

氏 名	大原 早紀子
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第7460号
学位授与の日付	令和 8年 3月 25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Evaluation of Mycobacterium-derived plasmids for application in oral Actinomyces species (口腔 Actinomyces 属細菌への応用を目的とした抗酸菌由来プラスミドの評価)
論文審査委員	山本 直史 教授 仲野 道代 教授 大森 一弘 准教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

Actinomyces 属は *Actinomycetes* 綱に属する Gram 陽性桿菌で、多くは嫌気性であり、口腔内細菌叢の主要な構成菌である。歯肉縁上と歯肉縁下のバイオフィルムの形成において、細菌が定着する初期段階に関与する。また、*Actinomyces* 属は頭頸部をはじめとする放線菌症の主要な原因菌である。中でも *Actinomyces israelii* は顎放線菌症で最も多く検出され、膿瘍内に褐色の硫黄顆粒（ドルーゼ、菌塊）を形成する。このように、*Actinomyces* 属は、正常な細菌叢の形成に寄与すると同時に病原性を示し、口腔内に幅広く影響を与えている。しかし、本菌の病原因子は未だ報告されていない。

病原因子を遺伝学的に解析するには、遺伝子組換えが有力な手法となるが、口腔内 *Actinomyces* 属では遺伝学的解析に関する報告は乏しい。口腔内 *Actinomyces* 属へプラスミドを導入した報告と、遺伝子欠損変異株作製の報告はこれまでにもあるが、その数は極めて少なく、*A. israelii* については申請者の所属研究室の知る限りは無い。

本研究では、*A. israelii* に導入可能なプラスミドを得ることを目的として、*Mycobacterium scrofulaceum* に由来する pMSC262に着目した。そして、pMSC262の複製領域を含む断片を大腸菌プラスミド pACYC177に導入して構築されたシャトルベクターpYT923を、制限酵素で消化することで縮小した pYT923S を作製し、*A. israelii* に導入することを試みた。

【材料と方法】

1. 使用した細菌と培養条件

大腸菌 DH5α は、LB 培地を用いて37℃で好気的に培養した。*A. naeslundii* JCM8349は、BHIY (Brain Heart Infusion, Yeast Extract) 培地を用いて、嫌気条件下で培養した。*A. israelii* JCM12964は、BHIY 培地に Tween 80を添加（終濃度0.5%）した BHIY-Tw 培地を用いて、嫌気条件下で培養した。必要に応じ、カルベニシリン50 µg/mL、カナマイシン (Km) 50 µg/mL を添加した。

2. プラスミド構築

pYT923を HincII で消化し、自己接合させることで pYT923S を構築した。

3. 遺伝子導入法

A. israelii と *A. naeslundii* への遺伝子導入には電気穿孔法を用いた。Electroporation (EP) buffer 緩衝液（272 mM マンニトール、2 mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.1）, 0.05%

Tween 80) を用い, Gene Pulser II (BioRad) により, 1700 V, 25 μ F, 600 Ω の条件下で電気パルス処理を行った. 電気パルス後に, BHIY 培地を加え, 37°C で 12 時間嫌氣的に培養したのち, Km 含有 BHIY 寒天培地に塗布した. 形質転換効率は寒天培地上のコロニー数に基づいて算出した.

4. ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain reaction, PCR)

Actinomyces へのプラスミド導入の確認は, pYT923S 特異的プライマー YT1 と YT2 を用いた PCR により行った.

5. *Actinomyces* からの DNA 抽出

Actinomyces から DNA 抽出は, フェノール抽出法によった. 抽出した DNA の一部を大腸菌に形質転換した.

【結果】

pYT923 を縮小化した pYT293S を電気穿孔法により *A. israelii* に導入したところ, Km 含有 BHIY 寒天培地上にコロニーが得られた. それらのコロニーを YT1 と YT-2 を用いた PCR で確認したところ, 想定される大きさの PCR 産物が得られた. そして, 形質導入効率は約 7~66 CFU/ μ g DNA と算定された. さらにプラスミドの平均保持率は 96.7% $\pm$ 2.9% と算定された. PCR の結果, pYT293S を保持していることが確認されたコロニーから DNA を抽出し, 大腸菌に形質転換したところ, Km 含有 LB 培地上にコロニーが得られ, それらのコロニーからプラスミドが回収された.

