

Title	Streptococcus mutans のタンパク質抗原 (PAc) 遺伝子のクローニングとその解析
Author(s)	岡橋, 暢夫
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/36590
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

# 博士論文題名 「<u>Streptococcus</u> <u>mutans</u> のタンパク質抗原

## ( PAc )遺伝子のクローニングとその解析」

# 学位申請者 岡橋暢夫

国立予防衛生研究所

## 歯科衛生部

ヒトあるいは実験動物においてう蝕を誘発する一群のレンサ球菌 は、"<u>Streptococcus mutans</u> グループ"あるいは"mutans streptococci"と総称されている<sup>1),2)</sup>。これら一群のレンサ球菌 は、細胞壁の多糖抗原の血清学的特異性に基づいて <u>a</u> 型から <u>h</u> 型 の 8 型に分けられている。 DNA 中の G+C 含量や DNA/DNA ホモロ ジーの研究などから、"<u>S. mutans</u> グループ"は <u>S. cricetus</u> (<u>a</u>型)、 <u>S. rattus</u> (<u>b</u>型)、 <u>S. mutans</u> (<u>c/e/f</u>型)、 <u>S. sobrinus</u> (<u>d/g</u>型)、<u>S. downei</u> (<u>h</u>型)と分類されている。 さらに、動物由来の <u>S. ferus</u> や <u>S. macacae</u> と命名された菌株が <u>c</u>型多糖抗原を保有することも報告されている<sup>3)</sup>。これら "<u>S. mutans</u> グループ"のうち、世界的にヒトのう蝕病巣からもっと も高頻度で分離されるのは <u>S. mutans</u>、なかでも <u>c</u>型に属する 菌株である<sup>1),2)</sup>。

S. mutans によるう蝕発生の第一段階は、本菌が歯面と接触し、 そこに付着することから始まる<sup>1)</sup>。ひきつづく第二段階では、 S. mutans のグルカン合成酵素系(glucosyltransferase; GTase)によりスクロースから合成される不溶性粘着性グルカンの 産生に伴う不可逆的かつ強固な付着が生じる<sup>4)</sup>。第三段階では、足 場を獲得した S. mutans が歯面上で持続的に生育、増殖し、最終 的には歯質に侵入し、う蝕を誘発する。この、S. mutans と歯面と の相互作用は、う蝕研究の大きな課題のひとつとして、様々な角度 から研究されている<sup>5)</sup>。

第一段階の初期付着に限定して考えても、細菌ならびに宿主の双 方に多くの因子が作用している。細菌側の因子としては、菌体表層 に存在する各種の成分、すなわち、血清型特異多糖抗原、リポタイ コ酸、 GTase 等の酵素タンパク質、各種の構造タンパク質抗原な どを挙げることができる<sup>6)</sup>。一方、歯面(特にエナメル質)には唾 液中のいくつかの糖タンパク質が吸着し、ベリクルが形成される<sup>7)</sup>。 このように、<u>S. mutans</u>の歯面への初期付着は、<u>S. mutans</u>菌体 表層の成分とペリクルとの相互作用により決定されると考えられて いるが、その相互作用の実体については不明な点が多く残されてい る<sup>8)</sup>。

ところで、Lehner らは、サルを用いたう蝕実験の系を用いて <u>S. mutans</u> 菌体上の分子量 190、000 と算定される高分子量タンパ ク質抗原がう蝕抑制のためのワクチンとして有効であることを見出 した<sup>9)</sup>。彼らのグループはその後、この抗原に対するモノクローナ ル抗体を作成し、これを歯面に塗布するだけで受身免疫が成り立つ と報告している<sup>10)、11)</sup>。また、 R. Russell らのグループも独自 に <u>S. mutans</u> の菌体表層タンパク質抗原の研究を行っていたが 、 Lehner らとほぼ同時期にこの高分子量タンパク質抗原がう蝕ワク チンとして有効であることを示唆する結果を報告した<sup>12)</sup>。

このような経緯から、 <u>S. mutans</u> の菌体表層抗原の中でも特に、 高分子量タンパク質抗原が注目を集めるようになった<sup>13)</sup>。 ワクチ ンとして有効であることから考えて、 本抗原が <u>S. mutans</u> の歯面 への定着あるいは歯面上での増殖になんらかの役割を果たしている と考える研究者は多い<sup>13)</sup>。

Moro と M. Russell<sup>14)</sup>、および Ayakawa ら<sup>15)</sup>は、高分子量タ ンパク質抗原に対する抗体を用いた免疫電顕法による観察から、こ の抗原が <u>S. mutans</u> 菌体上の微線毛状構造物(fuzzy coat)を構 成していることを示した。一方、McBride ら<sup>16)</sup>は、<u>S. mutans</u>の 継代培養株からその菌体疎水性が低下したものをえらび、それを親 株と比較した。菌体上のタンパク質の SDS- ポリアクリルアミドゲ ル電気泳動(SDS-PAGE)の結果、疎水性の低下した変異株では分 子量 190,000 のタンパク質が欠落していることを見出した。彼ら は、このタンパク質が既に報告されている高分子量タンパク質抗原 と同じものであろうと述べている。この観察は、高分子量タンパク 質抗原が <u>S. mutans</u> と歯面との間の疎水的相互作用に関わってい ることを示唆するものである。しかし、これらの疎水性が低下した

継代培養株ではタンパク質抗原だけでなくリポタイコ酸や他の菌体 表層物質にも量の変化が起こっていることから、菌体疎水性を高分 子量タンパク質抗原とだけに関連づけるべきではないと考える研究 者もいる<sup>17)</sup>。

この他、高分子量タンパク質抗原に対する抗体が多型核白血球に よる <u>S. mutans</u> の貪食を促進することも報告されている<sup>18)</sup>。こ の知見は、タンパク質抗原が抗食作用をもっていることを示唆する ものである。

本研究では、この高分子量タンパク質抗原の構造をより詳しく知るために、これをコードする遺伝子を <u>c</u> 型 <u>S. mutans</u> からクローニングし、その塩基配列を決定した。なお、この高分子量タンパク 質抗原は研究グループによって I/I1<sup>19)</sup>, B<sup>20)</sup>, IF<sup>21)</sup>, P1<sup>22)</sup>

などと呼ばれており、現時点では、統一されていない。ただし、 これらの抗原が同一のものであることは、 Forester  $6^{22}$ が既に 明らかにしている。本研究では、この抗原を PAc ( protein antigen serotype c )と呼ぶことにする 23)。

1. 菌およびプラスミド

本研究で主として用いた <u>S. mutans</u> MT8148 株(血清型 <u>c</u>)<sup>24)</sup> は、大阪大学歯学部付属病院小児歯科外来患者のう蝕病巣から分離 された菌株である。さらに、比較のため、<u>S. cricetus</u> E49 株(血 清型 <u>a</u>)、<u>S. rattus</u> BHT 株(血清型 <u>b</u>)、<u>S. mutans</u> MT703R 株 (血清型 <u>e</u>)および OMZ175 株(血清型 <u>f</u>)、<u>S. sobrinus</u> B13 株 (血清型 <u>d</u>)および MT3791 株(血清型 <u>g</u>)、<u>S. downei</u> MFe28 株 (血清型 <u>h</u>)、<u>S. sanguis</u> ST3 株および ATCC10557 株、

<u>S. salivarius</u> HHT 株、<u>S. pyogenes</u> SF42 株を供試した。以上の 菌株はいずれも、国立予防衛生研究所歯科衛生部で継代保存されて いるものである。

プラスミドベクターの宿主としては、東京大学医科学研究所細菌 研究部で継代保存されている <u>Escherichia coli</u> JM109株<sup>25)</sup>、 MC1061 株<sup>26)</sup>および MV1184 株(宝酒造、京都)を用いた。 クローニング用プラスミドベクターとしては、pUC118 および pUC119(宝酒造)を用いた。

2. 抗原および抗体

<u>S. mutans</u> MT8148 株の培養上清から DEAE-Sephacel イオン交換 クロマトグラフィーおよび Sepharose CL-6B ゲル濾過で精製した タンパク質抗原 PAc は太田博崇氏(国立予防衛生研究所歯科衛生 部)から恵与された。この精製 PAcをウサギに Freund 完全アジュ バント(Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA)とともに 筋肉内に注射し、抗 PAc 血清を得た。 <u>E. coli</u> に対する非特異的 反応を除くため、抗血清をあらかじめ <u>E. coli</u> JM109 株全菌体で 吸収してから実験に供した。

3. 制限酵素類と反応条件

各種の制限酵素および T4 DNA リガーゼなどの遺伝子研究用試薬 は宝酒造および東洋紡(大阪)から得た。反応条件は各試薬に添付 されている指示書に従った。DNA のアガロース電気泳動用装置は Mupid-2 (コスモ・バイオ、東京)を、アガロースは SeaKem ME (FMC Co., Rockland, Me., USA)を用いた。 DNA 分子量マーカー としては、 $\lambda$  DNA/HindIII (東洋紡)を用いた。

### 4. <u>S. mutans</u> MT8148 からの染色体 DNA の調製

S. mutans MT8148 株を 20 mM D,L-トレオニン (和光純薬、大 阪)を加えた Todd-Hewitt ブロス( TH ブロス:Difco )中で 37°C、18 時間培養した。菌体を遠心によって集め、1 mM エチレン ジアミン四酢酸( EDTA )を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液 ( pH 8.0; 以下、TE 緩衝液と略)で遠心洗浄した。菌体を 20% グルコースを含む TE 緩衝液に浮遊させ、リゾチーム(8 mg/ml; 生化学工業、東京)と、37°C、30分間反応させた。ついで、M1 酵 素<sup>27),28)</sup>(0.1 mg/ml)と50°C、30分間、リボヌクレアーゼA ( 0.3 mg/ml; Sigma Chemicals, St.Louis, Mo., USA )と 37°C、 30分間、ついで、プロナ-ゼ E ( 0.3 mg/ml; 科研化学工業、東 京)と 37℃、30分間、それぞれ反応させた。次に、N-ラウロイル サルコシン酸ナトリウム (Sigma)を最終濃度が 2% となるように 加え、37°Cで 15 分間保温した。遠心して不溶物を除き、フェノー ル・クロロホルム(1:1、v/v)混合溶液による抽出を 3 回、 ついでクロロホルムによる抽出を 2 回行った。DNA を含む水層を TE 緩衝液に対して透析し、4°C で保存した。

### 5. <u>E. coli</u> からのプラスミドの調製

1) 大量精製

プラスミドの大量精製は Sasakawa ら<sup>26)</sup>の記載に基づいて行っ た。 <u>E. coli</u> MC1061 株をアンピシリン(50 μg/ml)を含む LB 培地[バクトトリプトン(Difco)10 g, 酵母エキス(Difco) ' 5 g. NaCl 5 g を 1 リットルの脱イオン水に溶かして、pH 7.2 に 調製]中で37°C, 18 時間培養した。菌体を遠心して集め、5 ml の 25% スクロースを含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 ( pH 8.0 )に浮遊 させ、これに 0.05 ml の リボヌクレアーゼ A ( 5 mg/ml )と 0.5 mlの リゾチーム (10 mg/ml)を 加えて、4°C,5 分間反 応させた。 ついで、2 ml の 0.25 M EDTA ( pH 8.0 ) を加えて 4°C で 10分間放置し、さらに、8 ml のトリトン溶液 ( 0.1% ト リトン X-100 および 0.6 mM EDTA を含む 50 mM トリス緩衝液、 pH 8.0)を加えた。 4°C で 15分間静置後、遠心して不溶物を除き、 上清に 1/9 容量の 5 M NaCl と 0.313 容量の 42% ポリエチレ ン グリコール 6000 (和光純薬、大阪)溶液を加え、 DNA を沈殿さ せた。 4℃ 18 時間放置したのち、遠心によって沈殿を回収し 、 0.5 M NaCl および 50 mM EDTA を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 ( pH 8.0) 4 ml に溶かした。これに、3.6 g の塩化セシウム (和光純薬)および 0.3 ml の臭化エチジウム ( 10 mg/ml、 Sigma )を溶解し、Beckman SW 50.1 ローターを装着した Beckman L8M 超遠心機で 200、000 x g, 40 時間遠心した。遠心終了後、 プラスミドのバンドを紫外線下で確認し、注射器を用いて回収した。 イソプロパノール抽出で臭化エチジウムを除き、これを TE 緩衝液 に対して透析した。

2) 迅速法

アガロース電気泳動などでプラスミドの検出を行うときの迅速法として、Birnboim と Doly の方法<sup>29)</sup>を用いた。アンピシリンを含む LB 培地中で培養した <u>E. coli</u> 菌液 1.5 ml をマイクロチューブにとり、10、000 x g , 5 分で遠心した。菌を 0.1 ml のリゾチーム液(2 mg/ml リゾチーム, 50 mM グルコースおよび 10 mM EDTAを含む 25 mM トリス塩酸緩衝液, pH 8.0)に縣濁し、20°C,5 分間反応させた。 0.2 M NaOH を含む 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)溶液を 0.2 ml 加え、4°C で 10 分間放置したのち、3 M 酢酸ナトリウム(pH 4.8)を 0.15 ml 加え、さらに 4°C で

10 分放置した。これを遠心して得た上清 0.4 ml にエタノール 1 ml を加えてプラスミドを沈殿させた。遠心して回収したプラスミ ドに 0.1 M 酢酸ナトリウムを含む 50 mM トリス酢酸緩衝液 ( pH 7.0 ) 0.4 ml に溶かし再度エタノール沈殿を行った。沈殿 を 70% エタノールで洗ったのち、真空乾燥し、0.1 ml の TE 緩衝 液に溶解した。

6. 一方向欠失変異遺伝子の作成

エキソヌクレアーゼ III を利用した一方向欠失変異遺伝子の作 成には Henikoff の方法<sup>30)</sup>を基にしたキロシークエンス用デレー ションキット(宝酒造)を使った。pUC118 あるいは pUC119 に PAc抗原をコードする遺伝子を挿入したプラスミドを前述の方法で 精製した。この 10 μg を同キットの説明書に従い、 制限酵素 XbaI および KpnI で切断した。 DNA を含む溶液を TE 緩衝液で飽 和したフェノールで一回、ついでクロロホルムで一回抽出した。水 層を別の遠心管に移し、2.5 倍量のエタノールを加えて、 DNA を 沈殿させた。これを遠心によって回収し、さらに 70% エタノール で遠心洗浄した後、真空乾燥した。この DNA を上記キットの エキ ソヌクレアーゼ III緩衝液 ( 0.1 ml )に溶かし、180 単位の エキ ソヌクレアーゼ III を加えた。1 分毎に 10 μ1 反応液を汲み出 し、別に用意した同キットの mung bean ヌクレアーゼ用緩衝液 ( 0.1 ml )に移した。 65°C. 5 分間加熱して反応を止め、50 単 位の mung bean ヌクレアーゼ を入れて 37°C. 60 分間反応させた。 反応後、上述のように、フェノール抽出およびクロロホルム抽出、 エタノール沈殿を行い、 DNA を回収した。これを、同キットの Klenow 酵素用緩衝液(50 μ1)に溶解させ、2 単位の Klenow 酵素を加えて、37°C、15 分間反応させた。反応後、溶液に 2.5 倍量のエタノールを加えて DNA を沈殿させた。上述のようにエタ ノール洗浄後、真空乾燥させた後、 40 μ1 の TE 緩衝液に溶かし、 その 10 μ1 を T4 DNA リガーゼによる結合反応に用いた。

反応後の DNA を形質転換法により <u>E. coli</u> に導入し、アンピシ リン(50 μg/ml)を含む LB 寒天培地で形質転換株を選択した。 得られた形質転換株のプラスミドを迅速法で抽出し、<u>Pst</u>I, <u>Eco</u>RI 等の制限酵素で切断後、アガロース電気泳動によって得られた各々 のプラスミドにおける欠失の大きさを判定した。

### 7. 形質転換法

1) E. coli の形質転換法

<u>E. coli</u>の形質転換は Morrison の方法<sup>31)</sup>に従った。 50 ml の LB 培地で培養した対数増殖期の <u>E. coli</u>を遠心により集菌し、 10 mM CaCl<sub>2</sub>を含む 10 mM MOPS 緩衝液 ( pH 6.8; Sigma )で一回 洗浄した。これを 75 mM CaCl<sub>2</sub>を含む同緩衝液 ( 2.5 ml ) に縣 濁し、4°C で 18 時間放置した。この菌液 0.3 ml に 0.1 - 0.5  $\mu$ g のプラスミド DNA を加えて、 4°C で 45 分間静置した。これ を 42°C で 1 分間加熱した後、3 ml の LB 培地を加えて 37°C で 1 時間培養した。この菌を適当に希釈し、アンピシリン ( 50  $\mu$ g /ml )、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシ ド ( 40  $\mu$ g/ml; Boehringer Mannheim GmbH, West Germany ) お よびイソプロピル- $\beta$ -D-チオガラクトピラノシド ( 0.2 mM ; Boehringer Mannheim )を含む LB 寒天培地に接種した。

2) S. mutans の形質転換法

<u>S. mutans</u> MT8148 株の形質転換法は、 Lindler と Macrina の 方法<sup>32)</sup>を用いた。<u>S. mutans</u> MT8148 株を 10% ウマ血清を含む TH ブロス中でガスパックシステム (BBL Micorbiology Systems, Cockeysville, Md, USA )により、37°C, 18 時間嫌気培養した。 この 50 μ1 を 2 ml の同培地に接種し, 37°C, 4 時間静置培養し た。対数増殖期の菌液 0.3 ml に 10 μg の DNA を加えて更に 1 時間培養を続けた。これを適当に希釈し、エリスロマイシン (5 μg/ml)を含む Mitis-salivarius 寒天培地 (Difco)に接 種した。

8. コロニーイムノブロット法

アンピシリン(50  $\mu$ g/m1)を含む LB 寒天培地上に静置した滅 菌ニトロセルロース膜(BA85, Schleicher & Schnell, Dassel, West Germany)上に、組換え <u>E</u>. <u>coli</u>のコロニーを滅菌つまよう じで接種し、37°C, 18 時間培養した。ニトロセルロース膜をクロ ロホルム蒸気に曝して菌を溶菌させ、5% スキムミルクを含む PBST (0.14 M NaCl と 0.5% ツイーン 20 を含む 0.05 M リン酸緩衝 液、pH 7.2)中で菌残渣を洗い落とし、そのまま 20°C、1 時間 浸した。このニトロセルロース膜を 1000 倍希釈したウサギ抗 PAc 血清と 20°C, 1 時間反応させ、ついで、膜を PBST で洗浄後、さ らに 3,000 倍希釈ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ウサギ IgG (Bio Rad Laboratories, Richmond, Cal., USA) を 20°C, 1 時間反応 させた。再度、膜を洗浄した後、発色基質(0.5 mg/m1 4-クロロ-1-ナフトール, 0.01% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> および 20% メタノールを含む 10mM ト リス塩酸緩衝液、 pH 8.0)を加えて、発色の有無を観察した。

