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

博士論文題名　「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」

学位申請者　岡橋暢夫（おかはしのぶお）

国立予防衛生研究所

歯科衛生部

緒言

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、"Streptococcus mutans グループ" あるいは "mutans streptococci" と総称されている[1),2)]。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 a 型から h 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、"S. mutans グループ"は S. cricetus (a 型)、S. rattus (b 型)、S. mutans (c/e/f 型)、S. sobrinus (d/g 型)、S. downei (h 型) と分類されている。さらに、動物由来の S. ferus や S. macacae と命名された菌株が c 型多糖抗原を保有することも報告されている[3)]。これら "S. mutans 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 S. mutans 、なかでも c 型に属する菌株である[1),2)]。

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[1)]。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[4)]。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[5)]。

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[6)]。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、ペリクルが形成される[7)]。

このように、S. mutans の歯面への初期付着は、 S. mutans 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[8]。

ところで、 Lehner らは、サルを用いたう蝕実験の系を用いて S. mutans 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[9]。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[10),11]。また、 R. Russell らのグループも独自に S. mutans 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[12]。

このような経緯から、 S. mutans 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[13]。 ワクチンとして有効であることから考えて、 本抗原が S. mutans 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[13]。

Moro と M. Russell[14] 、および Ayakawa ら[15]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 S. mutans 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[16]は、S. mutans 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 S. mutans 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[17]。

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 S. mutans の貪食を促進することも報告されている[18]。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 c 型 S. mutans 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/II[19], B[20], IF[21], P1[22] 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 ら[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]。

材料と方法

1.　菌およびプラスミド

本研究で主として用いた S. mutans MT8148 株（血清型 c ）[24] 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、S. cricetus E49 株（血清型 a)、S. rattus BHT 株(血清型 b)、S. mutans MT703R 株(血清型 e)および OMZ175 株(血清型 f)、S. sobrinus B13 株(血清型 d)および MT3791 株(血清型 g)、S. downei MFe28 株(血清型 h)、S. sanguis ST3 株および ATCC10557 株、S. salivarius HHT 株、S. pyogenes 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 Escherichia coli JM109株[25]、MC1061 株[26]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

S. mutans 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。 E. coli に対する非特異的反応を除くため、抗血清をあらかじめ E. coli 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、λ DNA／HindIII（東洋紡）を用いた。

4.　S. mutans 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[27),28)]（ 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、プロナーゼ E（ 0.3 mg/ml; 科研化学工業、東京）と 37°C、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.　E. coli 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[26)]の記載に基づいて行った。 E. coli 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°C, 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 L 8 M 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[29]を用いた。アンピシリンを含む LB 培地中で培養した E. coli 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)に懸濁し、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[30]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 μl 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 μl ）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 μl の TE 緩衝液に溶かし、その 10 μl 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 E. coli 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、PstI, EcoRI 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

E. coli の形質転換は Morrison の方法[31]に従った。 50 ml の LB 培地で培養した対数増殖期の E. coli を遠心により集菌し、10 mM $CaCl_2$ 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 $CaCl_2$ を含む同緩衝液（ 2.5 ml ）に懸濁し、4°C で 18 時間放置した。この菌液 0.3 ml に 0.1 - 0.5 μg 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 μg/ml ）、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド（ 40 μg/ml; Boehringer Mannheim GmbH, West Germany ）およびイソプロピル-β-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

S. mutans MT8148 株の形質転換法は、 Lindler と Macrina の方法[32]を用いた。 S. mutans 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 μl 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 μg/ml ）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 E. coli 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/ml 4-クロロ-1-ナフトール, 0.01% H_2O_2 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[33]。

10.　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[34] 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[35] 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 E. coli 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)に懸濁した。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 μg/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 ^{32}P 標識は、ニックトランスレーション法で行った[36]。プローブ用 DNA 1 μg を、5 μl の緩衝液 (50 mM $MgCl_2$ を含む 0.5 M トリス塩酸緩衝液、pH 7.5)，5 μl 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 μl の DN アーゼ I (0.1 μg/ml)、4 μl の DNA ポリメラーゼ I (4 U/μl), 1 μl の [α-^{32}P] デオキシシチジン 3 リン酸 (10 mCi/ml; アマシャム・ジャパン、東京）の混合液に加え、全

容量を 50 μl 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 μl 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[37] 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 E. coli 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 ^{32}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 (10^5 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[38]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[36]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 ^{32}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

S. mutans MT8148 株の精製 PAc (0.5 mg)を 60 μl 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、 E. coli 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^{10} 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[39]を基にした Mizusawa らの改良法[40]を利用したものである。マイクロチューブに 5 μl (1 μg)の一本鎖 DNA 、 1.5 μl の濃縮緩衝液、1 μl のプライマー溶液および蒸留水を加えて全量を 12 μl 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 μl 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 μl の [α-^{35}S] デオキシシチジン 3 リン酸(10 mCi/ml; アマシャム)と 1 μl (2 U)の Klenow 酵素を加え、混合した後、3.4 μl 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 μl を加えて、更に20 分間反応させた。

反応溶液に、 6 μl 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 μl 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（アトー 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 ソフトウエアパッケージ（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[41]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[42]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 ）[43]由来のエリスロマイシン耐性遺伝子（ Em^r ）を持つトランスポソン MudE[44] は H. K. Kuramitsu 博士（ Northwestern 大学、Chicago, Ill., 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 ）[45]にグラム陽性菌で発現する Em^r を組み込んだものである。MudE を BamHI で切断し、Em^r 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 pac 遺伝子中に存在する BglII サイトに挿入した。こうして得られたプラスミドを PstI で切断した後、S. mutans 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[46]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; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 22.2 g, KH_2PO_4 7.26 g, 尿素 1.8 g および $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 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

1. S. mutans MT8148 株の染色体 DNA PstI 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

S. mutans MT8148 株染色体 DNA を制限酵素 PstI で切断し、それをプラスミドベクター pUC118 の PstI 部位に連結した。得られたキメラプラスミドを E. coli JM109 株に形質転換法で導入した 。約 5,000 個の組換え E. coli 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、PstI 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 S. mutans DNA 断片が挿入されていることがわかった（図１）。

