

論 文 要 旨

Involvement of Dpr, Sod and AhpCF in resistance to hydrogen peroxide produced by *Streptococcus sanguinis*, and PerR association with their factors in *Streptococcus mutans*

Streptococcus sanguinis の産生する過酸化水素に対する *Streptococcus mutans*

酸化ストレス耐性因子Dpr、Sod、AhpCFの関与及び耐性因子へのPerRを介した *Streptococcus mutans* の酸化ストレス耐性機構の解析

藤 島 慶

【序論および目的】

Streptococcus mutans の様々な刺激が存在する口腔内における定着機構の解明という観点から、*S. mutans* 同様、口腔常在菌でありプラーク中に高頻度に認められる、*Streptococcus sanguinis* の産生するバクテリオシンである過酸化水素に着目した。本研究では、*S. mutans* の *S. sanguinis* の産生する過酸化水素耐性獲得機構の解明を行い、口腔内定着における、*S. mutans* の酸化ストレス耐性獲得の意義を明確にすることを目的とする。

【材料および方法】

1. *Streptococcus sanguinis* 及び過酸化水素に対する *Streptococcus mutans* の酸化ストレス耐性因子欠損株を用いた感受性検証

S. mutans は、AhpCF（過酸化水素を分解し無害な水に分解する）、Dpr（過酸化水素から最も有害なヒドロキシラジカルへの合成を阻害する）、SOD（有害なスーパーオキシドアニオンラジカルを分解し過酸化水素へ変換する）などの酸化ストレス耐性因子をもつことがこれまでに報告されている。そこでこれらの耐性因子の欠損株を作製し、*S. sanguinis* 及び過酸化水素に対する感受性を、competition assay にて検証した。方法は、まず、*S. sanguinis* 及び過酸化水素(0.35、0.5%)を50% TSB 寒天培地上に10 μ l ずつ滴下後、*S. sanguinis* は37 $^{\circ}$ C で一晚培養後、過酸化水素は30分後に、中心間距離において、9mm 離れたポイントに、*S. mutans* UA159 野生株、及び酸化ストレス耐性因子欠損株を滴下し、さらに一晚培養し、増殖阻害度の検証を行った。

2. *Streptococcus mutans* UA159野生株及び酸化ストレス耐性因子欠損株における過酸化水素に対する生存率の定量化検証

S. mutans UA159野生株、及び酸化ストレス耐性因子欠損株を、過酸化水素(0.04%)含有TSBに添加した後、37 $^{\circ}$ Cで30分間5%CO₂下で培養し希釈後、50%TSB寒天培地にplatingし、生えてきたコロニー数の比較検証を行った。

3. *Streptococcus mutans* の酸化ストレス耐性因子の制御メカニズムの解析

3-1 *S. mutans* UA159 野生株における、酸化ストレス応答抑制因子 *perR* の役割検証

既報より、PerR は他菌種において酸化ストレス耐性因子の repressor として知られており、グラム陽性菌、グラム陰性菌において酸化ストレス耐性に関与する因子として、研究が行われてきた。そこで、*S. mutans* UA159 野生株における *perR* 欠損株及び *perR* のコンプリメント株を作製し、*S. sanguinis* が産生する過酸化水素に対する感受性を、competition assay にて検証を行った。また、合わせて *S. mutans* UA159 野生株、*perR* 欠損株、*perR* のコンプリメント株における過酸化水素に対する生存率の定量化検証を行った。

3-2 *S. mutans* UA159 野生株における、酸化ストレス耐性因子と *perR* の相関関係検証

PerR は、酸化ストレス耐性に関与する重要な因子であることから、PerR と酸化ストレス耐性因子である、Dpr、Sod、AhpC の制御機構の解析を行った。具体的な方法として、*S. mutans* UA159 野生株、*perR* 欠損株、*perR* のコンプリメント株それぞれを、37°C、5%CO₂ 下で exponentially phases まで培養し、菌回収後、酸化ストレス耐性因子の遺伝子発現量を定量性 PCR にて比較、検証を行った。

4. *Streptococcus mutans* UA159 野生株及び *perR* 欠損株と *Streptococcus sanguinis* 共培養時の増殖能の解析と酸化ストレス耐性因子の発現解析

4-1 *Streptococcus sanguinis*、*Streptococcus mutans* 共培養時の成長動態の解析

S. sanguinis と *S. mutans* UA159 野生株及び *perR* 欠損株を共培養した際の2菌種間での *S. mutans* の占める割合の解析を行った。具体的な方法としては、*S. sanguinis* と *S. mutans* UA159 野生株及び *perR* 欠損株を一定の割合で混和し、それを50%TSAプレートに spot し、37°C で8時間5%CO₂ 下で培養する。その後、プレート上のコロニーをかきとり、PBSに懸濁し、希釈後、50%TSAプレート及び *S. mutans* 選択培地に plating し、増殖動態の比較、検証を行った。

4-2. *Streptococcus sanguinis*、*Streptococcus mutans* 共培養時の酸化ストレス耐性因子 *dpr* の発現解析

S. sanguinis との共培養時の菌を回収し、酸化ストレス耐性因子本体である *dpr* の遺伝子発現量を定量性PCRにて比較、検証を行った。

【結果】

competition assay 及び過酸化水素に対する生存率の定量化検証より、過酸化水素への感受性には、*dpr*、*sod* の関与が示された。また、他菌種において酸化ストレス耐性因子の repressor として知られる PerR との相関検証より、PerR が *dpr* の発現抑制に強く関与している結果が得られた。実際の口腔内を想定した *S. sanguinis* との共培養検証では、*S. sanguinis* とのいずれの混合比率においても、*S. mutans* UA159 野生株よりも *perR* 欠損株の生存率は高く、またその時の *dpr* の発現量は *perR* 欠損株において有意に増加していた。

【結論及び考察】

S. mutans は *dpr*、*sod*、*ahpC* の3つの酸化ストレス耐性因子を所有し、このうち *dpr* が耐性因子の本体である。*dpr* は過酸化水素から Fenton pathway により致死的酸化ストレスであるヒドロキシラジカルが産生されることを抑制する因子である。他菌種において酸化ストレス耐性因子の repressor である PerR は、*S. mutans* においてこの *dpr* の発現を抑制する。本研究により、*dpr* の発現制御を調整する PerR を介した酸化ストレス耐性機構が明らかになった。