### 9. ゲル内沈降反応

PAc および組換え PAc のゲル内沈降反応は、 0.05 M ベロナー ル緩衝液を含む 1% アガロースゲルを用いて行った<sup>33)</sup>。

# SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とウエスタンブ ロット分析

SDS- ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)は、分離用 ゲルとして、7.5% ポリアクリルアミドゲル、濃縮用ゲルとして、 3% ポリアクリルアミドゲルを使い、Laemmli<sup>34)</sup>の方法に従って行 った。試料の電気泳動は 30 mA で行った。分子量算出のためのマ ーカーとして、低分子量用および高分子量用電気泳動キャリブレー ションキット(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)を 用いた。泳動後、ゲル内のタンパク質バンドをクーマシーブリリア ントブルー R250 ( Sigma )によって染色した。

ウエスタンブロット分析は、Burnette<sup>35)</sup>の記載に従った。SDS-PAGE 後のゲルをニトロセルロース膜に重ね,前後からろ紙、スポ ンジおよびプラスチック板でサンドイッチ状に圧接し、60 mA で終 夜通電してゲル内のタンパク質をニトロセルロース膜に転写した。 このニトロセルロース膜をコロニーイムノブロット法と同様に処理 して抗体と反応するバンドを検出した。

11. E. coli 菌体抽出物の調製

組換え <u>E. coli</u> をアンピシリンを含む LB 培地 (500 ml) で後 期対数増殖期になるまで培養した。菌を遠心によって集め、25 ml の 0.1 mM ふっ化フェニルメチルスルホニル(PMSF; Sigma )を含 む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2)に縣濁した。これを、4°C に冷却した状態で超音波発振器 (UR-200P, トミー精工、東京)に かけ、最大出力で 2 分間超音波破砕した。ヌクレアーゼ P1 (10  $\mu$ g/ml; 生化学工業) で 37°C, 30 分間処理後、不溶物を遠心に よって除き、上清に硫酸アンモニウムを 70% 飽和となるように加 えてタンパク質を沈殿させ、遠心によってこれを集めた。沈殿物を 10 ml の 0.1 mM PMSF を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2)に溶かし、同緩衝液に対して透析した。

12. ニックトランスレーション

DNA の <sup>32</sup>P 標識は、ニックトランスレーション法で行った<sup>36)</sup>。 プローブ用 DNA 1  $\mu$ g を、5  $\mu$ 1 の緩衝液(50 mM MgCl<sub>2</sub> を含む 0.5 M トリス塩酸緩衝液、pH 7.5),5  $\mu$ 1 のヌクレオチドリン酸 溶液(デオキシアデノシン 3 リン酸、デオキシグアノシン 3 リン 酸、デオキシチミジン 3 リン酸、各 0.3 mM;東洋紡)、4  $\mu$ 1 の DN アーゼ I (0.1  $\mu$ g/m1)、4  $\mu$ 1 の DNA ポリメラーゼ I (4 U/ $\mu$ 1),1  $\mu$ 1 の [  $\alpha$ -<sup>32</sup>P ] デオキシシチジン 3 リン酸 (10 mCi/m1; アマシャム・ジャパン、東京)の混合液に加え、全 容量を 50 μ1 とした。この混合液を 14°C で 2 時間反応させた 後、0.25 M EDTA を 5 μ1 入れて反応を停止させた。 Sephadex G-50 ( Pharmacia )の小カラム (0.5 cm x 5 cm )にこれを重層し、 TE 緩衝液で溶出させた。ボイド容量に出てくる標識 DNA 画分を集 めて、ハイブリダイゼーションに用いた。

13. コロニーハイブリダイゼーション

コロニーハイブリダイゼーションは、 Grunstein と Hogness の 記載<sup>37)</sup>に準じて行った。

アンピシリンを含む LB 寒天培地上に滅菌したニトロセルロース 膜をのせ、滅菌つまようじで組換え <u>E. coli</u> を接種した。37°C で 18 時間培養後、ニトロセルロース膜を 0.5 M NaOH 溶液に 10 分 間浸した。膜を 1 M トリス塩酸緩衝液 ( pH 7.4 )に 5 分間浸す 操作を 3 回繰返した後、1.5 M NaCl を含む 0.5 M トリス塩酸緩 衝液に 5分間浸した。ニトロセルロース膜を風乾後、70% エタノー ル、ついで、100% エタノールで洗浄し、再び風乾させ、最後に、 膜を 80°C で 2 時間焼き付け処理した。

ニックトランスレーション法で <sup>32</sup>P 標識したプローブ DNA は、 あらかじめ 100°C, 10 分間加熱し、熱変性させておいた。焼き付 けをしたニトロセルロース膜を 10 ml のハイブリダイゼーション 溶液(50% ホルムアミド, 0.5% SDS, 0.6 M NaCl, および 20 mM EDTAを含むトリス塩酸緩衝液、pH 7.9 )に浸した。これにプローブ DNA(10<sup>5</sup> cpm)を加え、42°C, 24 時間ハイブリダイゼーション 反応を行わせた。反応後、ニトロセルロース膜を 50% ホルムアミ ドを含む 2 x SSC(0.3 M NaCl, 0.03 M クエン酸ナトリウム)溶 液で 4 回、ついで、2 x SSC 溶液で 2 回洗浄した。ニトロセルロ ース膜を風乾させた後、サランラップをかけ、X 線用フィルム(コ ダック X-Omat AR; Eastman Kodak, Rochester, N.Y., USA)を用 いて、-70°C で 18 時間オートラジオグラフィーを行った。 14. サザンブロット法

サザンブロット法は Southern の方法<sup>38)</sup>に準じて行った。制限 酵素で切断した DNA 断片のアガロース電気泳動を行い、そのゲル を 0.25 M 塩酸中に 20°C, 15 分間浸し脱イオン水で 2 回洗浄し た。次に、ゲルを 1.5 M NaCl を含む 0.5 M NaOH 中に 20°C, 30 分間浸した。脱イオン水で洗浄後、3 M NaCl を含む 0.5 M トリス 塩酸緩衝液に浸して 20°C, 30 分間放置した。これをManiatis ら の記載<sup>36)</sup>に従って、20 x SSC ( 3 M NaCl, 0.3 M クエン酸ナトリ ウム)に浸したろ紙上にのせ、その上にニトロセルロース膜、ろ紙 の順にのせた。ペーパータオルをその上に 5 cm の高さになるよう に重ね、約 1 kg の重しをした。20°C で 18 時間転写を行ったあ と、ニトロセルロース膜を取り出し、2 x SSC で 2 回洗浄した。 これを風乾した後、 80°C で 2時間焼き付け、コロニーハイブリダ イゼーション法と同様に <sup>32</sup>P 標識プローブと反応させた。

15. アミノ酸シークエネーターによるアミノ酸配列決定

<u>S. mutans</u> MT8148 株の精製 PAc (0.5 mg)を 60 μ1 の 0.5% SDS 溶液に溶かした。 PAc のアミノ酸配列を Edman 分解の原理 に基づいて、アミノ末端側から気相型シークエネーター (モデル 470A, Applied Biosystems, Forester City, Cal., USA )で順次決 定した。

16. 塩基配列決定法

1) 一本鎖 DNA の調製

pUC118 あるいは pUC119 に塩基配列を決定する遺伝子断片を挿 入したプラスミドベクターを作成し、形質転換法により、 <u>E. coli</u> MV1184 株に導入した。これを、アンピシリン( 150 μg/ml )と チアミン( 0.01%)を含む 2 x YT 培地( バクトペプトン 16 g, 酵母エキス 10 g, NaCl 5 g を 1 リットルの脱イオン水に溶かし 、 pH 7.6 とした)で、37°C, 18 時間前培養した。 3 ml の 2 x YT 培地に前培養液 30 μl を接種し、培養を続けた。 550 nm の 吸 光度が 0.2 になった時点でヘルパーファージ M13 K07 (10<sup>10</sup>

pfu/ml; 宝酒造) 30 μl を加えた。 37°C, 30 分間培養した後、 70 μg/ml となるようにカナマイシン硫酸塩(和光純薬)を加え、 そのまま 37°C, 18 時間培養した。

培養液を遠心(8,000 x g, 5 分間)して菌体を除き、上清 1 ml を別のマイクロチューブにとった。これに、 0.2 ml の 20% ポリエチレングリコール 6000 を含む 2.5 M NaCl を加え、20°C, 15 分間静置した。遠心分離により上清を除き、沈殿を 0.1 ml の TE 緩衝液に溶かした。これにフェノール抽出、クロロホルム抽出 およびエタノール沈殿を行って、一本鎖 DNA を得た。

2) 塩基配列決定

塩基配列決定のために、7-DEAZA シークエンスキット(宝酒造) を利用し、キットの指示書に従って実験を行った。これは、 Sanger のジデオキシ法<sup>39)</sup>を基にした Mizusawa らの改良法<sup>40)</sup>を 利用したものである。マイクロチューブに 5  $\mu$ 1 (1  $\mu$ g)の一本 鎖 DNA、1.5  $\mu$ 1 の濃縮緩衝液、1  $\mu$ 1 のプライマー溶液および 蒸留水を加えて全量を 12  $\mu$ 1 とした。これと別のチューブに四種 類のデオキシヌクレオチド混合溶液をそれぞれ 2  $\mu$ 1 ずつ分注し ておいた。上記の一本鎖 DNA プライマー混合溶液に 2  $\mu$ 1 の [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S] デオキシシチジン 3 リン酸(10 mCi/m1; アマシャム) と 1  $\mu$ 1 (2 U)の Klenow 酵素を加え、混合した後、3.4  $\mu$ 1 ず つ四種類のデオキシヌクレオチド溶液に加えた。 25°C, 30 分間反 応させた後、同キットのチェイス溶液 1  $\mu$ 1 を加えて、更に20 分 間反応させた。

反応溶液に、 6 μ1 のホルムアミド液( 0.1% キシレンシアノ ール、0.1% ブロムフェノールブルーを含む 95% ホルムアミド)を 加え、95°C, 3 分間加熱した後、急冷し、ただちに電気泳動に用い た。電気泳動用ゲルはフジジェンサーゲルシート( S0802; 富士写 真フィルム、東京)を用い、フジ水冷式電気泳動装置( GW2040; 富士写真フィルム)に装着して泳動を行った。サンプルは 2 μ1 ずつ重層し、 2500 V で 3 時間泳動した。泳動後、ゲルをろ紙に 密着させ、ゲル乾燥器(アト- AE-3700; アトー、東京)で乾燥さ せた後、コロニーハイブリダイゼーションと同様にオートラジオグ ラフィーを行った。

3) PAc ポリペプチドの構造解析

得られた塩基配列結果の解析には、DNASIS ソフトウェアパッケ -ジ(日立ソフトエンジニアリング、東京)を使用した。疎水性プ ロットは、Kyte と Doolittle の方法<sup>41)</sup>により、ポリペプチド中 の各アミノ酸残基固有の疎水性度を基にして表示した。タンパク質 二次構造の推定には Chou と Fasman の方法<sup>42)</sup>を利用した。これ は、エックス線結晶構造解析されたタンパク質の二次構造のデータ に基づいて、あるアミノ酸配列が、どのような二次構造を取るかを 推定するものである。

## 17. エリスロマイシン耐性遺伝子の挿入による PAc 欠損 株の作成

S. sanguis のエリスロマイシン耐性プラスミド ( pVA1 ) <sup>43</sup> 由 来のエリスロマイシン耐性遺伝子 ( Em<sup>r</sup> )を持つトランスポソン

MudE<sup>14)</sup> は H. K. Kuramitsu 博士 (Northwestern 大学、 Chicago, Ili., USA )から恵与を受けた。この MudE トランスポ ソンは、グラム陰性菌の mini-Mu トランスポソン(pBC4041)<sup>45)</sup> にグラム陽性菌で発現する Em<sup>r</sup> を組み込んだものである。MudE を <u>Bam</u>HI で切断し、Em<sup>r</sup> を含む 1.8 kb の断片を調製した。この断 片をフェノール抽出およびクロロホルム抽出によって精製し、

pPC12 の <u>pac</u> 遺伝子中に存在する <u>Bg1</u>II サイトに挿入した。こ うして得られたプラスミドを <u>Pst</u>I で切断した後、<u>S. mutans</u> MT8148 株に形質転換法で導入した。

18. 菌体疎水性の測定

菌体の疎水性は、Rosenberg ら<sup>46)</sup>の方法を参考にして測定した。
Brain heart infusion ブロス(Difco)で培養した菌体を
550 nm での吸光度が 0.6 となるように PUM 緩衝液(pH 7.1;
K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·3H<sub>2</sub>O 22.2 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 7.26 g, 尿素 1.8 g および
MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g を 1 リットルの脱イオン水)に浮遊させた。この菌浮遊液 3 ml に n-ヘキサデカン(東京化成工業、東京)
0.3 ml を加え、ボルテックスミキサーで 1 分間混和した。 20°C
で 15 分間静置した後、アスピレーターで上層のヘキサデカン層を
除き、水層の吸光度を波長 550 nm で測定した。菌体の疎水性は、
以下のようにヘキサデカンを加える前の原浮遊液の吸光度に対する
水層の吸光度の割合(%)であらわした。

疎水性=-(原液の吸光度-試験液の吸光度)/(原液の吸光度) x 100(%) 結果

 <u>S. mutans</u> MT8148 株の染色体 DNA <u>Pst</u>I ライブラリーの作 製と抗 PAc 血清を用いたスクリーニング

<u>S. mutans</u> MT8148 株染色体 DNA を制限酵素 <u>Pst</u>I で切断し、そ れをプラスミドベクター pUC118 の <u>Pst</u>I 部位に連結した。得られ たキメラプラスミドを <u>E. coli</u> JM109 株に形質転換法で導入した 。 約 5、000 個の組換え <u>E. coli</u> について、PAc を発現しているか否 かをウサギ抗 PAc 血清を用いたコロニーイムノブロット法でス ク リーニングした。その結果、6 個の反応陽性クローンが見出された。 これらのクローンからプラスミド DNA を抽出し、<u>Pst</u>I で切断し、 アガロース電気泳動を行った。その結果、いずれのクローンも pUC 118 に約 3.8 キロ塩基対 (kb)の大きさの <u>S. mutans</u> DNA 断片 が挿入されていることがわかった(図1)。



図1 抗 PAc 血清反応陽性 <u>E. coli</u> クローンのプラスミドの分析。
 反応陽性組換え <u>E. coli</u> からプラスミドを抽出し、制限酵素 <u>Pst</u>I で切断後、アガロース電気泳動を行った。 A, プラスミドベクター pUC118; B, <u>S. mutans</u> DNA 由来の 3.8 kb
 断片。 1, pUC118; 2 - 7, 組換えプラスミド。

これら 6 個の組換え <u>E. coli</u> クローンの菌体抽出物をウエスタ ンプロット法で分析すると、いずれのクローンも抗 PAc 血清と反 応する分子量 95、000 のタンパク質を産生していることが示された。 これらのプラスミドの一つを選び、pPC12 と命名して、以下の研究 に用いた。

2. タンパク質抗原をコードする遺伝子の位置と方向

pPC12 の発現するタンパク質抗原の分子量( 95、000 )が、 <u>S. mutans</u> の天然型 PAc の約半分に過ぎないのは、クローニング された 3.8 kb の DNA 断片が完全な PAc 構造遺伝子( <u>pac</u> )を含 有していないためと考えられる。そこで、 <u>pac</u> 遺伝子の残りの部 分をクローニングするため、pPC12 中の 組換え遺伝子の位置と方 向の決定を行った。

まず、pPC12 の制限酵素地図を作成し、<u>S. mutans</u> DNA 由来の 3.8 kb 断片中に <u>Sac</u>I 部位と <u>Hin</u>dIII 部位がそれぞれひとつ存在 することを見出した(図2)。 pPC12 を <u>Sac</u>I あるいは <u>Hin</u>dIII で切断し、それぞれ 0.7 kb, 0.6 kb の断片を取り除いた上で再結 合させた(図2、del.S および del.H)。このふたつの欠失変異プ ラスミドを <u>E. coli</u> MC1061 株に導入し、ウエスタンブロット法で それぞれが産生する抗原の分子量を測定すると、<u>Hin</u>dIII 0.6 kb 断片を欠失した del.H は pPC12 と同じ分子量 95,000 の抗原を産 生していたが、<u>Sac</u>I 0.7 kb 断片を欠落した del.S の抗原は分子 量が 60,000 と小さくなっていた。

つぎに、 pPC12 中の 3.8 kb DNA に エキソヌクレアーゼ III を作用させ、一連の一方向欠失変異遺伝子を作成した。これらの欠 失変異遺伝子を有する <u>E. coli</u> からプラスミドを抽出し、<u>Pst</u>I で 切断したあと、アガロース電気泳動によってそれぞれの欠失の大き さを測定した。約 500 塩基対 ( bp )ずつ削除された一連のクロー ンを選び(図2、del.1 から del.6)、それぞれについてウエスタ ンブロット法で抗原の産生を調べた。図2に見られるように、 del.1 から del.3 は元の pPC12 と同じ分子量 95、000 の抗原を産 生していた。一方、 del.4 から del.6 のクローンは全く抗原を産 生していなかった。

これらの結果から、<u>pac</u> 遺伝子は pPC12 中の 3.8 kb DNA の中 央部 <u>Hin</u>dIII 側から始まって <u>Sac</u>I 側へ続いていると考えられた 。 さらに、pUCJ18 の lac プロモーターに対して逆向きに 3.8 kb DNA を挿入しても抗原の産生は影響をうけなかったので、この DNA 断片中に <u>S. mutans</u> 由来のプロモーターが存在していると推測さ



.

