

ふ り が な 氏 名	りゅう はくこう 劉 柏昂
学 位 の 種 類	博士（歯学）
学 位 記 番 号	甲 第 1011 号
学位授与の日付	令和 6 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項に該当
学 位 論 文 題 目	Transposon insertion in <i>Rothia dentocariosa</i> (<i>Rothia dentocariosa</i> に対するトランスポゾンの挿入)
学位論文掲載誌	Journal of Oral Biosciences 第 66 巻 第 2 号 令和 6 年 6 月
論 文 調 査 委 員	主 査 沖永 敏則 教授 副 査 前田 博史 教授 副 査 本田 義知 教授

論文内容要旨

Rothia 属細菌は、口腔健康状態が良好な人の口腔細菌叢に多く存在することが知られている。口腔に生息する *Rothia* 属細菌は主に *Rothia mucilaginosa*、*Rothia dentocariosa* と *Rothia aeria* である。*Rothia* 属細菌は硝酸塩還元性を有する細菌で、この特性が口腔の抗菌活性として働いていると考えられている。それ故に、*Rothia* 属細菌は口腔健康の維持・増進に寄与している可能性が高い。しかし、*Rothia* 属細菌を対象とした遺伝子改変技術はなく、本菌がヒトの口腔健康にどのような影響を与えているのかを、遺伝子レベルで明らかにすることができない。そこで本研究では、*R. dentocariosa* に注目し、新たな遺伝子改変技術を開発することを目的とした。

唾液・舌・頬粘膜から oral *Rothia* selective medium を用いて *Rothia* 属細菌を分離し、その後、種特異的な PCR および 16S rRNA 遺伝子塩基配列を決定することにより、*R. dentocariosa* を分離した。分離・同定した *R. dentocariosa* を対象に、広宿主域プラスミド pJRD215 を用いて、形質転換ができる株を選択した。得られた株の中で最も効率が良かった株を *R. dentocariosa* LX16 と命名した。次に遺伝子改変が可能かどうかを確かめるために、*R. dentocariosa* LX16 を対象に、EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome™ を用いたトランスポゾンミュータジェネシスを行った。トランスポゾンの薬剤マーカーである kanamycin (Km) と 5-Fluoroorotic acid (5-FOA) でスクリーニングを行い、形質が変化した株 (Km 耐性、5-FOA 耐性) を得た。トランスポゾン挿入領域は、Arbitrary primed PCR およびトランスポゾン挿入領域近傍を標的とした PCR で決定した。

この結果により、*R. dentocariosa* ゲノム上にトランスポゾンが挿入され、形質が変化した遺伝子改変株を作製することができた。今後、さらなる遺伝子発現技術などを開発することにより、*R. dentocariosa* の特性を遺伝子レベルで明らかにすることが可能となり、口腔健康に貢献する役割を明らかにすることができると考える。

論文審査結果要旨

本論文は、口腔健康に寄与すると考えられている *Rothia* 属細菌の一種、*Rothia dentocariosa* の遺伝子改変技術の開発を目的として実施された研究をまとめたものである。これまで *Rothia* 属細菌を対象とした遺伝子改変技術は存在せず、口腔健康への影響を遺伝子レベルで解明する手段がなかったことから、本研究の学術的意義は高い。

この研究は、唾液、舌、頬粘膜から *Rothia* 属細菌を oral *Rothia* selective medium を用いて分離し、種特異的な PCR および 16S rRNA 遺伝子塩基配列解析により *R. dentocariosa* を同定した。同定された *R. dentocariosa* に対して、広宿主域プラスミド pJRD215 を用いた形質転換実験を行い、効率的に形質転換ができる株を選択し、*R. dentocariosa* LX16 と命名している。

さらに、*R. dentocariosa* LX16 を対象に EZ-Tn5™ <KAN-2>Tnp Transposome™を用いたトランスポゾンミュータジェネシスを実施し、kanamycin (Km)および 5-Fluoroorotic acid (5-FOA)耐性を持つ 5-FOA 耐性株をスクリーニングした。得られた株のトランスポゾン挿入領域は Arbitrary primed PCR で決定した。

これらの結果により、*R. dentocariosa* の遺伝子改変技術が確立され、遺伝子改変株の作製が成功した。この技術は、今後のさらなる遺伝子発現技術の開発に繋がり、*R. dentocariosa* の口腔健康における役割を遺伝子レベルで明らかにするための基盤となることが期待される。

以上より、*Rothia* 属細菌の遺伝子改変技術の確立と、口腔健康の維持・増進における同細菌の役割の解明に向けた重要な一歩となる可能性を有した本論文は、博士(歯学)の学位論文としてふさわしいものであると認定した。