.267	7.788	DUF3850 domain-containing protein
SMU_RS01025		-1.663	12.912	hypothetical protein
SMU_RS01030		-1.635	12.807	phage tail-type lysozyme domain-containing protein
SMU_RS01035		-1.456	10.439	hypothetical protein
SMU_RS01040		-1.322	8.766	ATP-binding protein
SMU_RS01045		-1.399	9.404	conjugal transfer protein
SMU_RS01050		-1.540	11.152	hypothetical protein
SMU_RS01055		-1.348	8.986	conjugal transfer protein
SMU_RS01060		-1.433	9.987	hypothetical protein
SMU_RS01065		-1.057	5.878	hypothetical protein
SMU_RS01070		-1.394	9.474	hypothetical protein
SMU_RS01075		-1.342	8.954	replication initiation factor domain-containing protein
SMU_RS01080		-1.584	12.132	transposase
SMU_RS01085		-1.542	11.390	YdcP family protein
SMU_RS01090		-1.510	10.972	hypothetical protein
SMU_RS01095		-1.393	9.352	hypothetical protein
SMU_RS01100		-1.164	6.441	hypothetical protein
SMU_RS01105		-1.183	6.813	hypothetical protein
SMU_RS01110		-1.142	6.115	hypothetical protein
SMU_RS02065	<i>nImD</i>	-1.093	6.104	bacteriocin class II family protein
SMU_RS02415		-1.458	10.263	hypothetical protein
SMU_RS02895		-1.276	8.254	SH3 domain-containing protein
SMU_RS02955		-1.137	5.787	DNA internalization-related competence protein ComEC/Rec2
SMU_RS03175	<i>acnA</i>	-1.685	13.584	aconitate hydratase AcnA
SMU_RS03180		-1.634	12.797	citrate synthase
SMU_RS03185	<i>icd</i>	-1.553	11.703	NADP-dependent isocitrate dehydrogenase
SMU_RS06470		-1.307	8.410	2-oxo acid dehydrogenase subunit E2
SMU_RS06475		-1.383	9.189	alpha-ketoacid dehydrogenase subunit beta
SMU_RS07520		-1.418	8.925	P-II family nitrogen regulator
SMU_RS07525		-1.608	11.806	ammonium transporter
SMU_RS08020	<i>cas2</i>	-1.599	12.352	CRISPR-associated endonuclease Cas2
SMU_RS08025	<i>cas1c</i>	-1.484	10.833	type I-C CRISPR-associated endonuclease Cas1c
SMU_RS08030	<i>cas4</i>	-1.367	9.334	CRISPR-associated protein Cas4
SMU_RS08035	<i>cas7c</i>	-1.303	8.553	type I-C CRISPR-associated protein Cas7/Csd2

Table 2-2. Continued.

Gene id	Gene	log FC	$-\log_{10}(p)$	Product
SMU_RS08045	<i>cas5c</i>	-1.252	7.946	type I-C CRISPR-associated protein Cas5c
SMU_RS08675	<i>bsmB</i>	-1.025	5.486	Blp family class II bacteriocin
SMU_RS08680		-1.194	6.974	hypothetical protein
SMU_RS08690	<i>imm</i>	-1.179	6.962	hypothetical protein
SMU_RS08695	<i>immA</i>	-1.343	8.884	Blp family class II bacteriocin
SMU_RS09005	<i>nlmC</i>	-1.023	4.028	hypothetical protein
SMU_RS09010		-1.219	4.852	ComGF family competence protein
SMU_RS09020		-1.144	5.102	type II secretion system GspH family protein
SMU_RS09025		-1.309	6.539	prepilin-type N-terminal cleavage/methylation domain-containing protein
SMU_RS09030		-1.484	9.243	type II secretion system F family protein
SMU_RS09035	<i>tadA</i>	-1.187	6.487	Flp pilus assembly complex ATPase component TadA
SMU_RS09320	<i>treC</i>	-1.448	10.312	alpha, alpha-phosphotrehalase
SMU_RS09325	<i>treP</i>	-1.629	12.759	PTS system trehalose-specific EIIBC component
SMU_RS09555		-1.025	2.147	transposase
SMU_RS09955		-1.464	10.592	Fic family protein
SMU_RS09970		-1.107	5.713	hypothetical protein
SMU_RS10000		-1.311	1.356	transposase
SMU_RS10090		-1.599	12.088	lipase

Table 2-3. Upregulated genes in *S. mutans* upon Subtilisin NAT.