図2 pPC12 の制限酵素地図と pPC12 の欠失変異遺伝子が産生す る抗原の分子量。プラスミド pPC12 は <u>S. mutans</u> MT8148 株の 3.8 kb DNA 断片を pUC118 のマルチクローニングサイ トに連結して作成した。欠失遺伝子の欠失部分は点線で示し た。これらのプラスミドが発現する抗原はウエスタンブロッ ト法で分析した。 れた。以上の結果から、 pPC12 中 3.8 kb DNA に存在する <u>pac</u> 遺 伝子は PAc 抗原の N 末端側約半分に対応するものと考えられた。

### 3. 完全な pac 遺伝子の構築

<u>S. mutans</u> MT8148 株染色体 DNA を <u>Sac</u>I で切断し、サザンハイ ブリダイゼーションを行うと、約 4 kb の大きさの DNA 断片が pPC12 の <u>PstI-Sac</u>I 0.7 kb 断片とハイブリダイズすることが見出 された(図3)。先に推定した <u>pac</u> 遺伝子の方向から、この約 4 kb の SacI 断片上に pac 遺伝子の残りの部分が存在すると考えら



pac 遺伝子

図3 PAc の C 末端側に対応する遺伝子のクローニング。 <u>S. mutans</u> MT8148 株 DNA の <u>Sac</u>I ライブラリーを作成し、 pPC12 の <u>PstI-Sac</u>I 断片をプローブとしてコロニーハイブ リダイゼーションを行った。

れた。そこで、MT8148 株の染色体 DNA を <u>Sac</u>I で切断し、アガロ ース電気泳動後 5 - 3 kb の大きさの DNA を切りだし、 pUC118 に連結した。得られた形質転換株を pPC12 の 0.7 kb <u>PstI-Sac</u>I 断片をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションでスクリー ニングした結果、約 300 個のクローンから 22 個の反応陽性クロ ーンが得られた。これらのクローンのプラスミドには、いずれも
 4.2 kb の SacI 断片が挿入されていた。そのひとつ、pPC31 を完全な pac 遺伝子の構築に用いた。

図3に示すように、pPC31 を <u>Sac</u>I で切断後、pPC12 の <u>Sac</u>I 部 位に連結し、 これを <u>E. coli</u> MC1061 株に形質転換法で導入した 。 得られた形質転換株からプラスミドを抽出し、アガロース電気泳動 によってその大きさを測定した。約 7.5 kb の挿入 DNA を有す る プラスミドを持つクローンを選んで、産生する抗原の大きさをウエ スタンブロット法で調べた。約半数のクローンが SDS-PAGE 上で分 子量 が210、000 から 190、000 にわたる高分子量抗原を産生してい た。これらのクローンのプラスミドのひとつを pPC41 と名付け た。 pPC41 の制限酵素地図を図4に示す。



図4 pPC41 の制限酵素地図。太線は <u>S. mutans</u> MT8148 株由来 の 7.5 kb DNA 断片。点線はプラスミドベクター pUC118。 B, <u>Bam</u>HI; Bg, <u>Bg1</u>II; E, <u>Eco</u>RI; E14, <u>Eco</u>T14J; H, HindIII; P, <u>Pst</u>I; S, <u>Sac</u>I.

### 4. 組換え PAc の性状

<u>E. coli</u> (pPC41)が産生する組換え PAc (Coli PAc)の SDS-PAGE の結果を図5に示した。 Coli PAc は SDS-PAGE 上で <u>S</u>. mutans 由来の PAc より分子量が若干大きい複数のポリペプチドと して現われた。ウェスタンブロットの結果、この複数のポリペプチ ドはいずれも <u>S. mutans</u> 由来の PAc と同様、抗 PAc 血清と反応 した。なお、 <u>E. coli</u> ( pUC118 )の菌体抽出物には、抗 PAc 血清 と反応するタンパク質は見出されなかった。

Coli PAc と <u>S. mutans</u> 由来の PAc の免疫学的特異性をゲル内 沈降反応によって比較した(図6)。ウサギ抗 PAc 血清に対し、 Coli PAc は <u>S. mutans</u> PAc と互いに融合する沈降線を形成し、 Coli PAc の免疫学的特異性は <u>S. mutans</u> PAc のそれと同一である ことが明らかになった。なお、PAc の N 末端側約半分を発現して いると考えられる pPC12 の産生抗原による沈降線はごく弱いもの であった。



 図5 <u>E. coli</u> (pPC41) が発現する組換え抗原(Coli PAc)のウエスタンブロット分析。
 A: クーマシーブリリアントブルー染色。 B: ウサギ抗血 清によるウエスタンブロット分析。 1, <u>S. mutans</u> MT8148
 株精製 PAc. 2, E. coli (pUC118)の菌体抽出物.



図6 <u>E. coli</u> (pPC41)が発現する PAc のゲル内沈降反応。1, <u>E. coli</u> (pUC118)の菌体抽出物; 2、<u>S. mutans</u>の精製 PAc; 3, <u>E. coli</u> (pPC41)の菌体抽出物; 4、<u>E. coli</u> (pPC12)の菌体抽出物. A, ウサギ抗 PAc 血清.

### 5. pac 遺伝子と相同性のある遺伝子の分布

<u>pac</u> 遺伝子と相同性のある遺伝子が他のレンサ球菌に存在するか 否かを、サザンブロット法で調べた。 プローブとして pPC12 の <u>Sac</u>I-<u>Eco</u>T14I 断片(1.7 kb)を用いた。 図4から、この断片は PAc の N 末端に相当すると考えられる。pPC12 を <u>Sac</u>I および <u>Eco</u>T14I で切断し、アガロース電気泳動後、1.7 kb の断片を切り だした。これをニックトランスレーション法で<sup>32</sup>P 標識し、プロ ーブとした。各種のレンサ球菌の染色体 DNA を <u>S. mutans</u> MT8148 株のそれと同様に抽出し、<u>Eco</u>RI で切断した。これをアガロース電 気泳動後、ニトロセルロース膜に転写し、雑種核酸分子の形成(ハ イブリダイゼーション)の有無を調べた。

図7に示すように、pac プローブは <u>S. mutans</u> MT8148 株(血清 型 <u>c</u> )の DNA の他、 <u>S. mutans</u> MT703R 株(血清型 <u>e</u> )および OMZ175 株(血清型 f )の DNA とハイブリダイズしたが、他のレ





図7 各種口腔レンサ球菌 DNA と pac 遺伝子のサザンハイブリダ イゼーション。 pPC41 中の <u>S. mutans</u> 由来 7.3 kb DNA 断 片のうち、プローブとして用いた部分は黒で示した。矢印は <u>pac</u> 遺伝子の位置と方向。 1, <u>S. cricetus</u> E49 (血清型 <u>a</u>); 2, <u>S. rattus</u> BHT (血清型 <u>b</u>); 3, <u>S. mutans</u> MT8148 (血清型 <u>c</u>); 4, <u>S. sobrinus</u> B13 (血清型 <u>d</u>); 5, <u>S. mutans</u> MT703R (血清型 <u>e</u>); 6, <u>S. mutans</u> OMZ175 (血清型 <u>f</u>); 7, <u>S. sobrinus</u> MT3791 (血清型 <u>g</u>); 8, <u>S. downei</u> MFe28 (血清型 <u>h</u>); 9, <u>S. sanguis</u> ATCC10557; 10, <u>S. sanguis</u> ST3; 11, <u>S. salivarius</u> HHT; 12, S. pyogenes SF42.

### 6. pac 遺伝子の塩基配列

<u>pac</u> 遺伝子の塩基配列決定のために、pPC12 および pPC31 のサ ブクローンを作成し、それぞれ両方向から塩基配列決定を行った。 図8に <u>pac</u> 遺伝子を含む 5、169 bp より成る塩基配列を示した。 <u>pac</u> 遺伝子に対応するオープンリーデイングフレームは 200 番目 の ATG 開始コドンから 4895 番目までで、その大きさは 4、696 bp であった。この他には、タンパク質をコードしうるオープンリーデ イングフレームは見出されなかった。 ATG 開始コドンの 4 bp 上 流には Shine-Dalgarno 配列<sup>47)</sup> とみられる GGAGG 配列が認められ、 さらに、 -10 および -35 プロモーター配列<sup>48)</sup> と考えられる配列 がその上流に存在していた。

#### 7. PAc の構造

塩基配列から推定される PAc のアミノ酸配列を図8に示す。 pac 遺伝子がコードするタンパク質は 1、565 アミノ酸からなる分 子量 170、773 のタンパク質であった。このアミノ酸配列の正当性 を確認するため、精製 <u>S. mutans</u> PAc の N 末端アミノ酸配列の一 部をアミノ酸シークエネーターで求めた。その結果は塩基配列から 求めたアミノ酸配列の 39 番目から 48 番目(Asp-39 - Asp-48) と一致していた。 Met-1 から Ala-38 までのアミノ酸配列にはグ ラム陽性菌のシグナルペプチドの特徴が認められた<sup>49)</sup>。すなわち、 N 末端側に塩基性アミノ酸が多く、その後に疎水性アミノ酸が並ん でいた。さらにアラニンのカルボキシル基側で切断されることも多 くの報告と一致する<sup>49)</sup>。 アミノ酸シークエネーターによる分析結 果と併せ考え、 Met-1 から Ala-38までがシグナルペプチドである と結論された。

	т	TTG	TGC	TTT	AGA	ATT	AAT	GTT	GGA	TAA	AGT	GTG	GAG	TTT	GTG	стс	46
47	GAA	<b>A</b>	TAG	CAG	CGA	TTG	AAT	GTG	TTT	ATA	ATT	CTG	ATT	CAG	ACA	TTA	94
95	GTT	TTT	ATT	TCA	GCA	<b>A</b> A A	А <u>ТТ</u>	<u>gac</u> -35	<u> </u>	TCA	AAT	CAA	TTA	TAT	<u>tac</u> -1	<u>аат</u> 0	142
143	TTT	TTA	ACG	TAT	ATT	ACA	AAA	ATA	TAT	TTG	GAA	GAT	TTA	ттс	AGA	TTT	190
191	<u>gga</u> SD	GGA	ттт	ATG Met	AAA Lys	GTC Val	AAA Lys	AAA Lys	ACT Thr	TAC Tyr	GGT Gly	TTT Phe	CGT Arg	AAA Lys	AGT Ser	AAA Lys	238 13
239 14	ATT 11e	AGT Ser	AAA Lys	ACA Thr	CTG Leu	TGT Cys	GGT Gly	GCT Ala	GTT Val	CTA Leu	GGA Gly	ACA Thr	GTA Val	GCA Ala	GCA Ala	GTC Val	286 29
287 30	TCT Ser	GTA Val	GCA Ala	GGA Gly	CAA Gln	AAG Lys	GTT Val	TTT Phe	GCC Ala	GAT Asp	GAA Glu	ACG Thr	ACC Thr	ACT Thr	ACT Thr	AGT Ser	334 45
335 46	GAT Asp	GTA Val	GAT Asp	ACT Thr	AAA Lys	GTA Val	GTT Val	GGA Gly	ACA Thr	CAA Gln	ACT Thr	GGA Gly	AAT Asn	CCA Pro	GCG Ala	ACC Thr	382 61
383 62	AAT Asn	TTG Leu	ССА Рго	GAG Glu	GCT Ala	CAA Gln	GGG Gly	AGT Ser	GCG Ala	AGT Ser	AAG Lys	GAA Glu	GCT Ala	GAA Glu	CAA Gln	AGT Ser	430 77
431 78	CAA Gln	ACC Thr	AAG Lys	CTG Leu	GAG Glu	AGA Arg	CAA Gln	ATG Met	GTT Val	CAT His	ACC Thr	ATT Ile	GAA Glu	GTA Val	CCT Pro	AAA Lys	478 93
479 94	ACT Thr	GAT Asp	CTT Leu	GAT Asp	CAA Gln	GCA Ala	GCA Ala	AAA Lys	GAT Asp	GCT Ala	AAG Lys	TCT Ser	GCT Ala	GGT Gly	GTC Val	AAT Asn	526 109
527 110	GTT Val	GTC Val	CAA Gln	GAT Asp	GCC Ala	GAT Asp	GTT Val	AAT Asn	AAA Lys	GGA Gly	ACT Thr	GTT Val	AAA Lys	ACA Thr	CCT Pro	GAA Glu	574 125
575 126	GAA Glu	GCA Ala	GTC Val	CAA Gln	AAA Lys	GAA Glu	ACT Thr	GAA Glu	ATT Ile	AAA Lys	GAA Glu	GAT Asp	TAC Tyr	ACA Thr	AAA Lys	CAA Gln	622 141
623 142	GCT Ala	GAG Glu	GAT Asp	ATT Ile	AAG Lys	AAG Lys	ACA Thr	ACA Thr	GAT Asp	CAA Gln	TAT Tyr	AAA Lys	TCG Ser	GAT Asp	GTA Val	GCT Ala	670 157
671 158	GCT Ala	CAT His	GAG Glu	GCA Ala	GAA Glu	GTT Val	GCT Ala	AAA Lys	ATC 11e	AAA Lys	GCT Ala	AAA Lys	AAT Asn	CAG Gln	GCA Ala	ACT Thr	718 173
719 174	AAA Lys	GAA Glu	CAG Gln	ТАТ Туг	GAA Glu	AAA Lys	GAT Asp	ATG Met	GCA Ala	GCT Ala	CAT His	AAA Lys	GCC Ala	GAG Glu	GTT Val	GAA Glu	766 189
767 190	CGC Arg	ATT Ile	AAT Asn	GCT Ala	GCA Ala	AAT Asn	GCT Ala	GCC Ala	AGT Ser	AAA Lys	ACA Thr	GCT Ala	TAT Tyr	GAA Glu - A-	GCT Ala 1	AAA Lys	814 205
815 206	TTG Leu	GCT Ala	CAA Gln	TAT Tyr	CAA Gln	GCA Ala	GAT Asp	TTA Leu	GCA Ala	GCC Ala	GTT Val	CAA Gln	AAA Lys	ACC Thr	AAT Asn	GCT Ala	862 221
863 222	GCC Ala	AAT Asn	CAA Gln	GCA Ala	GCC Ala	TAT Tyr	CAA Gln	AAA Lys	GCC Ala	CTT Leu	GCT Ala	GCT Ala	TAT Tyr	CAG Gln	GCT Ala	GAA Glu	910 237
911 238	CTG Leu	AAA Lys	CGT	GTT Val	CAG Gln	GAA Glu	GCT Ala	AAT Asn	GCA Ala	GCC Ala	GCC Ala	AAA Lys	GCC Ala	GCT Ala	TAT Tyr	GAT Asp	958 253
959 254	ACT	GCT Ala	GTA Val	GCA Ala	GCA Ala	AAT Asn	AAT Asn	GCC Ala	AAA Lys	AAT Asn	ACA Thr	GAA Glu	ATT Ile	GCC Ala	GCT Ala	GCC Ala	1006 269
270	AAI Asn	GAA Glu	GAA Glu	Ile	AGA Arg	AAA Lys	CGC Arg	AAT Asn	GCA Ala	ACG Thr	Ala	AAA Lys	GCT Ala	GAA Glu	TAT Tyr	GAG Glu A-2	1054 285
286	Thr	AAG Lys	Leu	Ala	GIN	TAT Tyr	Gln	GCT Ala	GAA Glu	Leu	AAG Lys	CGT Arg	GTT Val	CAG Gln	GAA Giu	GCT Ala	1102 301
302	Asi	Ala	Ala	Asn	GAA Glu	Ala	Asp	Tyr	Gin	Ala	Lys	Leu	Thr	Ala	Tat Tyr	Gin	1150 317
318	Thr	GIU	Leu	Ala	Arg	Val	Gln	Lys	Ala	AAT	Ala	GAT Asp	Ala	Lys	GCG Ala	ACC Thr	1198 333
334	Tyr	GIU	Ala	Ala	Val	Ala	Ala	Asn	AAT	Ala	Lys	AAT	Ala Ala	GCA Ala	Leu	ACA Thr	1246 349
350	Ala	Glu	Asn	Thr	Ala	lle	Lys	Gin	Arg	Asn	Glu	AAI Asn	Ala	Lys	Ala	Thr	365
366	Tyr	GIU - A-	Ala 3	Ala	Leu	Lys	Gln	Tyr	Glu	Ala	Asp	Leu	Ala	Ala TTC	Val	Lys	1342 381
382	Lys	Ala	AA I As n	Ala	Ala	Asn	Glu	Ala	Asp	Tyr	Gln	Ala	Lys	Leu	Thr	Ala	397

