

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	Mohammad Minnatul Karim
審査委員	主査 阿座上 弘行 (印) 副査 赤壁 善彦 (印) 副査 會見 忠則 (印) 副査 川向 誠 (印) 副査 小崎 紳一 (印)
題目	Studies on the relationship between quorum sensing and biofilm formation of <i>Eikenella corrodens</i> ( <i>Eikenella corrodens</i> のクオラムセンシングとバイオフィーム形成の関連性に関する研究)
<p>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ー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ームの一例であり、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ームを形成する。口腔細菌は、デンタルプラーク中でお互いにコミュニケーションしながら、バイオフィームを形成すると考えられている。微生物はオートインデューサーと呼ばれるシグナルを使ってお互いにコミュニケーションしており、このシグナルを介して菌密度依存的に集団で遺伝子制御するしくみをクオラムセンシングと言う。多くのバクテリアにおいて、バイオフィーム形成を含めた病原性がクオラムセンシングによって制御されていることが報告されている。</p> <p><i>Eikenella corrodens</i> は歯周病患者の病変部から頻りに分離され、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歯周病関連細菌の一つである。近年、本菌が 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ームを形成すること、また AI-2 と呼ばれるオートインデューサーを対数増殖期中期から後期に生産することが明らかとなった。さらに、この AI-2 シグナルが本菌のバイオフィーム形成に影響を与えることも報告されている。しかしながら、AI-2 がどのようにしてバイオフィーム形成や病原性に関わっているのかは不明である。</p> <p>本研究は、<i>E. corrodens</i> のクオラムセンシングと病原性との関わりを調べたものである。定常期の AI-2 活性の減少に関与する因子を同定するために、<i>E. corrodens</i> から AI-2 を精製し、その性質を調べた。また、バイオフィーム形成を含めた病原性に及ぼす LuxS 依存的シグナルの役割を明らかにするために、<i>E. corrodens</i> のバイオフィーム形成に対する精製 AI-2 の効果を調べた。さらに、フロー</p>	

セルシステムや種々の顕微鏡技術を使って、野生株と *luxS* 欠損株のバイオフィーム性状を比較した。

第1章では、*E. corrodens* の定常期における AI-2 活性の減少のメカニズムについて研究を行った。このメカニズムを調べるために、対数増殖期中期の培養上清から AI-2 を抽出、精製した。また同時に、定常期の培養上清を硫酸沈殿により分画した。それぞれの画分を精製した AI-2 または MHF とインキュベーションしたところ、30%硫酸画分により AI-2 活性、MHF 活性ともに減少した。このことは、AI-2 と MHF が同じ機構で不活性化されたことを示唆している。30%画分の熱処理およびトリプシン処理を行ったところ、この画分による AI-2 の不活化を完全に停止させることはできなかった。したがって、部分的に熱安定なタンパク質が AI-2 の不活化に関与することが示唆された。さらに、この酵素が MHF を別の形に変換することを観察した。これらの結果から、*E. corrodens* は AI-2 の不活化酵素を生産し、AI-2 はこれによって分解または修飾されることが示唆された。

第2章では、*E. corrodens* のバイオフィーム形成における AI-2 の役割を調べた。AI-2 分子がバイオフィーム形成に直接影響を与えるかどうかを調べるために、精製した AI-2 を *E. corrodens* の *luxS* 変異株と野生株に添加し、静置系のバイオフィームアッセイによりバイオフィーム形成を比較した。その結果、AI-2 の添加により、*E. corrodens* のバイオフィーム形成が増加した。さらに、走査型電子顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡を用いて、*luxS* 変異株と野生株がフローセルシステムで形成したバイオフィームを比較した。*luxS* 変異株のバイオフィームでは野生株のものと比較して、生菌数が著しく減少し、疎らな構造が見られた。このことから、AI-2 がバイオフィームの成熟に関与することが示唆された。一方、共焦点反射顕微鏡を用いた解析では、野生株のバイオフィームは *luxS* 変異株のものに比べてより早く成熟し、時間とともに薄く疎らになっていくことが示された。これらの結果から、LuxS 酵素は *E. corrodens* においてバイオフィームの成熟と剥離を促進することが示唆された。

以上のように、本論文では、*E. corrodens* が AI-2 の不活化酵素を生産し AI-2 の分解または修飾を行うこと、AI-2 を介したクオラムセンシングが本菌のバイオフィームの成熟と剥離を促進することを明らかにした。よって本研究により、*E. corrodens* のクオラムセンシングを介した定着機構やその制御法を提案するとともに、微生物学の基礎的な知見のみならず、バイオフィーム感染症の予防や治療など臨床分野への応用にも大いに貢献できる結果をあげていると判断した。