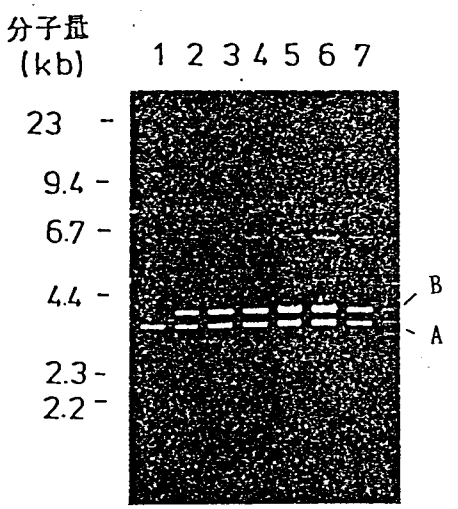

図１　抗 PAc 血清反応陽性 E. coli クローンのプラスミドの分析。反応陽性組換え E. coli からプラスミドを抽出し、制限酵素 PstI で切断後、アガロース電気泳動を行った。 A, プラスミドベクター pUC118; B, S. mutans DNA 由来の 3.8 kb 断片。 1, pUC118; 2 - 7, 組換えプラスミド。

これら 6 個の組換え E. coli クローンの菌体抽出物をウエスタンブ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、S. mutans 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（ pac ）を含有していないためと考えられる。そこで、 pac 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、 S. mutans DNA 由来の 3.8 kb 断片中に SacI 部位と HindIII 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 SacI あるいは HindIII 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 E. coli 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、HindIII 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、SacI 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 E. coli からプラスミドを抽出し、PstI 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、pac 遺伝子は pPC12 中の 3.8 kb DNA の中央部 HindIII 側から始まって SacI 側へ続いていると考えられた 。さらに、pUC118 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 S. mutans 由来のプロモーターが存在していると推測さ

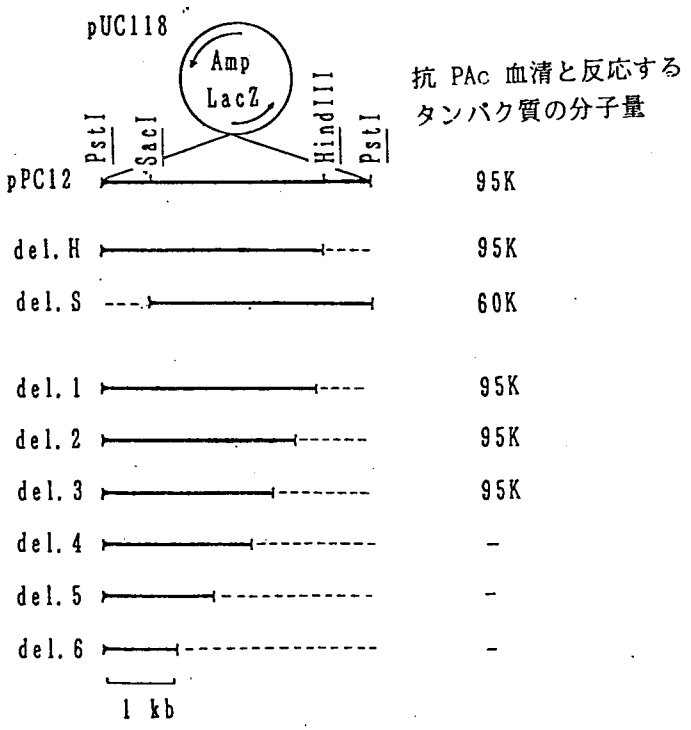

図２　pPC12 の制限酵素地図と pPC12 の欠失変異遺伝子が産生する抗原の分子量。プラスミド pPC12 は S. mutans MT8148 株の 3.8 kb DNA 断片を pUC118 のマルチクローニングサイトに連結して作成した。欠失遺伝子の欠失部分は点線で示した。これらのプラスミドが発現する抗原はウエスタンブロット法で分析した。

れた。以上の結果から、 pPC12 中 3.8 kb DNA に存在する pac 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

S. mutans MT8148 株染色体 DNA を SacI 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 PstI-SacI 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 pac 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

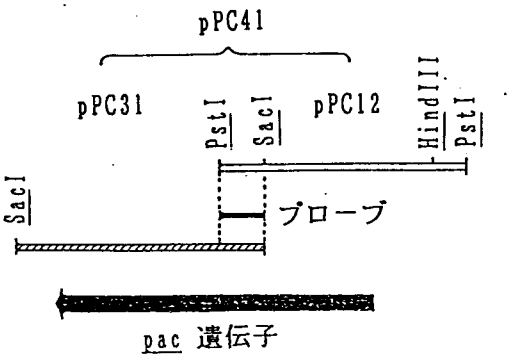

図３ PAc の C 末端側に対応する遺伝子のクローニング。
S. mutans MT8148 株 DNA の SacI ライブラリーを作成し、pPC12 の PstI-SacI 断片をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションを行った。

れた。そこで、MT8148 株の染色体 DNA を SacI 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 PstI-SacI 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 SacI で切断後、pPC12 の SacI 部位に連結し、これを E. coli 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。

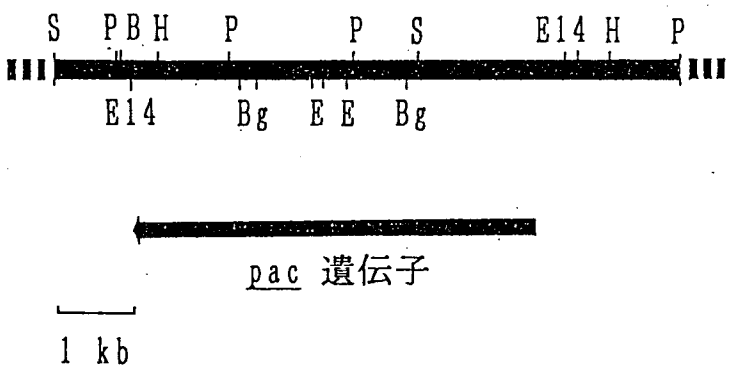

図4　pPC41 の制限酵素地図。太線は S. mutans MT8148 株由来の 7.5 kb DNA 断片。点線はプラスミドベクター pUC118。B, BamHI; Bg, BglII; E, EcoRI; E14, EcoT14I; H, HindIII; P, PstI; S, SacI.