TAT CAA ACA GAG CTC GCT CGC GTT CAA AAA GCC AAT GCG GAT GCT AAA 398 Tyr Gin Thr Glu Leu Ala Arg Val Gin Lys Ala Asn Ala Asp Ala Lys 1439 GCG GCC TAT GAA GCA GCT GTA GCA GCA AAT AAT GCC GCA AAT GCA GCG 414 Ala Ala Tyr Glu Ala Ala Val Ala Ala Asn Asn Ala Ala Asn Ala Ala 1487 CTC ACA GCT GAA AAT ACT GCA ATT AAG AAG CGC AAT GCG GAT GCT AAA Leu Thr Ala Glu Asn Thr Ala Ile Lys Lys Arg Asn Ala Asp Ala Lys GCT GAT TAC GAA GCA AAA CTT GCT AAG TAT CAA GCA GAT CTT GCC AAA Ala Asp Tyr Glu Ala Lys Leu Ala Lys Tyr Gln Ala Asp Leu Ala Lys 1583 TAT CAA AAA GAT TTA GCA GAC TAT CCA GTT AAG TTA AAG GCA TAC GAA Tyr Gln Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Pro Val Lys Leu Lys Ala Tyr Glu GAT GAA CAA ACT TCT ATT AAA GCT GCA CTG GCA GAA CTT GAA AAA CAT 478 Asp Glu Gln Thr Ser Ile Lys Ala Ala Leu Ala Glu Leu Glu Lys His AAA AAT GAA GAC GGA AAC TTA ACA GAA CCA TCT GCT CAA AAT TTG GTC Lys Asn Glu Asp Gly Asn Leu Thr Glu Pro Ser Ala Gln Asn Leu Val 1727 TAT GAT CTT GAG CCA AAT GCG AAC TTA TCT TTG ACA ACA GAT GGG AAG 510 Tyr Asp Leu Glu Pro Asn Ala Asn Leu Ser Leu Thr Thr Asp Gly Lys TTC CTT AAG GCT TCT GCT GTG GAT GAT GCT TTT AGC AAA AGC ACT TCA Phe Leu Lys Ala Ser Ala Val Asp Asp Ala Phe Ser Lys Ser Thr Ser AAA GCA AAA TAT GAC CAA AAA ATT CTT CAA TTA GAT GAT CTA GAT ATC Lys Ala Lys Tyr Asp Gin Lys lie Leu Gin Leu Asp Asp Leu Asp lie ACT AAC TTA GAA CAA TCT AAT GAT GTT GCT TCT TCT ATG GAG CTT TAT Thr Asn Leu Glu Gln Ser Asn Asp Val Ala Ser Ser Met Glu Leu Tyr GGG AAT TTT GGT GAT AAA GCT GGC TGG TCA ACG ACA GTA AGC AAT AAC 574 Gly Asn Phe Gly Asp Lys Ala Gly Trp Ser Thr Thr Val Ser Asn Asn 1967 TCA CAG GTT AAA TGG GGA TCG GTA CTT TTA GAG CGC GGT CAA AGC GCA 590 Ser Gin Val Lys Trp Gly Ser Val Leu Leu Giu Arg Gly Gin Ser Ala ACA GCT ACA TAC ACT AAC CTG CAG AAT TCT TAT TAC AAT GGT AAA AAG Thr Ala Thr Tyr Thr Asn Leu Gln Asn Ser Tyr Tyr Asn Gly Lys Lys ATT TCT AAA ATT GTC TAC AAG TAT ACA GTG GAC CCT AAG TCC AAG TTT Ile Ser Lys Ile Val Tyr Lys Tyr Thr Val Asp Pro Lys Ser Lys Phe CAA GGT CAA AAG GTT TGG TTA GGT ATT TIT ACC GAT CCA ACT TTA GGT Gin Gly Gin Lys Val Trp Leu Gly Ile Phe Thr Asp Pro Thr Leu Gly GTT TTT GCT TCT GCT TAT ACA GGT CAA GTT GAA AAA AAC ACT TCT ATT 654 Val Phe Ala Ser Ala Tyr Thr Gly Gln Val Glu Lys Asn Thr Ser Ile TIT ATT AAA AAT GAA TTC ACT TTC TAT CAC GAA GAT GAA AAA CCA ATT Phe lle Lys Asn Glu Phe Thr Phe Tyr His Glu Asp Glu Lys Pro Ile AAT TIT GAT AAT GCC CTT CTC TCA GTG ACT TCT CTT AAC CGT GAA CAT Asn Phe Asp Asn Ala Leu Leu Ser Val Thr Ser Leu Asn Arg Glu His 2303 AAC TCT ATT GAG ATG GCT AAA GAT TAT AGT GGT AAA TTT GTC AAA ATC Asn Ser Ile Glu Met Ala Lys Asp Tyr Ser Gly Lys Phe Val Lys Ile TCT GGT TCA TCT ATT GGT GAA AAG AAT GGC ATG ATT TAT GCT ACA GAT Ser Gly Ser Ser Ile Gly Glu Lys Asn Gly Met Ile Tyr Ala Thr Asp ACT CTT AAC TTT AAA CAG GGT GAA GGT GGC TCT CGC TGG ACT ATG TAT Thr Leu Asn Phe Lys Gln Gly Glu Gly Gly Ser Arg Trp Thr Met Tyr AAA AAT AGT CAA GCT GGT TCA GGA TGG GAT AGT TCA GAT GCG CCG AAT Lys Asn Ser Gln Ala Gly Ser Gly Trp Asp Ser Ser Asp Ala Pro Asn TCT TGG TAT GGA GCA GGG GCT ATT AAA ATG TCT GGT CCG AAT AAC CAT Ser Trp Tyr Gly Ala Gly Ala Ile Lys Met Ser Gly Pro Asn Asn His GTT ACT GTA GGA GCA ACT TCT GCA ACA AAT GTA ATG CCA GTT TCT GAC Val Thr Val Gly Ala Thr Ser Ala Thr Asn Val Met Pro Val Ser Asp ATG CCT GTT GTT CCT GGT AAG GAC AAT ACT GAT GGC AAA AAA CCA AAT Met Pro Val Val Pro Gly Lys Asp Asn Thr Asp Gly Lys Lys Pro Asn ATT TGG TAT TCT TTA AAT GGT AAA ATC CGT GCG GTT AAT GTT CCT AAA Ile Trp Tyr Ser Leu Asn Gly Lys Ile Arg Ala Val Asn Val Pro Lys GTT ACT ANG GAA AAA CCC ACA CCT CCG GTT AAA CCA ACA GCT CCA ACT Val Thr Lys Glu Lys Pro Thr Pro Pro Val Lys Pro Thr Ala Pro Thr 2735 AAA CCA ACT TAT GAA ACA GAA AAG CCA TTA AAA CCG GCA CCA GTA GCT 846 Lys Pro Thr Tyr Glu Thr Glu Lys Pro Leu Lys Pro Ala Pro Val Ala 

.

						- D.	_1											
2783	CCA	AAT	TAT	GAA	AAG	GAG	CCA	ACA	CCG	CCG	ACA	AGG	ACA	CCG	GAT	CAA	2830	
862	Pro	As n	Tyr	Glu	Lys	GI u	Pro	Thr	Pro	Pro	Thr	Arg	Thr	Pro	Asp	Gln	877	
2831 878	GCA Ala	GAG Glu	CCA Pro	AAC As n	AAA Lys	CCC Pro	ACA Thr	CCG Pro	CCG Pro	ACC Thr	TAT Tyr	GAA Glu	ACA	GAA Glu	AAG Lys	CCG Pro	2878 893	
2879 894	TTG Leu	GAG Glu	CCA Pro	GCA Ala	CCT Pro	GTT Val	GAG Glu	CCA Pro	AGC Ser	TAT Tyr	GAA Glu	GCA Ala	GAG	CCA Pro	ACA Thr	CCG Pro	2926 909	
2927	CCG	ACA	AGG	ACA	CCG	GAT	CAG	GCA	GAG	CCA	AAT	AAA	CCC	ACA	CCG	CCG	2974	
910	Pro	Thr	Arg	Thr	Pro	Asp	Gìn	Ala	Glu	Pro	Asn	Lys	Pro	Thr	Pro	Pro	925	
2975	ACC	TAT	GAA	ACA	GAA	AAG	CCG	TTG	GAG	CCA	GCA	CCT	GTT	GAG	CCA	AGC	3022	
926	Thr	Tyr	Glu	Thr	Glu	Lys	Pro	Leu	Glu	Pro	Ala	Pro	Val	Glu	Pro	Ser	941	
3023	TAT	GAA	GCA	GAG	CCA	ACG	CCA	CCG	ACA	CCA	ACA	CCA	GAT	CAA	CCA	GAA	3070	
942	Tyr	Glu	Ala	Glu	Pro	Thr	Pro	Pro	Thr	Pro	Thr	Pro	Asp	Gln	Pro	Glu	957	
3071	CCA	AAC	AAA	CCT	GTT	GAG	CCA	ACT	TAT	GAG	GTT	ATT	ССА	ACA	CCG	CCG	3118	
958	Pro	Asn	Lys	Pro	Val	Glu	Pro	Thr	Tyr	Glu	Val	11e	Рго	Thr	Pro	Pro	973	
3119	ACT	GAT	CCT	GTT	TAT	CAA	GAT	CTT	CCA	ACA	CCT	CCA	TCT	GAT	CCA	ACT	3166	
974	Thr	Asp	Pro	Val	Tyr	Gln	Asp	Leu	Pro	Thr	Pro	Pro	Ser	Asp	Pro	Thr	989	
3167	GTT	CAT	TTC	CAT	TAC	TTT	AAA	CTA	GCT	GTT	CAG	CCG	CAG	GTT	AAC	AAA	3214	
990	Val	His	Phe	His	Tyr	Phe	Lys	Leu	Ala	Val	Gln	Pro	Gln	Val	Asn	Lys	1005	
3215	GAA	ATT	AGA	AAC	AAT	AAC	GAT	ATT	AAT	ATT	GAC	AGA	ACT	TTG	GTG	GCT	3262	
1006	Glu	Ile	Arg	Asn	Asn	Asn	Asp	11e	Asn	Ile	Asp	Arg	Thr	Leu	Val	Ala	1021	
3263	AAA	CAA	TCT	GTT	GTT	AAG	TTC	CAG	CTG	AAG	ACA	GCA	GAT	CTC	CCT	GCT	3310	
1022	Lys	Gln	Ser	Val	Val	Lys	Phe	Gln	Leu	Lys	Thr	Ala	Asp	Leu	Pro	Ala	1037	
3311	GGA	CGT	GAT	GAA	ACC	ACT	TCC	TTT	GTC	TTG	GTA	GAT	CCC	CTG	CCA	TCT	3358	
1038	Gly	Arg	Asp	Glu	Thr	Thr	Ser	Phe	Val	Leu	Val	Asp	Pro	Leu	Pro	Ser	1053	
3359	GGT	ТАТ	CAA	TTT	AAT	CCT	GAA	GCT	ACA	AAA	GCT	GCA	AGC	CCT	GGC	TTT	3406	
1054	Gly	Туг	Glri	Phe	Ásn	Pro	Glu	Ala	Thr	Lys	Ala	Ala	Ser	Pro	Gly	Phe	1069	
3407	GAT	GTC	ACT	TAT	GAT	AAT	GCA	ACT	AAT	ACA	GTC.	ACC	TTC	AAG	GCA	ACT	3454	
1070	Asp	Val	Thr	Tyr	Asp	Asn	Ala	Thr	Asn	Thr	Val	Thr	Phe	Lys	Ala	Thr	1085	
3455	GCA	GCA	ACT	TTG	GCT	ACG	TTT	AAT	GCT	GAT	TTG	ACT	AAG	TCA	GTG	GCA	3502	
1086	Ala	Ala	Thr	Leu	Ala	Thr	Phe	Asn	Ala	Asp	Leu	Thr	Lys	Ser	Val	Ala	1101	
3503	ACG	ATT	TAT	CCA	ACA	GTG	GTC	GGA	CAA	GTT	CTT	AAT	GAT	GGC	GCA	ACT	3550	
1102	Thr	Ile	Tyr	Pro	Thr	Val	Val	Gly	Gln	Val	Leu	Asn	Asp	Gly	Ala	Thr	1117	
3551 1118	TAT Tyr	AAG Lys	AAT Asn	AAT Asn	TTC Phe	ACG Thr	CTC Leu	ACA Thr	GTC Val	AAT Asn	GAT Asp	GCT Ala	TAT Tyr	GGC Gly	ATT	AAA Lys	3598 1133	
3599	TCC	AAT	GTT	GTT	CGG	GTG	ACA	ACT	CCT	GGT	AAA	CCA	AAT	GAT	CCA	GAT	3646	
1134	Ser	Asn	Val	Val	Arg	Val	Thr	Thr	Pro	Gly	Lys	Pro	Asn	Asp	Pro	Asp	1149	
3647	AAT	CCA	AAT	AAT	AAT	TAT	ATT	AAA	CCA	ACT	AAG	GTT	AAT	AAA	AAC	GAA	3694	
1150	Asn	Pro	Asn	Asn	Asn	Tyr	Ile	Lys	Pro	Thr	Lys	Val	Asn	Lys	Asn	Glu	1165	
3695	AAT	GGC	GTT	GTT	ATT	GAT	GGT	AAA	ACA	GTT	CTT	GCC	GGT	TCA	ACG	AAT	3742	
1166	Asn	Gly	Val	Val	11e	Asp	Gly	Lys	Thr	Val	Leu	Ala	Gly	Ser	Thr	Asn	1181	
3743	TAT	TAT	GAG	CTA	ACT	TGG	GAT	TTG	GAT	CAA	TAT	AAA	AAC	GAC	CGC	TCT	3790	
1182	Tyr	Tyr	Glu	Leu	Thr	Trp	Asp	Leu	Asp	Gln	Tyr	Lys	Asn	Asp	Arg	Ser	1197	
3791	TCA	GCA	GAT	ACC	ATT	CAA	AAA	GGA	TTT	TAC	TAT	GTA	GAT	GAT	TAT	CCA	3838	
1198	Ser	Ala	Asp	Thr	Ile	Gln	Lys	Gly	Phe	Tyr	Tyr	Val	Asp	Asp	Tyr	Pro	1213	
3839	GAA	GAA	GCG	CTT	GAA	TTG	CGT	CAG	GAT	TTA	GTG	AAG	ATT	ACA	GAT	GCT	3886	
1214	Glu	Glu	Ala	Leu	Glu	Leu	Arg	Gln	Asp	Leu	Val	Lys	Ile	Thr	Asp	Ala	1229	
3887	AAT	GGT	AAT	GAA	GTT	ACT	GGT	GTT	AGT	GTG	GAT	AAT	TAT	ACT	AAT	CTT	3934	
1230	Asn	Gly	Asn	Glu	Val	Thr	Gly	Val	Ser	Val	Asp	Asn	Tyr	Thr	Asn	Leu	1245	
3935 1246	GAA Glu	GCA Ala	GCC Ala	Pro	CAA Gln	GAA Glu	ATT Ile	AGA Arg	GAT Asp	GTT Val	CTT Leu	TCT Ser	AAG Lys	GCA Ala	GGA Gly	ATT Ile	3982 1261	
1262	AGA Arg	Pro	AAA Lys	GGT Gly	GCT	Phe	GIN	ATT 11e	TTC Phe	CGT Arg	GCC Ala	GAT Asp	AAT Asn	CCA Pro	AGA Arg	GAA Glu	4030 1277	
1278	Phe	Tyr	GAT Asp	ACT Thr	Tyr	Val	AAA Lys	ACT Thr	GGA Gly	ATT	GAT Asp	TTG Leu	AAG Lys	ATT	GTA Val	TCA Ser	4078 1293	
4079	Pro	Met	Val	Val	Lys	AAA Lys	Gln	ATG Met	GGA Gly	CAA Gln	ACA Thr	GGC Gly	GGC Gly	AGT Ser	TAT Tyr	GAA Glu	4126 1309	
1310	Asn	Gin	Ala	TAC Tyr	Gln	ATT 11e	GAC Asp	fTT Phe	GGT Gly	AAT Asn	GGT Gly	TAT Tyr	GCA Ala	TCA Ser	AAT Asn	ATC Ile	4174 1325	

4175 GTT ATC AAT AAT GTT CCT AAG ATT AAC CCT AAG AAA GAT GTG ACC TTA 4222 1326 Val Ile Asn Asn Val Pro Lys Ile Asn Pro Lys Lys Asp Val Thr Leu 1341 ACA CTT GAT CCG GCT GAT ACA AAT AAT GTT GAT GGT CAG ACT ATT CCA Thr Leu Asp Pro Ala Asp Thr Asn Asn Val Asp Gly Gln Thr lie Pro 4223 4270 1342 1357 4271 CIT AAT ACA GTC TTT AAT TAC CGT TTG ATT GGT GGC ATT ATC CCT GCA 4318 1358 Leu Asn Thr Val Phe Asn Tyr Arg Leu Ile Gly Gly Ile Ile Pro Ala 1373 AAT CAC TCA GAA GAA CTC TTT GAA TAC AAT TTC TAT GAT GAT TAT GAT 4319 4366 1374 Asn His Ser Glu Glu Leu Phe Glu Tyr Asn Phe Tyr Asp Asp Tyr Asp 1389 4367 CAA ACA GGA GAT CAC TAT ACT GGT CAG TAT AAA GTT TTT GCC AAG GTT 4414 1390 Gln Thr Gly Asp His Tyr Thr Gly Gln Tyr Lys Val Phe Ala Lys Val 1405 GAT ATC ACT CTT AAA AAC GGT GTT ATT ATC AAG TCA GGT ACT GAG TTA 4415 4462 1406 Asp lie Thr Leu Lys Asn Gly Val lie lie Lys Ser Gly Thr Glu Leu 1421 ACT CAG TAT ACG ACA GCG GAA GTT GAT ACC ACT AAA GGT GCT ATC ACA 4463 4510 1422 Thr Gln Tyr Thr Thr Ala Glu Val Asp Thr Thr Lys Gly Ala Ile Thr 1437 4511 ATT AAG TTC AAG GAA GCC TTT CTG CGT TCT GTT TCA ATT GAT TCA GCC 4558 Ile Lys Phe Lys Glu Ala Phe Leu Arg Ser Val Ser Ile Asp Ser Ala 1438 1453 4559 TTC CAA GCT GAA AGT TAT ATC CAA ATG AAA CGT ATT GCG GTT GGT ACT 4606 1454 Phe Gln Ala Glu Ser Tyr Ile Gln Met Lys Arg Ile Ala Val Gly Thr 1469 4607 TTT GAA AAT ACC TAT ATT AAT ACT GTC AAT GGG GTA ACT TAC AGT TCA 4654 1470 Phe Glu Asn Thr Tyr Ile Asn Thr Val Asn Gly Val Thr Tyr Ser Ser 1485 AAT ACA GTG AAA ACA ACT ACT CCT GAG GAT CCT GCA GAC CCT ACT GAT 4655 4702 1486 Asn Thr Val Lys Thr Thr Thr Pro Glu Asp Pro Ala Asp Pro Thr Asp 1501 4703 CCG CAA GAT CCA TCA TCA CCG CGG ACT TCA ACT GTA ATT ATC TAC AAA 4750 Pro Gln Asp Pro Ser Ser Pro Arg Thr Ser Thr Val lle Ile Tyr Lys 1502 1517 4751 CCT CAA TCA ACT GCT TAT CAG CCA AGC TCT GTT CAA GAA ACA TTA CCA 4798 1518 Pro Gln Ser Thr Ala Tyr Gln Pro Ser Ser Val Gln Glu Thr Leu Pro 1533 4799 AAT ACG GGA GTA ACA AAC AAT GCT TAT ATG CCT TTA CTT GGT ATT ATT 4846 Asn Thr Gly Val Thr Asn Asn Ala Tyr Met Pro Leu Leu Gly Ile Ile 1534 1549 4847 GGC TTA GTT ACT AGT TIT AGT TTG CTT GGT TTA AAG GCT AAG AAA GAT 1550 Gly Leu Val Thr Ser Phe Ser Leu Leu Gly Leu Lys Ala Lys Lys Asp 4894 1565 4895 TGA CAG CAT AGA CAT TAC ATT AGA ATT AAA AAG TGA GAT AGA AGC GAT 4942 1566 \*\*\* 4943 AAA TCA CAG ATT GAG CTT TTA TCT CAT TTT TTG ATT AAT TAA AAG AGA 4990 . 4991 AAT AAC TAG CCT ATC TIT GTT CTA TTA AAA AAA CAG TTA TGC TTA AAT 5038 5039 AGG AAT ATC ATT AAC CAA TTT TAG CAA AAC GAT CAT TTA GTG TGA GTT 5086 5087 TTT AAC TAT CTT TCT TAA AGA AAA AAT GCT ATA ATA TTT TAG TTG CAC 5134 5135 ATT ACT AAC GTT TGA TAA GGT ACT TCG CAC TGC CTT

図8 pac 遺伝子の塩基配列とそれから推定されるアミノ酸配列。
 下線-35と-10はプロモーターと考えられる領域<sup>480</sup>。
 下線 SD は Shine-Dalgarno 配列<sup>470</sup>。矢印はシグナルペプ
 チドの切断位置と考えられる位置。2つの繰返しドメインは
 カッコで示した(A-1, -2, -3 および P-1, -2, -3)。
 3'下流のターミネーター様配列を矢印で示した。

PAc の構成アミノ酸の相同性プロット(図9)から PAc には 2 ケ所の繰返し構造(図9; A-1, A-2, A-3 および P-1, P-2, P-3)が存在することが示された。ひとつは N 末端側に存在し、82 アミノ酸からなる構造単位が 3 つ並んでいると考えられた( A-繰 返しドメイン、図10A)。この構造の特徴は、構成アミノ酸のう ち特にアラニンが多いことであった。A-繰返しドメインとその近傍 ( Ala-157 から Ala-488 )では全アミノ酸のうちアラニンが 32% を占めていた。さらに、Chou と Fasman の方法<sup>42)</sup>によると、A-繰 返しドメイン を含む PAc の約 4 分の 1 は、 α-ヘリックス構造 を取る傾向の強いアラニン残基やグルタミン酸残基が多く、ほぼ完 全にα- ヘリックス構造を取っていると推定された。

