



Title	Streptococcus mutansの病原性におけるグルカン結合タンパクC (GbpC) の役割 : グルコシルトランスフェラーゼとの相互作用の解析
Author(s)	和泉, 智宏
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43999
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名	い ず み とも ひろ 和 泉 智 宏
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 1 7 7 5 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 15 年 3 月 25 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	<i>Streptococcus mutans</i> の病原性におけるグルカン結合タンパク C (GbpC) の役割 : グルコシルトランスフェラーゼとの相互作用の解析
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 大 嶋 隆 (副査) 教 授 雫 石 聡 助教授 今 里 聡 助教授 川 端 重 忠

論 文 内 容 の 要 旨

目的：う蝕の主要な原因菌である *Streptococcus mutans* の菌体表層には様々なタンパク質が存在する。その一つであるグルカン結合タンパク (Gbp) は、*S. mutans* の主要な病原因子が粘着性で不溶性のグルカンであることから、*S. mutans* の病原性の発現に重要な役割を果たしていると考えられている。*S. mutans* の産生する Gbp には、これまで GbpA、GbpB および GbpC の 3 種が報告されている。特に菌体結合型タンパクである GbpC は、グルカンとの結合だけでなく、歯面への初期付着にも関与していることが報告されている。本研究の目的は、*S. mutans* のう蝕発生における GbpC の役割を明確にするとともに、*S. mutans* の産生する 3 種のグルコシルトランスフェラーゼ (GTF ; GTFB、GTFC、および GTFD) により合成されるグルカンと GbpC との相互作用を解析することである。

方法：(1)供試菌；*S. mutans* MT8148 株 (血清型 c) と、その GbpC を欠失させた変異株 C1、および 3 種の GTF の全てを欠失させた変異株 BC7s を供試した。

(2)変異株の作製；MT8148 株の *gbpA* 遺伝子にエリスロマイシン耐性遺伝子を挿入することにより GbpA を欠失させた変異株 A1 を作製した。また、MT8148 株の全ての GTF を欠失させた変異株 BC7s の *gbpC* 遺伝子にカナマイシン耐性遺伝子を挿入して、全ての GTF と GbpC を欠失した変異株 CM1 を作製した。

(3)う蝕誘発動物実験；供試菌を 5 日間ラット口腔に感染させ、同時にう蝕誘発性飼料を投与し、55 日間飼育した。実験期間中、定期的に供試菌の定着を確認した。屠殺後、上顎臼歯のプラークスコアと全臼歯のう蝕スコアを実体顕微鏡下で計測した。

(4)デキストラン結合能；供試菌の懸濁液を ELISA PLATE に加え、反応させた。洗浄後、ビオチン標識デキストランで反応させ、蒸留水で 3 回洗浄後、ストレプトアビジン・ホースラディッシュペルオキシダーゼを反応させた。洗浄後、発色液を添加し、波長 490 nm でその発色を測定することで各菌体へのデキストラン結合量を判定した。

(5)唾液被覆ヒドロキシアパタイトへの吸着能；唾液処理したヒドロキシアパタイト (SHA) を、セルロースエステルメンブレンフィルターに吸着させた。洗浄後、 $[^3\text{H}]$ チミジンで標識した供試菌の懸濁液を反応させた。洗浄後、メンブレンフィルター上の放射活性をシンチレーションカウンターで測定することにより、SHA に吸着した供試菌の菌量を計測した。

(6)静止菌体のスクロース依存性平滑面付着;37℃で一晩培養した供試菌体を0.05%アジ化ナトリウム存在下で1%スクロース含有0.1 M リン酸緩衝液に懸濁し、波長 550 nm における濁度が 1.0 になるように調整した。この菌液を含むガラス試験管を水平面から 30° に傾けて 37℃で 18 時間静置反応させ、管壁に強固に付着する菌体量を測定することにより、全菌量に対するそのスクロース依存性平滑面付着率を調べた。またこの反応系に一定単位の rGTF を加え、その付着率の変化を調べた。

(7)供試菌と rGTFD 合成グルカンとの結合;波長 550 nm で 1.0 になるようにリン酸緩衝液で調整した供試菌液と、rGTFD により合成された [¹⁴C] グルカンとを反応させて、供試菌体に結合するグルカン量を、放射活性を測定することにより調べた。

(8)rGTF 合成グルカンと rGbpC との反応;各 rGTF 合成グルカンを ELISA PLATE に加え、反応させた。PBST で洗浄後、各濃度の rGbpC を反応させた。反応後洗浄し、5%のウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝液を添加し、37℃で 1 時間静置した。洗浄後、抗 rGbpC 抗体を添加し、37℃で 1 時間反応させた。再び洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識ヤギ抗ウサギ免疫グロブリン抗体を添加し、さらに 37℃で 1 時間反応させた。洗浄後、発色液を添加してその発色を測定した。

結果と考察: GbpC を欠失させた C1 株の唾液被覆ヒドロキシアパタイトへのスクロース非依存性付着能は、MT8148 株と比較して有意に低かった。また、C1 株のスクロース依存性付着能やデキストラン結合能も、親株 MT8148 株と比較して有意に低い値を示した。さらにラットを用いた実験う蝕系における C1 株のう蝕誘発能は、MT8148 株のそれより有意に低下していた。

S. mutans 静止菌体のスクロース依存性付着を調べたところ、MT8148 株、A1 株では rGTFD を添加により有意に付着率の増加を認めた。一方、GbpC を欠失する C1 株では、rGTFD を添加してもその付着率はほとんど変化が認められなかった。また、GTFD 合成グルカンとの結合量を調べると、MT8148 株や BC7s 株においては、それぞれ C1 株や CM1 株と比較して有意に高い結合量が認められた。また、ELISA PLATE を用いて、rGbpC と各 rGTF 合成グルカンとの結合量を調べた結果、rGbpC と、rGTFD 合成グルカンとの結合量は、rGTFB あるいは rGTFC 合成グルカンと比べて明らかに高い値を示した。以上の結果は、GbpC が GTFD の合成するグルカンと結合することにより、スクロース依存性付着に強く関与している可能性の高いことを示している。

結論: *S. mutans* の菌体表層に存在する GbpC は、主に GTFD の合成する水溶性グルカンと結合することにより *S. mutans* のスクロース依存性平滑面付着に関与し、結果として *S. mutans* の病原性に寄与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、う蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* の菌体表層タンパクであるグルカン結合タンパク C (GbpC) の病原性発現における役割を、3 種のグルコシルトランスフェラーゼ (GTFB、GTFC、GTFD) により合成されるグルカンとの相互作用を中心に調べたものである。その結果、GbpC は、主に GTFD の合成する水溶性グルカンと結合することにより *S. mutans* のスクロース依存性平滑面付着に関与し、結果としてその病原性に寄与することが示唆された。

以上の業績は、*S. mutans* のグルカン結合タンパク C のう蝕発生過程における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。