

## 論 文 要 旨

Involvement of Dpr, Sod and AhpCF in resistance to  
hydrogen peroxide produced by *Streptococcus sanguinis*,  
and PerR association with their factors in *Streptococcus mutans*

*Streptococcus sanguinis* の産生する過酸化水素に対する *Streptococcus mutans*

酸化ストレス耐性因子Dpr、Sod、AhpCFの関与及び耐性因子へのPerRを  
介した *Streptococcus mutans* の酸化ストレス耐性機構の解析

藤 島 慶

【序論および目的】

*Streptococcus mutans* の様々な刺激が存在する口腔内における定着機構の解明という観点から、*S. mutans* 同様、口腔常在菌でありプラーク中に高頻度に認められる、*Streptococcus sanguinis* の産生するバクテリオシンである過酸化水素に着目した。本研究では、*S. mutans* の *S. sanguinis* の産生する過酸化水素耐性獲得機構の解明を行い、口腔内定着における、*S. mutans* の酸化ストレス耐性獲得の意義を明確にすることを目的とする。

【材料および方法】

1. *Streptococcus sanguinis* 及び過酸化水素に対する *Streptococcus mutans* の酸化ストレス耐性因子欠損株を用いた感受性検証

*S. mutans* は、AhpCF（過酸化水素を分解し無害な水に分解する）、Dpr（過酸化水素から最も有害なヒドロキシラジカルへの合成を阻害する）、SOD（有害なスーパーオキシドアニオンラジカルを分解し過酸化水素へ変換する）などの酸化ストレス耐性因子をもつことがこれまでに報告されている。そこでこれらの耐性因子の欠損株を作製し、*S. sanguinis* 及び過酸化水素に対する感受性を、competition assay にて検証した。方法は、まず、*S. sanguinis* 及び過酸化水素(0.35、0.5%)を50%TSB寒天培地上に10μlずつ滴下後、*S. sanguinis* は37℃で一晩培養後、過酸化水素は30分後に、中心間距離において、9mm離れたポイントに、*S. mutans* UA159野生株、及び酸化ストレス耐性因子欠損株を滴下し、さらに一晩培養し、増殖阻害度の検証を行った。

2. *Streptococcus mutans* UA159野生株及び酸化ストレス耐性因子欠損株における過酸化水素に対する生存率の定量化検証

*S. mutans* UA159野生株、及び酸化ストレス耐性因子欠損株を、過酸化水素(0.04%)含有TSBに添加した後、37℃で30分間5%CO<sub>2</sub>下で培養し希釈後、50%TSB寒天培地にplatingし、生えてきたコロニー数の比較検証を行った。

### 3. *Streptococcus mutans* の酸化ストレス耐性因子の制御メカニズムの解析

#### 3-1 *S. mutans* UA159 野生株における、酸化ストレス応答抑制因子 *perR* の役割検証

既報より、PerR は他菌種において酸化ストレス耐性因子の repressor として知られており、グラム陽性菌、グラム陰性菌において酸化ストレス耐性に関与する因子として、研究が行われてきた。そこで、*S. mutans* UA159 野生株における *perR* 欠損株及び *perR* のコンプリメント株を作製し、*S. sanguinis* が産生する過酸化水素に対する感受性を、competition assay にて検証を行った。また、合わせて *S. mutans* UA159 野生株、*perR* 欠損株、*perR* のコンプリメント株における過酸化水素に対する生存率の定量化検証を行った。

#### 3-2 *S. mutans* UA159 野生株における、酸化ストレス耐性因子と *perR* の相関関係検証

PerR は、酸化ストレス耐性に関与する重要な因子であることから、PerR と酸化ストレス耐性因子である、Dpr、Sod、AhpC の制御機構の解析を行った。具体的な方法として、*S. mutans* UA159 野生株、*perR* 欠損株、*perR* のコンプリメント株それぞれを、37℃、5%CO<sub>2</sub> 下で exponentially phases まで培養し、菌回収後、酸化ストレス耐性因子の遺伝子発現量を定量性 PCR にて比較、検証を行った。