ふたつめの繰返し構造は PAc の中央 C 末端側寄りに存在した。 これは 39 アミノ酸からなる構造が 2.5 個並んでいると考えられ た ( P-繰返しドメイン、図10B). P-繰返しドメイン とその近



図9 PAc のアミノ酸配列の相同性プロット。縦軸、横軸とも PAc のアミノ酸配列。数字はアミノ酸残基数。10個のアミノ酸 のうち8個が一致する箇所に点が現われる。

傍(Pro-835 から Pro-985)では全アミノ酸のうちプロリンが 30 % を占めていた。PAc の C 末端側にもプロリンの多い小領域が存 在し(Pro-1、493 から Pro-1、508)、16 残基のうち 6 個がプロ リンであった。

> Α A1 219 TNAANQAAYQKALAAYQAELKRVQEANAAAKAAYDTAVAANNAKNTEIAA 301 ANAANEADYQAKLTAYQTELARVQKANADAKATYEAAVAANNAKNAALTA A2 383 ANAANEADYQAKLTAYQTELARVQKANADAKAAYEAAVAANNAANAALTA A3 . 一致するアミノ酸の割合 269 ANEEIRKRNATAKAEYETKLAQYQAELKRVQE : : :: ::: : : : : : : 48/82 351 ENTAIKORNENAKATYEAALKOYEADLAAVKK 69/82 \*\*\*\*\*\* \*\* \*\*\* \*\*\* \* \* \*\*\*\* \* \* 433 ENTAIKKRNADAKADYEAKLAKYQADLAKYQK B P1 867 EPTPPTRTPDQAEPNKPTPPTYETEKPLEPAPVEPSYEA 39/39 P2 906 EPTPPTRTPDQAEPNKPTPPTYETEKPLEPAPVEPSYEA 19/23 P3 945 EPTPPTPTPDQPEPNKPVEPTYE

図10 繰返しドメイン中の単位構造の比較。A,A 繰返しドメイン;B,P 繰返しドメイン。左端の数字はアミノ酸残基数。

PAc の 疎水性プロットの結果が図11である。この図から、 N 末端側と C 末端側の両方に疎水性の高い領域があることがわかっ た。このうち、 N 末端側の疎水性領域はシグナルペプチドに相当 していた。 C 末端側の領域は、ブドウ球菌の プロテイン A<sup>50)</sup> や A 群レンサ球菌の M タンパク<sup>49)</sup>と同様、タンパク質抗原を膜に 固定するアンカーとしての働きがあると考えられる。

塩基配列から推定された PAc のアミノ酸組成を <u>S. mutans</u> Ingbritt 株から Forester ら<sup>22)</sup>が精製した P1 抗原( PAc と同 一抗原)のそれと比較したところ、PAc の推定アミノ酸組成は P1 のそれと良い一致を示した(表1)。

以上の結果をまとめて PAc の構造をモデル化したものを図12 に示した。



図11 PAc の一次構造から推定される疎水性。 Kyte と Doolittle の方法<sup>41)</sup>により、 PAc の疎水性をプロットし た。 Index は疎水性の指標。5がもっとも疎水性で-5 がもっとも親水性。

•	塩基配列か			
アミノ酸	PrePAc <sup>a</sup>	MatPAc <sup>D</sup>	精製 Pl	抗原
		(mol %)		
Gly	4.60	4.45	5.6	
Ala	12.33	12.31	12.0	
Val	6.96	6.75	5.6	
Leu	5.37	5.37	4.9	
Ile	3.96	3.99	3.4	
Ser	5.11	5.04	6.4	
Thr	9.58	9.63	8.7	
Cys	0.06	0.00	0	
Met	0.89	0.85	1.0	
Asx	13.55	13.88	13.4	
Glx	11.37	11.60	13.0	
Arg	1.98	1.96	1.9	
Lys	9.20	8.97	8.8	
His	0.70	0.72	1.0	
Phe	2.36	2.29	2.3	
Tyr	5.05	5.11	4.5	
Trp	0.51	0.52	_d	
Pro	6.39	6.55	6.6	

表1 PAc のアミノ酸組成

a. シグナルペプチドを含む PAc 前駆体

b. 成熟 PAc

c. Forester ら<sup>22)</sup>の報告から

d. 記載なし



図12 PAc の構造モデル。 PAc は 1,565 のアミノ酸より成り、 分子量の理論値は 170,773 となる。 8. PAc 欠損株の作成とその菌体疎水性

PAc が <u>S. mutans</u> の菌体疎水性に関与しているのかどうかを明 らかにするために、PAc を欠損する変異体を作成した。クローニン グした <u>pac</u> 遺伝子の途中に Em' 遺伝子を挿入し、これを <u>S.</u> <u>mutans</u> MT8148 株に形質転換で導入した(図13)。得られた Em'

株は、組換えの結果、染色体 DNA 上の pac 遺伝子の途中に Em<sup>-</sup> 遺伝子が挿入されており、PAc の N 末端側に相当する分子量約 6 万の不完全なポリペプチドを産生するに過ぎない。得られた変異株



図13 エリスロマイシン耐性遺伝子(Em<sup>\*</sup>)の挿入による pac 遺伝子の変異と PAc 欠損株の作成。Em<sup>\*</sup>をコードする 1.8 kb の BamHI 断片を pPC12 の BglII 部位に挿入し た。作成したプラスミドを PstI で切断し、S. mutans MT8148 株に形質転換した。組換えを起こした株はエリス ロマイシン耐性株として選択された。略号、 B: BamHI; Bg, BglII; P, PstI; S, SacI. のうち、2株(PAcEm-2 および PAcEm-3)を選び、サザンハイブ リダイゼーションで染色体 DNA 中に Em' 遺伝子が挿入されている ことを確かめた(図14)。この2株の菌体疎水性をヘキサデカ ン法で測定した結果を表2に示す。PAcEm-2、 PAcEm-3 株の菌体 疎水性は いずれも MT8148 株と比べて極めて低いことが明らかに された。

分子 <u>乱</u> (kb)	123		
23 -			
9.4 -			
6.7 -	<b>39 4</b> 07		
4.4 -		⊠14	PAc 欠損株における染色体 DNA 中の Em「遺伝子の検出。染色体 DNA を
2.3 - 2.2 -			<u>Eco</u> RI で切断し、1.8 kb Em' 遺伝子を <sup>32</sup> P で標識してサザンブロット分析を行った。 1, <u>S. mutans</u> MT8148 株; 2、PAcEm-2 株; 3、PAcEm-3 株。

### 表2 エリスロマイシン耐性遺伝子挿入による タンパク質抗原欠損株の疎水性

株名	菌体疎水性
<u> </u>	ヘキサテカンへの吸着比(%)
MT8148	29.5 <u>+</u> 3.6
PAcEm-2	4.9 <u>+</u> 1.5
PAcEm-3	7.1 <u>+</u> 2.7

菌液 3 ml にヘキサデカン 0.3 ml を加え、 ボルテックスミキサーで混和した。混和前後の 菌液の吸光度の差からヘキサデカン層に吸着された 菌の割合を求めた。吸着比:平均値 <u>+</u> SD、
考察

S. mutans の高分子量タンパク質抗原 PAc の構造を解明するために、これをコードする遺伝子のクローニングを行った。はじめにクローニングした PstI 断片とコロニーハイブリダイゼーションでクローニングした SacI 断片を連結して、最終的に 7.5 kb の完全な pac 遺伝子を含む DNA をクローニングすることができた。 7.5 kb という比較的長い遺伝子のため、クローニングの間に DNA 断片の一部が欠落する恐れもあった。そこで、MT8148 株の染色体DNA と pPC41 を各種の制限酵素で切断し、サザンハイブリダイゼーションで両方の DNA 断片の長さを比較した。その結果、各断片の長さに差は認められず、クローニングした遺伝子に欠落などはないと結論された。

<u>pac</u> 遺伝子は <u>E. coli</u> 中で発現し、SDS-PAGE 上での分子量が <u>S. mutans</u> 由来の PAc より若干大きい抗原 ( Coli PAc )を産生し た。 Coli PAc の免疫学的特異性は <u>S. mutans</u> 由来の PAc と同じ であることが、ゲル内沈降反応で示された。これらの結果もクロー ニングした遺伝子が完全なものであることを支持している。Coli PAc の SDS-PAGE 上の分子量が <u>S. mutans</u> の培養上清から精製し た PAc のそれよりも若干大きい理由として、<u>S. mutans</u> の PAc が <u>S. mutans</u> 自身のプロテアーゼによりシグナルペプチドの削除な どのプロセシングを受けていることが考えられる。また、 Coli PAc のタンパク質バンドが SDS-PAGE 上で 複数検出されるという 実験結果は、 Coli PAc もまた <u>E. coli</u> のプロテアーゼによって 別の形のプロセシングを受けていることを示唆している。 なお、 <u>E. coli</u> が産生する組換えタンパク質が SDS-PAGE 上で複数のバン ドを示す例は、 A 群レンサ球菌の M タンパクなどでも報告されて いる<sup>51)</sup>。

Lee ら<sup>52)</sup> はごく最近、<u>S. mutans</u> NG5 株(血清型 <u>c</u>)から P1 抗原 ( PAc と同一抗原)の遺伝子 ( <u>spa</u>P1 )をクローニングした 。

35

クローニングした DNA 断片の長さは 5.2 kb であり、発現する 抗 原の分子量は SDS-PAGE 上で 185,000 から 160,000 にわたってい た。また、ゲル内沈降反応では、 <u>S. mutans</u> 由来の P1 ( PAc )と わずかながらスパーを形成し、免疫学的特異性がわずかに異なると 述べている。なお、彼らの <u>spa</u>P1 遺伝子の制限酵素切断地図を <u>pac</u> 遺伝子 のそれと比較すると <u>Hin</u>dIII 部位が一箇所異なる他は 酷似していた。

サザンブロット分析の結果(図7)から、pac 遺伝子と相同性の ある遺伝子は c 型の他、 e 型と f 型の S. mutans に存在するこ とが分かった。ゲル内沈降反応などでは c/e/f 型 S. mutans の高 分子量タンパク質抗原 ( PAc/e/f )は d/g 型 S. sobrinus の PAd/g と交差反応することが知られている<sup>13),20)</sup>。しかし、本研 究のような通常のハイブリダイゼーション条件下(約 85% 以上の 相同性があれば検出される)では、これらの遺伝子の相同性は認め られなかった。 Holt ら  $5^{3}$ は、 S. sobrinus 6715 株 (g型) から分子量 21 万のタンパク質抗原 ( SpaA )遺伝子のクローニン グを行い、この遺伝子と相同性のある遺伝子は d/g 型 S. sobrinus に存在すると報告した。さらに、最近、高橋らは <u>S. sobrinus</u> MT3791 株 (血清型 g )から同じ高分子量タンパク質 抗原 ( PAg )をコードする遺伝子 ( pag )をクローニングし、 pac遺伝子との相同性をさらに詳しく検討した。それによると、pag 遺伝子は本研究と同じ条件下では pac 遺伝子とハイブリダイズし ないが、 65% 程度の相同性でも検出できるような条件下では弱い ながらもハイブリダイズしたという( 高橋ら、未発表)。これら の結果は S. mutans PAc と S. sobrinus PAg の遺伝子レベルでの 相同性はさほど高くないことを示唆するものである。

クローニングした <u>pac</u> 遺伝子の塩基配列を Sanger のジデオキ シ法<sup>39)</sup>で決定した。その結果、 4、695 bp からなるオープンリー デイングフレームの存在が示された。それ以外には、タンパク質を コードしうる オープンリーデイングフレームは検出できなかった。 この <u>pac</u> 遺伝子は 1、565 アミノ酸からなる分子量 170、773 の タ ンパク質をコードする。この N 末端の Met-1 から Ala-36 までは、 これまで報告された他のグラム陽性菌のシグナルペプチド<sup>49)</sup>の次 のような特徴、 すなわち N 末端側の塩基性アミノ酸に続く疎水性 アミノ酸の配列が存在し<sup>49)</sup>、また、 切断サイトにアラニンが存在 <sup>54)</sup> するという性状を具備していた。さらに、 アミノ酸シークエネ ーターによる <u>S. mutans</u> PAc の N 末端アミノ酸配列決定の 結果 もこの推定アミノ酸配列を支持していた。 PAc がシグナルペプチ ドを持つことは、PAc が分泌型タンパク質であることを示している。 シグナルペプチドが切断された後の成熟タンパク抗原の分子量は 166、817 と算出された。

塩基配列から求めた PAc の分子量(166、817)は、 SDS-PAGE 上の Coli PAc の分子量 ( 210、000 - 190、000 )より 21% -14% も小さかった。同様の所見は A 群レンサ球菌の M タンパク や G 群レンサ球菌の プロテイン G でも報告されている。 Hollingshead ら<sup>49</sup>は、 MG タンパクの塩基配列から求めた分子量 ( 48、956 )は SDS-PAGE から求めた分子量 ( 57、000 )より 17% 小さかったと報告している。彼らは M タンパクの C 末端側にある 高プロリン含有領域の存在に基づくユニークな立体構造が SDS-PAGE 上で高値を与える原因ではないかと考えている。また、Guss ら<sup>55)</sup>も塩基配列から求めた プロテイン G の分子量( 51、871 ) が SDS-PAGE 上の分子量( 67,000 )より 23% ほど小さいことを 見出している。彼らもまた、この原因として高プロリン含有領域の 存在に注目している。 PAc の場合も高プロリン含有領域( P-繰返 しドメイン)が存在するので、塩基配列から求めた分子量と SDS-PAGE 上のそれとの違いはこのためかもしれない。また、疎水性ア ミノ酸であるアラニンが多い繰返し領域( A-繰返しドメイン)が 存在することも、 SDS-PAGE 上の分子量と理論値の間の食い違いの 理由のひとつと考えられる。

いずれにしても、 SDS-PAGE 上の分子量が必ずしも実際の分子量

を正確に反映しているものではないことは、他のタンパク質でも報告されている。プロテアーゼインヒビターのひとつであるカルパスタチンの塩基配列から求められた分子量は77、000と算出されるが、 SDS-PAGE 上では分子量110、000の位置に泳動される<sup>56)</sup>。この場合も、プロリンや酸性アミノ酸の含量が多いことが理由として挙げられている<sup>56)</sup>。

Forester ら<sup>22)</sup>は PAc を SDS-PAGE 後、過ヨウ素酸・ Schiff 染色法で PAc が染色されることから、PAc は糖タンパク質である とみなしている。我々の研究室で精製した PAc も、糖分析の結果、 7% の糖を含有することが示されている。しかし、我々の標品は過 ヨウ素酸・ Schiff 染色法では染色されず、Forester らの結果は 追試されていない(太田ら、未発表)。もし、PAc が糖鎖を有する タンパク質であるなら、上述の分子量の差異の理由の一部は糖鎖の 存在に帰することができよう。

アミノ酸配列の分析から、 PAc には 2 つの繰返し領域が存在す ることが示された。 N 末端側の A-繰返しドメインにはアラニンが 多く、中央部の P-繰返しドメインにはプロリンが多かった。 Chou と Fasman の方法<sup>4 2)</sup> による二次構造の推定によると、 A-繰返しド メインを含む N 末端側はほぼ完全な $\alpha$ -ヘリックス構造であった。  $\alpha$ -ヘリックス構造をもつ抗原タンパク質の代表的なものは A 群 レンサ球菌の M タンパクである<sup>57)</sup>。 M タンパクでは N 末端側の 約 70% が $\alpha$ -ヘリックス構造であるといわれる<sup>49)</sup>。 M タンパク の機能のひとつに、菌が多型核白血球による貪食作用から逃れる抗 食作用が挙げられる<sup>58)</sup>。アミノ酸配列上は PAc と M タンパク の 間に相同性は認められないが、どちらも N 末端側が $\alpha$ -ヘリック ス構造をとるところから考えると、 PAc にも食細胞の機能に抗す る作用があるのかも知れない。 実際に、Scully ら<sup>18)</sup> は、PAc に 対する抗血清が多型核白血球による <u>S. mutans</u> の食作用を促進す ると報告している。

PAc の C 末端側の構造にも、 M タンパク, プロテイン G やブ

ドウ球菌の プロテイン A との共通点が認められた。すなわち、プ ロリンの多い小領域とそれに続く高疎水性領域である。 M タンパ クでは、 C 末端側の高プロリン領域は細胞壁のペプチドグリカン 層に入りこんでいることが報告されている<sup>59)</sup>。 Uhlen ら<sup>50)</sup> は、 C 末端側の高プロリン領域がタンパク質を細胞壁から外向きに配列 させるのに必要なのではないかと述べている。 PAc の C 末端側 ( Pro-1493 から Pro-1544 )もこのような役割を持っている可能 性が大きいと思われる。また、高プロリン領域に続く高疎水性領域 は M タンパク, プロテイン G や プロテイン A で示唆されている のと同様、タンパク質を膜に固定するアンカー領域とみなされる <sup>50)、59)</sup>。 このように、 PAc の構造には、 M タンパク や プロ テイン G と様々な共通点が見られるが、アミノ酸配列上の相同性 はほとんど認められなかった。

<u>S. mutans</u>の最も重要な病原因子はスクロースから不溶性粘着性 グルカンを合成する酵素 GTase である<sup>1)、4)</sup>。<u>S. mutans</u> による う蝕の誘発にスクロースが必要な理由のひとつは、スクロースが GTase の基質であるという事実による<sup>4)</sup>。また、 GTase を欠損し た<u>S. mutans</u> 変異株は、う蝕原性が低下していることも知られて いる<sup>60)</sup>。一方、 PAc の病原因子としての役割は、 GTase ほど明 確ではない。その理由のひとつは、PAc の役割が、主に、 <u>S. mutans</u> 菌体と歯面(ペリクル)との相互作用による初期付着に 限定されており<sup>13)</sup>、その後の、不溶性グルカンによる強固な付着 などの段階には関わっていないためと思われる。

ところで、<u>S. mutans</u> に限らず、口腔細菌が歯面に定着する際 には菌体疎水性が大きな役割を果たすという報告もいくつか存在す る<sup>8)</sup>。そこで、本研究では、クローニングした <u>pac</u> 遺伝子を利用 して、 PAc を欠損した <u>S. mutans</u> 変異株を作成し、その菌体疎水 性を調べた(表2)。その結果、 PAc 欠損変異株では、菌体疎水 性が明らかに低下していた。 遺伝子工学的に作成した PAc 欠損変 異株では、PAc 以外の性質に変化はないとみなし得るので、この結 果は、 PAc が <u>S. mutans</u> の菌体疎水性に関わっていることをより 直接的に示したものといえる。 Westergren と Olsson <sup>61)</sup>は、菌 体疎水性が低下した <u>S. mutans</u> 変異株では、唾液を被覆したハイ ドロキシアパタイトへの吸着量が、親株よりも明確に低下している ことを報告している。 これらの結果から、 PAc が菌体疎水性を介 して <u>S. mutans</u> の歯面への初期付着に関与していると推測するこ とも可能であろう。本研究では、 PAc 欠損株について菌体疎水性 を測定したが、 PAc の病原因子としての役割が疎水性だけで説明 可能か否かは不明である。 PAc の役割を一層明らかにするために も、ここで得られた PAc 欠損株の性質をさらに詳しく研究するこ とが必要であると考えられる。