4.　組換え PAc の性状

E. coli (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 S. 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。ウエ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 S. mutans 由来の PAc と同様、抗 PAc 血清と反応した。なお、E. coli (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 S. mutans 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 S. mutans 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 S. mutans 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。

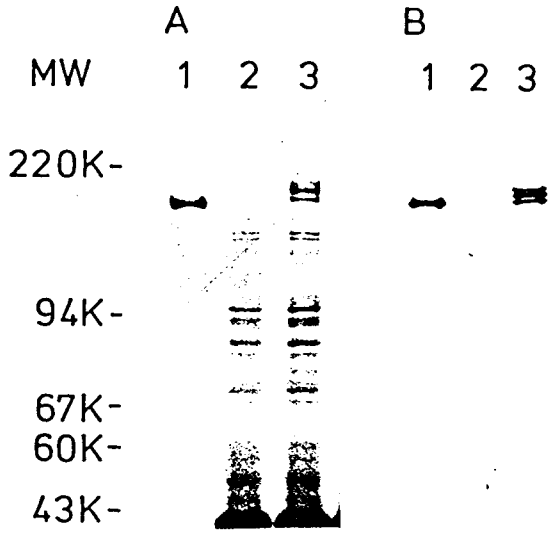

図５　E. coli (pPC41) が発現する組換え抗原 (Coli PAc)のウエスタンブロット分析。
A：クーマシーブリリアントブルー染色。 B：ウサギ抗血清によるウエスタンブロット分析。 1，S. mutans MT8148 株精製 PAc. 2，E. coli (pUC118) の菌体抽出物.

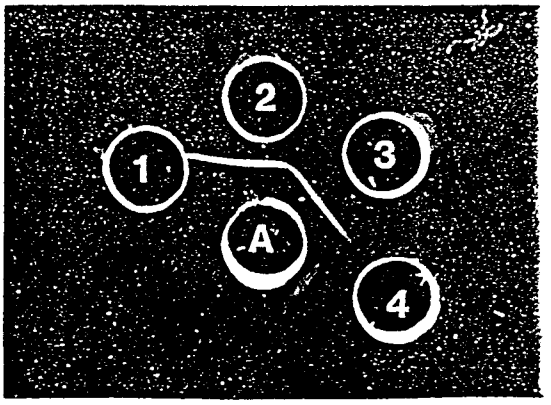

図6　E. coli (pPC41)が発現する PAc のゲル内沈降反応。1，E. coli (pUC118) の菌体抽出物；2、S. mutans の精製 PAc; 3，E. coli (pPC41) の菌体抽出物; 4、E. coli (pPC12) の菌体抽出物.　A，ウサギ抗 PAc 血清.

5.　pac 遺伝子と相同性のある遺伝子の分布

pac 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 SacI-EcoT14I 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 SacI および EcoT14I 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 ^{32}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 S. mutans MT8148 株のそれと同様に抽出し、EcoRI 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 S. mutans MT8148 株（血清型 c）の DNA の他、S. mutans MT703R 株（血清型 e）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

ンサ球菌の DNA とは、ハイブリダイズしなかった。

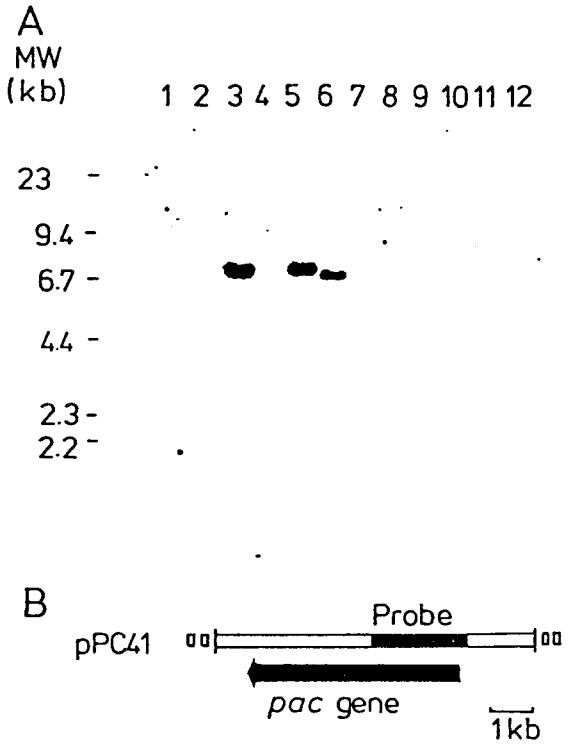

図7　各種口腔レンサ球菌 DNA と pac 遺伝子のサザンハイブリダイゼーション。 pPC41 中の S. mutans 由来 7.3 kb DNA 断片のうち、プローブとして用いた部分は黒で示した。矢印は pac 遺伝子の位置と方向。 1, S. cricetus E49 （血清型 a ）; 2, S. rattus BHT （血清型 b ）; 3, S. mutans MT8148 （血清型 c ）; 4, S. sobrinus B13 （血清型 d ）; 5, S. mutans MT703R （血清型 e ）; 6, S. mutans OMZ175 （血清型 f ）; 7, S.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

