The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	和泉　智宏（いずみ　ともひろ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学位記番号	第　17750　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	***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**
論文審査委員	（主査） 教　授　大嶋　隆 （副査） 教　授　雫石　聰　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}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［^{14}C］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は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。