

論文審査の要旨

報 告 番 号	総 研 第 649 号		学位申請者	中 園 賢太
審 査 委 員	主 査	西 順一郎	学 位	博士 (歯学)
	副 査	於保 孝彦	副 査	西谷 佳浩
	副 査	松口 徹也	副 査	比地岡 浩志

Complete sequences of epidermin and nukacin encoding plasmids from oral-derived *Staphylococcus epidermidis* and their antibacterial activity (口腔由来の *staphylococcus epidermidis* の epidermin 及び nukacin をコードするプラスミドの完全な配列とその抗菌活性)

ブドウ球菌は黄色ブドウ球菌とコアグラゼ陰性ブドウ球菌 (CoNS) に分類される。CoNS には抗菌ペプチドを産生する株が存在し、代表種に *Staphylococcus epidermidis* が存在する。細菌が産生する代表的な抗菌因子にバクテリオシンが挙げられる。バクテリオシンは口腔内に広く活性を示すことから他の細菌の排除や共生に関与すると考えられる。現在まで口腔内の *S. epidermidis* が産生するバクテリオシンについての報告は存在しない。申請者らは生体の口腔内からバクテリオシン産生性 *S. epidermidis* を分離し、産生するバクテリオシンの抗菌活性を明らかにすることを目的とした。Next generation sequencing でバクテリオシン産生株の全ゲノム解析を行った。バクテリオシンの精製を行い、ゲノム解析の結果と比較した。Direct 法により、皮膚常在菌、口腔常在菌、バクテリオシン産生株のプラスミド脱落株に対する抗菌活性の評価を行い、精製バクテリオシンを用いた抗菌活性の評価と比較した。バクテリオシン産生株が細菌叢に与える影響については共培養試験で検証を行った。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) ボランティアの口腔内から 150 株の *S. epidermidis* を分離し、2 株のバクテリオシン産生株 (KSE56、KSE650) を同定した。
- 2) 全ゲノム解析の結果、バクテリオシン産生遺伝子群はプラスミド上にコードされていた。
- 3) 精製バクテリオシンの分子量は、ゲノム解析の結果得られたバクテリオシンの分子量と一致した。
- 4) プラスミド脱落株は、野生株で抗菌活性を認める株に対して抗菌活性を示さなかった。
- 5) 生菌を用いた Direct 法による抗菌活性と精製バクテリオシンを用いた抗菌活性は、指標菌に対して同様の結果を示した。
- 6) 生菌を用いた共培養試験では、KSE56、KSE650 の占有率が有意な上昇を認めた。

本研究で KSE56、KSE650 が産生するバクテリオシンをコードするプラスミドの完全な塩基配列を決定した。KSE 56 の epidermin をコードする遺伝子は既報の遺伝子配列と完全に一致した。既存の遺伝子では分断されていた epidermin 分泌遺伝子は KSE56 では完全長で検出されたことから、KSE56 の *epiT* が epidermin の完全分泌を担っている可能性が示唆された。KSE650 の nukacin をコードする遺伝子は既報の遺伝子と近似していた。特に既報の nukacin IVK-45 とは成熟ペプチド部分は完全に一致した。既報の nukacin ISK-1 とは 5 つのアミノ酸の違いを認め抗菌活性の違いに関与していることが示唆された。ゲノム解析で得られたバクテリオシンの分子量と、質量解析の分子量が一致したことから、KSE56 が epidermin を、KSE650 が nukacin KSE650 を産生することが明らかになった。

Direct 法の抗菌活性の結果と精製バクテリオシンを用いた抗菌活性の評価が同様の結果を示したことから、プラスミド上にコードされるバクテリオシンが皮膚及び口腔細菌に対して抗菌効果を与えていることが明らかとなった。また、生菌を用いた共培養試験の結果から、バクテリオシン産生株が生体で優位に生着する可能性が示唆された。

本研究は口腔由来の *S. epidermidis* が産生するバクテリオシンの抗菌活性が生体の細菌叢組成に関わる可能性を示唆しており、非常に興味深い論文である。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。