6. pac 遺伝子の塩基配列

pac 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 pac 遺伝子を含む 5,169 bp より成る塩基配列を示した。pac 遺伝子に対応するオープンリーディングフレームは 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ィ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[47]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[48]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 S. mutans 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[49]。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[49]。 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。

```
      T TTG TGC TTT AGA ATT AAT GTT GGA TAA AGT GTG GAG TTT GTG CTC     46

  47  GAA AAA TAG CAG CGA TTG AAT GTG TTT ATA ATT CTG ATT CAG ACA TTA     94

  95  GTT TTT ATT TCA GCA AAA ATT GAC AAA TCA AAT CAA TTA TAT TAC AAT    142
                              -35                             -10
 143  TTT TTA ACG TAT ATT ACA AAA ATA TAT TTG GAA GAT TTA TTC AGA TTT    190

 191  GGA GGA TTT ATG AAA GTC AAA AAA ACT TAC GGT TTT CGT AAA AGT AAA    238
      SD          Met Lys Val Lys Lys Thr Tyr Gly Phe Arg Lys Ser Lys     13
 239  ATT AGT AAA ACA CTG TGT GGT GCT GTT CTA GGA ACA GTA GCA GCA GTC    286
  14  Ile Ser Lys Thr Leu Cys Gly Ala Val Leu Gly Thr Val Ala Ala Val     29

 287  TCT GTA GCA GGA CAA AAG GTT TTT GCC GAT GAA ACG ACC ACT ACT AGT    334
  30  Ser Val Ala Gly Gln Lys Val Phe Ala Asp Glu Thr Thr Thr Thr Ser     45

 335  GAT GTA GAT ACT AAA GTA GTT GGA ACA CAA ACT GGA AAT CCA GCG ACC    382
  46  Asp Val Asp Thr Lys Val Val Gly Thr Gln Thr Gly Asn Pro Ala Thr     61

 383  AAT TTG CCA GAG GCT CAA GGG AGT GCG AGT AAG GAA GCT GAA CAA AGT    430
  62  Asn Leu Pro Glu Ala Gln Gly Ser Ala Ser Lys Glu Ala Glu Gln Ser     77

 431  CAA ACC AAG CTG GAG AGA CAA ATG GTT CAT ACC ATT GAA GTA CCT AAA    478
  78  Gln Thr Lys Leu Glu Arg Gln Met Val His Thr Ile Glu Val Pro Lys     93

 479  ACT GAT CTT GAT CAA GCA GCA AAA GAT GCT AAG TCT GCT GGT GTC AAT    526
  94  Thr Asp Leu Asp Gln Ala Ala Lys Asp Ala Lys Ser Ala Gly Val Asn    109

 527  GTT GTC CAA GAT GCC GAT GTT AAT AAA GGA ACT GTT AAA ACA CCT GAA    574
 110  Val Val Gln Asp Ala Asp Val Asn Lys Gly Thr Val Lys Thr Pro Glu    125

 575  GAA GCA GTC CAA AAA GAA ACT GAA ATT AAA GAA GAT TAC ACA AAA CAA    622
 126  Glu Ala Val Gln Lys Glu Thr Glu Ile Lys Glu Asp Tyr Thr Lys Gln    141

 623  GCT GAG GAT ATT AAG AAG ACA ACA GAT CAA TAT AAA TCG GAT GTA GCT    670
 142  Ala Glu Asp Ile Lys Lys Thr Thr Asp Gln Tyr Lys Ser Asp Val Ala    157

 671  GCT CAT GAG GCA GAA GTT GCT AAA ATC AAA GCT AAA AAT CAG GCA ACT    718
 158  Ala His Glu Ala Glu Val Ala Lys Ile Lys Ala Lys Asn Gln Ala Thr    173

 719  AAA GAA CAG TAT GAA AAA GAT ATG GCA GCT CAT AAA GCC GAG GTT GAA    766
 174  Lys Glu Gln Tyr Glu Lys Asp Met Ala Ala His Lys Ala Glu Val Glu    189

 767  CGC ATT AAT GCT GCA AAT GCT GCC AGT AAA ACA GCT TAT GAA GCT AAA    814
 190  Arg Ile Asn Ala Ala Asn Ala Ala Ser Lys Thr Ala Tyr Glu Ala Lys    205
                                                          A-1
 815  TTG GCT CAA TAT CAA GCA GAT TTA GCA GCC GTT CAA AAA ACC AAT GCT    862
 206  Leu Ala Gln Tyr Gln Ala Asp Leu Ala Ala Val Gln Lys Thr Asn Ala    221

 863  GCC AAT CAA GCA GCC TAT CAA AAA GCC CTT GCT GCT TAT CAG GCT GAA    910
 222  Ala Asn Gln Ala Ala Tyr Gln Lys Ala Leu Ala Ala Tyr Gln Ala Glu    237

 911  CTG AAA CGT GTT CAG GAA GCT AAT GCA GCC GCC AAA GCC GCT TAT GAT    958
 238  Leu Lys Arg Val Gln Glu Ala Asn Ala Ala Ala Lys Ala Ala Tyr Asp    253

 959  ACT GCT GTA GCA GCA AAT AAT GCC AAA AAT ACA GAA ATT GCC GCT GCC   1006
 254  Thr Ala Val Ala Ala Asn Asn Ala Lys Asn Thr Glu Ile Ala Ala Ala    269

1007  AAT GAA GAA ATT AGA AAA CGC AAT GCA ACG GCC AAA GCT GAA TAT GAG   1054
 270  Asn Glu Glu Ile Arg Lys Arg Asn Ala Thr Ala Lys Ala Glu Tyr Glu    285
                                                          A-2
1055  ACT AAG TTA GCT CAA TAT CAA GCT GAA CTA AAG CGT GTT CAG GAA GCT   1102
 286  Thr Lys Leu Ala Gln Tyr Gln Ala Glu Leu Lys Arg Val Gln Glu Ala    301

1103  AAT GCC GCA AAC GAA GCA GAC TAT CAA GCT AAA TTG ACC GCC TAT CAA   1150
 302  Asn Ala Ala Asn Glu Ala Asp Tyr Gln Ala Lys Leu Thr Ala Tyr Gln    317

1151  ACA GAG CTT GCT CGT GTT CAA AAA GCC AAT GCG GAT GCT AAA GCG ACC   1198
 318  Thr Glu Leu Ala Arg Val Gln Lys Ala Asn Ala Asp Ala Lys Ala Thr    333

1199  TAT GAA GCA GCT GTA GCA GCA AAT AAT GCC AAA AAT GCG GCA CTC ACA   1246
 334  Tyr Glu Ala Ala Val Ala Ala Asn Asn Ala Lys Asn Ala Ala Leu Thr    349