### 4. *Streptococcus mutans* UA159 野生株及び *perR* 欠損株と *Streptococcus sanguinis* 共培養時の増殖能の解析と酸化ストレス耐性因子の発現解析

#### 4-1 *Streptococcus sanguinis*、*Streptococcus mutans* 共培養時の成長動態の解析

*S. sanguinis* と *S. mutans* UA159 野生株及び *perR* 欠損株を共培養した際の2菌種間での *S. mutans* の占める割合の解析を行った。具体的な方法としては、*S. sanguinis* と *S. mutans* UA159 野生株及び *perR* 欠損株を一定の割合で混和し、それを50%TSAプレートにspotし、37℃で8時間5%CO<sub>2</sub> 下で培養する。その後、プレート上のコロニーをかきとり、PBSに懸濁し、希釈後、50%TSAプレート及び *S. mutans* 選択培地にplatingし、増殖動態の比較、検証を行った。

#### 4-2. *Streptococcus sanguinis*、*Streptococcus mutans* 共培養時の酸化ストレス耐性因子 *dpr* の発現解析

*S. sanguinis* との共培養時の菌を回収し、酸化ストレス耐性因子本体である *dpr* の遺伝子発現量を定量性PCRにて比較、検証を行った。

### 【結 果】

competition assay 及び過酸化水素に対する生存率の定量化検証より、過酸化水素への感受性には、*dpr*、*sod* の関与が示された。また、他菌種において酸化ストレス耐性因子の repressor として知られる PerR との相関検証より、PerR が *dpr* の発現抑制に強く関与している結果が得られた。実際の口腔内を想定した *S. sanguinis* との共培養検証では、*S. sanguinis* とのいずれの混合比率においても、*S. mutans* UA159 野生株よりも *perR* 欠損株の生存率は高く、またその時の *dpr* の発現量は *perR* 欠損株において有意に増加していた。

### 【結論及び考察】

*S. mutans* は *dpr*、*sod*、*ahpC* の3つの酸化ストレス耐性因子を所有し、このうち *dpr* が耐性因子の本体である。*dpr* は過酸化水素から Fenton pathway により致死性酸化ストレスであるヒドロキシルラジカルが産生されることを抑制する因子である。他菌種において酸化ストレス耐性因子の repressor である PerR は、*S. mutans* においてこの *dpr* の発現を抑制する。本研究により、*dpr* の発現制御を調整する PerR を介した酸化ストレス耐性機構が明らかになった。

## 論文審査の要旨

報 告 番 号	総 研 第 234 号	学位申請者	藤 島 慶
審 査 委 員	主 査	松 口 徹 也	学 位 博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副 査	於 保 孝 彦	副 査 西 順 一 郎
	副 査	松 山 孝 司	副 査 西 原 一 秀

**Involvement of Dpr, Sod and AhpCF in resistance to hydrogen peroxide produced by *Streptococcus sanguinis*, and PerR association with their factors in *Streptococcus mutans***

(*Streptococcus sanguinis* の産生する過酸化水素に対する *Streptococcus mutans*

酸化ストレス耐性因子 Dpr、Sod、AhpCF の関与および耐性因子への

PerR を介した *Streptococcus mutans* の酸化ストレス耐性機構の解析)

