

## 論文審査の結果の要旨

氏名：水田 勝

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：*Streptococcus mutans* membrane vesicles, containing insoluble glucan synthase and extracellular DNA, contribute to the promotion of initial attachment and colonization of *Actinomyces oris*

（不溶性グルカン合成酵素および細胞外 DNA を有する *Streptococcus mutans* の膜小胞は *Actinomyces oris* の初期付着・凝集の促進に寄与する）

審査委員：           （主 査）           教授     泉福 英信

                          （副 査）           教授     有川 量崇

  教授     岡田 裕之

口腔バイオフィームは、う蝕や歯周病などの口腔感染症の発症に寄与する。口腔バイオフィームは、唾液ペリクルが形成された表面に、初期付着菌群が付着・凝集する。その後、中期付着菌群や後期付着菌群が付着・凝集し、成熟した口腔バイオフィームを形成する。初期付着菌の 1 つとして知られる *Actinomyces oris* (*A. oris*) は、菌体表層に 2 種類の線毛を有する。1 型線毛は、線毛軸構成タンパク質である FimP と線毛先端構成タンパク質である FimQ で構成され、主に歯面にコートされた唾液ペリクル中の高プロリンタンパク質に、FimQ が付着することで初期付着に関与する。一方、2 型線毛は、線毛軸構成タンパク質である FimA と線毛先端構成タンパク質である FimB、CafA で構成され、主に FimA が *A. oris* の凝集に、CafA が streptococci との共凝集に関与し、口腔バイオフィームの形成に寄与する。う蝕原生菌である *Streptococcus mutans* (*S. mutans*) は、膜小胞 (Membrane vesicles: MVs) を産生する。MVs とは、細菌から放出される 20~400 nm の大きさの球状で二重膜構造の物質であり、DNA や RNA、さらに様々なタンパク質が含まれている。さらに、*S. mutans* が産生した MVs の表面には不溶性グルカン合成酵素 (Glucosyltransferase B and C: GtfBC) が付着し、不溶性グルカンの合成によりバイオフィーム形成の促進に寄与する。細菌が有する細胞外 DNA (extracellular DNA: eDNA) はバイオフィーム形成に関与している。eDNA は短時間で形成されたバイオフィームやバイオフィームの構造安定性に重要な成分であり、*S. mutans* が産生した MVs にも含まれている。現在までに、様々な細菌から産生した MVs がバイオフィーム形成に与える影響について報告されている。しかしながら、*S. mutans* が産生した MVs が *A. oris* の初期付着・凝集 (Initial attachment and colonization: INAC) に与える影響についてはほとんど明らかとなっていない。

本研究では、*A. oris* の INAC 形成に対する *S. mutans* 産生 MVs の影響について、*A. oris* が有する線毛との関係性、さらに *S. mutans* 産生 MVs が有する GtfBC や eDNA との関係性を検討することを目的とした。INAC 形成実験には、*A. oris* MG1 株 (WT) および各線毛欠損株 ( $\Delta fimA$ ,  $\Delta fimP$ ,  $\Delta fimQ$ ) を用いた。MVs 抽出および精製実験には、*S. mutans* UA159 株および不溶性グルカン合成酵素欠損株 ( $\Delta gtfBC$ ) を用いた。INAC 形成実験は、滅菌ヒト唾液をコートした滅菌ガラスベースディッシュに、0.25% スクロース添加トリプチケースソイブローズ (TSBs) と OD<sub>600</sub> = 0.4 に調整した *A. oris* の菌液を添加し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 下で 3 時間培養し、底面に菌を付着させた。その後、滅菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、非付着菌を取り除いた。次に、通法に従い精製された *S. mutans* 産生 MVs および DNA 分解酵素 (DNase I) を添加し、37 °C、5% CO<sub>2</sub> 下で 1 時間培養した。培養後、滅菌 PBS で洗浄し、非付着菌を取り除いた。形成された INAC は、FilmTracer LIVE/DEAD biofilm viability kit を用いて

LIVE/DEAD 染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。得られた画像は ImageJ を用いて、画像全体に対する生菌と死菌の面積の割合を計算した。なお、本研究は日本大学松戸歯学部の研究倫理委員会の承認を受けて実施された (EC23-008)。

まず、*S. mutans* 産生 MVs が *A. oris* の INAC 形成に対してどのような影響を与えるか検討した。終濃度 3.125  $\mu\text{g/ml}$  の *S. mutans* 産生 MVs は、*A. oris* の WT,  $\Delta fimA$ ,  $\Delta fimP$ ,  $\Delta fimQ$  の INAC 形成を促進させた。また、*S. mutans* 産生 MVs を添加していない時と比較し、死菌量が有意に促進した。次に、*S. mutans* 産生 MVs が持つ不溶性グルカン合成酵素が *A. oris* の INAC 形成にどのような影響を与えるか検討した。不溶性グルカン合成酵素を持たない *S. mutans*  $\Delta gtfBC$  産生 MVs は、*A. oris* の全ての株の INAC 形成を促進させなかった。次に、*S. mutans* 産生 MVs により促進する *A. oris* の INAC 形成において、eDNA はどのような役割を果たすか検討した。eDNA の影響を除外するため、DNase I を *A. oris* の INAC 形成実験に用いた。DNase I は、*S. mutans* 産生 MVs によって促進する *A. oris* WT および  $\Delta fimA$  の死菌依存的な INAC 形成の促進を阻害した。一方、*S. mutans* 産生 MVs によって促進する *A. oris*  $\Delta fimP$  および  $\Delta fimQ$  の INAC 形成は阻害されなかった。

以上により、*S. mutans* 産生 MVs による *A. oris* の INAC 形成の促進には、GtfBC が合成した不溶性グルカンが影響している可能性が示唆された。さらに、その不溶性グルカンは *A. oris* の線毛非依存的に作用している可能性も示唆された。また、*S. mutans* 産生 MVs が持つ GtfBC 由来の不溶性グルカんに依存して促進した *A. oris* の INAC において、eDNA が *A. oris* の 1 型線毛に作用することが、INAC 形成の構造安定性に寄与している可能性も示唆された。本研究で得られた知見は、口腔バイオフィーム形成のメカニズムを明らかにし、齲蝕や歯周病の新たな予防法の開発の一助になると考えられ、今後一層の発展が望めるものである。

よって本論文は、博士（歯学）の学位を授与されるに値するものと認められる。

以上

令和            年            月            日

