

論 文 要 旨

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

中 園 賢 太

【序論及び目的】

口腔内細菌叢は多様な細菌種で構成されている。口腔常在菌は抗菌性ペプチドであるバクテリオシンなどの抗菌因子を産生することが知られている。バクテリオシンの抗菌力は、各バクテリオシンにより菌種特異性があることから、口腔内の他の細菌の排除や共生に関与すると考えられている。

これまで、口腔内から分離されたレンサ球菌種が産生するバクテリオシンについては多くの報告があるが、他の口腔内細菌についての報告は少ない。細菌叢形成におけるバクテリオシンの意味を理解するためには、より多くの口腔内細菌種が産生するバクテリオシンに関する情報が必要である。口腔には皮膚の常在菌である黄色ブドウ球菌や表皮ブドウ球菌が存在することが報告されている。

そこで本研究では、表皮ブドウ球菌のバクテリオシンについて検討することを目的とし、口腔から表皮ブドウ球菌の分離を行い、バクテリオシン産生株の全ゲノム配列決定及びバクテリオシンの口腔細菌を含む種々の細菌に対する抗菌活性の解明を行った。

【材料及び方法】**① 口腔内からの *S. epidermidis* の分離とバクテリオシン産生株の同定**

ボランティア 287 名の口腔内から唾液を採取後、ブドウ球菌用選択培地に播種し、白色コロニーを形成した菌について、*S. epidermidis* 特異的プライマーを用いて PCR 法で同定した。また、*S. epidermidis* のバクテリオシン産生性を確認するため、種々のバクテリオシンに対して感受性が高い *Staphylococcus aureus* MW2 *braRS* 不活化株を指標株として、被検菌を直接用いて抗菌評価を行う Direct 法を用いてバクテリオシン産生性を確認した。

② バクテリオシン産生性 *S. epidermidis* の全ゲノム配列の解読

バクテリオシン産生性 *S. epidermidis* 株の全ゲノム配列決定を行うために、各株から DNA を抽出し、ライブラリーを作成後、全ゲノムシーケンスを行い、バクテリオシン産生遺伝子群を同定した。また同定したバクテリオシン産生関連遺伝子について、既報の遺伝子との比較を行った。

③ バクテリオシンの精製

バクテリオシン産生性 *S. epidermidis* を培養し、培養上清画分を用いて弱陽イオン交換担体により粗精製品を得た。次に粗精製品を octadecyl C18 カラムを用いた逆相高速液体クロマトグラフィーにより精製を行った。得られた精製標品を ESI-MS により質量解析を行った。

④ バクテリオシンをコードした菌株のプラスミドの欠失

バクテリオシン産生性 *S. epidermidis* の培養液に 25 μ g/ml アクリフラビンを加え培養することで、プラスミド欠失株を作成した。プラスミドの欠失は、Direct 法による抗菌活性およびバクテリオシン産

生遺伝子の特異的プライマーを用いた PCR で確認した。

⑤ 感受性試験

指標となる皮膚細菌、口腔細菌に対してバクテリオシン産生性 *S. epidermidis* の感受性試験を行った。まず、Direct 法による感受性試験を行い、次に精製バクテリオシンを用いて抗菌活性を示す最小抗菌量を評価した。Direct 法については、nukacin ISK-1 を産生することが報告されている *S. warneri* ISK-1 も用いて比較を行った。また、バクテリオシンに対して強い感受性を示した *Micrococcus luteus* を用いて *S. epidermidis* との共培養試験を行った。2つの菌液を混合後、寒天培地にスポットし、24時間培養後に菌を回収し、DNAを抽出した。各菌種特異的プライマーを用いて定量性 PCR を行い、各菌の割合を算出した。

【結果】

①287名のボランティアから、150株の *S. epidermidis* が口腔内から分離した。150株の *S. epidermidis* のうち、Direct 法により、*S. aureus* MW2 *braRS* 不活化株に対して明確な阻止円を示した2株 (KSE56、KSE650) を同定した。

②KSE56、KSE650の全ゲノムシーケンスを行い、KSE56のプラスミド (pEpi56) 上に既報の *epidermin* 産生遺伝子が、KSE650のプラスミド (pNuk650) 上に既報の *nukacin* ISK-1 と相同性が高いバクテリオシン産生遺伝子 (*nukacin* KSE650 と命名) が存在することが明らかとなった。既報の *epidermin* 産生性 *S. epidermidis* において2つの断片に破壊された遺伝子 (*epiT'* と *epiT''*) は、KSE56のプラスミドにおいて *epiT* として検出された。また KSE650のプラスミドは、*S. epidermidis* で報告されている *nukacin* IVK45 産生性をコードするプラスミド (pIVK45) と高い相同性を認めたが、pIVK45には存在しない遺伝子領域を持つことが明らかになった。

③精製産物を用いた質量分析の結果、*epidermin* および *nukacin* KSE650 は予想される質量と一致した。

④KSE56 および KSE650 株のプラスミド欠失株は、Direct 法による抗菌活性では、親株に認められた阻止円が認められなかった。

⑤Direct 法による抗菌活性評価の結果、KSE56 および KSE650 株は種々の皮膚および口腔細菌に対してそれぞれ特有の抗菌活性を示した。*S. epidermidis* KSE650 株と *S. warneri* ISK-1 の抗菌活性を比較した結果、一部の細菌種に対して異なる抗菌活性を示す結果となった。また、精製標品を用いた抗菌活性評価では、Direct 法の結果と同様の傾向を示した。共培養試験ではバクテリオシン産生株はバクテリオシン非産生株に比べて *M. luteus* の占有率を有意に低下させた。

【結論及び考察】

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、一つは新規のバクテリオシンを同定できた。精製した *epidermin*、*nukacin* KSE650 を用いた抗菌活性評価と Direct 法を用いた抗菌活性の結果が相関したことから、プラスミド欠失株では抗菌効果を認めなかったことから、プラスミド上にコードされるバクテリオシンが実際に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、Direct 法の結果から、*nukacin* ISK-1 と *nukacin* KSE650 において5つのアミノ酸配列の違いが、種々の細菌に対する抗菌活性に影響を及ぼすことが示唆された。また、生菌を用いた共培養試験の結果からもバクテリオシン産生が2株の構成比に影響を与えた。以上のことから、表皮ブドウ球菌の産生するバクテリオシンは、生体の細菌叢形成に影響を与える可能性が示唆された。