1247  GCT GAA AAT ACT GCA ATT AAG CAA CGC AAT GAG AAT GCT AAG GCG ACT   1294
 350  Ala Glu Asn Thr Ala Ile Lys Gln Arg Asn Glu Asn Ala Lys Ala Thr    365

1295  TAT GAA GCT GCA CTC AAG CAA TAT GAG GCC GAT TTG GCA GCG GTG AAA   1342
 366  Tyr Glu Ala Ala Leu Lys Gln Tyr Glu Ala Asp Leu Ala Ala Val Lys    381
          A-3
1343  AAA GCT AAT GCC GCA AAC GAA GCA GAC TAT CAA GCT AAA TTG ACC GCC   1390
 382  Lys Ala Asn Ala Ala Asn Glu Ala Asp Tyr Gln Ala Lys Leu Thr Ala    397
```

```
1391  TAT CAA ACA GAG CTC GCT CGC GTT CAA AAA GCC AAT GCG GAT GCT AAA   1438
 398  Tyr Gln Thr Glu Leu Ala Arg Val Gln Lys Ala Asn Ala Asp Ala Lys    413

1439  GCG GCC TAT GAA GCA GCT GTA GCA GCA AAT AAT GCC GCA AAT GCA GCG   1486
 414  Ala Ala Tyr Glu Ala Ala Val Ala Ala Asn Asn Ala Ala Asn Ala Ala    429

1487  CTC ACA GCT GAA AAT ACT GCA ATT AAG AAG CGC AAT GCG GAT GCT AAA   1534
 430  Leu Thr Ala Glu Asn Thr Ala Ile Lys Lys Arg Asn Ala Asp Ala Lys    445

1535  GCT GAT TAC GAA GCA AAA CTT GCT AAG TAT CAA GCA GAT CTT GCC AAA   1582
 446  Ala Asp Tyr Glu Ala Lys Leu Ala Lys Tyr Gln Ala Asp Leu Ala Lys    461

1583  TAT CAA AAA GAT TTA GCA GAC TAT CCA GTT AAG TTA AAG GCA TAC GAA   1630
 462  Tyr Gln Lys Asp Leu Ala Asp Tyr Pro Val Lys Leu Lys Ala Tyr Glu    477

1631  GAT GAA CAA ACT TCT ATT AAA GCT GCA CTG GCA GAA CTT GAA AAA CAT   1678
 478  Asp Glu Gln Thr Ser Ile Lys Ala Ala Leu Ala Glu Leu Glu Lys His    493

1679  AAA AAT GAA GAC GGA AAC TTA ACA GAA CCA TCT GCT CAA AAT TTG GTC   1726
 494  Lys Asn Glu Asp Gly Asn Leu Thr Glu Pro Ser Ala Gln Asn Leu Val    509

1727  TAT GAT CTT GAG CCA AAT GCG AAC TTA TCT TTG ACA ACA GAT GGG AAG   1774
 510  Tyr Asp Leu Glu Pro Asn Ala Asn Leu Ser Leu Thr Thr Asp Gly Lys    525

1775  TTC CTT AAG GCT TCT GCT GTG GAT GAT GCT TTT AGC AAA AGC ACT TCA   1822
 526  Phe Leu Lys Ala Ser Ala Val Asp Asp Ala Phe Ser Lys Ser Thr Ser    541

1823  AAA GCA AAA TAT GAC CAA AAA ATT CTT CAA TTA GAT GAT CTA GAT ATC   1870
 542  Lys Ala Lys Tyr Asp Gln Lys Ile Leu Gln Leu Asp Asp Leu Asp Ile    557

1871  ACT AAC TTA GAA CAA TCT AAT GAT GTT GCT TCT TCT ATG GAG CTT TAT   1918
 558  Thr Asn Leu Glu Gln Ser Asn Asp Val Ala Ser Ser Met Glu Leu Tyr    573

1919  GGG AAT TTT GGT GAT AAA GCT GGC TGG TCA ACG ACA GTA AGC AAT AAC   1966
 574  Gly Asn Phe Gly Asp Lys Ala Gly Trp Ser Thr Thr Val Ser Asn Asn    589

1967  TCA CAG GTT AAA TGG GGA TCG GTA CTT TTA GAG CGC GGT CAA AGC GCA   2014
 590  Ser Gln Val Lys Trp Gly Ser Val Leu Leu Glu Arg Gly Gln Ser Ala    605

2015  ACA GCT ACA TAC ACT AAC CTG CAG AAT TCT TAT TAC AAT GGT AAA AAG   2062
 606  Thr Ala Thr Tyr Thr Asn Leu Gln Asn Ser Tyr Tyr Asn Gly Lys Lys    621

2063  ATT TCT AAA ATT GTC TAC AAG TAT ACA GTG GAC CCT AAG TCC AAG TTT   2110
 622  Ile Ser Lys Ile Val Tyr Lys Tyr Thr Val Asp Pro Lys Ser Lys Phe    637

2111  CAA GGT CAA AAG GTT TGG TTA GGT ATT TTT ACC GAT CCA ACT TTA GGT   2158
 638  Gln Gly Gln Lys Val Trp Leu Gly Ile Phe Thr Asp Pro Thr Leu Gly    653

2159  GTT TTT GCT TCT GCT TAT ACA GGT CAA GTT GAA AAA AAC ACT TCT ATT   2206
 654  Val Phe Ala Ser Ala Tyr Thr Gly Gln Val Glu Lys Asn Thr Ser Ile    669

2207  TTT ATT AAA AAT GAA TTC ACT TTC TAT CAC GAA GAT GAA AAA CCA ATT   2254
 670  Phe Ile Lys Asn Glu Phe Thr Phe Tyr His Glu Asp Glu Lys Pro Ile    685

2255  AAT TTT GAT AAT GCC CTT CTC TCA GTG ACT TCT CTT AAC CGT GAA CAT   2302
 686  Asn Phe Asp Asn Ala Leu Leu Ser Val Thr Ser Leu Asn Arg Glu His    701

2303  AAC TCT ATT GAG ATG GCT AAA GAT TAT AGT GGT AAA TTT GTC AAA ATC   2350
 702  Asn Ser Ile Glu Met Ala Lys Asp Tyr Ser Gly Lys Phe Val Lys Ile    717

2351  TCT GGT TCA TCT ATT GGT GAA AAG AAT GGC ATG ATT TAT GCT ACA GAT   2398
 718  Ser Gly Ser Ser Ile Gly Glu Lys Asn Gly Met Ile Tyr Ala Thr Asp    733

2399  ACT CTT AAC TTT AAA CAG GGT GAA GGT GGC TCT CGC TGG ACT ATG TAT   2446
 734  Thr Leu Asn Phe Lys Gln Gly Glu Gly Gly Ser Arg Trp Thr Met Tyr    749

2447  AAA AAT AGT CAA GCT GGT TCA GGA TGG GAT AGT TCA GAT GCG CCG AAT   2494
 750  Lys Asn Ser Gln Ala Gly Ser Gly Trp Asp Ser Ser Asp Ala Pro Asn    765

2495  TCT TGG TAT GGA GCA GGG GCT ATT AAA ATG TCT GGT CCG AAT AAC CAT   2542
 766  Ser Trp Tyr Gly Ala Gly Ala Ile Lys Met Ser Gly Pro Asn Asn His    781

2543  GTT ACT GTA GGA GCA ACT TCT GCA ACA AAT GTA ATG CCA GTT TCT GAC   2590
 782  Val Thr Val Gly Ala Thr Ser Ala Thr Asn Val Met Pro Val Ser Asp    797

2591  ATG CCT GTT GTT CCT GGT AAG GAC AAT ACT GAT GGC AAA AAA CCA AAT   2638
