

Title	Streptococcus mutansグルカン結合タンパクBの生物学的意義
Author(s)	藤田, 一世
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46416">https://hdl.handle.net/11094/46416</a>
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">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</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	藤 田 一 世
博士の専攻分野の名称	博士 (歯 学)
学位記番号	第 20227 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学位論文名	<i>Streptococcus mutans</i> グルカン結合タンパク B の生物学的意義
論文審査委員	(主査) 教授 大嶋 隆 (副査) 教授 零石 聡 助教授 今里 聡 助教授 川端 重忠

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 【研究目的】

う蝕病原性細菌 *Streptococcus mutans* の菌体表層にはグルコシルトランスフェラーゼ (GTF)、高分子タンパク抗原 (Pac)、及びグルカン結合タンパク (Gbp) などのタンパク構成成分が存在し、う蝕との関与が報告されている。Gbp はこれまでに GbpA、GbpB、GbpC、及び GbpD の 4 種が精製され、そのうち GbpA、GbpB、GbpC をコードする遺伝子が特定されている。GbpA は GTF の一つである GTFB と、GbpC は Pac との相同性が高く、*S. mutans* の病原性に関与することが明らかにされている。しかしながら、GbpB はこれまでのところその性状についての報告はほとんどなされていない。本研究では、*S. mutans* MT8148 株の GbpB 欠失株を作製することにより、GbpB の生物学的意義について検討した。

#### 【実験方法】

- (1) *S. mutans* MT8148 株における GbpA、GbpB 及び GbpC 欠失変異株の作製  
*S. mutans* MT8148 株の *gbpA*、*gbpB*、及び *gbpC* 遺伝子に、抗生物質耐性遺伝子を挿入し、遺伝子を不活化することにより、GbpA 欠失株 (AD1)、GbpB 欠失変異株 (BD1)、及び GbpC 欠失変異株 (CD1) を作製した。
- (2) デキストラン結合能：菌を固定し、ピオチン化したデキストランを加え反応させた。洗浄後、ストレプトアビジン・ホースラッディッシュペルオキシダーゼを加え室温で 5 分反応させ、洗浄後発色基質を添加し、波長 490 nm での吸光度を測定した。
- (3) スクロース依存性平滑面付着能：1%スクロース含有リン酸バッファーで波長 550 nm=1.0 に調整した供試菌を 30 度に傾けて 37°C、18 時間培養した。反応後、静止、培養菌体とも試験管壁に強固に付着した菌体の全菌体に対する割合を調べ、付着率とした。
- (4) 耐酸性実験：供試菌を pH 5.0 に調整した培地に播種し、37°C で 2 時間培養し、さらに pH 3.5 に調整した培地に播種し、2 時間培養した。培養後、それぞれを同 pH の寒天培地に播種して、pH 5.0 の寒天培地上のコロニー数に対する pH 3.5 の寒天培地上のコロニー数の割合を求め、耐酸性を調べた。
- (5) 増殖速度：供試菌を THY 中に播種し、その増殖を波長 550 nm の吸光度として経時的に測定し、Doubling time を計算した。
- (6) ラット菌血症モデルでの評価：供試菌を 5 週齢の Sprague Dawley 系ラットの頸静脈に、注射した。その 12、24、

48、72、96、120 時間後に頸静脈より採血を行い、0.1 ml を Mitis Salivarius 寒天培地に播種し、培地上のコロニー数を測定した。また、120 時間後に屠殺し脾臓重量を測定した。

(7) レンサの長さ：供試菌を THY を用いて 18 時間培養後、スライドガラスに塗抹し、ギムザ染色を行いレンサの長さを NIH Image を用いて測定した。

(8) 電子顕微鏡写真：供試菌を BHI 培地で培養し、洗浄後、2.5% グルタルアルデヒドで固定し、3 万倍、10 万倍での菌体の表層を電子顕微鏡で観察した。

#### 【結果および考察】

GbpB を欠失した変異株 BD1 株では、親株 MT8148 株と比較してデキストラン結合能の低下が認められた。しかし、スクロース依存性平滑面付着能の低下は BD1 株では認められなかった。また耐酸性はすべての Gbp 欠失株で低下していた。また増殖曲線より、Doubling time を算定した結果、その増殖速度は BD1 株においてのみ有意に遅延し、レンサの長さも BD1 株でのみ有意な増加が認められた。ラット血液中の生存率や脾臓重量に変化はなかったが、抗生物質感受性は上昇していた。さらに電子顕微鏡写真では、MT8148 株、AD1 株、及び CD1 株の菌体表層においては、ペプチドグリカンとリポタイコ酸の二層が明瞭であるのに対して、BD1 株においては不明瞭であった。

以上の結果は、GbpB の欠失変異株には、*S. mutans* のう蝕原性に深く関与するデキストラン結合能の低下を認めるものの、*S. mutans* の病原性と最も強く相関するスクロース依存性平滑面付着の低下は認められないことから、GbpB がう蝕との関連が明確な GbpA や GbpC ほどには強く *S. mutans* によるう蝕発生に関与していない可能性のあることが示唆された。しかしながら、GbpB 欠失株はその表層にある細胞壁構造が不明瞭となり、Doubling time の遅延、レンサの長さの増加、ヒト多形核白血球による食作用率の低下などの所見を示すことから、GbpB は *S. mutans* 細胞の維持や分裂に関与している可能性の高いことを示唆している。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、*Streptococcus mutans* の菌体表層に存在するグルカン結合タンパク (Gbp) B の欠失変異株を作製し、Gbp の生物学的意義について検討を加えたものである。その結果、GbpB 欠失変異株では細胞壁構造が不明瞭で、野生株に比べて増殖速度の遅延や連鎖の長さの増加が認められた。しかしデキストラン結合能の低下を認めるものの、スクロース依存性平滑面付着の変化は無いことが明らかとなった。このことは、GbpB が GbpA や GbpC のように *S. mutans* の病原性発揮に重要な役割を演じるというよりも、*S. mutans* 細胞の維持や分裂に関与している可能性の高いことを示唆している。以上のことから、本研究はう蝕原性細菌 *S. mutans* の生物学的意義を明らかにする上で重要な示唆を与えるものであり、博士 (歯学) の学位授与に値するものと認める。