

氏名（本籍）	永沢 亮		
学位の種類	博 士（農 学）		
学位記番号	博 甲 第 9864 号		
学位授与年月日	令和 3 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	<i>Streptococcus mutans</i> における細胞外シグナルに応答した細胞死誘導の解析		
主査	筑波大学教授	博士（工学）	野村 暢彦
副査	筑波大学教授	博士（農学）	高谷 直樹
副査	筑波大学教授	博士（理学）	中村 幸治
副査	筑波大学准教授	博士（工学）	橋本 義輝

## 論 文 の 要 旨

多くの細菌は実環境中において物質表面に定着したバイオフィーム状態で生活している。バイオフィームは微生物と微生物が産生する細胞外マトリクスから構成される三次元構造体であり、バイオフィーム状態の細菌は浮遊状態とは異なる特性を示すことが明らかとなっている。従って、細菌が関連する諸問題に対処するためにはバイオフィーム状態、つまり、集団としての細菌の挙動を理解する必要がある。また、遺伝的に均質な細胞によって形成されたバイオフィームであっても、一つ一つの細胞の遺伝子発現や表現型は異なることが明らかになってきており、一細胞レベル解析が求められる。微生物の集団的挙動の一例として、バイオフィームの形成や構造安定性に寄与する細胞外 DNA の産生が挙げられる。本論文で著者は、バイオフィーム感染症の一つであるう蝕の主要原因細菌 *Streptococcus mutans* を研究対象として、集団中の一部の細胞で誘導される細胞死と細胞外 DNA 産生がバイオフィーム内部において、いつ、どこで、どのようにして起きるかを明らかにすることなど、背景および目的を第 1 章で記述している。

第 2 章では、蛍光顕微鏡や共焦点顕微鏡による一細胞レベルイメージング及び、フローサイトメトリー解析による一細胞レベル定量解析手法や細菌集団の不均一化とバイオフィーム内部における局在性についての解析手法について記述している。

第 3 章は 5 つの節で構成され、以下について述べている。CSP (competence stimulating-peptide) と呼ばれるペプチド性シグナルを介した細胞間コミュニケーションによって、集団中の一部の細胞で誘導される細胞死に着目し、一細胞レベルのタイムラプスイメージングを行い、細胞外 DNA が溶菌を介して産生されることを実証し、また、細胞死誘導と細胞外 DNA には集団中の一部の細胞で発現誘導されるオートリシン LytF が必要であることを示した。

著者は次に、バイオフィーム内部における *LytF* 発現細胞、死細胞、細胞外 DNA の局在を調べ

るために、共焦点レーザー顕微鏡を用いたバイオフィルムの三次元イメージングを行い、バイオフィルム底面部に *lytF* 発現細胞が多く存在することを明らかにした。また、死細胞と細胞外 DNA もバイオフィルム底面部に多いことを示した。さらに、バイオフィルム底面部における細胞死誘導、細胞外 DNA 産生が *lytF* に依存することを確認し、*lytF* 発現を介した細胞死誘導及び、細胞外 DNA 産生がバイオフィルム底面部で起きることを明らかにした。

続いて著者は、*lytF* 発現の局在化がバイオフィルムの三次元構造に由来すると考え、その検証を行った。そして、バイオフィルムの三次元構造に由来する環境不均一性よりも物質表面と細胞との相互作用が *lytF* 発現に影響することを推察している。

以上、著者は集団中の一部の細胞が溶菌することでバイオフィルム形成に必要な細胞外 DNA を産生すること、そして、細胞間コミュニケーションを介したオートリシン発現、細胞死誘導、細胞外 DNA 産生がバイオフィルム内において空間的制御を受けることを実証した。

## 審 査 の 要 旨

本論文による一細胞レベル解析から、*S. mutans* は CSP を介した細胞間コミュニケーションにより遺伝子発現、表現型が異なる細胞亜集団に分化することが示された。また、各細胞亜集団がバイオフィルム内部において局在化することで、構造的に安定なバイオフィルムを形成することを示している。また、局在化には、細胞と物質表面との物理的接触が影響する可能性を示唆している。

以上のように、同一菌種からなるバイオフィルムにおいて、生菌と死菌などの不均一性が存在し、さらにその局在がバイオフィルムの高次構造に寄与することを明らかにしている。本論文で使用された *S. mutans* は、実環境中において、他の口腔常在細菌と複合細菌バイオフィルムを形成する。従って、口腔病原バイオフィルムの制御に向けても、大きく貢献することが見込まれ高く評価出来る。また、本論文におけるバイオフィルムの新たな局在化機構の知見は、基礎研究としても評価出来るとともに農学の観点からも有用である。

令和3年1月18日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。