




### 学位論文審査の結果の要旨

平成 28年 12月 12日

審査委員	主査	上田夏生 		
	副主査	星川宏史 		
	副主査	新井明治 		
願出者	専攻	分子情報制御学	部門	分子腫瘍学
	学籍番号	13D734	氏名	Khaleque Hasibul
論文題目	D-tagatose inhibits the growth and biofilm formation of <i>Streptococcus mutans</i>			
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格	不合格 (該当するものを○で囲むこと。)		

[ 要 旨 ]

Dental caries are an important global health concern, and *Streptococcus mutans* has been established as a major cariogenic bacterial species. Reports indicate that a rare sugar, D-tagatose, is not easily catabolized by pathogenic bacteria. In this study, we examined the inhibitory effects of D-tagatose on the growth and biofilm formation of *S. mutans* GS-5. Monitoring the *S. mutans* growth over a 24-h period showed that D-tagatose prolonged the lag phase without interfering with the final cell yield. This growth retardation by D-tagatose was also observed in the presence of 1% sucrose, although it was abolished by the addition of D-fructose. *S. mutans* biofilm formation was significantly inhibited by D-tagatose (1.0 to 4.0%) compared with that in the culture containing sucrose alone, and *S. mutans* formed granular biofilms in the presence of this rare sugar. The inhibitory effect of D-tagatose on *S. mutans* biofilm formation was more evident than that of xylitol. The addition of 1% D-tagatose significantly repressed the expression of genes for glucosyltransferase B, fructosidase A and D-fructose-specific phosphotransferases, but not the expression of fructosyltransferase gene compared with the culture containing 1% sucrose alone. The activity of cell-associated glucosyltransferase in *S. mutans* was inhibited by 4% D-tagatose. These results indicate that D-tagatose reduces water-insoluble glucan production from sucrose by inhibiting glucosyltransferase activities, which limits access of *S. mutans* to the free D-fructose released during this process and retards the cell growth. Taken together, D-tagatose is considered to be an alternative sweetener that reduces the caries risk by inhibiting *S. mutans* biofilm formation on tooth surface.

平成28年12月12日に行われた学位論文審査委員会においては、以下に示す様々な質疑応答が行われた。

1. 走査型電子顕微鏡観察 (SEM) による*S. mutans*バイオフィーム形成の定量的評価においては、クリスタル紫を使用したバイオフィームアッセイで認められた用量依存性が認められないのはなぜか。

→ 後者の方法では、残存色素量を定量することにより、バイオフィームの容積を定量的に評価できるのに対し、前者の方法は画像処理ソフトを用いた面積の比較であるため、明瞭な用量依存性が認められなかったと考えられる。

2. D-tagatoseはどのようなメカニズムでglucosyltransferase B (GtfB)を阻害しているのか。

→ GtfBは $\beta$ -fructofranosidase活性を有し、sucroseからD-fructoseを遊離するとともにD-glucoseを重合し、glucanを合成する。D-tagatoseはD-fructoseのC4-epimerであり、sucroseと部分的に構造が類似しているため、GtfBのsucroseに対する結合を競合的に阻害しているのではないかと考えているが、実験的なデータがないので、今後検討したい。

3. この実験では、プラスチックディスクの上にバイオフィームを形成させているが、この方法はin vivoでの環境を反映できているのか。

→ 本実験では用いなかったが、ハイドロキシアパタイトディスク(HPA)は実際の歯牙表面に類似した組成であるので、HPAディスク上でD-tagatoseが*S. mutans*のバイオフィーム形成を抑制するか否かを検討する必要がある。

4. *S. mutans*においてxylitolとD-tagatoseはどのように代謝されるのか。違いはあるのか。

→ XylitolとD-tagatoseはいずれも*S. mutans*のエネルギー源にはならないと考えられている。XylitolはD-fructoseに特異的なtransport systemにより細胞内に取り込まれリン酸化されるが、速やかに脱リン酸化されて排出される。この取り込みと排出はATP依存性であり、xylitolは*S. mutans*にATP消費を強いることで抗菌効果を発揮する。一方、*S. mutans*を48時間培養した後も、添加したD-tagatoseの86%が培地に残存しており、D-tagatoseは*S. mutans*の細胞内へほとんど取り込まれないと考えられる。

5. Xylitolの摂取はときに腹部膨満感や下痢のような消化器症状を誘発するが、D-tagatoseも摂取すると同様な症状が起こるのか。

→ 現在、D-tagatose含有チューイングガムを用いた齲蝕予防に関する臨床試験を行っている。参加者1人当たりの投与量は9 g/dayであり、30日間服用しているが、腹部症状を訴えた被験者はこれまで認めていない。

申請者はいずれの質問に対しても的確に回答し、医学博士の学位授与に値する十分な見識と能力を有することが認められた。

本論文は、希少糖のひとつであるD-tagatoseが齲蝕原因菌である*S. mutans*のglucosyltransferase活性を阻害することによりバイオフィーム形成を抑制することを示したものである。本研究成果は新たな齲蝕予防薬の開発に寄与するものであり、審査員全員一致して博士(医学)論文に相応しいものと判断し、合格とした。

掲載誌名	Molecular Medicine Reports		
(公表予定) 掲載年月	2016年8月	出版社(等)名	Spandidos Publications