

| | |
|--------------|---|
| Title | Streptococcus mutansビルレンス因子のウーロン茶ポリフェノールによる抑制メカニズムの解析 |
| Author(s) | 仲野, 道代 |
| Citation | 大阪大学, 2000, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/42792 |
| 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 | なかのちよ代 |
| 博士の専攻分野の名称 | 博士(歯学) |
| 学位記番号 | 第15795号 |
| 学位授与年月日 | 平成12年12月6日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第2項該当 |
| 学位論文名 | <i>Streptococcus mutans</i> ビルレンス因子のウーロン茶ポリフェノールによる抑制メカニズムの解析 |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 祖父江鎮雄 |
| | (副査) 教授 浜田 茂幸 講師 河合 啓次 講師 永田 英樹 |

論文内容の要旨

ヒト口腔のう蝕病巣部から常にしかも高頻度に検出される *Streptococcus mutans* が主要な役割を果たしている。このミュータンスレンサ球菌は自ら産生する酵素グルコシルトランスフェラーゼ (GTF) の作用により、スクロースから不溶性で粘着性のグルカンを合成する。

ウーロン茶は紅茶よりも発酵程度の弱い半発酵茶に属する。茶の主要な化学成分は、ポリフェノール、カフェイン、アミノ酸、ビタミンCであるが、発酵の程度により変化する。ウーロン茶では、様々な重合の程度を示すウーロン茶特有のポリフェノールが認められている。近年、ウーロン茶特有のポリフェノールが、実験動物におけるう蝕発生を顕著に抑制することが明らかにされている。このウーロン茶ポリフェノールのう蝕抑制作用は、ミュータンスレンサ球菌の主要な病原因子である GTF への阻害作用にあることが明らかにされている。本研究では、ミュータンスレンサ球菌のさまざまな病原因子に対するウーロン茶ポリフェノールの作用を検討するとともに、その主要な病原因子である GTF に対する阻害効果の機序を明らかにすることを目的とした。

粉末状にしたウーロン茶葉を45%エタノールで室温抽出し、凍結乾燥したものをウーロン茶抽出物 (OTE) として実験に供試した。さらに OTE を合成吸着樹脂カラムクロマトグラフィーで分画し、ウーロン茶ポリフェノールのみを構成成分とする OTF6 を使用した。

本研究で用いたウーロン茶ポリフェノール (OTPP) 標品 OTE と OTF6 は、共に日本人小児より最も高頻度に検出される *S. mutans* を感染させた実験動物において、う蝕発生とプラーク沈着を有意に抑制した。このう蝕抑制作用は極めて明瞭で、OTF6 の飲料水中への50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の投与においてラットのう蝕発生を明確に抑制した。

S. mutans MT8148R 株を OTF6 で処理すると、極めて低濃度で菌体疎水性はほとんど消失し、菌体凝集を引き起こした。また、OTPP の前処理により、*S. mutans* MT8148R 株の唾液被覆ハイドロキシアパタイトへの吸着が明瞭に阻害された。このことはウーロン茶ポリフェノールが *S. mutans* の菌体疎水性を担うタンパク質と結合して、菌体疎水性を低下させ、う蝕発生の最初のステップであるエナメル質表面への初期付着を阻害することを示している。

S. mutans の3種の GTF (GTFB, GTFC, GTFD) のリコンビナントタンパクを用いて、スクロースからのグルカン合成に対する OTPP の阻害効果を検討した。OTPP 添加により、GTFC においてはあまり阻害効果は認められず、GTFB で最も強い阻害効果が認められた。すでに報告されている *S. mutans* GTF のアミノ酸シークエンスによると、GTFB の C 末端側1/3 の領域に繰り返し構造が存在し、この部分がデキストラン結合に関与すると考えられ

ている。デキストラン結合試験で、その結合部位へのデキストランの結合を蛍光標識により視覚化して検討したところ、OTF6で前処理したGTFBへのデキストランの結合は濃度依存的に阻害された。また、GTFDにおいても同様の結果が得られたが、その阻害効果はGTFBよりも弱いものであった。このことは、ウーロン茶ポリフェノールがGTFのデキストラン結合部位へ結合することによりグルカンの合成を阻害していると考えられる。またLine-Weaver Burk plotにより、この阻害は非拮抗阻害であると考えられた。このことは、酵素活性自体を阻害するのではなく、むしろGTFのコンフォーメーションを変化させることにより、阻害を起こすと考えられる。

本研究では、ウーロン茶ポリフェノールが、う蝕原性細菌である*S. mutans*のさまざまな病原因子に及ぼす影響を検討し、以下のことが明らかとなった。

- (1) OTPPは*S. mutans* MT8148R株を感染させたラットにおいて、う蝕の発生とプラーク沈着を有意に抑制した。
- (2) OTPPは*S. mutans* MT8148R株の菌体疎水性を低下させ、菌体凝集を促進し、唾液被覆ハイドロキシアパタイトへの吸着を阻害した。
- (3) OTPPは*S. mutans*の産生するGTFの活性を阻害し、その阻害様式は非拮抗阻害であった。
- (4) OTPPはGTFのデキストラン結合部位へのデキストランの結合を阻害することにより、GTFのグルカン合成を阻害した。

以上の結果より、ウーロン茶ポリフェノールは、*S. mutans*の菌体疎水性の低下、菌体凝集の促進、唾液被覆ハイドロキシアパタイトへの吸着阻害によりエナメル質表面への初期付着を抑制する。加えて、*S. mutans*の産生するグルカン合成酵素GTFBのデキストラン結合部位に結合することによるグルカン合成阻害により、プラーク形成を抑制する、ウーロン茶ポリフェノールは少なくともこの2つの作用により、*S. mutans*のう蝕誘発性を抑制することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ウーロン茶ポリフェノールのう蝕抑制作用を*Streptococcus mutans*の歯面への付着抑制の面から、細菌学的、分子生物学的手法を用いて検討したものである。その結果、ウーロン茶ポリフェノールは、*S. mutans*の菌体疎水性の低下、菌体凝集の促進、唾液被覆ハイドロキシアパタイトへの吸着抑制などの作用を有することを示した。さらに*S. mutans*グルコシルトランスフェラーゼ(GTF)の抑制がデキストラン結合部位に結合することにより発揮されることを明らかにした。これらの結果は、ウーロン茶ポリフェノールは*S. mutans*の菌体並びにGTFに作用し、歯面への付着を抑制することを示唆するものである。

以上の業績は、う蝕の発生過程におけるウーロン茶ポリフェノールの作用機序の一端を明らかにしたものであり、博士(歯学)の学位を得るに値するものと認める。