Osaka University Knowledge Archive

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	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【9】

氏名・(本籍)	岡(おか) 橋(はし) 暢(のぶ) 夫(お)
学位の種類	歯 学 博 士
学位記番号	第 8519 号
学位授与の日付	平成元年3月15日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	*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
論文審査委員	(主査) 教授 浜田 茂幸 (副査) 教授 常光 旭 助教授 恵比須繁之 講師 滝川 正春

論文内容の要旨

う蝕原性レンサ球菌 *Streptococcus mutans* のうち，ヒトの口腔からもっとも多く分離されるのは血清型 *c* に属する菌株である。*S. mutans* の菌体表層にはタンパク質抗原，不溶性グルカン合成酵素，多糖抗原，リポタイコ酸などの高分子量抗原物質が局在している。この中でも，分子量が約19万と算定されるタンパク質抗原（以下PAc と略）は，微線毛状の構造物として菌体表層に認められ，菌の歯面への付着の第一段階で極めて重要な役割を演じている。また，本PAc 抗原が *S. mutans* の菌体疎水性に関係していることも示唆されている。

本研究では，PAc をコードする *S. mutans* 遺伝子を大腸菌にクローニングし，その塩基配列の決定を行った。さらに，PAc 抗原を欠損した *S. mutans* 変異株を，遺伝子工学の技法を用いて作出し，PAc が *S. mutans* の疎水性に直接関与していることを示した。

PAc は *S. mutans* MT 8148 株（血清型 *c*）の培養上清から精製し，実験に供した。

S. mutans MT 8148 株の染色体 DNA を制限酵素 *Pst* I で消化し，その断片をプラスミドベクターpUC 118 に連絡した。これを大腸菌K12株に形質転換法で導入し，得られた形質転換株をウサギ抗PAc 血清によるコロニーイムノブロット法でスクリーニングした。制限酵素地図作成，サザンブロット分析，ゲル内沈降反応，ウエスタンブロット法などは常法に従って実施した。

塩基配列決定のためには，得られた遺伝子（*pac*）の *Pst* I サブクローンを用意し，それからエキソヌクレアーゼⅢ処理による一連の欠失変異遺伝子を作成した。これらを用いてサンガーのジデオキシ法により塩基配列を決定した。

PAc 変異株の作成のために，PAc のN末端側半分をコードする遺伝子中の *Bgl*II サイトに，エリス

ロマイシン耐性（Em^r）をコードする1.8 kbの*Bam* HI断片を挿入した。これを*S. mutans* MT8148株に形質転換法で導入し，Em^r変異株を選択した。

クローニングした*pac*遺伝子は大腸菌内で発現し，SDS－PAGE上で*S. mutans*由来のPAcよりやや分子量の大きい複数のポリペプチドからなるPAc（Coli PAc）を産生した。このColi PAcの免疫学的特異性は*S. mutans*由来の精製PAcと同一であることがゲル内沈降反応で確かめられた。*pac*遺伝子の制限酵素地図は，*S. sobrinus*のSpaA抗原（分子量21万；Holtら，*Infect. Immun.*, 38：147－156, 1982）のそれとは異なっていた。また，*pac*遺伝子の約1.5 kbのDNA断片をプローブとして，*S. mutans*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*c*／*e*／*f* *S. mutans*のDNAのみがこのプローブと反応し，*S. sobrinus*やその他のレンサ球菌の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塩基対からなり，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と結論された。PAcの特徴として，(1) シグナルペプチド配列をもつこと，(2) N末端側にアラニンを多く含む（32%）繰り返し構造があること，(3) 中央C末端寄りにプロリンを多く含む（30%）繰り返し構造があること，(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，などが明らかになった。SDS－PAGE法から得た分子量と塩基配列から求めた分子量との違いは，独特の繰り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。

さらに，遺伝子工学的に*S. mutans* MT 8148株からPAc欠損変異株を作出した。この変異株の菌体の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大きく低下していることが分かった。

本研究により，*pac*遺伝子のヌクレオチドレベルの構造，およびPAcのアミノ酸配列とその推定構造が明らかにされた。また，同じミュータンスレンサ球菌間でも，*S. mutans*のPAcと*S. sobrinus*のSpaAとでは，DNAレベルでの高い相同性は認められなかった。さらに，PAc欠損変異株の解析からPAcが菌体の疎水性に直接関与していることが明らかにされた。

論文の審査結果の要旨

本研究はう蝕病原菌*Streptococcus mutans* MT 8148株（血清型*c*）の菌体表層タンパク質抗原(PAc)の遺伝子をクローニングし，その塩基配列を決定し，それに基づいて同タンパク質の一次構造を明らかにしたものである。その結果，PAcを支配する遺伝子は4695 bpよりなり，1565個のアミノ酸をコードしていることを解明し，PAcの分子量を170,773と算出した。また構成アミノ酸の解析により，PAcはA群レンサ球菌のMタンパク質やブドウ球菌のプロテインAなどと構造上のいくつかの類似点が存在することが示された。さらに，遺伝子工学的に作成したPAc欠損株を用いた実験は，PAcが*S. mutans*の菌体疎水性と密接に関連していることを明かにした。

以上のように，岡橋暢夫君の研究は，*S. mutans*の菌体表層タンパク質抗原の研究に遺伝子工学的手

法を取り入れたものであり，口腔細菌学の分野に新しい局面を開いたものである。従って，本論文は歯学博士の学位に十分値するものと認める。