はじめに述べたように、 PAc にはう蝕ワクチンとしての可能性 が考えられている。 Curtiss ら<sup>62)</sup>は、 <u>S. sobrinus</u> の <u>spaA</u> 遺 伝子を病原性の欠落した <u>Salmonella</u> 変異株中で発現させ、う蝕に 対する経口生ワクチンとして利用する研究を開始している。この試 みがどのような成果を挙げるかは、今後の報告を待つほかないが、 本研究でクローニングされた <u>pac</u> 遺伝子についても同じような応 用は可能であろう。また、<u>pac</u> 遺伝子のプロモーター領域を改変し て大量の PAc を産生する変異株を得ることも可能である。精製 PAc を大量に得ることができれば、 PAc を用いたう蝕ワクチンの 研究も一層加速されると期待される。 結論

う蝕原性レンサ球菌 <u>S. mutans</u> MT8148 株(血清型 <u>c</u>)の菌体表 層高分子量タンパク質抗原(PAc)の遺伝子クローニングを行った。
同株からクローニングした <u>pac</u> 遺伝子は <u>E. coli</u> 内で発現し、
SDS-PAGE 上で <u>S. mutans</u> 由来の PAc より分子量のやや大きいタンパク質(Coli PAc)を産生した。 この Coli PAc の免疫学的
特異性は <u>S. mutans</u> 由来の PAc と同一であることがゲル内沈降反応で確かめられた。 <u>pac</u> 遺伝子の約 1.5 kbの DNA 断片をプローブとして、 <u>S. mutans</u> を含むいくつかの口腔レンサ球菌の染色体 DNA とサザンブロット分析を行うと、血清型 <u>c/e/f</u> に属する
<u>S. mutans</u> の DNA だけがこのプローブと反応し、<u>S. sobrinus</u> や
他のレンサ球菌の DNA とは反応しなかった。

塩基配列決定の結果、 pac 遺伝子は 4、695 bp からなり、 1、565 個のアミノ酸、すなわち、分子量 170、773 のタンパク質を コードしていることが明らかになった。 PAc の特徴として、1)シ グナルペプチド配列を持つ、2) N 末端側にアラニンを多く含む (32%)繰返し構造がある、3)中央 C 末端寄りにプロリンを多 く含む(30%)繰返し構造がある、4)N 末端側は大部分α-ヘリ ックス構造をとっている、ことなどが明らかとなった。 SDS-PAGE から得た分子量(190、000)と塩基配列から求めた分子量 (170、773)との違いは、独特の繰返し構造と高プロリン領域の存 在に基づくユニークな立体構造によるものと考えられる。

遺伝子工学的に <u>S. mutans</u> MT8148 株から PAc 欠損株を作成し た。この変異株の菌体疎水性をヘキサデカン法で親株と比較すると、 変異株の疎水性は親株に比べて著しく低下していることが明らかに なった。

稿を終えるにあたり、本論文に対して懇切丁寧な御指導と御校閲 を頂きました国立予防衛生研究所歯科衛生部古賀敏比古部長ならび に大阪大学歯学部浜田茂幸教授に心から感謝の意を表します。また、 遺伝子クローニング技術について細部にわたり御指導を頂きました 東京大学医科学研究所細菌研究部吉川昌之介教授ならびに笹川千尋 助教授に深く感謝致します。加えて、様々な御協力を頂きました国 立予防衛生研究所歯科衛生部の皆様と東京大学医科学研究所細菌研 究部の皆様に厚くお礼申し上げます。

- Hamada, S. and Slade, H. D. (1980): Biology, immunology, and cariogenicity of <u>Streptotococcus mutans</u>. Microbiol. Rev., 44, 331-384.
- Loesche, W. J. (1986): Role of <u>Streptococcus mutans</u> in human dental decay. Microbiol. Rev., 50, 353-380.
- Coykendall, A. L. and Gustafson, K. B. (1986): Taxonomy of <u>Streptococcus mutans</u>. <u>Molecular microbiology and</u> <u>immunobiology of Streptococcus mutans</u>. (Hamada, S., Michalek, S. M., Kiyono, H., Menaker, L. and McGhee, J. R., editors). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 21 -28.
- Mukasa, H. (1986): Properties of <u>Streptococcus mutans</u> glucosyltransferases. <u>Molecular microbiology and</u> <u>immunobiology of Streptococcus mutans</u>. (Hamada, S., Michalek, S. M., Kiyono, H., Menaker, L. and McGhee, J. R., editors). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 121-132.
- 古賀敏比古、浜田茂幸 (1982): 口腔細菌の付着とプラーク形成;う蝕と歯周病(浜田茂幸編)、日本歯科評論社、東京、第 1巻、71-112、昭和57年。
- Cohen, B., Peach, S. L. and Russell, R. R. B. (1983): Immunization against dental caries. Med. Microbiol., 2, 255-294.
- Hay, D. I. (1967): The adsorption of salivary proteins by hydroxyapatite and enamel. Arch. Oral Biol., 18, 937 -946.
- B) Gibbons, R. J. (1984): Adherent interactions which may affet microbial ecology in the mouth. J. Dent. Res., 63, 378-385.
- 9) Lehner, T., Russell, M. W., Caldwell, J. and Smith, R. ( 1981): Immunization with purified protein antigens from <u>Streptococcus mutans</u> against dental caries in rhesus monkeys. Infect. Immun., 34, 407-415.
- 10) Lehner, T., Caldwell, J. and Smith, R. (1985): Local 4.3

passive immunization by monoclonal antibodies against streptococcal antigen I/II in the prevention of dental caries. Infect. Immun., 50, 796-799.

- 11) Ma, J. K.-C., Smith, R. and Lehner, T. (1987): Use of monoclonal antibodies in local passive immunization to prevent colonization of human teeth by <u>Streptococcus</u> mutans. Infect. Immun., 55, 1274-1278.
- 12) Russell, R. R. B., Beighton, D. and Cohen, B. (1982): Immunisation of Monkeys (<u>Macaca fascicularis</u>) with antigens purified from <u>Streptococcus mutans</u>. British Dent. J., 152, 81-84.
- 13) 浜田茂幸、岡橋暢夫、古賀敏比古 (1986): <u>Streptococcus</u> <u>mutans</u>の菌体表層タンパク質抗原の免疫化学的性状と機能。 歯科基礎医学会雑誌、28、1-11.
- 14) Moro, I. and Russell, M. W. (1983): Ultrastructural localization of protein antigens I/II and III in <u>Streptococcus mutans</u>. Infect. Immun. 41, 410-413.
- 15) Ayakawa, G. Y., Boushell, L. E. Crowley, P. J., Erdos,
  G. W., McArthur, W. P. and Bleiweis, A. S. (1987):
  Isolation and characterization of monoclonal antibodies specific for antigen Pl, a major surface protein of mutans streptococci. Infect. Immun., 55, 2759-2767.
- 16) McBride, B. C., Song, M., Krasse, B. and Olsson, J. (1984): Biochemical and immunological differences between hydrophobic and hydrophilic strains of <u>Streptococcus mutans</u>. Infect. Immun., 44, 68-75.
- 17) Russell, R. R. B. and Smith, K. (1986): Effect of subculturing on location of <u>Streptococcus mutans</u> antigens. FEMS Microbiol. Lett., 35,319-323.
- 18) Scully, C. W., Russell, M. W. and Lehner, T. (1980): Specificity of opsonizing antibodies to antigens of Streptococcus mutans. Immunology, 41, 467-473.
- 19) Russell, M. W., Bergmeier, L. A., Zanders, E. D. and Lehner, T. (1980): Protein antigens of <u>Streptococcus</u> <u>mutans</u>: purification and properties of a double antigen and its protease-resistant component. Infect. Immun., 4 4

28, 486-493.

- 20) Russell, R. R. B. (1979): Wall-associated protein antigens of Streptococcus mutans. J. Gen. Microbiol., 114, 109-115.
- 21) Hughes, M., Machardy, S. M., Sheppard, A. J. and Woods, N. C. (1980): Evidence for an immunological relationship between Streptococcus mutans and human cardiac tissue. Infect. Immun., 27, 576-588.
- 22) Forester, H., Hunter, N. and Knox, K. W. (1983): Characteristics of a high molecular weight extracellular protein of Streptococcus mutans. J. Gen. Microbiol., 129, 2779-2788.
- 23) Okahashi, N., Koga, T. and Hamada, S. (1986): Purification and immunochemical properties of a protein antigen from serotype g Streptococcus mutans. Microbiol. Immunol., 30, 35-47.
- 24) Okahashi, N., Asakawa, H., Koga, T., Masuda, N. and Hamada, S. (1984): Clinical isolates of Streptococcus mutans serotype c with altered colony morphology due to fructan synthesis. Infect. Immun., 44, 617-622.
- 25) Yanisch-Perron, C., Vieiraaaaa, J. and Messing, J. (1985) ): Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene. 33. 103-119.
- 26) Sasakawa, C., Carle, G. F. and Berg, D. E. (1983): Sequences essential for transposition at the termini of IS50. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 7293-7197.
- 27) Yokogawa, K., Kawata, S., Nishimura, S., Ikeda, Y. and Yoshimura, Y. (1974): Mutanolysin, bacteriolytic agent for cariogenic streptococci: partial purification and properties. Antimicrob. Agents Chemother., 6, 156-165.
- 28) Hamada, S., Torii, M., Kotani, S., Masuda, N., Ooshima, T., Yokogawa, K. and Kawata, S. (1978): Lysis of Streptococcus mutans cells with mutanolysin, a lytic enzyme prepared from a culture liquor of Streptomyces <u>globisporus</u> 1829. Arch. Oral Biol., 23, 543-549. 4 5

- 29) Birnboim, H. C. and Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res., 7, 1513-1523.
- 30) Henikoff, S. (1984): Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. Gene, 28, 351-359.
- 31) Morrison, D. A. (1977): Transformation in <u>Escherichia</u> <u>coli</u>: cryogenic preservation of competent cells. J. Bacteriol., 132, 349-351.
- 32) Lindler, L. E. and Macrina, F. L. (1986): Characterization of genetic transformation in <u>Streptococcus mutans</u> by using a novel high-efficency plasmid marker rescue system. J. Bacteriol., 166, 658-665.
- 33) Hamada, S. and Slade, H. D. (1976): Purification and immunochemical characterization of type <u>e</u> polysaccharide antigen of <u>Streptococcus mutans</u>. Infect. Immun., 14, 68 -76.
- 34) Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London), 227, 680-685.
- 35) Burnette, W. N. (1981): "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. Anal. Biochem., 112, 195-203.
- 36) Maniatis, T., Fristsch, E. F. and Sambrook, J. (1982): <u>Molecular cloning: a laboratory manual</u>. Cold Spring Harbor Laboratoty, New York.
- 37) Grunstein, M. and Hogness, D. S. (1975): Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that cotain a specific gene. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 72, 3961-3965.
- 38) Southern, E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.
   J. Mol. Biol., 98, 503-517.

- 39) Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463-5467.
- 40) Mizusawa, S., Nishimura, S. and Seela, F. (1986): Improvement of the dideoxy chain termination method of DNA sequencing by use of deoxy-7-deazaguanosine triphosphate in place of dGTP. Nucleic Acids Res., 14, 1319-1324.
- 41) Kyte, J. and Doolittle, R. F. (1982): A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J. Mol. Biol., 157, 105-132.
- 42) Chou, P. Y. and Fasman, G. D. (1974): Prediction of protein conformation. Biochemistry, 13, 222-244.
- 43) Macrina, F. L., Jones, K. R. and Wood, P. H. (1980): Chimeric streptococcal plasmids and their use as molecular cloning vehicles in <u>Streptococcus sanguis</u> (Challis). J. Bacteriol., 143,1425-1435.
- 44) Kuramitsu, H. K. (1987): Utilization of a mini-mu transposon to construct defined mutants in <u>Streptococcus</u> <u>mutans</u>. Mol. Microbiol., 1, 229-231.
- 45) Castilho, B. A., Olfson, P. and Casadaban, M. J. (1984): Plasmid insertion mutagenesis and <u>lac</u> gene fusions with mini-Mu bacteriophage transposons. J. Bacteriol., 158, 488-495.
- 46) Rosenberg, M., Gutnick, D. and Rosenberg, E. (1980): Adherence of bacteria to hydrocarbons: a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. FEMS Microbiol. Lett., 9, 29-33.
- 47) Shine, J. and Dalgarno, L. (1975): Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes. Nature (London), 254, 34-38.
- 48) Hawley, D. K. and McClure, W. R. (1983): Compilation and analysis of <u>Escherichia coli</u> promoter DNA sequencing. Gene, 28, 351-359.
- 49) Hollingshead, S. K., Fischetti, V. A. and Scott, J. R. (1986): Complete nucleotide sequence of type 6 M protein 4 7

of the group A streptococcus. J. Biol. Chem., 261, 1677 -1686.

- 50) Uhlen, M., Lindberg, M. and Philipson, L. (1984): The Immunology Today, 5. gene for staphylococcal protein A. 244-248.
- 51) Scott. J. R. and Fischetti, V. A. (1983): Expression of streptococcal M protein in Escherichia coli. Science. 221, 758-760.
- 52) Lee, S. F., Progulske-Fox, A. and Bleiweis, A. S. (1988) : Molecular cloning and expression of a Streptococcus mutans major surface protein antigen, P1(I/II), in Escherichia coli. Infect. Immun., 56, 2114-2119.
- 53) Holt, R. G. and Ogundipe, J. O. (1987): Molecular cloning in Escherichia coli of the gene for a Streptococcus sobrinus surface protein containing two antigenic determinants. Streptococcal Genetics. (Ferretti, J. J. and Curtiss III, R., editors). American Society for Microbiology, Washington, D. C., 217-219.
- 54) Vlasuk, G. P., Inouye, S., Ito, H., Itakura, K. and Inoue, M. (1983): Effects of the complete removal of basic amino acid residues from the signal peptide on secretion of lipoprotein in Escherichia coli. J. Biol. Chem., 258, 7141-7148.
- 55) Guss, B., Eliasson, M., Olsson, A., Uhlen, M., Frej, A-K., Jornvall, H., Flock, J.-I. and Lindberg, M. (1986) : Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein G. EMBO J., 5, 1567-1575.
- 56) Takano, E., Maki, M., Mori, H., Hatanaka, M., Marti, T., Titani, K., Kannagi, R., Ooi, T. and Murachi, T. (1988): Pig heart calpastatin: identification of repetitive domain structures and anomalous behavior in polyacrylamide gel electrophoresis. Biochemistry, 27, 1964-1972.
- 57) Phillips, Jr. G. N., Flicker, P. F., Cohen, C., Manjula, B. N. and Fischetti, V. A. (1981): Streptococcal M protein;  $\alpha$ -helical coiled-coil structure and 4.8

arrangement on the cell surface. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4689-4693.

- 58) Scott, J. R., Guenthner, P. C. Malone, L. N. and Fischetti, V. A. (1986): Conversion of an M<sup>-</sup> group A streptococcus to M<sup>+</sup> by transfer of a plasmid containing an M6 gene. J. Exp. Med., 164, 1641-1651.
- 59) Pancholi, V. and Fischetti, V. A. (1988): Isolation and characterization of the cell-associated region of group A streptococcal M6 protein. J. Bacteriol., 170, 2618-2624.
- 60) 古賀敏比古、井上昌一、浜田茂幸 (1983): <u>Streptococcus</u>
   <u>mutans</u> の突然変異. I. 主要ビルレンス因子を欠落した変異
   株. 歯界展望、61、461-473。
- 61) Westergren, G. and Ollson, J. (1983): Hydrophobicity and adherence of oral streptococci after repeated subculture in vitro. Infect. Immun., 40, 432-435.
- 62) Curtiss III, R., Goldschmidt, R. M., Fletchall, N. B. and Kelly, S. M. (1988): Avirulent <u>Salmonella</u> <u>typhimurium</u>  $\Delta \underline{cya} \Delta \underline{cry}$  oral vaccine strains expressing a streptococcal colonization and virulence antigen. Vaccine, 6, 155-159.

Molecular Cloning and Sequencing of a Surface Protein Antigen Gene from Serotype c Streptococcus mutans

## Nobuo Okahashi

# Department of Dental Research, National Institute of Health 2-10-35, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141, Japan

Key words: Streptococcus mutans / Gene cloning / Protein antigen

The structural gene for a surface protein antigen (PAc) of Streptococcus mutans MT8148 (serotype c) was cloned into the plasmid vector pUC118. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and Western immunoblot showed that the E. coli harboring the chimeric plasmid produced multiple polypeptides of 190,000 to 210,000 daltons (D). Immunodiffusion analysis revealed that the cloned PAc had the same specific determinants as the S. mutans The cloned pac gene was mapped, and its transcriptional PAc. orientation.was determined by characterizing deletion mutants of the chimeric plasmid. Southern blot analysis with the cloned gene sequence as a probe revealed the presence of a homologous sequence in DNAs from serotypes e and f S. mutans. The complete nucleotide sequence of the pac gene was determined. The gene consisted of 4,695 bp and coded for a 170,773 D protein. The pac gene product contained a putative 38-amino acid signal peptide.

50

A potential promoter sequence and a putative Shine-Dalgarno sequence preceded the open reading frame. Two internal repeating amino acid sequences were present in the PAc. One repeating region located in the N-terminal region was rich in alanine, and the other located in the central region was rich in proline. PAc-defective mutants were constructed by the insertion of an erythromycin-resistance gene into the <u>pac</u> gene. Cell-surface hydrophobicity of the mutants was lower than that of the parent strain.

51

Cloning of a surface protein antigen gene from serotype <u>c</u> <u>Streptococcus</u> mutans

Nobuo Okahashi\*<sup>,§</sup> , Chihiro Sasakawa\*, Masanosuke Yoshikawa\*, Shigeyuki Hamada<sup>+</sup> and Toshihiko Koga<sup>§</sup>

\*Department of Bacteriology, The Institute of Medical Science, University of Tokyo, Minato-ku, Tokyo 108, Japan.

<sup>+</sup>Department of Oral Microbiology, Osaka University Faculty of Dentistry, Suita, Osaka 565, Japan.