 798  Met Pro Val Val Pro Gly Lys Asp Asn Thr Asp Gly Lys Lys Pro Asn    813

2639  ATT TGG TAT TCT TTA AAT GGT AAA ATC CGT GCG GTT AAT GTT CCT AAA   2686
 814  Ile Trp Tyr Ser Leu Asn Gly Lys Ile Arg Ala Val Asn Val Pro Lys    829

2687  GTT ACT AAG GAA AAA CCC ACA CCT CCG GTT AAA CCA ACA GCT CCA ACT   2734
 830  Val Thr Lys Glu Lys Pro Thr Pro Pro Val Lys Pro Thr Ala Pro Thr    845

2735  AAA CCA ACT TAT GAA ACA GAA AAG CCA TTA AAA CCG GCA CCA GTA GCT   2782
 846  Lys Pro Thr Tyr Glu Thr Glu Lys Pro Leu Lys Pro Ala Pro Val Ala    861
```

```
                                P-1
2783  CCA AAT TAT GAA AAG [GAG CCA ACA CCG CCG ACA AGG ACA CCG GAT CAA   2830
 862  Pro Asn Tyr Glu Lys [Glu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Thr Pro Asp Gln    877

2831  GCA GAG CCA AAC AAA CCC ACA CCG CCG ACC TAT GAA ACA GAA AAG CCG   2878
 878  Ala Glu Pro Asn Lys Pro Thr Pro Pro Thr Tyr Glu Thr Glu Lys Pro    893

                                                            P-2
2879  TTG GAG CCA GCA CCT GTT GAG CCA AGC TAT GAA GCA [GAG CCA ACA CCG   2926
 894  Leu Glu Pro Ala Pro Val Glu Pro Ser Tyr Glu Ala [Glu Pro Thr Pro    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 Gln 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

                    P-3
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 CCA ACA CCG CCG   3118
 958  Pro Asn Lys Pro Val Glu Pro Thr Tyr Glu] Val Ile Pro 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 Ile 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 TAT CAA TTT AAT CCT GAA GCT ACA AAA GCT GCA AGC CCT GGC TTT   3406
1054  Gly Tyr Gln Phe Asn 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  TAT AAG AAT AAT TTC ACG CTC ACA GTC AAT GAT GCT TAT GGC ATT AAA   3598
1118  Tyr Lys Asn Asn Phe Thr Leu Thr Val Asn Asp Ala Tyr Gly Ile Lys   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 Ile 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  GAA GCA GCC CCT CAA GAA ATT AGA GAT GTT CTT TCT AAG GCA GGA ATT   3982
1246  Glu Ala Ala Pro Gln Glu Ile Arg Asp Val Leu Ser Lys Ala Gly Ile   1261

3983  AGA CCT AAA GGT GCT TTC CAA ATT TTC CGT GCC GAT AAT CCA AGA GAA   4030
1262  Arg Pro Lys Gly Ala Phe Gln Ile Phe Arg Ala Asp Asn Pro Arg Glu   1277

4031  TTT TAT GAT ACT TAT GTC AAA ACT GGA ATT GAT TTG AAG ATT GTA TCA   4078
1278  Phe Tyr Asp Thr Tyr Val Lys Thr Gly Ile Asp Leu Lys Ile Val Ser   1293

4079  CCA ATG GTT GTT AAA AAA CAA ATG GGA CAA ACA GGC GGC AGT TAT GAA   4126
1294  Pro Met Val Val Lys Lys Gln Met Gly Gln Thr Gly Gly Ser Tyr Glu   1309

4127  AAT CAA GCT TAC CAA ATT GAC TTT GGT AAT GGT TAT GCA TCA AAT ATC   4174
1310  Asn Gln Ala Tyr Gln Ile Asp Phe Gly Asn Gly Tyr Ala Ser Asn Ile   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

4223  ACA CTT GAT CCG GCT GAT ACA AAT AAT GTT GAT GGT CAG ACT ATT CCA   4270
1342  Thr Leu Asp Pro Ala Asp Thr Asn Asn Val Asp Gly Gln Thr Ile Pro   1357

4271  CTT 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

4319  AAT CAC TCA GAA GAA CTC TTT GAA TAC AAT TTC TAT GAT GAT TAT GAT   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

4415  GAT ATC ACT CTT AAA AAC GGT GTT ATT ATC AAG TCA GGT ACT GAG TTA   4462
1406  Asp Ile Thr Leu Lys Asn Gly Val Ile Ile Lys Ser Gly Thr Glu Leu   1421

4463  ACT CAG TAT ACG ACA GCG GAA GTT GAT ACC ACT AAA GGT GCT ATC ACA   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
1438  Ile Lys Phe Lys Glu Ala Phe Leu Arg Ser Val Ser Ile Asp Ser Ala   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

4655  AAT ACA GTG AAA ACA ACT ACT CCT GAG GAT CCT GCA GAC CCT ACT GAT   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
1502  Pro Gln Asp Pro Ser Ser Pro Arg Thr Ser Thr Val Ile Ile Tyr Lys   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
1534  Asn Thr Gly Val Thr Asn Asn Ala Tyr Met Pro Leu Leu Gly Ile Ile   1549

4847  GGC TTA GTT ACT AGT TTT AGT TTG CTT GGT TTA AAG GCT AAG AAA GAT   4894
1550  Gly Leu Val Thr Ser Phe Ser Leu Leu Gly Leu Lys Ala Lys Lys Asp   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 TTT 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[48]。
下線 SD は Shine-Dalgarno 配列[47]。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[42]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

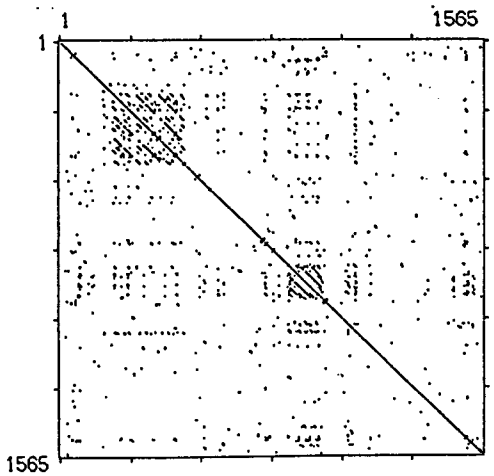

図９　PAc のアミノ酸配列の相同性プロット。縦軸、横軸とも PAc のアミノ酸配列。数字はアミノ酸残基数。１０個のアミノ酸のうち８個が一致する箇所に点が現われる。

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。