A. naeslundii における pYT923S の形質転換効率は約 20~30 CFU/ μ g DNA であった. *A. israelii* と同様に PCR で陽性だったコロニーから得られた DNA で形質転換した大腸菌からは, プラスミドが回収された.

以上のことから, pYT923S は少なくとも 2 種類の *Actinomyces* 属細菌に導入可能であることが示された.

【考察】

Actinomyces 属の形質転換は, 技術的に困難と考えられてきた. *A. naeslundii* や *A. viscosus* などの口腔内 *Actinomyces* 属細菌の形質転換を可能にする唯一のプラスミドとして, Gram 陰性菌広域プラスミド pJRD215 が報告されている. *A. israelii* については pJRD215 を含めてプラスミド導入の報告はこれまでなく, 我々による今回の pYT923S の導入が初めてである.

今回, *A. israelii* にプラスミドを導入可能なことは示された. しかし, 形質転換コロニー数はプレート間で大きく異なっていた. その理由は不明であるが, 菌の凝集の程度が反映されたことが一因と考えられる. 実施に外来の DNA を組み込んで使用するためには, この点を含めて安定した導入ができるようにプラスミドを改善する必要と考えられる.

【結論】

シャトルベクタープラスミド pYT923S は, *A. israelii* へ導入可能であることが示された. pYT923S ベクターは放線菌属にとって有用な遺伝子ツールであり, 放線菌の生物学および病原性に関する今後の研究を促進することが期待される.

論文審査結果の要旨

【緒言】 *Actinomyces* 属は口腔内細菌叢の主要な構成菌である。 *Actinomyces* 属は頭頸部をはじめとする放線菌症の原因菌でもあり、中でも *Actinomyces israelii* は顎放線菌症で最も多く検出される。しかし、本菌の病原因子は未だ報告されていない。細菌の病原因子を遺伝学的に解析するには、遺伝子組換えが有力な手法となるが、 *Actinomyces* 属では遺伝学的解析に関する報告は乏しく、 *A. israelii* については皆無である。本研究では、 *A. israelii* に導入可能なプラスミドを得ることを目的として、抗酸菌の1菌種である *Mycobacterium scrofulaceum* 由来 pMSC262に着目した。そして、pMSC262の複製領域を含む pYT923を縮小した pYT923S を作製し、 *A. israelii* に導入することを試みた。

【方法】 pYT923を HincII で消化し、自己接合させることで pYT923S を構築した。 *Actinomyces naeslundii* と *A. israelii* へのプラスミド導入には電気穿孔法を用い、1,700 V、25 μ F、600 Ω の条件下で1回の電気パルス処理を行った。プラスミド導入菌の選択には、カナマイシン (Km) 含有 Brain Heart Infusion, Yeast Extract (BHIY) 寒天培地を用いた。形質転換効率は寒天培地上のコロニー数に基づいて算出した。プラスミド導入菌の確認は、pYT923S に特異的なプライマー YT1と YT2を用いた PCR と、プラスミド導入菌から抽出した DNA で形質転換した大腸菌から得られたプラスミドのサイズと制限酵素パターンを電気泳動で解析することによって行った。

【結果】pYT923S を電気穿孔法により *A. naeslundii* と *A. israelii* に導入したところ、Km 含有 BHIY 寒天培地上にコロニーが得られた。それらのコロニーを YT1と YT2を用いた PCR により、想定されるサイズの PCR 産物が得られた。形質導入効率は、 *A. naeslundii* では約 20~30 CFU/ μ g DNA、 *A. israelii* では約7~66 CFU/ μ g DNA と算出された。PCR 陽性コロニーから DNA を抽出し、大腸菌に形質転換したところ、形質転換菌から pYT923S が回収された。

【考察】口腔内 *Actinomyces* 属細菌の形質転換を可能にする唯一のプラスミドとして、グラム陰性菌広域プラスミド pJRD215が報告されているが、 *A. israelii* については pJRD215を含めてプラスミド導入の報告はこれまでなく、本研究により、抗酸菌由来のプラスミド pYT923S が *A. israelii* に導入可能であることが示された。このことは、 *A. israelii* に外来遺伝子を導入することが可能であることを示す世界で初めての報告である。得られた成果は新規性に富んでおり、また本菌の遺伝子操作を行う上での礎となるものである。本論文はすでに Journal of Oral Biosciences 誌に掲載されており、国際的にも評価されている。

よって、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。