*Streptococcus mutans* は、う蝕原性菌であり様々な口腔細菌が存在するデンタルプラーク中において他の口腔細菌と共存、拮抗を果たしている。デンタルプラーク中に存在する様々な口腔細菌のうち、*Streptococcus sanguinis* はデンタルプラーク中における主要な口腔細菌の一つであり、多量の過酸化水素を産生することで知られる。そこで学位申請者らは、*S. sanguinis* が産生する過酸化水素の *S. mutans* への影響について検討した。*S. mutans* は、酸化ストレス耐性因子として、alkyl hydroperoxide reductase (AhpCF)、dps like peroxide resistance protein (Dpr)、および superoxide dismutase (SOD) をもつことがこれまでに報告されている。そこで、これらの耐性因子の欠損株を作製し、*S. sanguinis* 及び過酸化水素に対する感受性検証を行った。感受性検証方法として、*S. sanguinis* 及び過酸化水素に対する感受性を検証するために competition assay を、過酸化水素への感受性を定量的に検証するために生存率定量化検証も合わせて行った。また、他菌種において酸化ストレス耐性因子の repressor として知られている PerR とこれら酸化ストレス耐性因子との相関関係検証を行うため、*perR* の欠損株を作製した。さらに実際の口腔内環境を想定し、*S. sanguinis* および *S. mutans* を共培養した際の各菌のポピュレーション解析を行った。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) competition assay において *dpr*、*sod* の欠損株では UA159 野生株より広範な増殖阻害像が認められた。
- 2) 過酸化水素に対する生存率定量化検証では、*dpr*、*sod* の欠損株で有意な生存率の低下が認められた。
- 3) *perR* 欠損株は UA159 野生株と比較し、*S. sanguinis* 及び過酸化水素に対し耐性を示した。
- 4) *perR* 欠損株における *dpr* の発現量は UA159 野生株より有意な増加を認めた。
- 5) *S. sanguinis* との共培養検証では、*S. sanguinis* とのいずれの混合比率においても、*S. mutans* UA159 野生株より *perR* 欠損株の生存率は高く、またその時の *dpr* の発現量は *perR* 欠損株において有意に増加していた。

*S. mutans* は Dpr、SOD、AhpCF の 3 つの酸化ストレス耐性因子を所有し、このうち Dpr が過酸化水素に対する耐性因子の本体である。Dpr は過酸化水素から Fenton pathway により致死的酸化ストレスであるヒドロキシルラジカルが産生されることを抑制する因子である。他菌種において酸化ストレス耐性因子の repressor である PerR は *S. mutans* においてこの Dpr の発現を抑制する。本研究により、Dpr の発現制御を調整する PerR を介した酸化ストレス耐性機構が明らかになった。

本研究は、*S. sanguinis* の産生する過酸化水素への *S. mutans* の酸化ストレス耐性機構の解析を行ったものであり、その結果 Dpr の発現制御を調整する PerR を介した酸化ストレス耐性機構が明らかになった。本研究成果は口腔細菌の口腔内定着化メカニズムの解明の一助になることが期待され非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

