

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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	まつ 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 μmol 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。