

Title	Streptococcus mutans GbpCにおけるグルカン結合の機能解析
Author(s)	高島, 由紀子
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59294
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【30】

氏名	高島由紀子
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 25038 号
学位授与年月日	平成24年3月22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	Streptococcus mutans GbpC におけるグルカン結合の機能解析
論文審査委員	(主査) 教授 大嶋 隆 (副査) 教授 川端 重忠 准教授 永田 英樹 講師 野村由一郎

論文内容の要旨

Streptococcus mutans の表層にはグルコシルトランスフェラーゼ (GTF)、タンパク抗原 *c* (PAc)、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、う蝕の発生に強く関与している。その中で、Gbp はこれまでに4種が発見され、それぞれをコードする遺伝子が決定されている。GbpA は、アミノ酸配列から GTF のグルカン結合領域と高い相同性を持ち、そのグルカン結合領域が特定されている。しかしながら、GbpC においては、Gbp のうち最も強いグルカン結合活性を保有しているが、遺伝子配列における結合領域は明らかとなっていない。本研究の目的は、*gbpC* 遺伝子におけるグルカン結合領域を明らかにすることである。

【材料および方法】

1) 使用細菌

S. mutans の標準株として広く使用されている *S. mutans* MT8148 株とその GbpC 欠失変異株 (CD1) を用いた。

2) リコンビナント GbpC (rGbpC) の発現と精製

GbpC の全長をフラグメント A、デキストラン凝集能に関与していると考えられている部分をフラグメント B、全長からフラグメント B を除いたものをフラグメント C として断片タンパクの作製を行った。制限酵素の認識配列を付加したプライマーを用いて PCR 法にて増幅させた後、この PCR 産物をタンパク発現用ベクター pET42a (+) に挿入し、プラスミドを作製した。作製したプラスミドをタンパク発現用大腸菌 *Escherichia coli* BL21 (DE3) 株に形質転換し、Luria Bertani 液体培地で震盪培養し、遠心分離を行った。得られた菌体を超音波で破砕し、遠心分離した後、上清を GST 融合タンパク質精製用アフィニティゲルを用いてリコンビナント GbpC タンパク (rGbpC) を精製した。

3) 推定グルカン結合領域欠失変異株の作製

GbpC の3次元構造を構築することにより、機能ドメイン5カ所を推定した。推定されたアミノ酸配列を欠失させた GbpC 配列を挿入したシャトルベクターを作製し、CD1 株に形質転換し、それぞれ CDGB1 株、CDGB2 株、CDGB3 株、CDGB4 株、および CDGB5 株とシャトルベクターのみを CD1 株に形質転換した CDE2 株作製し、実験に供試した。

4) デキストラン結合能

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 0.35 nmol になるように調整した各フラグメントタンパクを 96 穴マルチタイタープレートに 4°C で 16 時間固定し、洗浄後ビオチン化したデキストランを加え室温で 10 分反応させた。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。

5) ドットプロット分析

本実験で調整したすべての変異株を含めたすべての供試菌を、培養後、PBS で洗浄し凍結乾燥を行った。この凍結乾燥菌体を PBS で波長 550 nm が 1.5 になるように調整した。この菌液 100 μ l をドットプロットシステムを用いてメンブレンに吸着させ、ビオチン化したデキストランを加えて室温で 10 分反応させた。0.05% トライトン含有 PBS (PBST) にて洗浄後、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室温で 30 分反応させた。さらに PBST にて洗浄後、発色基質を添加し、可視化した。可視化したバンドを NIH image にて解析した。

6) 変異株によるバイオフィルムの構造の比較

すべての供試菌をヘキシジンヨーダイドにより蛍光染色を行い、0.25% スクロース含有化学合成培地で吸光度 600 nm が 0.1 になるように調整した。この菌液をチェンバースライドプレートに播種し、嫌気下で 24 時間、37°C で培養した。培養後、浮遊液を取り除いた後、共焦点走査型レーザー顕微鏡により、形成されたバイオフィルム

の構造を調べた。

【結果】

デキストラン結合能は、フラグメントA とB の結合能は同程度であったが、フラグメントC において結合能は認められなかった。このことから、B 部分が、デキストラン結合能に強く関係することが示唆された。ドットプロット分析におけるデキストラン結合能は、CD1 株、CDGB4 株およびCDE2 株において、MT8148 株と比較して有意に低く、CDGB1 株、CDGB2 株、CDGB3 株、およびCDGB5 株では、MT8148 株と同程度であった。一方、バイオフィルムの構造においては、MT8148 株と比較した場合、CD1 株、CDGB4 株、およびCDE2 株では明らかに密度は疎であり、厚みが減少していた。しかし、CDGB1 株、CDGB2 株、CDGB3 株、およびCDGB5 株においては、CD1 株と比較して、明らかに密度と厚みが増加していたが、MT8148 株よりやや密度、厚みともに低いものであった。

【考察】

フラグメント B のデキストラン結合能が高かったことや、CDGB4 株においてドットプロット分析の結果が有意に下がったことは GB4 の領域が GbpC タンパクのグルカン結合領域である可能性が高いと考えられる。また、バイオフィルムの構造が CDGB4 株において、他の領域欠失株と比較して、CD1 株とほとんど変化がなかったことから、この領域がグルカンの結合に関与していることを示唆している。以上の結果は、GbpC タンパクのグルカン結合領域がアミノ酸配列において全遺伝子配列の中央部付近に存在することを明らかにしている。

論文審査の結果の要旨

本研究は、う蝕原性細菌 *Streptococcus mutans* の グルカン結合タンパク C (GbpC) において、既知の他の細菌の結合タンパクの領域と相似した遺伝子配列を有し、かつ GbpC の 3 次元構造において結合ポケットを形成する 5 領域を抽出し、その欠失変異株のデキストラン結合能とバイオフィルム形成能を調べることにより、そのグルカン結合領域を検討したものである。その結果、GbpC の中央付近の 7 つのアミノ酸 (DPTKTIF) の欠失した変異株においてデキストラン結合能の有意な低下と疎で薄いバイオフィルムの形成を認め、この領域が GbpC におけるグルカン結合領域であることを明らかにした。

以上の結果は、*S. mutans* の GbpC におけるグルカン結合領域を明らかにするものであり、*S. mutans* の病原性を考察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。