Gene id	Gene	log FC	$-\log_{10}(p)$	Product
SMU_RS00235		1.036	5.606	DNA alkylation repair protein
SMU_RS01130		1.258	7.717	ImmA/IrrE family metallo-endopeptidase
SMU_RS05755		1.164	6.949	DUF4352 domain-containing protein
SMU_RS05760		1.049	5.676	hypothetical protein
SMU_RS06065		1.079	6.091	hypothetical protein
SMU_RS06070		1.018	5.488	hypothetical protein
SMU_RS06170	<i>mubA</i>	1.162	6.834	mutanobactin A non-ribosomal peptide synthetase MubA
SMU_RS06175	<i>mubH</i>	1.219	7.103	mutanobactin A polyketide synthase MubH
SMU_RS06180	<i>mubG</i>	1.450	9.273	mutanobactin A biosynthesis transacylase MubG
SMU_RS06185	<i>mubE</i>	1.180	6.741	mutanobactin A non-ribosomal peptide synthetase MubE
SMU_RS07095		1.285	8.388	glycogen/starch/alpha-glucan phosphorylase
SMU_RS09350		1.224	7.651	endonuclease/exonuclease/phosphatase family protein
SMU_RS09355		1.195	7.371	PTS transporter subunit IIBC

Table 2-4. Biofilm-related gene expression of *S. mutans* upon Subtilisin NAT.

Geneid	Gene	logFC	-LOG10(P)	Product
SMU_RS190	<i>gbpB</i>	0.596	2.239	CHAP domain-containing protein
SMU_RS1995	<i>brpA</i>	0.155	0.325	biofilm formation/cell division transcriptional regulator BrpA
SMU_RS2900	<i>spaP</i>	-0.610	2.325	cell surface antigen I/II
SMU_RS3590	<i>gbpD</i>	0.529	1.834	YSIRK-type signal peptide-containing protein
SMU_RS4210	<i>gjfD</i>	0.166	0.356	glucosyltransferase-S
SMU_RS4620	<i>gjfB</i>	-0.358	1.014	glucosyltransferase GtfB
SMU_RS4625	<i>gjfC</i>	-0.394	1.173	glucosyltransferase GtfC
SMU_RS6360	<i>gbpC</i>	0.123	0.245	glucan-binding protein
SMU_RS8705	<i>comD</i>	-0.270	0.671	GHKL domain-containing protein
SMU_RS8710	<i>comE</i>	-0.453	1.435	response regulator transcription factor
SMU_RS9655	<i>gbpA</i>	0.177	0.386	KxYKxGKxW signal peptide domain-containing protein

## 総括と展望

当研究室ではこれまでに納豆抽出液、及び納豆中の主要プロテアーゼである Subtilisin NAT が *S. mutans* の BF 形成を抑制することを明らかにしている (Narisawa *et al.*, 2014; Iwamoto *et al.*, 2018)。本研究では、納豆のう蝕予防食品としての利用に向けた基礎的データの集積を行うことを目的とした。

本研究で得られた結果について、模式図を示した (Fig. 3-1)。第 1 章では、小児う蝕患者から分離した 9 株のヒト臨床株に対する納豆抽出液、及び Subtilisin NAT の BF 抑制効果を評価した。9 株のヒト臨床株には実験室株と比較して高い BF 形成能を有する株が含まれていた (Fig. 1-3)。納豆菌宮城野株をスターターとして作製した納豆より得られた納豆抽出液はいずれの株に対しても高い BF 形成抑制効果を示すことが明らかとなった (Fig. 1-5)。納豆抽出液に含まれる BF 形成抑制因子は、Subtilisin NAT の特徴と良く類似した (Fig. 1-7, Fig. 1-8)。納豆抽出液と Subtilisin NAT は *S. mutans* に対する生育阻害効果は認められなかった (data not shown)。このことから、納豆抽出液と Subtilisin NAT は *S. mutans* の BF 形成抑制剤として有益であることが示された。

第 2 章では、Subtilisin NAT による BF 形成抑制メカニズムについて評価した。*S. mutans* の BF 形成にはスクロースを基質として GTF の触媒作用による不溶性グルカン合成が必須である。そこで、本研究では Subtilisin NAT による GTF 活性の阻害効果について検討した。その結果、Subtilisin NAT は濃度依存的に GTF 活性を阻害することが明らかとなった (Fig. 2-2)。これは GTF タンパク質の加水分解に起因することを明らかにした (Fig. 2-3)。

また、第 2 章では Subtilisin NAT による抗菌活性への影響についても評価した。*S. mutans* は口腔内でのニッチ獲得のために複数種のバクテリオシンを合成することが知られている。Subtilisin NAT は *S. mutans* の抗菌活性を抑えることが明らかとなった (Fig. 2-4)。*S. mutans* のバクテリオシン構造遺伝子の一部は、ComCDE システムのレギュロンである。ComCDE システムの活性化は CSP と呼ばれる 18 アミノ酸残基から成るシグナルペプチドが担う。Subtilisin NAT は CSP に対して阻害的に働き (Fig. 2-5)、バクテリオシン構造遺伝子の発現量の低下を引き起こすことが明らかとなった (Table 2-2)。よって、Subtilisin NAT の存在による抗菌活性の低下は、バクテリオシンを直接加水分解することに加え、転写レベルで影響することが示された。

*S. mutans* の成熟した BF は不溶性グルカンに加え、核酸、タンパク質、テイコ酸などが主成分

であり、これら各成分が BF 形成にとって協調的に働いている (Castillo Pedraza *et al.*, 2017)。これまで *S. mutans* の成熟 BF に対して Proteinase K 処理の効果について検討されている。

