

Title	グルコシルトランスフェラーゼ(GTF)欠失変異株と組換えGTFを用いたStreptococcus mutansのスクロース依存性平滑面付着の解析
Author(s)	松村, 美依子
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42462
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について こちら をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	まつ 村 み え こ 松 村 美 依 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 1 4 5 号
学 位 授 与 年 月 日	平成13年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学 位 論 文 名	グルコシルトランスフェラーゼ (GTF) 欠失変異株と組換え GTF を用いた <i>Streptococcus mutans</i> のスクロース依存性平滑面付着の解析
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 祖父江鎮雄 (副査) 教 授 雫石 聰 講 師 川井 直彦 講 師 中川 一路

論 文 内 容 の 要 旨

う蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* は3種のグルカン合成酵素 (グルコシルトランスフェラーゼ、GTF) を産生し、スクロースから粘着性で不溶性のグルカンを合成する。このグルカンを介して *S. mutans* は歯面に強固に付着し、う蝕発生の基盤となるプラークを形成する。これまでの遺伝子組換えを用いた研究では、この *S. mutans* の産生する GTF のうち、主に不溶性グルカンを合成する GTFC がスクロース依存性平滑面付着に重要であると報告されている。しかしこの GTFC と不溶性グルカンを合成する GTFB あるいは水溶性グルカンを合成する GTFD との相互作用については明らかにされていない。本研究の目的は、スクロース依存性平滑面付着における *S. mutans* の産生する3種の GTF の役割を、*S. mutans* の各 GTF 遺伝子 (*gtfB*、*gtfC*、*gtfD*) を大腸菌に発現させた組換え GTF (rGTF) と、同遺伝子を欠失させた *S. mutans* の GTF 欠失変異株を用いて明確にすることである。

S. mutans の産生する3種の GTF をコードする遺伝子を含むプラスミド pSK 6 (*gtfB*)、pSK16 (*gtfC*)、pYT104 (*gtfD*) を宿主大腸菌に形質転換し、その菌体の超音波破砕物を rGTFs として実験に供試した。各 rGTF のグルカン合成能は [¹⁴C] グルコース標識スクロースを用いて測定し、1 分間に 1 μ mol のグルコース残基をスクロース分子からグルカンに転移する酵素活性を 1 単位 (U) とした。

供試菌として日本人小児よりもっとも高頻度に検出される血清型 c に属する *S. mutans* MT8148株と、MT8148株由来の GTFB、GTFC および GTFD の1種、2種あるいはすべての GTF 遺伝子を欠失させた変異株を用いた。

本実験に供試した各 GTF 欠失変異株において、それぞれの GTF を欠失していることはウェスタンブロット分析により確認した。また、各変異株の培養菌体および培養上清のグルカン合成活性は、GTFD 欠失変異株の菌体における GTF 活性を除くすべてにおいて、親株に比べ有意に低下していた。また培養菌体のスクロース依存性平滑面付着は、親株の MT8148株にくらべ有意に低下していた。特に GTFC を欠失させた変異株において著明な付着率の低下が認められた。

これらの変異株の静止菌体を用いてスクロース依存性平滑面付着を調べると、いずれも親株の MT8148よりも有意に減少していた。そこで1種の GTF を欠失した変異株に、それぞれ対応する rGTF を加えてスクロース依存性平滑面付着を調べたところ、rGTFB では 5 mU、rGTFC では 0.25 mU、rGTFD では 1 mU を反応液に加えたとき最大の付着を示した。また、3種の GTF をすべて欠失した変異株では、親株と同等の付着を獲得するためにはすべての rGTF が必要で、15 mU の rGTFB と 0.75 mU の rGTFC および 3 mU の rGTFD の存在下で最大の付着率を示し

た。

次に、rGTF による不溶性グルカンの合成量とガラス平面への付着率を調べた。不溶性グルカンの合成量は rGTF の量に応じて増加し、その付着率は rGTFB 30 mU、rGTFC 1.5 mU、rGTFD 6 mU のときに最大となった。しかし、rGTFC 1.5 mU と rGTFD 6 mU だけを混合しても多量の不溶性グルカンが合成され、その付着率もきわめて高かった。

以上のように、本研究では *S. mutans* MT8148 株の各 *gtf* 遺伝子を大腸菌に発現させた rGTF と、7 種の GTF 欠失変異株を用いて、*in vitro* において *S. mutans* 静止菌体のスクロース依存性平滑面付着の再構築を試み、以下の結果が得られた。

1. 各 GTF 欠失変異株における静止菌体のスクロース依存性平滑面付着は、親株の *S. mutans* MT8148 株に比べ有意に低下した。
2. GTF 欠失変異株に対応する rGTF を加えるとスクロース依存性平滑面付着は、親株の MT8148 株と同程度にまで回復した。
3. すべての GTF を欠失した変異株を平滑面に付着させるには、すべての GTF が必要で、最も強固な付着は 15 mU の GTFB、0.75 mU の GTFC および 3 mU の GTFD を添加したときに生じた。
4. rGTF の合成する不溶性グルカンの付着能は、反応液中に rGTFB が 30 mU、rGTFC が 1.5 mU、rGTFD が 6 mU 存在するとき最大であった。しかし、GTFC と GTFD を 1 : 4 の割合で混合したとき、GTFB を添加しなくても、不溶性グルカンの平滑面への強い付着が認められた。

これらの結果は、*S. mutans* 菌体の平滑面付着には 3 種の GTF のすべてが必要であるだけでなく、各 GTF の活性比率も重要な役割を果たすことを明らかにしている。また各 GTF がスクロースから合成するグルカンの不溶性と粘着性には、不溶性グルカン合成酵素 GTFC と水溶性グルカン合成酵素 GTFD の共存が不可欠であることを示している。

論文審査の結果の要旨

本研究は、う蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* のスクロース依存性平滑面付着における 3 種のグルカン合成酵素（グルコシルトランスフェラーゼ、GTF）の役割を、組換え GTF と GTF 欠失変異株を用いて調べたものである。その結果、*S. mutans* 菌体の平滑面付着にはすべての GTF が必要であるだけでなく、各 GTF の活性比率も重要な役割を果たすことを明らかにした。また各 GTF が合成するグルカンへの不溶性と粘着性の付与には、不溶性グルカン合成酵素 GTFC と水溶性グルカン合成酵素 GTFD の共存が必須であることを示した。

以上の業績は、う蝕の発生過程における *S. mutans* のスクロース依存性平滑面付着での GTF の役割を解明したものであり、博士（歯学）の学位を得るに値するものと認める。