

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	貞岡 直樹
学位授与の条件	学位規則第 4 条第①・2 項該当		
論文題目 Opposing genetic polymorphisms of two ABC transporters contribute to the variation of nukacin resistance in <i>Streptococcus mutans</i> (<i>Streptococcus mutans</i> におけるヌカシン耐性の多様性には、2 つの ABC トランスポーターの相反する遺伝子多型が関与している)			
論文審査担当者			
主 査	教授	野村 良太	印
審査委員	教授	吾郷 由希夫	
審査委員	教授	加来 真人	
〔論文審査の結果の要旨〕			
【背景・目的】 <i>Streptococcus mutans</i> は主要なう蝕原因細菌であり、近年、脳血管障害などの全身疾患にも関与することが報告されている。 <i>S. mutans</i> は抗菌性ペプチドであるバクテリオシンを産生し、同時にそれらに対する自己耐性を保持している。本研究の目的は、バクテリオシンの一つであるヌカシン耐性に関わる 2 つの ABC トランスポーター (LctFEG と MukFEG) の解析を行い、 <i>S. mutans</i> におけるバクテリオシン耐性メカニズムの獲得機構を明らかにすることである。			
【材料と方法】			
1. 使用菌株及び培養条件 <i>S. mutans</i> 臨床分離株 126 株および UA159 株を使用した。 <i>S. mutans</i> の培養は trypticase soy broth (TSB) を用い、37°C で 5% CO ₂ 存在下で培養した。ヌカシン産生菌である <i>Staphylococcus warneri</i> 及び <i>Staphylococcus epidermidis</i> は 37°C、好気下で培養した。			
2. LctFEG, MukFEG 領域のアミノ酸配列の比較 <i>S. mutans</i> 臨床分離株 126 株と UA159 株の全ゲノムデータを用いて、LctFEG と MukFEG のアミノ酸配列およびその周辺領域を検証した。			
3. 遺伝子欠損株および相補株の作製 エリスロマイシン耐性遺伝子 (Em ^r) またはスペクチノマイシン耐性遺伝子 (Spc ^r) をダブルクロスオーバー法を用いて <i>S. mutans</i> の標的遺伝子欠損株を作製した。相補株は Spc ^r を導入した遺伝子欠損株のフルクトース転移酵素をコードする <i>ftf</i> 遺伝子に Em ^r と標的遺伝子を導入し、作製した。			
4. ヌカシン ISK-1 および KSE650 の精製 ヌカシン産生株の培養上清を弱陽イオン交換担体 Macro-Prep CM を用いて粗精製し、逆相高速液体クロマトグラフィーによって精製した。			
5. 感受性試験 バクテリオシンの抗菌活性は最小発育阻止濃度 (以下 MIC) の測定と Direct 法で評価した。MIC は、精製したヌカシン ISK-1 とヌカシン KSE650 を用いて、微量液体希釈法により測定した。Direct 法ではバクテリオシン産生菌の培養液を TS 寒天培地 (TSA) にスポットし、37°C、好気下で 24 時間培養した。その後、指標菌を含む加温した TSA 軟寒天培地 (1%寒天) 5mL を TSA に注ぎ、37°C、CO ₂ 条件下で 16 時間培養し、阻止円の直径を測定し評価した。			
6. 遺伝子発現解析 細菌の RNA 抽出後、相補 DNA を合成作成し、定量性 PCR 法による <i>lctF</i> と <i>mukF</i> の発現を評価した。			
7. 統計解析 GraphPad Prism version 10.1.0 を用いてスチューデントの t 検定および一元配置分散分析を用いて遺伝子発現の比較を行った。			

【結果】

1. *S. mutans* 臨床分離株 126 株および UA159 株のヌカシン感受性に多様性を認めた。
2. ヌカシン耐性に関与する 2 つ ABC トランスポーターの LctF と MukF のアミノ酸配列の解析の結果、LctF は完全長 (type II) と truncate 型 (type I)、MukF はアミノ酸の数が 3 つ異なる 2 つのタイプ (type α , β) の存在を認め、各保有状況から大きく 4 つのタイプに分類された。
3. LctF-I 保有株 19 株の中で 18 株は Mutacin K8 合成関連遺伝子 (*mukA-T*) と *mukFEG* を保有していた。LctF-II 保有株 108 株では 8 株が *mukA-T* および *mukFEG* を保有し、*mukFEG* のみの保有株が 19 株、両領域非保有株が 83 株であった。また、LctF-I 保有株は全て MukFa を保有していた。
4. ヌカシン耐性には LctF-II と MukFa のみ関与することが明らかとなった。

【結論】

S. mutans のヌカシン耐性に相反する 2 つの遺伝子多型が、ヌカシン感受性の多様性に寄与することが判明した。この多様性には Mutacin K8 合成に関わる *mukA-T* 領域の有無による LctF と MukF の 2 つの ABC トランスポーター間の変異が関与し、一方の因子のみが耐性機能を発揮するようになると考えられた。本研究は細菌のバクテリオシン耐性機構における新規メカニズムの存在を示唆し、遺伝子獲得による細菌の進化を理解する上でとても重要な知見を創出する。

以上の結果から、本論文はバクテリオシン合成遺伝子の挿入により、細菌が遺伝子改変を行い進化する可能性を示唆するものとなった。

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