§ <u>Department of Dental Research, National Institute of Health,</u> <u>Shinagawa-ku, Tokyo 141, Japan.</u>

Running title: Gene for <u>S. mutans</u> protein antigen

Key words: <u>Streptococcus mutans</u>; cell surface; antigen; gene cloning

All communication should be addressed to Dr. Toshihiko Koga, Department of Dental Research, National Institute of Health, 2-10-35, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141, Japan.

#### Summary

The structural gene for a 190 kD protein antigen (PAc) of <u>Streptococcus</u> <u>mutans</u> MT8148 (serotype <u>c</u>) was cloned into the plasmid vector pUC118. SDSpolyacrylamide gel electrophoresis and Western immunoblot showed that the <u>E</u>. <u>coli</u> harboring the chimeric plasmid produced multiple polypeptides of 190 to 210 kD. Immunodiffusion analysis revealed that the cloned PAc had the same specific determinants as the <u>S. mutans</u> PAc. The cloned <u>pac</u> gene was mapped, and its transcriptional orientation was determined by characterizing deletion mutants of the chimeric plasmid. Southern blot analysis with the cloned gene sequence as a probe revealed the presence of a homologous sequence in DNAs from serotypes <u>e</u> and <u>f S. mutans</u>. PAc-defective mutants were constructed by the insertion of an erythromycin-resistance gene into the <u>pac</u> gene. Cell-surface hydrophobicity of the mutants was lower than that of the parent strain.

#### Introduction

Organisms of the mutans group of streptococci are composed of seven genospecies and have been strongly implicated as causative agents of dental caries (Coykendall and Gustafson, 1986; Hamada and Slade, 1980; Loesche, 1986). Among the mutans streptococci, serotype <u>c Streptococcus mutans</u> is most frequently isolated from human dental plaque (Hamada and Slade, 1980).

Serotype <u>c S. mutans</u> possessevarious cell-associated antigenic substances; much interest has been focused on a wall-associated protein of 190 kD which has been variously designated as antigen B (R. Russell, 1979), I/II (M. Russell <u>et al.</u>, 1980), IF (Hughes <u>et al.</u>, 1980) and P1 (Forester <u>et al.</u>, 1983). This high-molecular-weight protein antigen is produced by serotypes <u>e and f S. mutans</u> as well as serotype <u>c</u>. This protein antigen shows serological cross-reactivity with a protein of 210 kD named SpaA (Holt <u>et</u> <u>al.</u>, 1982) or PAg (Okahashi <u>et al.</u>, 1986), which is produced by Streptococcus sobrinus strains (serotypes d and g) (R. Russell, 1979).

Although the biological functions of this 190 kD protein are not well understood, antigen I/II has been successfully used as a vaccine to protect monkeys against dental caries (Lehner <u>et al.</u>, 1981). In this regard, Scully <u>et al.</u> (1980) reported that antiserum directed against this antigen opsonizes <u>S. mutans</u> cells for phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. In addition, antiserum to this antigen has been reported to block adherence of saliva-coated hydroxyapatite <u>in vitro</u> (Douglas and Russell, 1984) and to reduce colonization <u>in vivo</u> (Lehner <u>et al.</u>, 1985). McBride et al. (1985)

-3-

claimed that the 190 kD protein is involved in the hydrophobic interactions between S. mutans cells and tooth surfaces.

As an initial step to elucidate the structure and function of the 190 kD protein antigen of <u>S. mutans</u>, we attempted to clone the structural gene for this protein. In this report, we refer to the 190 kD protein antigen as PAc (protein antigen serotype <u>c</u>).

#### Results

#### Cloning of the pac gene in E. coli

Fragments of <u>PstI</u>-digested chromosomal DNA of <u>S. mutans</u> MT8148 (serotype <u>c</u>) were ligated into the <u>PstI</u> site of pUC118. About 5000 recombinant <u>Escherichia coli</u> clones were screened for reactivity with rabbit antibody against the 190 kD protein antigen (PAc) of <u>S. mutans</u> MT8148 by colony immunoassay. Six clones were positive for antigen expression. Plasmid DNAs from these antibody-reactive clones were prepared, digested with <u>PstI</u> or other restriction enzymes, and electrophoresed on agarose gel. Restriction endonuclease analysis revealed that all of these plasmids possessed the same 3.8 kb insert.

Western blot analysis of cell lysates showed that all the proteins expressed by these 6 clones were 95 kD (Data not shown). The chimeric plasmid present in one of these clones was named pPC12, and used for the following study.

#### Determination of coding region and direction of transcription

The molecular weight (95 kD) of the antigen expressed by the clone containing pPC12 was smaller than that of native PAc (190 kD). Thus, we thought that the cloned gene was not complete. In order to clone the remaining region, the coding region on pPC12 and the orientation was

-5-

estimated.

pPC12 DNA was digested with <u>SacI</u> or <u>HindIII</u>, self-ligated, and then transformed into <u>E. coli</u> MC1061. This self-ligation method resulted in isolation of some deletion mutants. The expression of antigen was analyzed by colony immunoblot and Western immunoblot. As shown in Fig. 1, deletion of 0.6 kb <u>HindIII</u> fragment of the right side of 3.8 kb inserted DNA (pPC12del.H) did not affect the antigen expressed. On the other hand, deletion of the 0.7 kb <u>SacI</u> fragment of the left side (-del.S) resulted in the reduction of the molecular weight of the antigen expressed.

Then, a series of unidirectional deletions of 3.8 kb insert were constructed, and transformed into <u>E. coli</u> MC1061. Their plasmid DNAs were extracted, digested with <u>PstI</u>, and analyzed for the extent of deletion. The expression of antigen was analyzed by colony immunoblot and Western blot, and compared with the deletion map (Fig. 1). <u>E. coli</u> harboring plasmid pPC12-del.1, -del.2 or -del.3 produced the antigen of 95 kD. However, <u>E. coli</u> harboring pPC12-del.4, -del.5 or -del.6 did not express the antigen. These results suggested that the cloned gene was transcribed from near the <u>Hind</u>III site toward the internal <u>Sac</u>I site. The 3.8 kb insert fragment appeared to contain a promoter that was functional in <u>E. coli</u>, since clones containing the insert in either orientation with respect to the <u>lacZ</u> gene (i.e. in either pUC118 or pUC119) produced the 95 kD protein. Thus, the protein expressed by pPC12 was expected to be the N-terminal half of the PAc protein.

-6-

#### Construction of the complete pac gene

A preliminary Southern hybridization analysis of <u>SacI-digested S. mutans</u> MT8148 chromosomal DNA indicated that a single band of approximately 4 kb hybridized with the radiolabeled 0.7 kb <u>PstI-SacI</u> fragment of pPC12. Therefore, the 0.7 kb <u>PstI-SacI</u> fragment was used for the colony hybridization to screen an <u>E. coli</u> library which consisted of <u>SacI</u> fragments of 3 to 5 kb from MT8148 DNA ligated into the plasmid vector pUC118 (Fig. 2). About 300 colonies were screened, resulting in the detection of 22 positive colonies by autoradiographic analysis. The chimeric plasmids were isolated from these clones and shown to contain a 4.2 kb insert. One of these plasmids (pPC31) was used for the construction of the complete gene.

pPC31 DNA was digested with <u>SacI</u>, ligated into the <u>SacI</u> site of pPC12, and transformed into <u>E. coli</u> MC1061. Plasmid was extracted from each transformant, and the DNA pattern was determined by agarose electrophoresis. Transformants harboring a plasmid with an insert of about 7.5 kb were selected, and their expression of the PAc antigen was analyzed. Western blot analysis revealed that about half of these clones produced the PAc antigen of high molecular weight (190 to 210 kD). One of these chimeric plasmid was termed pPC41. The gene was mapped with <u>PstI</u>, <u>SacI</u> and <u>HindIII</u> on the chromosomal DNA by Southern blotting. No significant difference of sizes of restriction fragments between chromosomal DNA and pPC41 was detected, suggesting that the complete pac gene was constructed by this

-7-

procedure (Data not shown). The restriction map of pPC41 is shown in Fig. 3.

## Immunological characterization of the recombinant PAc

Immunodiffusion tests revealed that rabbit antiserum to <u>S. mutans</u> PAc formed a fused precipitin line with cell extract of <u>E. coli</u> MC1061 (pPC41) and purified PAc of <u>S. mutans</u> MT8148. <u>E. coli</u> MC1061 (pUC118) extract, on the other hand, formed no precipitin line. Cell extract of <u>E. coli</u> MC1061 (pPC12), which produced N-terminal half of the PAc protein, formed a very weak precipitin line (Data not shown).

SDS-PAGE and Western blot analyses of these <u>E. coli</u> extracts are shown in Fig. 4. The recombinant PAc expressed by pPC41 appeared to be three closely spaced polypeptides of 190 to 210 kD (Fig. 4, lane 3). The cell extract of <u>E. coli</u> harboring pUC118 did not react with the antiserum to PAc.

## Distribution of sequences homologous to the pac gene

To determine whether sequences homologous to the <u>pac</u> gene were present in other streptococcal species, hybridization studies with a specific probe were undertaken. To generate the <u>pac</u> gene probe, pPC41 was digested to completion with <u>PstI</u>. After electrophoresis on an agarose gel, 1.5 kb fragment was electroeluted and  $^{32}P$ -labeled by the nick translation method. Based on our previous results, this 1.5 kb <u>PstI</u> fragment encoded the central

-8-

### region of PAc (see Fig. 3).

<u>PstI-digested chromosomal DNA preparations from various streptococci</u> were transferred to nitrocellulose, and hybridized. As shown in Fig. 5, hybridization of the radiolabeled probe to a <u>PstI</u> fragment from <u>S.</u> <u>mutans</u> MT703R (serotype <u>e</u>) and to OMZ175 (serotype <u>f</u>) as well as to MT8148 (serotype <u>c</u>) was detected. No hybridization to <u>PstI-digested chromosomal</u> DNA isolated from other strains of oral streptococci and <u>Streptococcus</u> <u>pyogenes</u> was detected.

## Insertional mutation of pac gene and cell hydrophobicity of the mutants

To determine whether the PAc is essential for the cell-surface hydrophobicity of <u>S. mutans</u>, we constructed PAc-defective mutants. An erythromycin-resistance ( $Em^r$ ) gene fragment was inserted into the PAc coding region of pPC12. It was linearized by digestion with <u>PstI</u>, and transformed into <u>S. mutans</u> MT8148 (Fig. 6). More than 90% of the resultant  $Em^r$ transformants displayed a decreased reactivity against anti-PAc serum in enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Table 1 showed the result of ELISA for PAc of two typical transformants, PAcEm-2 and PAcEm-3. Southern blot analysis utilizing the 1.8 kb  $Em^r$  gene fragment as a probe revealed the insertion of the  $Em^r$  gene into the chromosomal DNA of these transformants (Data not shown).

The surface hydrophobicity of these transformants was determined by their

-9-

adsorption to hexadecane. As shown in Table 1, the hydrophobicity of PAcEm-2 and PAcEm-3 was lower than that of parent strain MT8148.

•

#### Discussion

In the present study, a gene coding for a high-molecular-weight protein antigen PAc of <u>S. mutans</u> MT8148 (serotype <u>c</u>) has been cloned. The cloned PAc reacted with antiserum directed against <u>S. mutans</u> PAc, and produced a fused precipitin line with <u>S. mutans</u> PAc in immunodiffusion test. When produced in recombinant <u>E. coli</u>, the protein had a molecular weight of 190 to 210 kD (Fig. 4). The molecular weights of multiple bands of cloned PAc was slightly larger than that of <u>S. mutans</u> PAc. No clear explanation is available for the multiple banding pattern of the cloned PAc at this time. However, a similar multiple banding pattern has been observed for the group A streptococcal M protein produced in <u>E. coli</u> (Scott and Fischetti, 1983; Kehoe et al., 1985).

Genes of several other surface proteins of mutans streptococci have been cloned by others. Holt <u>et al</u>. (1982) reported the cloning of a gene coding for a high-molecular-weight protein antigen SpaA of <u>S. sobrinus</u> (serotype <u>g</u>). However, the <u>spaA</u> gene expresses a polypeptide of 160 to 170 ckD, which is different from the actual molecular weight of the native SpaA protein (210 kD). More recently, Holt and Ogundipe (1987) have cloned the entire coding sequence for SpaA. SDS-PAGE of <u>E. coli</u> extracts containing the cloned gene has shown a protein band 210 kD. Although <u>S. sobrinus</u> SpaA protein is known to be immunologically related to <u>S. mutans</u> PAc protein (Okahashi <u>et al</u>., 1986; R. Russell, 1979), the restriction maps of the two genes of the SpaA (Holt and Ogundipe, 1987) and our PAc (Fig. 3) did not

-11-

show any correlation between the positions of the restriction sites of BamHI, EcoRI, HindIII, PstI and SalI. Furthermore, our Southern hybridization analysis revealed that the pac gene did not hybridize with the PstI-digested chromosomal DNA of <u>S. sobrinus</u> under the conditions employed in this study (Fig. 5). In this regard, we have recently cloned a gene coding for 210 kD protein antigen PAg (identical to SpaA) of a strain of serotype g S. sobrinus. DNA hybridization experiments revealed that the pac-specific probe did not hybridize to the pag gene under the condition employed in this study. However, under the low stringency hybridization condition [20% (v/v) formanide at  $35^{\circ}$ C], significant hybridization was detected. These results suggested that there is low but significant homology between pac gene and pag gene (Takahashi et al., unpublished data). Recently, Sommer et al. (1987) have cloned a gene coding for saliva-interacting protein (SR) of S. mutans OMZ175 (serotype f). They used a polyclonal antibody against SR of 74 kD (74K SR) to screen the lambda phage library. They found that the antibody-reactive clones produce a protein of 195 kD, and suggested that the 195 kD protein would be a precursor of 74K SR. The molecular weight of this precursor protein is very similar to S. mutans PAc. The restriction map of the gene for the 195 kD precursor was different from that of the gene for PAc. Thus, the relationship between these two proteins is unclear at present. Further work will be needed to compare the precursor protein of the 74K SR with PAc, since both of these proteins have been considered to be important in the interaction between salivary component and S. mutans cells.

-12-

Although it has been reported that PAc is a potent vaccine against dental caries (Lehner <u>et al.</u>, 1981), biological roles of this protein are poorly understood. There is currently great interest in the role of cell-surface hydrophobicity in mediating bacterial adherence to teeth and oral mucosal surfaces (Gibbons, 1984). Thus, we have constructed structural gene mutants by using an erythromycin-resistance gene, and then examined their hydrophobicity. As shown in Table 1, the hydrophobicity of the PAc-defective mutants were lower than that of the parent strain. This finding indicates that the PAc takes part in surface hydrophobocity of <u>S. mutans</u>. Other properties of the PAc-defective mutants are now under investigation.

The nucleotide sequence of the <u>pac</u> gene and its regulatory region will be determined to explore the fine structure of the protein and investigate the regulation of its expression in <u>S. mutans</u>. The knowledge of the molecular structure of PAc may lead to an understanding of the role of the PAc protein in the colonization of <u>S. mutans</u> on tooth surfaces. Furthermore, the cloned <u>pac</u> gene may be useful for developing an effective recombinant vaccine against dental caries. Experimental procedures

#### Bacterial strains and plasmid vectors

<u>S. mutans</u> MT8148, a typical strain of serotype <u>c</u> <u>S. mutans</u>, has been described previously (Okahashi <u>et al.</u>, 1984). Other streptococcal strains used in this study were as follows: <u>S. cricetus</u> E49 (mutans serotype <u>a</u>), <u>S. rattus</u> FA1 (serotype <u>b</u>), <u>S. sobrinus</u> strains B13 (serotype <u>d</u>), MT3791 (serotype <u>g</u>), <u>S. downei</u> MFe28 (serotype <u>h</u>), <u>S. mutans</u> strains MT703R (serotype <u>e</u>) and OMZ175 (serotype <u>f</u>), <u>S. sanguis</u> strains ATCC10557 and ST3, <u>S. salivarius</u> HHT, and <u>S. pyogenes</u> SF42. These strains were selected from the stock culture collection at the Department of Dental Research, National Institute of Health, Tokyo and at the Department of Oral Microbiology, Osaka University Faculty of Dentistry. <u>E. coli</u> K-12 strains MC1061 (Sasakawa <u>et</u> <u>al</u>., 1983) and JM109 (Yanisch-Perron <u>et al</u>., 1985) were used as a host for the plasmid. Plasmid vector pUC118 and pUC119 (Vieira and Messing, in press) were purchased from Takara Shuzo Co., Kyoto, Japan.

#### Antigen and antibodies

Native PAc antigen was purified from culture supernatant of <u>S. mutans</u> MT8148 grown in TTY medium according to the methods of Russell <u>et al</u>. (1980) and Forester <u>et al</u>. (1983), as modified by Okahashi <u>et al</u>. (1986). This protein had a molecular weight of about 190 kD and immunologically identical to

-14-

antigen B kindly supplied by Dr. R. R. B. Russell (R. Russell, 1979; Okahashi <u>et al</u>., 1986). This antigen and rabbit anti-PAc serum were supplied by H. Ohta (Department of Dental Research, the National Institute of Health, Tokyo).

#### DNA manipulations

<u>S. mutans</u> MT8148 was grown in Todd-Hewitt broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) supplemented with 20 mM D,L-threonine for 18 h at 37°C. The cells were harvested, washed with TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) buffer, and suspended in TE buffer containing 20% (w/v) glucose. The cells were lysed with 8 mg ml<sup>-1</sup> lysozyme for 30 min at 37°C, followed by Nacetylmuramidase SG (0.1 mg ml<sup>-1</sup>, Seikagaku Kogyo Co., Tokyo, Japan) for 30 min at 50°C. The lysate was then treated at 37°C with RNase (0.3 mg ml<sup>-1</sup>) for 30 min, and with Pronase E (0.3 mg ml<sup>-1</sup>, Kaken Kagaku Co., Tokyo, Japan) for 30 min. Sodium N-lauroylsarcosine (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was then added to a final concentration of 2% (w/v), and the mixture was incubated for 15 min at 37°C, and centrifuged. The supernatant was extracted three times with an equal volume of phenol-chloroform (1 : 1) and twice with chloroform. Chromosomal DNA in the aqueous phase was extensively dialysed against TE buffer, and stored at 4°C.

Large-scale preparation of plasmid DNA has been previously described (Sasakawa and Yoshikawa, 1980). Small-scale preparation for detection of plasmid and for restriction enzyme digestion was performed by the method

-15-

of Birnboim and Doly (1979).

A series of unidirectional deletions of pPC12 were prepared by using the Kilo-deletion kit (Takara Shuzo). The pPC12 DNA was digested with restriction enzymes <u>XbaI</u> and <u>KpnI</u>, and then treated with exonuclease III. The digest was treated with mung bean nuclease and Klenow fragment to ensure formation of blunt-ended DNA. T4 DNA ligase was added to recircularize the various deletion products (Henikoff, 1984).