Karygianni ら (2020) は、*S. mutans* の成熟 BF に Proteinase K を施すことでマトリックス内のタンパク質量を低下し、BF の密度の低下をもたらすことを報告しており、さらにこの効果は菌体外 DNA の有無の影響を受けることを報告している。本研究において納豆抽出液、及び Subtilisin NAT は成熟 BF に対して減少効果を示さなかったが (data not shown)、他の酵素との併用により BF 分解効果をもたらす可能性がある。

全国納豆協同組合連合会によると、2019 年の市場規模は約 2,503 億円であり、発酵食品ブームの継続、消費者の節約志向、健康機能性の高さからマーケットは 8 年連続で拡大し、16 年以降は過去最高を更新し続けている。2020 年に入り、国立がん研究センターが、日常的に納豆を摂取する層は死亡リスクが 1 割以上低下すると発表、TV 番組でも取り上げられたことから、更なる市場規模が拡大している (Katagiri *et al.*, 2020)。また、納豆は COVID-19 に対する抑制効果も期待されている (Padhi *et al.*, 2021; Oba *et al.*, 2021)。今後納豆の摂食はさらに需要が高まるものと予想される。

本研究において納豆抽出液、及び Subtilisin NAT の *S. mutans* に対する抑制効果が示され、この結果から納豆のう蝕予防食品としての利用が期待される。今後納豆の摂食とう蝕予防効果の関係について、摂食期間や摂食量、摂食のタイミングなどヒト臨床評価が必要となるだろう。近年、乳製品やキャンディーなど特定の加工食品の摂食によるう蝕誘発への影響評価について報告されている (Anderson *et al.*, 2018; Anderson *et al.*, 2020)。これらの報告では、ハイドロキシアパタイト片を装着したスプリント(マウスピース)を一定期間装着し、各食品を継続摂食した。また、一定期間の摂食後、ハイドロキシアパタイトディスクの脱灰度、及び細菌叢の評価を行っている。これら報告を参考として、納豆摂食によるヒト臨床実験を実施することでう蝕予防効果を評価することが可能になると考えられる。今後、更なるプロテアーゼ含量の高い納豆の製造が可能になることで、納豆の摂食によるう蝕予防効果が期待される。Subtilisin NAT に類似した酵素は、中国の豆豉、韓国の豆板醤、タイ北部の Thua nao などの他の伝統的な発酵食品からも得られる (Inatsu *et al.*, 2006; Kim

*et al.*, 1996; Wei *et al.*, 2012)。よって納豆以外の食品でも *S. mutans* の BF 形成抑制効果が期待される。

Subtilisin NAT は血清溶解活性を有する (Sumi *et al.*, 1987)。消化管内で十分に安定であることから、この酵素は経口血栓溶解療法に有用な薬剤であることが認められている。Subtilisin NAT は栄養補助食品あるいは栄養補助食品として価値があると考えられている。Subtilisin NAT は安全性が証明されていること、大量生産が可能である点で優位性を有する。

Subtilisin NAT のう蝕予防剤としての利用を考える場合、口腔内での滞留時間を考慮する必要がある。今後は Subtilisin NAT を非加熱加工食品であるタブレット菓子などに加えること、洗口剤への利用などが想定される。他の応用例としてこれまでに新規複合粒子としての Subtilisin NAT の利用 (Wei *et al.*, 2014) や、キトサン膜へ固定化したプロテアーゼによる創傷治癒 (Baidamshina *et al.*, 2020) など試みられている。納豆菌の  $\gamma$ -PGA の浄化作用や保水性に着目した歯科セメントへの納豆菌の包埋に関する検討も行われている (岡, 2020)。今後、Subtilisin NAT の歯科素材への応用利用も期待される。

Subtilisin NAT による *S. mutans* の制御について、口腔微生物生態学にとっても有益な知見であると考えられる。口腔 BF において、*S. mutans* は他菌種と協調的、もしくは競合的な種間相互作用を構築している。これまでに *S. mutans* が産生するバクテリオシンと、*S. sanguinis* や *S. gordonii* が産生する  $H_2O_2$  を介した競合的相互作用が広く知られている。本研究で示した結果から、プロテアーゼは *S. mutans* の口腔でのニッチ獲得にとって重要な役割を果たすことが示された。これまでに口腔細菌によるプロテアーゼを介した相互作用に関する研究はわずかである。Wang ら (2011) は、歯面上への初期付着菌に由来するプロテアーゼが、*S. mutans* の定着を阻害することを報告している。今後、より詳細にプロテアーゼを介した種間相互作用を明らかにすることが可能になれば、口腔プロバイオティクスを利用した BF の制御が可能になるかもしれない。