## 最終試験の結果の要旨

報 告 番 号	総 研 第 234 号		学位申請者	藤 島 慶
審 査 委 員	主 査	松 口 徹 也	学 位	博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副 査	於 保 孝 彦	副 査	西 順 一 郎
	副 査	松 山 孝 司	副 査	西 原 一 秀
<p>主査および副査の5名は、平成25年1月28日、学位申請者 藤島 慶 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) 実際の口腔内およびプラーク中における過酸化水素濃度はどの程度か？</p> <p>(回答) 実際の口腔内、プラーク中における過酸化水素濃度の定量は行っていないため不明である。また、文献もない。</p> <p>質問2) 共培養検証を行なって <i>S. mutans</i> の <i>dpr</i> 発現を見ているが、<i>S. sanguinis</i> の <i>dpr</i> 発現は含まれないのか？</p> <p>(回答) <i>S. mutans</i> に特異的なプライマーを使用しているため、<i>S. sanguinis</i> の <i>dpr</i> の発現は含まれない。</p> <p>質問3) 共培養検証において、<i>S. mutans</i> : <i>S. sanguinis</i> の比が 1 : 10 の時に <i>S. mutans</i> における <i>dpr</i> 発現が最も大きくなるのではないかと考えられるが、これについてはどのように考察しているか？</p> <p>(回答) <i>S. mutans</i> : <i>S. sanguinis</i> の比率が 1 : 10 の時では、確かに高濃度の過酸化水素に曝露されるので、それに伴い <i>dpr</i> の発現も大きくなると推測されたが、結果はそうにはならなかった。多量の過酸化水素に曝露されることにより、<i>S. mutans</i> が <i>dpr</i> の発現を行う前に死滅したため、<i>dpr</i> の発現量がそれほど上昇しなかったためと考えている。</p> <p>質問4) 細菌特有の情報伝達系である two component system (TCS) と酸化ストレス耐性との相関関係は認めるか？</p> <p>(回答) <i>S. mutans</i> は外来の刺激を two component system (TCS) によって感知する。<i>S. mutans</i> は15組の TCS を保有し、そのうち TCS9 の過酸化水素感知の関与を明らかにしている。しかし TCS9 の制御因子については現在検証中である。</p> <p>質問5) PerR が付着可能な領域である PerR box は <i>dpr</i>、<i>sod</i>、<i>ahpCF</i> の上流に存在するのか？</p> <p>(回答) <i>dpr</i> と <i>sod</i> の上流に PerR box が存在するが、<i>ahpCF</i> の上流域には存在しない。よって、PerR は <i>dpr</i>、<i>sod</i> を直接的に、<i>ahpCF</i> を間接的に制御すると考えている。</p> <p>質問6) <i>S. sanguinis</i> と <i>S. mutans</i> は共凝集するか？</p> <p>(回答) 共凝集について検証は行っていないので分からない。</p> <p>質問7) 今回の実験はプラーク中に <i>S. sanguinis</i> と <i>S. mutans</i> が共に存在しているという前提で行なっているが、プラークの成熟段階において <i>S. sanguinis</i> が産生する過酸化水素に対し、<i>S. mutans</i> はどのような影響を受けていると考えるか？</p> <p>(回答) プラークが初期プラークから成熟プラークへ移行する過程において、プラーク中における <i>S. mutans</i> と <i>S. sanguinis</i> の菌量や近接具合は変化すると考える。<i>S. sanguinis</i> との接触頻度が高ければ高いほど <i>S. mutans</i> は <i>S. sanguinis</i> が産生する過酸化水素の影響を受けると推測している。</p> <p>質問8) <i>S. sanguinis</i> 自体は自己の産生する過酸化水素に対してどのような耐性機構を有しているか？</p> <p>(回答) <i>S. sanguinis</i> も SOD や他の peroxidase を所有し自己の産生する過酸化水素に対して耐性を示すと考えられる。</p> <p>質問9) 本文にある <i>sod</i> 欠損株におけるスーパーオキシドアニオンラジカルと過酸化水素との反応について説明せよ。</p> <p>(回答) 詳細なメカニズムについては報告されていないが、菌体内に蓄積したスーパーオキシドアニオンラジカルと過酸化水素が相互作用を起こし、最も有害なヒドロキシラジカルが産生されるのではないかと考えている。そのため <i>sod</i> 欠損株においても過酸化水素に対して感受性が増強すると考えている。</p>				

質問 1 0) *S. mutans* における欠損株の作成方法について詳しく説明せよ。

(回答) 標的遺伝子上流ならびに下流各々 500bp を PCR で増幅する。この際上流の Reverse primer ならびに下流の Forward primer にエリスロマイシン耐性/スペクチノマイシン耐性遺伝子と相補的な配列を付与しておくことで、増幅された PCR 産物をエリスロマイシン/スペクチノマイシン耐性遺伝子に fuse させる。これにより得られたエリスロマイシン/スペクチノマイシン耐性遺伝子カセットを用い、*S. mutans* を形質転換することで欠損株を作製する。

質問 1 1) エリスロマイシン/スペクチノマイシン耐性遺伝子カセットはエレクトロポレーションで導入するのか?

