

氏名 伊東俊太郎 (いとう しゅんたろう)  
 学位の種類 博士(歯学)  
 学位授与番号 岩医大院歯博第251号  
 学位授与の日付 平成22年3月11日  
 学位論文題目 Identification and molecular analysis of  $\beta$ C-S lyase producing hydrogen sulfide in *Streptococcus intermedius*.  
 - *Streptococcus intermedius* の硫化水素産生酵素 $\beta$ C-S lyase の分子生物学的解析 -

## 論文内容の要旨

### I 研究目的

硫化水素は生体に対して毒性を持つガスとして知られており、高濃度では溶血反応によってヘモグロビンの放出や変性を引き起こす。また、細菌感染による炎症の助長や、アポトーシスにも関与するという報告もある。細菌の硫化水素産生機序はメチオニン合成経路の硫化水素産生酵素によるシステイン分解反応に因る。主要口腔細菌であるレンサ球菌のほとんどの菌種も硫化水素産生能を持つが、*Streptococcus anginosus* や *S. constellatus* といった *anginosus* グループのレンサ球菌を除き、その産生能は低いことが明らかにされている。しかし、その産生機序の詳細については明らかにされていない。そこで本研究では、*anginosus* グループレンサ球菌の *S. intermedius* の硫化水素産生機序、特に硫化水素産生酵素である $\beta$ C-S lyase について分子生物学的検討を行った。

### II 研究方法

*anginosus* グループには *S. anginosus*, *S. constellatus*, *S. intermedius* が含まれる。低硫化水素産生能を持つ *S. gordonii* 4株 (リファレンス株1株, 臨床分離株3株) と *S. anginosus* 6株, *S. constellatus* 6株, *S. intermedius* 29株 (リファレンス株3株, 臨床分離株38株) を用いて、粗酵素による硫化水素産生能を比色法にて測定した。また、*S. intermedius* の一部については $\beta$ C-S lyase をコードする遺伝子 *lcd* の塩基配列を決定し、大腸菌の組換えタンパクとして抽出した精製酵素を用いて酵素学的性質および基質特異性を決定した。 $\beta$ C-S lyase のシスタチオニンの分解産物については、ダンシル化を行い HPLC によって解析を行った。

### III 研究成績

*S. intermedius* は平均して *S. gordonii* より高い粗酵素活性を示したが、*anginosus* グループの中では低い活性を示した。また、*S. intermedius* において29株中26株は粗酵素活性を示したが、3株 (*S. intermedius* ATCC 27335, IMU151, IMU202) は硫化水素産生能を全く認めなかった。これら3株の *lcd* の塩基配列について産生能を持つ株と比較したところ、*S. intermedius* ATCC 27335 については1塩基、*S. intermedius* IMU151, IMU202 については2塩基欠損が存在した。そこで、*S. intermedius* ATCC 27335 の修復株 KO101 を作製したところ、硫化水素産生株と同程度以上に粗酵素活性を回復した。さらに、*lcd* の発現量を real-time PCR 法を用いて比較したところ、硫化水素産生株と非産生株ではほぼ同程度であった。

*S. intermedius* ATCC 27335 における精製酵素は予測されていたことではあるが不完全なタンパクを形成していた。しかし、修復株 KO101 と硫化水素産生株 IMU201 からの精製酵素ではシステイン分解能が認められた。 $K_m$  と  $V_{max}$  から検討した結果、*S. intermedius* の $\beta$ C-S lyase はシステインに高い結合性を有していること、しかし硫化水素産生能は他の *anginosus* グループのそれより低いことが明らかとなった。精製酵素のシスタチオニン分解産物については、ホモシステインを産生していた。さらに HPLC 解析および酵素活性の検討から $\beta$ C-S lyase は、システインから直接硫化水素を産生する direct sulphydrylation pathway と、 $\alpha,\beta$ -elimination 反応によってシスタチオニンからホモシステインを産生する trans-sulfuration pathway の2つのメチオニン合成経路に関わっている

ことが示唆された。

#### IV 考察及び結論

real-time PCR の結果より *S. intermedius* ATCC 27335 は *lcd* が限局的に変異しているにもかかわらず mRNA を発現していることから、*lcd* における変異は比較的近年に起きたと推察される。

一連の研究によって、*anginosus* グループ 3 種類のいずれにおいても、他のレンサ球菌に比べて高い硫化水素産生能を有することが示された。硫化水素産生能と膿瘍形成の関連に対する明確なエビデンスは存在しないため、今後さらなる研究が必要と考えられた。

#### 論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 國 松 和 司 (口腔機能保存学講座 歯周病学分野)

副査 教授 木 村 重 信 (口腔病因病態制御学講座 口腔微生物学免疫学分野)

副査 教授 石 崎 明 (口腔機能構造学講座 口腔生化学遺伝学分野)

口腔内に発生する硫化水素は口臭の原因、細胞への傷害、ガスメッセンジャーとしての作用などの機能を有することが知られている。口腔内から単離される大部分のレンサ球菌は低い硫化水素産生能であるが、*Streptococcus anginosus* や *S. constellatus* は高い硫化水素産生能を持つことが報告されている。そこで本研究では、同じ *anginosus* グループに属する *S. intermedius* の硫化水素産生機序、特に硫化水素産生酵素である  $\beta$ C-S lyase について分子生物学的検討を行った。

*anginosus* グループにおける粗酵素活性を測定すると菌種間ではそれぞれ高い硫化水素産生能を示し、*S. anginosus* が一番高く、次いで *S. constellatus*, *S. intermedius* であった。また、菌株間では *S. anginosus*, *S. constellatus* に大きな差は認められなかったが、*S. intermedius* においては硫化水素産生能を全く持たない 3 株を認めた。これらの菌株の  $\beta$ C-S lyase をコードする遺伝子の DNA 配列を産生能を持つ株と比較すると、それぞれ 1 塩基欠損が存在した。そこで、欠損した *S. intermedius* ATCC 27335 の *lcd* の修復を行い、硫化水素産生活性を測定したところ、修復株は活性を回復した。さらに、*lcd* の発現量を real-time PCR 法を用いて比較すると、硫化水素産生株と非産生株ではほぼ同程度であった。*S. intermedius* ATCC 27335 は *lcd* が一部欠損しているにもかかわらず mRNA を発現していることから、*lcd* における欠損は比較的近年に起きたものであることが推測された。

本研究は、口腔常在細菌の一つである *S. intermedius* の硫化水素産生酵素である  $\beta$ C-S lyase について、菌種内の分布状況、*anginosus* グループ間を含めた菌属間の差異について遺伝子レベルで検討したもので、本菌の細菌学的特異性の一端を明らかにするとともに、膿瘍形成等の本菌の病原性の解明につながるものと期待される。

#### 試験・試問の結果の要旨

学位申請者に対し、本研究の内容について試問したところ、適確な回答が得られた。申請者は歯周病学に関する知識に優れ、患者治療も積極的にいき、歯周病撲滅のためにさらなる研究を実施していきたいという強い意志を有している。本研究で得られた成果は学位論文に値し、また、申請者は十分な学識と研究能力を有しており、合格と判定した。