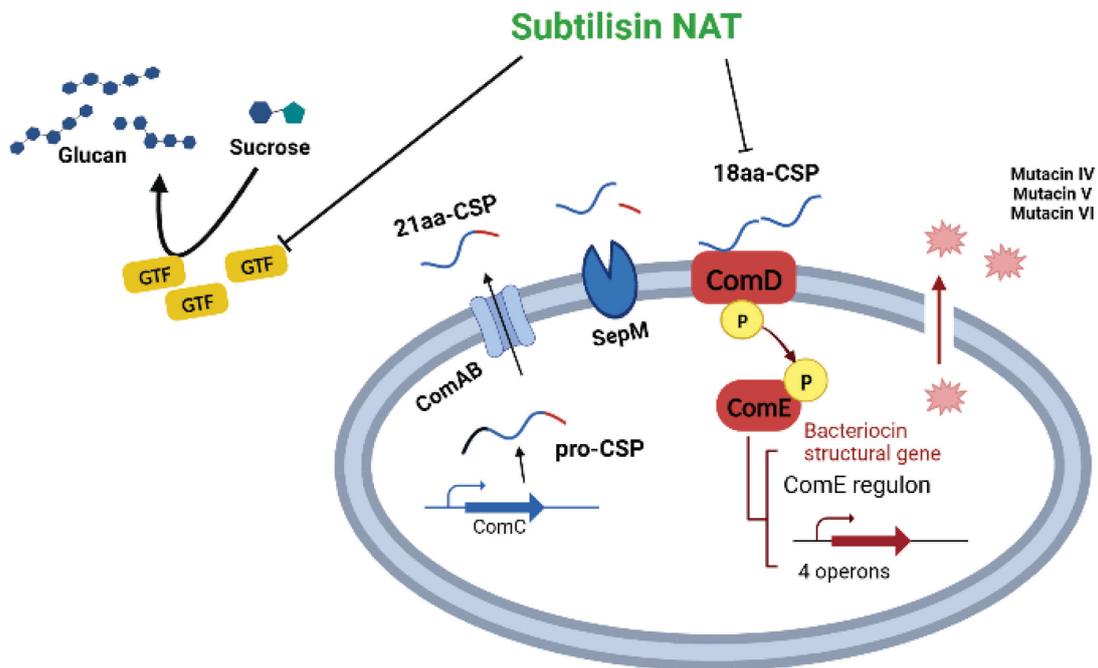


Fig. 3-1. Schematic image of Subtilisin NAT inhibiting effects on biofilm formation and bacteriocin production in *S. mutans*. In this study, the inhibition of biofilms by Subtilisin NAT was proposed to result from inhibition of GTF activity. One of the reasons for the decrease in bacteriocin productivity by Subtilisin NAT was thought to be due to decreased transcription of structural genes by inhibition of extracellular signal peptides.

## 引用文献

- Ajdić D, McShan WM, McLaughlin RE, Savić G, Chang J, Carson MB, Primeaux C, Tian R, Kenton S, Jia H, Lin S, Qian Y, Li S, Zhu H, Najar F, Lai H, White J, Roe BA, Ferretti JJ. 2002. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:14434–14439.
- Anderson AC, Rothballer M, Altenburger MJ, Woelber JP, Karygianni L, Lagkouvardos I, Hellwig E, Al-Ahmad A. 2018. In-vivo shift of the microbiota in oral biofilm in response to frequent sucrose consumption. *Sci Rep* 8:14202.
- Anderson AC, Rothballer M, Altenburger MJ, Woelber JP, Karygianni L, Vach K, Hellwig E, Al-Ahmad A. 2020. Long-Term Fluctuation of Oral Biofilm Microbiota following Different Dietary Phases. *Appl Environ Microbiol* 86: e01421-20.
- Badet C, Thebaud NB. 2008. Ecology of lactobacilli in the oral cavity: a review of literature. *Open Microbiol J* 2:38–48.
- Baidamshina DR, Koroleva VA, Trizna EY, Pankova SM, Agafonova MN, Chirkova MN, Vasileva OS, Akhmetov N, ShubinaVV, Porfiryev AG, Semenova EV, Sachenkov OA, Bogachev MI, Artyukhov VG, Baltina TV, Holyavka MG, Kayumov AR. 2020. Anti-biofilm and wound-healing activity of chitosan-immobilized Ficin. *Int J Biol Macromol.* 164:4205-4217.
- Becker MR, Paster BJ, Leys EJ, Moeschberger ML, Kenyon SG, Galvin JL, Boches SK, Dewhirst FE, Griffen AL. 2002. Molecular analysis of bacterial species associated with childhood caries. *J Clin Microbiol* 40:1001–1009.
- Berg CH, Kalfas S, Malmsten M, Arnebrant T. 2001. Proteolytic degradation of oral biofilms in vitro and in vivo: potential of proteases originating from *Euphausia superba* for plaque control. *Eur J Oral Sci* 109:316–324.
- Biswas S, Biswas I. 2012. Complete genome sequence of *Streptococcus mutans* GS-5, a serotype c strain. *J Bacteriol* 194:4787–4788.
- Biswas S, Biswas I. 2005. Role of HtrA in surface protein expression and biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 73:6923–6934.

