

論文審査の要旨および担当者

愛知学院大学

報告番号	① 乙 第 号	論文提出者名	金野 弘靖
論文審査 委員氏名	主査 副査	田中貴信 教授 吉村文信 教授 松原達昭 教授	
論文題名	口腔レンサ球菌における環状ヌクレオチドの働き について		

インターネットの利用による公表用

本研究は、細菌におけるセカンドメッセンジャーとしての環状ヌクレオチドとして発見された **c-di-GMP** と **c-di-AMP** に注目し、口腔レンサ球菌におけるその働きを検討したものである。

現在我国は超高齢社会を迎えたことに加え、国民の健康に対する認識も高まって来たため、高齢者の健康増進に関しては歯科医療も今後さらに重要な役割を担うことになる。その中でも、部分欠損歯列の修復に伴う口腔内のメンテナンスがより必要となってきた。しかし、高齢期は身体機能全般の変調を伴うことが多いため、一般的に口腔内環境の悪化を招くことに成り易く、それにより、支台歯における齲蝕や歯周病、義歯性口内炎の発症のリスクも増大する。これらの疾患の主要な原因はバイオフィルム感染症とされているため、口腔バイオフィルムの形成過程を理解し、そのメカニズムを解明することは、それらの諸病変の基本的解決策に繋がるものと考えられる。

口腔内の細菌叢は 700 種類以上の微生物によって構成されていることが知られ、初期バイオフィルムを構成する菌種の 60 ~ 90% は、口腔レンサ球菌であることが報告されている。そのため、口腔レンサ球菌のバイオフィルム形成抑制は、バイオフィルム感染症の予防に大きく寄与することになる。近年このバイオフィルム形成には、様々な分子が関与していることが確認されてきたが、その中でも、環状ヌクレオチドが重要な役割をしていると報告されている。特に、環状ジグアノシンーリン酸 (**c-di-GMP**) や

環状ジアデノシンーリン酸 (c-di-AMP) は、近年注目されている分子である。

c-di-GMP は細菌内に広く存在する重要なセカンドメッセンジャーである。この環状ヌクレオチドは、細菌の病原因子の発症変化や凝集反応、付着機構、バイオフィルム形成、二次的情報伝達物質の誘導等、様々な細菌の機能に関与していることから報告されている。特に近年では、緑膿菌や黄色ブドウ球菌などの病原菌の感染症に対して、抗菌薬を用いず、あるいは耐性菌を作ることなく抑制する薬剤としても期待されている。

一方、c-di-AMP は、細胞のサイズ、環境におけるストレス、薬剤耐性などのコントロールも行っていると報告されている。

本研究は、実験 1 として、口腔レンサ球菌のバイオフィルム形成能に対する c-di-GMP の影響を検討するために、バイオフィルム形成実験、定量 PCR 法を用いた *Streptococcus mutans* の c-di-GMP による *gtf* 発現量の比較を行い、また実験 2 として、*S. mutans* において、c-di-AMP の分解酵素と想定されている SMU-2140c と SMU-1297 に着目し、組換え酵素の精製、逆相 HPLC を用いた c-di-AMP 分解産物の解析および酵素活性の検討、遺伝子欠損株の作製、欠損株の増殖曲線、バイオフィルム形成の比較、形態学的観を行ったものである。

これらの結果として以下の所見を得たとしている。

1. ショ糖 0.1% を含む培地に 400 μ M c-di-GMP を添加した際、用いた全ての菌においてバイオフィルム形成が抑制された。c-di-GMP 添加により *S. mutans* の不溶性グルカンの形成に関与する *gtfB*、*gtfC* の発現が抑制された。ショ糖 0.1% 存在下培地を使用し、c-di-GMP の濃度と口腔レンサ球菌のバイオフィルム形成抑制効果の関係を検討したところ、200 μ M 以上の濃度でバイオフィルム形成量は有意に抑制された。

2. SMU-2140c には、c-di-AMP を分解する酵素活性が検出されなかった。従って、c-di-AMP から pApA に分解するタンパク質は別の形で存在していることが示唆された。一方、SMU-1297 組換えタンパク質では、c-di-AMP から AMP の分解活性が検出された。バイオフィルム形成実験を行ったところ、SMU-1297 遺伝子欠損株では野生株と比較して、有意に形成量が増加した。SEM 観察により、多数の凝集塊を形成しているのが認められた。

以上のことから、細胞外で c-di-GMP を口腔レンサ球菌に添加することにより、バイオフィルム形成が抑制された。さらに *S. mutans* においては、不溶性グルカン形成に関与する遺伝子の発現が抑制された。細胞内における c-di-AMP の分解には、SMU-1297 が関与し、その欠損株においてバイオフィルム形成が促進された。c-di-AMP の分解酵素を抑制させることで、同分子の濃度が菌体内で上昇すると予測され、その結果、菌体凝集塊を形成し、バイオフィルム形成量が増加したと推察している。このように、c-di-AMP の分解酵素を抑制することで、細菌の存在状態に変化を引き起こ

(論文審査の要旨)

No. 4

(2000字以内のこと)

愛知学院大学

し、バイオフィルム形成を促進したという知見は初めて得られたものである。

以上の所見から、バイオフィルム形成にはこれらの環状ヌクレオチドが深く関与していることが明らかになった。

本論文はバイオフィルム形成の過程に関して新たな知見を示唆したものであり、歯科補綴学、微生物学ならびに関連諸学科に寄与するところが大きいと考えられ、博士（歯学）の学位授与に値するものと判定した。

平成27年1月28日