```
A
A1   219 TNAANQAAYQKALAAYQAELKRVQEANAAAKAAYDTAVAANNAKNTEIAA
         :::: : ::  : ::: :: ::: ::: ::: :  :::::::::    :
A2   301 ANAANEADYQAKLTAYQTELARVQKANADAKATYEAAVAANNAKNAALTA
         :::::::::::::::::::::::::::::::: :::::::::: ::::::
A3   383 ANAANEADYQAKLTAYQTELARVQKANADAKAAYEAAVAANNAANAALTA

                                                 一致するアミノ酸の割合
     269 ANEEIRKRNATAKAEYETKLAQYQAELKRVQE
          :  :  ::  ::: ::  : :: : :  :                48/82
     351 ENTAIKQRNENAKATYEAALKQYEADLAAVKK
         :::::: ::  ::: ::: :  : :::: . :               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[50] や A 群レンサ球菌の M タンパク[49]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 S. mutans Ingbritt 株から Forester ら[22]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。

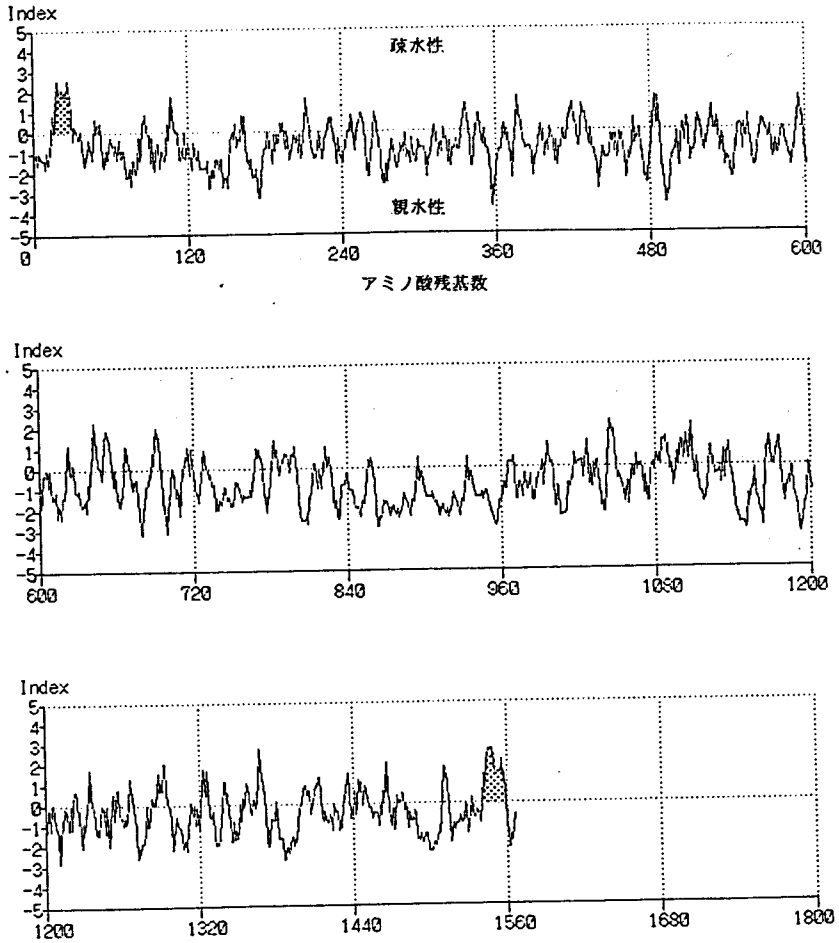

図１１　PAc の一次構造から推定される疎水性。 Kyte と Doolittle の方法[41]により、 PAc の疎水性をプロットした。 Index は疎水性の指標。５がもっとも疎水性で－５がもっとも親水性。

表1　PAc のアミノ酸組成

アミノ酸	塩基配列から推定した PAc PrePAc[a]	MatPAc[b]	精製 P1 抗原[c]
		(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

a.　シグナルペプチドを含む PAc 前駆体
b.　成熟 PAc
c.　Forester ら[22]の報告から
d.　記載なし

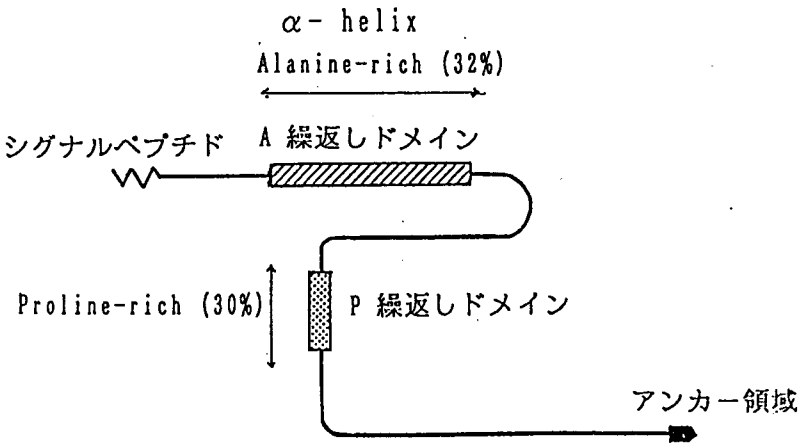

図12　PAc の構造モデル。PAc は 1,565 のアミノ酸より成り、分子量の理論値は 170,773 となる。

8. PAc 欠損株の作成とその菌体疎水性

PAc が S. mutans 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 pac 遺伝子の途中に Em^r 遺伝子を挿入し、これを S. mutans MT8148 株に形質転換で導入した（図１３）。得られた Em^r 株は、組換えの結果、染色体 DNA 上の pac 遺伝子の途中に Em^r 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

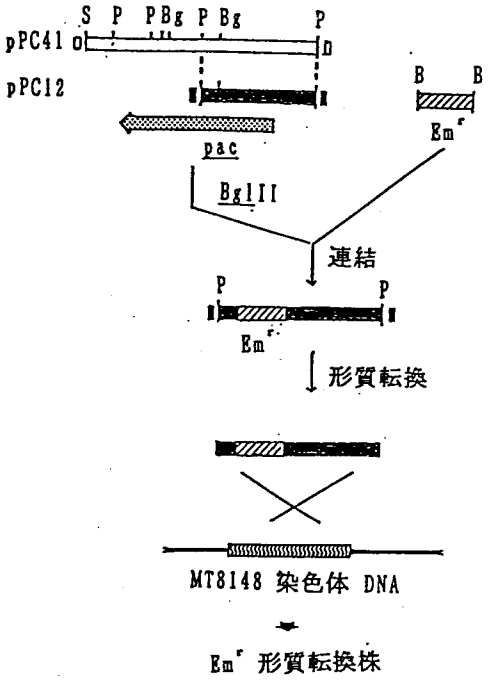

図１３　エリスロマイシン耐性遺伝子（ Em^r ）の挿入による pac 遺伝子の変異と PAc 欠損株の作成。 Em^r をコードする 1.8 kb の BamHI 断片を pPC12 の BglII 部位に挿入した。作成したプラスミドを PstI で切断し、 S. mutans MT8148 株に形質転換した。組換えを起こした株はエリスロマイシン耐性株として選択された。略号、 B: BamHI; Bg, BglII; P, PstI; S, SacI.