- Castillo Pedraza MC, Novais TF, Faustoferri RC, Quivey RG Jr, Terekhov A, Hamaker BR, Klein MI. 2017. Extracellular DNA and lipoteichoic acids interact with exopolysaccharides in the extracellular matrix of *Streptococcus mutans* biofilms. *Biofouling* 33:722–740.
- Chen P, Qi F, Novak J, Caufield PW. 1999. The specific genes for lantibiotic Mutacin II biosynthesis in *Streptococcus mutans* T8 are clustered and can be transferred en bloc. *Appl Environ Microbiol* 65:1356–1360.
- Chen Z, Saxena D, Caufield PW, Ge Y, Wang M, Li Y. 2007. Development of species-specific primers for detection of *Streptococcus mutans* in mixed bacterial samples. *FEMS Microbiol Lett* 272:154–162.
- Cugini C, Shanmugam M, Landge N, Ramasubbu N. 2019. The Role of Exopolysaccharides in Oral Biofilms. *J Dent Res* 98:739–745.
- Deus FP, Ouanounou A. 2022. Chlorhexidine in Dentistry: Pharmacology, Uses, and Adverse Effects. *Int Dent J* 72:269-277
- Feldman M, Ginsburg I, Al-Quntar A, Steinberg D. 2016. Thiazolidinedione-8 Alters Symbiotic Relationship in *C. albicans-S. mutans* Dual Species Biofilm. *Front Microbiol* 7:140.
- Fujita M, Nomura K, Hong K, Ito Y, Asada A, Nishimuro S. 1993. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan. *Biochem Biophys Res Commun* 197:1340–1347.
- Gross EL, Beall CJ, Kutsch SR, Firestone ND, Leys EJ, Griffen AL. 2012. Beyond *Streptococcus mutans*: dental caries onset linked to multiple species by 16S rRNA community analysis. *PLoS One* 7:e47722.
- Grönroos L, Mättö J, Saarela M, Luoma AR, Luoma H, Jousimies-Somer H, Pyhälä L, Asikainen S, Alaluusua S. 1995. Chlorhexidine susceptibilities of mutans streptococcal serotypes and ribotypes. *Antimicrob Agents Chemother* 39:894–898.
- Hamada S, Torii M. 1978. Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surfaces. *Infect Immun* 20:592–599.

- Han S, Abiko Y, Washio J, Luo Y, Zhang L, Takahashi N. 2021. Green Tea-Derived Epigallocatechin Gallate Inhibits Acid Production and Promotes the Aggregation of *Streptococcus mutans* and Non-Mutans Streptococci. *Caries Res* 55:205–214.
- Hansen ME, Yasmin SO, Wolfrum S, Carreira EM. 2022. Total Synthesis of Mutanobactins A, B from the Human Microbiome: Macrocyclization and Thiazepanone Assembly in a Single Step. *Angew Chem Int Ed Engl* 61:e202203051.
- Hara T, Shiraishi A, Fujii H, Ueda S. 1984. Specific host range of *Bacillus subtilis* (natto) phages associated with polyglutamate production. *Agric Biol Chem* 48:2373–2374.
- Hengge R. 2019. Targeting Bacterial Biofilms by the Green Tea Polyphenol EGCG. *Molecules* 24.
- Hossain MS, Biswas I. 2012. An extracellular protease, SepM, generates functional competence-stimulating peptide in *Streptococcus mutans* UA159. *J Bacteriol* 194:5886–5896.
- Huang R, Li M, Gregory RL. 2015. Nicotine promotes *Streptococcus mutans* extracellular polysaccharide synthesis, cell aggregation and overall lactate dehydrogenase activity. *Arch Oral Biol* 60:1083–1090.
- Inatsu Y, Nakamura N, Yuriko Y, Fushimi T, Watanasiritum L, Kawamoto S. 2006. Characterization of *Bacillus subtilis* strains in Thua nao, a traditional fermented soybean food in northern Thailand. *Lett Appl Microbiol* 43:237–242.
- Iwamoto A, Nakamura T, Narisawa N, Kawasaki Y, Abe S, Torii Y, Senpuku H, Takenaga F. 2018. The Japanese Fermented Food Natto Inhibits Sucrose-dependent Biofilm Formation by Cariogenic Streptococci. *Food Sci Technol Res* 24:129–137.
- Järvinen H, Tenovuo J, Huovinen P. 1993. In vitro susceptibility of *Streptococcus mutans* to chlorhexidine and six other antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 37:1158–1159.
- Kada S, Yabusaki M, Kaga T, Ashida H, Yoshida K-I. 2008. Identification of two major ammonia-releasing reactions involved in secondary natto fermentation. *Biosci Biotechnol Biochem* 72:1869–1876.
- Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T, 2020. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in

