

## 論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（歯学）	氏名	井手 規暁
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 Different CprABC amino acid sequences affect nisin A susceptibility in <i>Clostridioides difficile</i> isolates ( <i>Clostridioides difficile</i> 分離株のナイシン A 感受性に影響を及ぼす CprABC のアミノ酸配列の違いについて)			
論文審査担当者			
主査	教授	水野 智仁	印
審査委員	教授	相川 友直	
審査委員	講師	重石 英生	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>本論文は、腸内細菌の一つである <i>Clostridioides difficile</i>（以下 CD 菌）に対して、抗菌効果のある乳酸菌が生産するカチオン性抗菌性ペプチド（バクテリオシン）Nisin A に対する感受性を評価し、Nisin A 感受性に影響を及ぼす因子の解明を目的とした内容である。</p> <p>CD 菌標準株 2 株および臨床分離株 9 株の全 11 株の全ゲノム塩基配列を MiSeq システム（Illumina 社）を用いて決定した。得られたゲノムデータを用いて、系統樹解析を行った。その結果、CD 11 株において、大きく 2 つのグループに分かれた。</p> <p>次に、抗菌性物質感受性試験として Nisin A および各種抗菌薬の感受性の評価には微量液体希釈法による MIC 値の測定と、バクテリオシン産生菌を用いた抗菌活性評価法（ダイレクト法）による検証を行った。その結果、Nisin A 感受性が高い株（5 株）と低い株（6 株）の 2 つのグループに分かれた。この 2 つのグループは全ゲノム配列を用いた系統樹解析での 2 つのグループと一致した。また、Nisin A と相同性を認める表皮ブドウ球菌が産生する Epidermin, <i>Streptococcus mutans</i> が産生する Mutacin I, IIIb および III も感受性が Nisin A と同様に 2 つのグループに分かれる傾向を示したが、その他のバクテリオシンはその傾向を示さなかった。また、抗菌薬の感受性については、系統樹解析で認められた 2 つグループにおいて感受性に有意差を認めなかった。</p> <p>本研究で認められたグループ間での Nisin A 感受性に関与する遺伝子解析として、Nisin A 耐性に関連することが報告されている Nisin A 排出に関与する <i>cprABC</i> および細菌表層の電荷に影響を及ぼす <i>dltABCD</i> について、Nisin A 添加・非添加時の <i>cprA</i> および <i>dltD</i> の発現を、定量性 PCR 法により検証した。その結果、Nisin A 添加により全ての株で <i>cprA</i> 発現は増大したが、2 つのグループ間での発現量・発現誘導能に差はなく、Nisin A 非添加時での発現量も差は認められなかった。<i>dltD</i> 発現は Nisin A 添加による誘導は認められず、また全ての株で発現量は低く、2 つのグループで差は認めなかった。11 株の CprABC のアミノ酸配列を用いて系統樹解析を行った結果、ゲノム解析で認められた 2 つのグループに分かれた。さらに、CprABC のアミノ酸配列を 2 つのグループで比較検証したところ、2 つのグループ間で 11 のアミノ酸に共通の違いが認められた。</p> <p>CprABC のアミノ酸配列比較について、本研究で得られたゲノムデータおよび既に公開されているゲノムデータ（50 株）を用いて解析を行った。その結果、系統樹解析によるグループはさらにいくつかのサブグループに分けられたが、2 つのグループ間の CprABC アミノ酸パターンの共通の違いは、他の菌株でも認められた。つまり、今回見出したアミ</p>			

ノ酸の配列の違いは、広く CD 菌株に認められ、Nisin A 感受性にも影響を及ぼしていると考察された。

最後に、芽胞の発芽時における Nisin A の感受性を検証するため Nisin A (32 または 512  $\mu\text{g/ml}$ ) の存在下または非存在下で 0.1% taurocholate (発芽誘導物質) を添加した BHI 液体培地に芽胞 ( $10^5$  spores) を添加し、嫌氣的に 37°C で 30 分間反応後、0.1% taurocholate を含む BHI 寒天培地に播種・培養を行い、コロニー数を計測した。その結果、Nisin A は芽胞の発芽時の CD 菌にも効果があることを認めた。しかし、その感受性には 2 つのグループで差が認められた。

以上の結果から、Nisin A は CD 菌株に抗菌力を発揮するが、その感受性は 2 つに分かれ、その原因として CprABC のアミノ酸構造が関与している可能性が示唆された。本研究結果は CD 菌に対する新しい抗菌薬として臨床応用の可能性を示す基盤的な研究であることが示された。

よって審査委員会委員全員は、本論文が井手規暁に博士 (歯学) の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。