## Construction of the S. mutans clone banks

Chromosomal DNA from <u>S. mutans</u> MT8148 was digested with <u>PstI</u> (Toyobo Co., Osaka, Japan) and ligated with T4 DNA ligase (Takara Shuzo) to <u>PstI</u>digested, calf intestine alkaline phosphatase (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, West Germany)-treated pUC118. <u>E. coli</u> JM109 was then transformed, and plated LB (Maniatis <u>et al.</u>, 1982) agar containing ampicillin (50  $\mu$ g m1<sup>-1</sup>), 5-bromo-4-chloro-3-indoly1- $\beta$ -D-galactopyranoside (40  $\mu$ g m1<sup>-1</sup>)(Boehringer Mannheim) and isopropy1- $\beta$ -D-thiogalactopyranoside (0.2 mM)(Boehringer Mannheim). A similar procedure was employed to construct the <u>SacI</u> digested DNA clone bank.

## Colony immunoblot and colony hybridization

Recombinant clones were transferred with toothpicks onto sterile nitrocellulose filters placed on LB agar plates containing 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>

ampicillin. The plates were incubated overnight at 37°C. The filters were placed over chloroform vapor for 10 min to lyse the cells, and blocked with 5% (w/v) skimmed milk in PBST [0.05 M sodium phosphate, 0.14 M NaCl, 0.1% (v/v) Tween 20, pH 7.2] for 30 min. Rabbit anti-PAc serum in 5% (w/v) skimmed milk in PBST was incubated with the filters for 1 h at 20°C. The filters were washed four times with PBST, and reacted with anti-rabbit immunoglobulin G conjugated with horseradish peroxidase (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) for 1 h at 20°C. After extensive washing with PBST, the filters were developed with 0.5 mg 4-chloro-1-naphtol per ml in 0.01% (v/v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 10 mM Tris-HC1 (pH 8.0).

Colony hybridization was performed as described by Grunstein and Hoggness (1975). Recombinant clones were transferred onto the nitrocellulose filters as described above. The filters were treated with successive, 0.5 N NaOH, 1 M Tris-HCl (pH 7.4) and 0.5 M Tris-HCl containing 1.5 M NaCl (pH 7.4). After heating at 80°C for 2 h, the filters were reacted with the <sup>32</sup>P-labeled probe.

#### Preparation of sonic extract of recombinant E. coli

Recombinant <u>E. coli</u> cells were grown to a late logarithmic phase in 500 ml of LB medium containing ampcillin (50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>). The cells were harvested by centrifugation, suspended in 25 ml of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) containing 0.1 mM phenylmethylsulfonylfluoride (PMSF) (Sigma Chemicals), and sonicated for 2 min at 0°C using a Tomy ultrasonic disruptor (UR-200P, Tomy

-17-

Seiko Co., Tokyo, Japan). After treatment with nuclease P1  $(10 \ \mu g \ ml^{-1})$  (Seikagaku Kogyo) for 30 min at 37°C, cell debris was removed by centrifugation, and the supernatant was concentrated by adding solid ammonium sulfate to 70% saturation. The precipitate was collected by centrifugation, dissolved in 10 ml of 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.2) containing 0.1 mM PMSF, and dialyzed extensively against the buffer.

### Immunological procedures

For Western blot analysis, the <u>E. coli</u> sonic extracts were applied to sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide slab gels [7.5% (w/v)] (Laemmli, 1970). After SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), the proteins were transferred to a nitrocellulose membrane by the electrophoretic blotting technique (Burrett, 1981). The membrane was treated with rabbit anti-PAc serum. The antibody bound to the immobilized replica proteins on the membrane was detected by a procedure similar to the colony immunoblot (see above).

Immunodiffusion analysis was performed in a 1.5% (w/v) agarose gel in 0.05 M veronal buffer, pH 8.6. For ELISA, whole cells (0.2 mg/ml in 0.05 M bicarbonate buffer, pH 9.6) were coated to the microtiter plate (100  $\mu$ l) at 4°C for overnight, and then rabbit anti-PAc serum (1 : 2000 dilution) was added. Antibody binding was detected with alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG (Bio-Rad) at a 1 : 1000 dilution with <u>p</u>-nitrophenyl phosphate as the substrate. After incubation for 60 min at 37°C, the

-18-

optical density at 405 nm (OD<sub>405</sub>) was measured (Hamada <u>et al.</u>, 1984).

### Southern hybridization

Chromosomal DNAs from various streptococci were digested with <u>PstI</u>. The DNA fragments separated by agarose gel electrophoresis were transferred to nitrocellulose membranes by standard procedures (Maniatis <u>et al.</u>, 1982). The 1.5 kb <u>PstI</u> fragment of the <u>pac</u> gene was radiolabelled by nick translation (Maniatis <u>et al.</u>, 1982) using <sup>32</sup>P-labeled deoxycytidine triphosphate. Hybridization on nitrocellulose membranes was performed according to the procedure of Sasakawa <u>et al</u>. (1986) with 50% (v/v) formamide at 42°C.

## Insertional inactivation of the pac gene

The 1.8 kb fragment coding for erythromycin-resistance  $(Em^{r})$  was isolated from agarose gels after <u>Bam</u>HI cleavage of transposon MudE (Kuramitsu, 1987; Makino <u>et al.</u>, 1988). The  $Em^{r}$  fragment was ligated into the <u>Bgl</u>II site of pPC12 (Fig. 6). The resultant plasmid pPC12Em<sup>r</sup> was used as the source of the defective <u>pac</u> gene. The linear 5.6 kb <u>pac</u> gene fragment with an  $Em^{r}$ insert was isolated from agarose gels after digestion of pPC12Em<sup>r</sup> with <u>PstI</u>. Transformation of <u>S. mutans</u> MT8148 with the defective pac gene was carried

-19-
out as described by Lindler and Macrina (1986). The transformants were isolated on mitis-salivarius agar (Difco) plates containing erythromycin (5 ug/ml).

## Hydrophobicity

The relative surface hydrophobicity of <u>S. mutans</u> was determined by their adsorption to hexadecane (Rosenberg <u>et al.</u>, 1980). Cells grown in brain heart infusion broth (Difco) were suspended in PUM buffer (Rosenberg <u>et al.</u>, 1980) to an optical density at 550 nm ( $OD_{550}$ ) of 0.6. Samples (3 ml) of the bacterial suspensions were placed in test-tubes, and hexadecane (0.3 ml) was added. The tubes were then mixed with a vortex mixer for 1 min. After the aqueous and hexadecane phases were separated, the  $OD_{550}$  of the lower aqueous phase was measured. Adsorption was calculated as the percentage loss in optical density relative to that of the initial cell suspension.

## Acknowledgements

This work was supported in part by Tokyo Institute for Immunopharmacology, and by Grant-in-Aid for Developmental Scientific Research (no. 63870086) from the Ministry of Education and Culture of Japan.

-20-

## References

- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. <u>Nucleic Acids Res</u> 7:1513-1523.
- Burnette, W. N. (1981) "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. <u>Anal Biochem</u> 112:195-203.
- Coykendall, A. L., and Gustafson, K. B. (1986) Taxonomy of <u>Streptococcus</u> <u>mutans</u>. In <u>Molecular Microbiology and Immunology of Streptococcus mutans</u>. Hamada, S., Michalek, S. M., Kiyono, H., Menaker, L., and McGhee, J. R. (eds). Amsterdam: Elsevier Science Publishers, pp. 21-28.
- Douglas, C. W. I., and Russell, R. R. B. (1984) Effect of specific antisera upon <u>Streptococcus mutans</u> adherence to saliva-coated hydroxyapatite. <u>FEMS</u> <u>Microbiol Lett</u> 25:211-214.
- Forester, H., Hunter, N., and Knox, K. W. (1983) Characteristics of a high molecular weight extracellular protein of <u>Streptococcus mutans</u>. <u>J Gen</u> <u>Microbiol</u> 129:2779-2788.
- Gibbons, R. J. (1984) Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. <u>J Dent Res</u> 63:378-385.
- Grunstein, M., and Hogness, D. S. (1975) Colony hybridization: a method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. <u>Proc Natl Acad</u> <u>Sci USA</u> 72:3961-3965.

Hamada, S., Furuta, T., Okahashi, N., Nisizawa, T., Yamamoto, T., and Chiba,

J. (1984) Characterization of a monoclonal antibody specific for lipoteichoic acid from various Gram-positive bacteria. <u>Microbiol Immunol</u> 28:1009-1021.

- Hamada, S. and Slade, H. D. (1980) Biology, immunology, and cariogenicity of <u>Streptococcus mutans</u>. Microbiol Rev 44:331-384.
- Henikoff, S. (1984) Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing. Gene 28:351-359.
- Holt, R. G., Abiko, Y., Saito, S., Smorawinska, M., Hansen, J. B., and Curtiss III, R. (1982) <u>Streptococcus mutans</u> genes that code for extracellular proteins in <u>Escherichia coli</u> K-12. <u>Infect Immun</u> 38:147-156.
- Holt, R. G., and Ogundipe, J. O. (1987) Molecular cloning in <u>Escherichia</u> <u>coli</u> of the gene for a <u>Streptococcus sobrinus</u> surface protein containing two antigenic determinants. In <u>Streptococcal Genetics</u>. Ferretti, J. J., and Curtiss III, R. (eds). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp.217-219.
- Hughes, M., Machardy, S. M., Sheppard, A. J., and Woods, N. C. (1980) Evidence for an immunological relationship between <u>Streptococcus mutans</u> and human cardiac tissue. <u>Infect Immun</u> 27:576-588.
- Kehoe, M. A., Poirier, T. P., Beachey, E. H., and Timmis, K. N. (1985) Cloning and genetic analysis of serotype 5 M protein determinant of group A streptococci: evidence for multiple copies of the M5 determinant in the <u>Streptococcus pyogenes</u> genome. <u>Infect Immun</u> 48:190-197.

Kuramitsu, H. K. (1987) Utilization of a mini-mu transposon to construct

-22-

defined mutants in Streptococcus mutans. Mol Microbiol 1:229-231.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. <u>Nature (London)</u> 227:680-685.

- Lehner, T., Caldwell, J., and Smith, R. (1985) Local passive immunization by monoclonal antibodies against streptococcal antigen I/II in the prevention of dental caries. <u>Infect Immun</u> 50:796-799.
- Lehner, T., Russell, M. W., Caldwell, J., and Smith, R. (1981) Immunization with purified protein antigens from <u>Streptococcus mutans</u> against dental caries in rhesus monkeys. <u>Infect Immun</u> 34:407-415.
- Lindler, L. E., and Macrina, F. L. (1986) Characterization of genetic transformation in <u>Streptococcus mutans</u> by using a novel high-efficiency plasmid marker rescue system. <u>J Bacteriol</u> 166:658-665.
- Loesche, W. J. (1986) Role of <u>Streptococcus mutans</u> in human dental decay. <u>Microbiol Rev</u> 50:353-380.
- Makino, S., Sasakawa, C., Uchida, I., Terakado, N., and Yoshikawa, M. (1988) Cloning and CO<sub>2</sub>-dependent expression of the genetic region for encapsulation from <u>Bacillus anthracis</u>. <u>Mol Microbiol</u> 2:371-376.
- Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982) <u>Molecular Cloning; A</u> <u>Laboratory Manual</u>. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory.
- McBride, B. C., Morris, E. J., and Ganeshkumar, N. (1985) Relationship of streptococcal cell surface proteins to hydrophobicity and adherence. In
  <u>Molecular Basis of Oral Microbial Adhesion</u>. Mergenhagen, S. E., and Rosan, B. (eds). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp.85-93.

-23-

- Okahashi, N., Asakawa, H., Koga, T., Masuda, N., and Hamada, S. (1984) Clinical isolates of <u>Streptococcus mutans</u> serotype <u>c</u> with altered colony morphology due to fructan synthesis. <u>Infect Immun</u> 44:617-622.
- Okahashi, N., Koga, T., and Hamada, S. (1986) Purification and immunochemical properties of a protein antigen from serotype <u>g</u> <u>Streptococcus</u> mutans. Microbiol Immunol 30:35-47.
- Rosenberg, M., Gutnick, D., and Rosenberg, E. (1980) Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. FEMS Microbiol Lett 9:29-33.
- Russell, M. W., Bergmeier, L. A., Zanders, E. D., and Lehner, T. (1980) Protein antigens of <u>Streptococcus mutans</u>: purification and properties of a double antigen and its protease-resistant component. <u>Infect Immun</u> 28:486-493.
- Russell, R. R. B. (1979) Wall-associated protein antigens of <u>Streptococcus</u> mutans. J Gen Microbiol 114:109-115.
- Sasakawa, C., Carle, G. F., and Berg, D. E. (1983) Sequences essential for transposition at the termini of IS<u>50</u>. <u>Proc Natl Acad Sci USA</u> 80:7293-7297.
- Sasakawa, C., Kamata, K., Sakai, T., Murayama, S. Y., Makino, S., and Yoshikawa, M. (1986) Molecular alteration of the 140-megadalton plasmid associated with loss of virulence and Congo red binding activity in Shigella flexneri. Infect Immun 51:470-475.
- Sasakawa, C., and Yoshikawa, M. (1980) Transposon (Tn<u>5</u>)-mediated suppressive integration of ColE1 derivatives into the chromosome of

-24-

Escherichia coli K12 (dnaA). Biochim Biophys Res Commun 96:1364-1370.

- Scully, C. M., Russell, M. W., and Lehner, T. (1980) Specificity of opsonizing antibodies to antigens of <u>Streptococcus mutans</u>. <u>Immunology</u> 41:467-473.
- Scott, J. R., and Fischetti, V. A. (1983) Expression of streptococcal M protein in <u>Escherichia coli</u>. <u>Science</u> 221:758-760.
- Sommer, P., Bruyere, T., Ogier, J. A., Garnier, J.-M., Jeltsch, J.-M., and Klein, J.-P. (1987) Cloning of the saliva-interacting protein gene from <u>Streptococcus mutans</u>. J Bacteriol 169:5167-5173.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33:103-119.

	Hydrophobicity <sup>a</sup>	ELISA for PAc <sup>b</sup>
Strain	(% adsorbed to hexadecane)	(00 <sub>405</sub> )
S. mutans		
MT8148	29.5 ± 3.6	0.56 ± 0.12
PAcEm-2	4.9 ± 1.5	0.08 ± 0.03
PAcEm-3	7.1 ± 2.7	0.09 ± 0.04

Table 1. Cell-surface hydrophobicity of Em<sup>r</sup> transformants.

a. The relative surface hydrophobicity of cells was determined by their adsorption to hexadecane. Values are the mean  $\pm$  standard deviation (SD) of triplicate assays.

b. Binding of the anti-PAc antibodies to the cells of each strain. Binding was measured by ELISA with intact cells coated to 96 well microtiter plates. Rabbit anti-PAc serum and alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG were used for the assay. Values are the mean  $\pm$  SD of triplicate assays. OD<sub>405</sub>, Optical density at 405 nm.

Figure legends

Fig. 1. Partial restriction map of pPC12 and deletion analysis. The plasmid pPC12 contained the 3.8 kb <u>PstI</u> fragment of <u>S. mutans</u> DNA (thick line) at the multicloning site of pUC118 plasmid vector. The broken lines indicate the regions of DNA deleted. Antigen expressed by each subclone was detected by the colony immunoblot and Western blot assays. Abbreviations: H, <u>HindIII</u>; P, PstI; S, SacI.

Fig. 2. Strategy for the cloning of the gene encoding the C-terminal portion of the PAc protein. <u>E. coli</u> library which consisted of <u>SacI</u> fragments from <u>S. mutans</u> MT8148 DNA was screened by colony hybridization.  $^{32}$ P-labeled <u>PstI-SacI</u> fragment of pPC12 was used as the probe.

Fig. 3. Endonuclease restriction map of pPC41. <u>S. mutans</u> DNA insert is indicated by the thick line. The broken bars indicate the plasmid vector pUC118. Abbreviations: B, <u>Bam</u>HI; Bg, <u>Bg</u>]II; E, <u>Eco</u>RI; E14, <u>Eco</u>T14I; H, <u>Hind</u>III; P, <u>Pst</u>I; S, <u>Sac</u>I. There is no site in the insert for <u>Kpn</u>I, <u>SalI</u> or XbaI.

Fig. 4. SDS-PAGE and Western bolt analyses of cell extracts of <u>E. coli</u> harvoring pUC118 and pPC41.

A: Coomassie blue staining of the gel.

-27-

B: Western blot showing the reaction of rabbit anti-PAc serum.

Lane 1, chromatographically purified PAc of <u>S. mutans</u> MT8148; lane 2, cell extract of <u>E. coli</u> MC1061 (pUC118); lane 3, cell extract of MC1061 (pPC41).

Fig. 5. Southern hybridization analysis of various streptococcal DNAs digested with <u>PstI</u>.  $3^{2}$ P-labeled 1.5 kb <u>PstI</u> fragment of pPC41 was used as the probe.

A: Lane 1, <u>S. cricetus</u> E49 (serotype <u>a</u>); lane 2, <u>S. rattus</u> FA1 (serotype <u>b</u>); lane 3, <u>S. mutans</u> MT8148 (serotype <u>c</u>); lane 4, <u>S. sobrinus</u> B13 (serotype <u>d</u>); lane 5, <u>S. mutans</u> MT703R (serotype <u>e</u>); lane 6, <u>S. mutans</u> OMZ175 (serotype <u>f</u>); lane 7, <u>S. sobrinus</u> MT3791 (serotype <u>g</u>); lane 8, <u>S. downei</u> MFe28 (serotype <u>h</u>); lane 9, <u>S. sanguis</u> ATCC10557; lane 10, <u>S. sanguis</u> ST3; lane 11, <u>S. salivarius</u> HHT; lane 12, <u>S. pyogenes</u> SF42.

B: The open bar represents the 7.5 kb insert DNA of pPC41. The fragment used as the probe (1.5 kb  $\underline{PstI}$ ) is indicated by the closed bar.

Fig. 6. In vitro inactivation of pac gene and its recombination with the homologous region of the chromosome. The 1.8 kb BamHI fragment coding for  $Em^{r}$  (hatched box) was inserted into the Bg]II site of the pac gene (thick line) in pPC12. The resultant pPC12Em<sup>r</sup> plasmid was cleaved with <u>PstI</u>, and transformed into <u>S. mutans</u> MT8148. The right portion of the figure depicts the recombinatial event between the inactivated <u>pac</u> gene and the homologous region of the MT8148 chromosome (open bar). Abbreviations: B, BamHI; Bg,

-28-

<u>Bgl</u>II; H, <u>Hin</u>dIII; P, <u>Pst</u>I; S, <u>Sac</u>I.

,





<u>Fig. 2</u>





5

<u>Fig. 4</u>



Fig. 5



۰.