Structured Microbial Communities. Trends Microbiol 28:668-681

- Kasuga A, Ogiwara E, Aoyagi Y, Kimura H. 2006. Changes in isoflavone content of soybeans during heating process. Food Sci Technol Res 53:365-372.
- Katagiri R, Sawada N, Goto A, Yamaji T, Iwasaki M, Noda M, Iso H, Tsugane S, Japan Public Health Center-based Prospective Study Group. 2020. Association of soy and fermented soy product intake with total and cause specific mortality: prospective cohort study. BMJ 368:m34.
- Khan R, Rukke HV, Høvik H, Åmdal HA, Chen T, Morrison DA, Petersen FC. 2016. Comprehensive Transcriptome Profiles of *Streptococcus mutans* UA159 Map Core Streptococcal Competence Genes. mSystems 1: e00038-15.
- Kim W, Choi K, Kim Y, Park H, Choi J, Lee Y, Oh H, Kwon I, Lee S. 1996. Purification and characterization of a fibrinolytic enzyme produced from *Bacillus* sp. strain CK 11-4 screened from Chungkook-Jang. Appl Environ Microbiol 62:2482-2488.
- Kitagawa M, Shiraishi T, Yamamoto S, Kutomi R, Ohkoshi Y, Sato T, Wakui H, Itoh H, Miyamoto A, Yokota S-I. 2017. Novel antimicrobial activities of a peptide derived from a Japanese soybean fermented food, Natto, against *Streptococcus pneumoniae* and *Bacillus subtilis* group strains. AMB Express 7:127.
- Koo H, Falsetta ML, Klein MI. 2013. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. J Dent Res 92:1065-1073.
- Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F. 2005a. Competition and coexistence between *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis* in the dental biofilm. J Bacteriol 187:7193-7203.
- Kreth J, Merritt J, Shi W, Qi F. 2005b. Co-ordinated bacteriocin production and competence development: a possible mechanism for taking up DNA from neighbouring species. Mol Microbiol 57:392-404.
- Kreth J, Merritt J, Qi F. 2009. Bacterial and host interactions of oral streptococci. DNA Cell Biol 28:397-403.
- Lee H-J, Kwon T-Y, Kim K-H, Hong S-H. 2014. Soybean extracts facilitate bacterial agglutination and

- prevent biofilm formation on orthodontic wire. *J Med Food* 17:135–141.
- Lee SF, Boran TL. 2003. Roles of sortase in surface expression of the major protein adhesin P1, saliva-induced aggregation and adherence, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Infect Immun* 71:676–681.
- Lembo FL, Longo PL, Ota-Tsuzuki C, Rodrigues CRMD, Mayer MPA. 2007. Genotypic and phenotypic analysis of *Streptococcus mutans* from different oral cavity sites of caries-free and caries-active children. *Oral Microbiol Immunol* 22:313–319.
- Maeda H, Mizutani O, Yamagata Y, Ichishima E, Nakajima T. 2001. Alkaline-resistance model of subtilisin ALP I, a novel alkaline subtilisin. *J Biochem* 129:675–682.
- Mantzourani M, Fenlon M, Beighton D. 2009. Association between Bifidobacteriaceae and the clinical severity of root caries lesions. *Oral Microbiol Immunol* 24:32–37.
- Marchant S, Brailsford SR, Twomey AC, Roberts GJ, Beighton D. 2001. The predominant microflora of nursing caries lesions. *Caries Res* 35:397–406.
- Marioni JC, Mason CE, Mane SM, Stephens M, Gilad Y. 2008. RNA-seq: an assessment of technical reproducibility and comparison with gene expression arrays. *Genome Res* 18:1509–1517.
- Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Xaus J, Fernández L, Rodríguez JM. 2003. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. *J Pediatr* 143:754–758.
- Mattos-Graner RO, Smith DJ, King WF, Mayer MP. 2000. Water-insoluble glucan synthesis by *mutans* streptococcal strains correlates with caries incidence in 12- to 30-month-old children. *J Dent Res* 79:1371–1377.
- McLoon AL, Guttenplan SB, Kearns DB, Kolter R, Losick R. 2011. Tracing the domestication of a biofilm-forming bacterium. *J Bacteriol* 193:2027–2034.
- Merritt J, Qi F. 2012. The Mutacins of *Streptococcus mutans*: regulation and ecology. *Mol Oral Microbiol* 27:57–69.
- Motegi M, Takagi Y, Yonezawa H, Hanada N, Terajima J, Watanabe H, Senpuku H. 2006. Assessment of genes associated with *Streptococcus mutans* biofilm morphology. *Appl Environ Microbiol*

72:6277–6287.

- Nakamura T, Iwabuchi Y, Hirayama S, Narisawa N, Takenaga F, Nakao R, Senpuku H. 2020. Roles of membrane vesicles from *Streptococcus mutans* for the induction of antibodies to glucosyltransferase in mucosal immunity. *Microb Pathog* 149:104260.
- Nakamura T, Yamagata Y, Ichishima E. 1992. Nucleotide sequence of the subtilisin NAT gene, *aprN*, of *Bacillus subtilis* (natto). *Biosci Biotechnol Biochem* 56:1869–1871.
- Narisawa N, Kawarai T, Suzuki N, Sato Y, Ochiai K, Ohnishi M, Watanabe H, Senpuku H. 2011. Competence-dependent endogenous DNA rearrangement and uptake of extracellular DNA give a natural variant of *Streptococcus mutans* without biofilm formation. *J Bacteriol* 193:5147–5154.
- Narisawa N, Kawasaki Y, Nakashima K, Abe S, Torii Y, Takenaga F, Others. 2014. Interference effects of proteolytic nattokinase on biofilm formation of cariogenic streptococci. *Food Preserv Sci* 40:273–278.
- Oba M, Rongduo W, Saito A, Okabayashi T, Yokota T, Yasuoka J, Sato Y, Nishifuji K, Wake H, Nibu Y, Mizutani T. 2021. Natto extract, a Japanese fermented soybean food, directly inhibits viral infections including SARS-CoV-2 in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 570:21-25.
- Okahashi N, Sasakawa C, Yoshikawa M, Hamada S, Koga T. 1989. Cloning of a surface protein antigen gene from serotype c *Streptococcus mutans*. *Mol Microbiol* 3:221–228.
- Padhi S, Sanjukta S, Chourasia R, Labala RK, Singh SP, Rai AK. 2021. A multifunctional peptide from *Bacillus* fermented soybean for effective inhibition of SARS-CoV-2 S1 receptor binding domain and modulation of toll like receptor 4: A molecular docking study. *Front Mol Biosci* 8:636647.
- Peng Y, Yang X, Zhang Y. 2005. Microbial fibrinolytic enzymes: an overview of source, production, properties, and thrombolytic activity in vivo. *Appl Microbiol Biotechnol* 69:126–132.
- Qi F, Chen P, Caufield PW. 1999a. Purification of Mutacin III from group III *Streptococcus mutans* UA787 and genetic analyses of Mutacin III biosynthesis genes. *Appl Environ Microbiol* 65:3880–3887.
- Qi F, Chen P, Caufield PW. 2000. Purification and biochemical characterization of Mutacin I from the