(回答) *S. mutans* は DNA の形質転換効率が非常に高い性質を有する。形質転換時の具体的な方法としては、OD = 0.1~0.2 まで増殖した *S. mutans* 500  $\mu$ l に 100ng のエリスロマイシン/スペクチノマイシン耐性遺伝子カセットを加え、1~2 時間 incubate 後、500  $\mu$ l の BHI を加え、さらに 1.5 時間 incubate することで行う。欠損株のスクリーニングはエリスロマイシン 10  $\mu$ g/ml、スペクチノマイシン 600  $\mu$ g/ml 含有 BHI 寒天培地にて行う。

質問 1 2) 今回 *perR* においては complement 株を作成し polar effect の可能性について検証しているが、*dpr* や *sod* について検証されていないのはなぜか?

(回答) 他遺伝子については今回 complement 株は作成していないが、過去の研究より既に検証されているためである。

質問 1 3) *dpr* や *sod* の欠損株においてそれぞれの遺伝子の発現がノックアウトされていることを確認しているか?

(回答) リアルタイム PCR で *dpr* や *sod* の欠損株において、*dpr* や *sod* の発現が認められないことを確認している。

質問 1 4) *S. sanguinis* は教科書的にはバシトラシン耐性なのではないか?

(回答) 他の細菌に比べると *S. sanguinis* はバシトラシンの感受性が低いということが言われている。しかし、*S. mutans* のバシトラシン MIC は 64  $\mu$ g/ml であるのに対し、*S. sanguinis* のバシトラシン MIC は 16  $\mu$ g/ml 以下であったことから、今回、*S. mutans* のみ選択するために 32  $\mu$ g/ml のバシトラシン含有プレートを使用した。

質問 1 5) 欠損株作製に関する Table 1. 中の 540、629 deletion という記述は何を意味するのか?

(回答) 540 と 629 は *S. mutans* の遺伝子の gene ID を示し、540 番目と 629 番目の遺伝子 (= ORF) を表している。540、629 deletion というのは、各々 540 番目と 629 番目の遺伝子へのエリスロマイシンカセットの挿入を意味する。

質問 1 6) 酸化ストレス耐性遺伝子の発現検証を示す Fig. 5 と Fig. 6 で野生株での遺伝子発現量が異なるのはなぜか?

(回答) UA159 野生株と *perR* 欠損株における *dpr* 発現量の変化を明示するために、野生株における発現量をそれぞれ 1、0.5 と定め基準としただけであり発現量に差があるわけではない。

質問 1 7) 今回、実験で用いた過酸化水素濃度 (0.35% や 0.5%) の使い分けにどのような意味があるか?

(回答) 寒天培地上で行った competition assay における 0.35% の過酸化水素濃度は野生株が完全に増殖できる濃度である。一方、0.5% 過酸化水素濃度は野生株と比較した際の *perR* 欠損株の過酸化水素への耐性度を検証するために用いたが、この濃度では *S. mutans* の野生株はほぼ半分の増殖を示す。

質問 1 8) *S. sanguinis* との competition assay において *perR* 欠損株の増殖が完全でないのはなぜか?

(回答) *perR* 欠損株は *S. mutans* UA159 野生株と比較すると過酸化水素に対し耐性を示す。耐性は示すが *S. sanguinis* の産生する過酸化水素に完全な耐性を示すわけではないので、完全に増殖することはできないと考察する。

質問 1 9) TSB 液体培地での実験における過酸化水素濃度は 0.04% で適切か?

(回答) 液体培地における過酸化水素は寒天培地における実験に比べ、より直接的に菌に作用する。したがって液体培地での実験では、寒天培地の実験で用いた過酸化水素濃度よりも低濃度な 0.04% 濃度の過酸化水素を用いた。

質問 2 0) 本研究の成果を実際の口腔内に反映させた場合、考慮すべき点は何か?

(回答) 様々な口腔細菌との相互作用および唾液中に含まれる生体由来の peroxidase について考慮すべきと考える。

質問 2 1) 今回の研究結果の臨床的展望をどのように考えるか?

(回答) 口腔内への過酸化水素を多量に産生する *S. sanguinis* の導入、または、*S. mutans* における *perR* の発現増強による過酸化水素易感受性により、*S. mutans* の菌量を減少させ齲蝕リスクの低下に寄与することが可能であると考えられる。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。