

(別紙様式第3号)

学 位 論 文 要 旨

氏名: 松 永 哲 郎

題目: Studies on the Mechanism of Lectin-dependent Colonization of *Eikenella corrodens* in the Oral Cavity

(歯周病関連細菌*Eikenella corrodens*の口腔内へのレクチン依存的定着機構に関する研究)

ある種の細菌がその病原性を発揮するためには、まず生体の局所組織に定着する必要がある。すなわち、病原細菌は細菌感染症の第一段階において宿主細胞と接触するが、その際、宿主の物理的（例えば、口腔内における唾液の流れや咀嚼運動）および生理的（例えば、分泌液中の抗体、抗菌性物質、酵素などの化学的物質）な排除機構に抵抗しながら、長時間滞留、増殖し、局所組織に定着して感染が成立する。この細菌の定着には、一般に細菌表面に存在する付着因子（リガンド）と宿主側のそれに対する受容体（レセプター）が重要な役割を果たしている。

歯周病の原因であるデンタルプラークは約 500 種以上の口腔細菌から形成されるバイオフィルムコミュニティである。デンタルプラークは典型的なバイオフィルムの一例であり、浮遊細菌が歯面や歯周組織に付着して、マイクロコロニーを形成し、成熟したバイオフィルムを形成する。これらの細菌はバイオフィルムを形成することで口腔内に定着し、宿主の免疫機能や酵素、抗生物質などから逃れる特殊な環境を形成していると考えられている。歯周病関連細菌の中で、*Porphyromonas gingivalis* や *Tannerella forsythus*、*Treponema denticola* は成人性歯周炎に関与し、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* は若年性歯周炎に関与すると考えられており、数多くの研究が進められている。本研究では、年齢や環境ストレスに関わらず高頻度に分離される *Eikenella corrodens* について研究を行っている。

E. corrodens は歯周病患者の病変部から頻繁に分離され、無菌ラットへの単一感染により重度の歯周病を惹起するため、歯周病関連細菌の一つであると考えられている。これまでに、本菌は菌体表層に N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)特異的なレクチンを有しており、口腔内上皮細胞への付着、赤血球の凝集、他の口腔細菌との共凝集、マウス B 細胞の活性化、細胞接着因子 ICAM の誘導などを行うことが報告されている。したがって、GalNAc 特異的レクチンが *E. corrodens* の口腔内への病原性に大きく関与していると考えられている。最近、我々はプラスミド上にコードされたリコンビナーゼが線毛遺伝子領域に組換えを起こし、このゲノム再編が GalNAc 特異的レクチン活性を増加させることを報告した。さらに、本菌は GalNAc 特異的レクチンに依存してポリスチレン表面にバイオフィルムを形成することが明らかとなった。しかしながら、本菌の口腔内への定着機構やその制御法については明らかに

されていない。

本研究では、*E. corrodens* の口腔内へのレクチン依存的な定着機構に関する研究を行った。すなわち、第一章では、本菌の定着に対する阻害剤の開発を目的として、お茶に多く含まれるカテキン類による *E. corrodens* のバイオフィーム抑制効果を、第二章では本菌による定着機構の解明を目的として、*E. corrodens* の病原因子におけるリコンビナーゼによるゲノム再編の効果を調べた。

第一章では、*E. corrodens* の定着阻害剤としてカテキン類を用いた。その結果、ピロガロール型 B リングやガロイル基を持つカテキン類の添加により本菌のバイオフィーム形成が抑制された。このうち、ピロガロール型 B リングを持つカテキン類には増殖抑制効果は見られなかった。さらに、ガロイル基を構成する没食子酸の添加により増殖阻害なしにバイオフィーム形成を抑制した。これらの結果より、ある種のカテキン類は最小生育阻害濃度以下でバイオフィーム形成を抑制することが示唆された。近年、オートインデューサー (AI) と呼ばれるシグナル物質を介した菌密度依存的な細菌間コミュニケーション機構(クオラムセンシング: QS) がバイオフィーム形成を調節することが明らかとなり、数多くの研究が進められている。*E. corrodens* においてもオートインデューサー 2 (AI-2) を介した QS がバイオフィーム形成に関与することが明らかとなった。そこで AI-2 合成に関与する *luxS* 遺伝子を欠損させた変異株を用いて、カテキン類のバイオフィーム抑制効果における QS の関与を調べたところ、最小生育阻害濃度以下のエピガロカテキンガレート (EGCg) に見られたバイオフィーム抑制は *luxS* 欠損株では見られなかった。これらの結果から、ガロイル基をもつカテキン類は AI-2 を介した QS を阻害し、これによってバイオフィーム形成を抑制する可能性が示唆された。

第二章では、*E. corrodens* のレクチン依存的な定着機構の解明を試みた。以前、重度歯周病患者の臨床分離株の一つ (1073 株) からプラスミド DNA (pMU1) を発見し、pMU1 上にタイプ IV 線毛遺伝子を特異的に組み換えるリコンビナーゼ遺伝子がコードされていることを示した。さらに、このリコンビナーゼがゲノム上の線毛遺伝子 (*ecpAB*) 領域に組換えを起こし、このゲノム再編が本菌の GalNAc 特異的レクチン活性やバイオフィーム形成を大きく増加させることを示した。上述のように、GalNAc 特異的レクチンは様々な宿主細胞表面への付着に関与し、本菌の病原性に大きく寄与すると考えられている。そこで、口腔内における *E. corrodens* の定着機構を解明するために、病原因子におけるゲノム再編の効果を調べた。その結果、リコンビナーゼ遺伝子の導入により、血液寒天培地上に β 溶血が見られ、口腔内上皮細胞への付着能が増加した。一方、上皮細胞への侵入能はリコンビナーゼ遺伝子の導入により減少した。これらの結果から、リコンビナーゼによる GalNAc 特異的レクチン活性の上昇が *E. corrodens* の病原性を高めることが示唆された。

本研究において、カテキン類が *E. corrodens* の定着機構を抑制すること、リコンビナーゼによる GalNAc 特異的レクチンの増加が *E. corrodens* の定着に寄与することが明らかとなった。したがって、本菌によるレクチン依存的な定着機構の解明やその制御法の確立は *E. corrodens* によるバイオフィーム感染症の予防や治療への応用に有効であることが示唆された。