- group I strain of *Streptococcus mutans*, CH43, and genetic analysis of Mutacin I biosynthesis genes. *Appl Environ Microbiol* 66:3221–3229.
- Qi F, Chen P, Caufield PW. 1999b. Functional analyses of the promoters in the lantibiotic Mutacin II biosynthetic locus in *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol* 65:652–658.
- Qiu W, Zhou Y, Li Z, Huang T, Xiao Y, Cheng L, Peng X, Zhang L, Ren B. 2020. Application of Antibiotics/Antimicrobial Agents on Dental Caries. *Biomed Res Int* 2020:5658212.
- Redmo Emanuelsson I-M, Carlsson P, Hamberg K, Bratthall D. 2003. Tracing genotypes of mutans streptococci on tooth sites by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Oral Microbiol Immunol* 18:24–29.
- Robert SH, Amid I, Nigel PB. 2007. Dental caries. *Lancet*. 369(9555):51-59.
- Sarkar PK, Hasenack B, Nout MJR. 2002. Diversity and functionality of *Bacillus* and related genera isolated from spontaneously fermented soybeans (Indian Kinema) and locust beans (African Soumbala). *Int J Food Microbiol* 77:175–186.
- Shiroza T, Kuramitsu HK. 1993. Construction of a model secretion system for oral streptococci. *Infect Immun* 61:3745–3755.
- Sumi H, Hamada H, Tsushima H, Mihara H, Muraki H. 1987. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto; a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia* 43:1110–1111.
- Sun Y, Jiang W, Zhang M, Zhang L, Shen Y, Huang S, Li M, Qiu W, Pan Y, Zhou L, Zhang K. 2021. The Inhibitory Effects of Ficin on *Streptococcus mutans* Biofilm Formation. *Biomed Res Int* 2021:6692328.
- Tamura S, Yonezawa H, Motegi M. 2009. Inhibiting effects of *Streptococcus salivarius* on competence - stimulating peptide - dependent biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol* 24:152-161.
- Tanaka T, Muramatsu K, Kim HR, Watanabe T, Takeyasu M, Kanai Y, Kiuchi K. 1998. Comparison of Volatile Compounds from Chungkuk-Jang and Itohiki-Natto. *Biosci Biotechnol Biochem*

62:1440–1444.

- Valdez RMA, Duque C, Caiaffa KS, Dos Santos VR, Loesch ML de A, Colombo NH, Arthur RA, Negrini T de C, Boriollo MFG, Delbem ACB. 2017. Genotypic diversity and phenotypic traits of *Streptococcus mutans* isolates and their relation to severity of early childhood caries. *BMC Oral Health* 17:115.
- van Houte J. 1994. Role of micro-organisms in caries etiology. *J Dent Res* 73:672–681.
- van Houte J. 1993. Microbiological predictors of caries risk. *Adv Dent Res* 7:87–96.
- Vieira J, Messing J. 1989. 11 - Production of Single-Stranded Plasmid DNA, p. 225–233. In Wu, R, Grossman, L, Moldave, K (eds.), *Recombinant DNA Methodology*. Academic Press, San Diego.
- Watanabe A, Kawada-Matsuo M, Le MN-T, Hisatsune J, Oogai Y, Nakano Y, Nakata M, Miyawaki S, Sugai M, Komatsuzawa H. 2021. Comprehensive analysis of bacteriocins in *Streptococcus mutans*. *Sci Rep* 11:12963.
- Waterhouse JC, Russell RRB. 2006. Dispensable genes and foreign DNA in *Streptococcus mutans*. *Microbiology* 152:1777–1788.
- Wei X, Luo M, Liu H. 2014. Preparation of the antithrombotic and antimicrobial coating through layer-by-layer self-assembly of nattokinase-nanosilver complex and polyethylenimine. *Colloids Surf B Biointerfaces* 116:418–423.
- Wei X, Luo M, Xie Y, Yang L, Li H, Xu L, Liu H. 2012. Strain screening, fermentation, separation, and encapsulation for production of nattokinase functional food. *Appl Biochem Biotechnol* 168:1753–1764.
- Wen ZT, Burne RA. 2002. Functional genomics approach to identifying genes required for biofilm development by *Streptococcus mutans*. *Appl Environ Microbiol* 68:1196–1203.
- Wu C, Cichewicz R, Li Y, Liu J, Roe B, Ferretti J, Merritt J, Qi F. 2010. Genomic island TnSmu2 of *Streptococcus mutans* harbors a nonribosomal peptide synthetase-polyketide synthase gene cluster responsible for the biosynthesis of pigments involved in oxygen and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tolerance. *Appl Environ Microbiol* 76:5815–5826.

- Yang J, Deng D, Brandt BW, Nazmi K, Wu Y, Crielaard W, Ligtenberg AJM. 2019. Diversity of SpaP in genetic and salivary agglutinin mediated adherence among *Streptococcus mutans* strains. Sci Rep 9:19943.
- Yokoyama T, Nakamura T, Kimijima M, Mandokoro K, Tokumaru M, Takatsuka A, Narisawa N, Kobayashi R, Takenaga F. 2021. Subtilisin NAT, a subtilisin-like serine protease present in fermented soybean “natto” extract, inhibits *Streptococcus mutans* biofilm formation. Food Sci Technol Res 27:537–542.
- Yonezawa H, Kuramitsu HK. 2005. Genetic analysis of a unique bacteriocin, Smb, produced by *Streptococcus mutans* GS5. Antimicrob Agents Chemother 49:541–548.
- Zayed SM, Aboulwafa MM, Hashem AM, Saleh SE. 2021. Biofilm formation by *Streptococcus mutans* and its inhibition by green tea extracts. AMB Express 11:73.
- 岡俊哉. 2020. MTA セメントと納豆菌混和材料の齶蝕治療応用と相乗効果: 基礎的実験の意義と今後. 日本歯科大学紀要 一般教育系 49:5–12.
- 菅野彰重, 高松晴樹. 1995. セチルトリメチルアンモニウムブロミドを用いた納豆の  $\gamma$ -ポリグルタミン酸の定量 納豆に関する研究 (第 5 報). 日本食品科学工学会誌 42:878–886.
- 徳永綾子, 高みな子, 中村雅子, 木村道子, 福山麻里, 田中二見. 2005. 水がもたらす含嗽の効果 : 緑茶・イソジンとの比較を行って. 葦 35:38-42.

## 謝辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、実に多くの方にご指導を賜りお世話になりました。この場を借りて、感謝の意を述べさせていただきます。

まず指導教員である日本大学生物資源科学部食品生命学科教授 竹永章生先生に心より深く感謝申し上げます。温かい雰囲気のもといつも背中を押していただきました。学部生の時から目をかけてくださり、ときに厳しく指導して頂いたこと、ときにやさしく励ましてくださったことを通して私の至らなさを実感することができたことは今後の人生の糧になるものであります。

また、大学入学当初から研究だけでなく様々な相談に応じていただき、多大なご指導をしていただきました日本大学生物資源科学部食品生命学科准教授 成澤直規先生に心より深く感謝申し上げます。9年間を通して先生の大きさ・深さをヒシヒシと実感し、先生から教えていただいたことや学んだことも今後の人生において欠かせない財産になるものであります。

本論文作成の審査委員として多くのご助言をいただきました日本大学生物資源科学部食品生命学科教授 細野朗先生、並びに日本大学生物資源科学部動物資源科学科教授 川井泰先生に深く感謝申し上げます。本研究で対象としたヒト臨床分離株の取得にご協力いただきました、日本大学松戸歯学部小児歯科学講座専任講師 伊藤龍朗先生、同講座専修医 指田もも子先生並びに同講座太田雪菜氏に深く感謝申し上げます。また、本研究に多くの助言やご協力をいただきました、国立感染症研究所細菌第1部(現 日本大学松戸歯学部感染免疫学講座教授 泉福英信先生に深く感謝申し上げます。公表原著論文の共著者であり、研究に多くの助言をいただきました、日本大学生物資源科学部食品生命学科(現 静岡県立大学食品栄養科学部食品生命科学科助教)小林りか先生並びに東京工科大学応用生物学部助手 中村知世先生、並びに日本大学大学院生物資源利用科学専攻生物資源利用科学専攻食品資源利用学研究室 君島愛美氏、横山友紀氏、高塚絢巳氏、徳丸瑞貴氏に深く感謝申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人安藤スポーツ・食文化振興財団からの2年間に渡り多額の支援を受けております。ここに感謝の意を表します。

最後に、これまで私のやりたいことに対し、温かく見守り支援してくださった家族そして長くサポートしていただいた早川千晶に対し深い感謝の意を表して謝辞といたします。

## 論文の内容の要旨

## 論文の内容の要旨

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

### 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ーム(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 wiggsiae* 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ー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ー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ー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。菌垢を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構造遺伝子は、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 を宿主として 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* と共に菌面上で 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。