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^r 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。

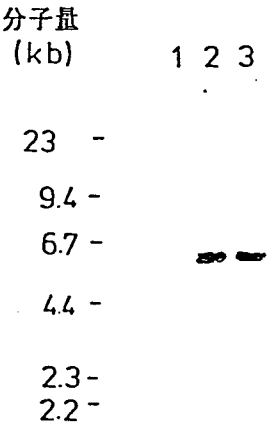

図１４　PAc 欠損株における染色体 DNA 中の Em^r 遺伝子の検出。染色体 DNA を EcoRI で切断し、1.8 kb Em^r 遺伝子を ^{32}P で標識してサザンブロット分析を行った。1, S. mutans MT8148 株； 2、PAcEm-2 株； 3、PAcEm-3 株。

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 ヘキサデカンへの吸着比（％）
MT8148	29.5 ± 3.6
PAcEm-2	4.9 ± 1.5
PAcEm-3	7.1 ± 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 ± 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。

pac 遺伝子は E. coli 中で発現し、SDS-PAGE 上での分子量が S. mutans 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 S. mutans 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 S. mutans 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、S. mutans の PAc が S. mutans 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 E. coli 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、E. coli 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[51]。

Lee ら[52]はごく最近、 S. mutans NG5 株 (血清型 c) から P1 抗原 (PAc と同一抗原) の遺伝子 (spaP1)をクローニングした 。

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、 S. mutans 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 spaP1 遺伝子の制限酵素切断地図を pac 遺伝子 のそれと比較すると HindIII 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[13),20)]。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 [53)]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 S. sobrinus 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 pac 遺伝子の塩基配列を Sanger のジデオキシ法[39)]で決定した。その結果、 4,695 bp からなるオープンリーディ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 オープンリーディングフレームは検出できなかった 。

この pac 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[49] 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[49]、また、 切断サイトにアラニンが存在[54]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 S. mutans 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[49]は、 M6 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[55]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[56]。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[56]。

Forester ら[22]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[42]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α－ヘリックス構造であった。α－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[57]。 M タンパクでは N 末端側の約 70% がα－ヘリックス構造であるといわれる[49]。 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[58]。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α－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[18]は、PAc に対する抗血清が多型核白血球による S. mutans 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[59]。 Uhlen ら[50]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[50),59)]。 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。

S. mutans 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[1),4)]。 S. mutans 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[4)]。また、 GTase を欠損した S. mutans 変異株は、う蝕原性が低下していることも知られている[60)]。 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、S. mutans 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[13)]、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、 S. mutans 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[8)]。そこで、本研究では、クローニングした pac 遺伝子を利用して、 PAc を欠損した S. mutans 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 S. mutans 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 [61] は、菌体疎水性が低下した S. mutans 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 S. mutans 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 [62] は、 S. sobrinus の spaA 遺伝子を病原性の欠落した Salmonella 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 pac 遺伝子についても同じような応用は可能であろう。また、pac 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 S. mutans MT8148 株（血清型 c ）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 pac 遺伝子は E. coli 内で発現し、SDS-PAGE 上で S. mutans 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 S. mutans 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。 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 に属する S. mutans の DNA だけがこのプローブと反応し、S. sobrinus 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 S. mutans 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。

文献

1) Hamada, S. and Slade, H. D. (1980): Biology, immunology, and cariogenicity of Streptotococcus mutans. Microbiol. Rev., 44, 331-384.

2) Loesche, W. J. (1986): Role of Streptococcus mutans in human dental decay. Microbiol. Rev., 50, 353-380.

3) Coykendall, A. L. and Gustafson, K. B. (1986): Taxonomy of Streptococcus mutans. Molecular microbiology and immunobiology of Streptococcus mutans. (Hamada, S., Michalek, S. M., Kiyono, H., Menaker, L. and McGhee, J. R., editors). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 21-28.

4) Mukasa, H. (1986): Properties of Streptococcus mutans glucosyltransferases. Molecular microbiology and immunobiology of Streptococcus mutans. (Hamada, S., Michalek, S. M., Kiyono, H., Menaker, L. and McGhee, J. R., editors). Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 121-132.

5) 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。

6) Cohen, B., Peach, S. L. and Russell, R. R. B. (1983): Immunization against dental caries. Med. Microbiol., 2, 255-294.

7) Hay, D. I. (1967): The adsorption of salivary proteins by hydroxyapatite and enamel. Arch. Oral Biol., 18, 937-946.

8) 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 Streptococcus mutans against dental caries in rhesus monkeys. Infect. Immun., 34, 407-415.

10) 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. 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 Streptococcus mutans. Infect. Immun., 55, 1274-1278.

12) Russell, R. R. B., Beighton, D. and Cohen, B. (1982): Immunisation of Monkeys (Macaca fascicularis) with antigens purified from Streptococcus mutans. British Dent. J., 152, 81-84.

13) 浜田茂幸、岡橋暢夫、古賀敏比古 (1986): Streptococcus mutans 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 Streptococcus mutans. 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 P1, 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 Streptococcus mutans. Infect. Immun., 44, 68-75.

17) Russell, R. R. B. and Smith, K. (1986): Effect of subculturing on location of Streptococcus mutans 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 Streptococcus mutans: purification and properties of a double antigen and its protease-resistant component. Infect. Immun.,

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 globisporus 1829. Arch. Oral Biol., 23, 543-549.

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 Escherichia coli: cryogenic preservation of competent cells. J. Bacteriol., 132, 349-351.
32) Lindler, L. E. and Macrina, F. L. (1986): Characterization of genetic transformation in Streptococcus mutans 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 e polysaccharide antigen of Streptococcus mutans. 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): Molecular cloning: a laboratory manual. 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 Streptococcus sanguis (Challis). J. Bacteriol., 143,1425-1435.

44) Kuramitsu, H. K. (1987): Utilization of a mini-mu transposon to construct defined mutants in Streptococcus mutans. Mol. Microbiol., 1, 229-231.

45) Castilho, B. A., Olfson, P. and Casadaban, M. J. (1984): Plasmid insertion mutagenesis and lac 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 Escherichia coli 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

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

50) Uhlen, M., Lindberg, M. and Philipson, L. (1984): The gene for staphylococcal protein A. Immunology Today, 5, 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; α-helical coiled-coil structure and

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^- group A streptococcus to M^+ 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): Streptococcus mutans 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 Salmonella typhimurium Δcya Δcry 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* PAc. The cloned *pac* 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 *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.

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 pac gene. Cell-surface hydrophobicity of the mutants was lower than that of the parent strain.

REVISED MANUSCRIPT

Cloning of a surface protein antigen gene from serotype c *Streptococcus mutans*

Nobuo Okahashi*,§ , Chihiro Sasakawa*, Masanosuke Yoshikawa*, Shigeyuki Hamada+ and Toshihiko Koga§

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

+Department of Oral Microbiology, Osaka University Faculty of Dentistry, Suita, Osaka 565, Japan.

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

Running title: Gene for *S. mutans* protein antigen

Key words: *Streptococcus mutans*; 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 *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 to 210 kD. Immunodiffusion analysis revealed that the cloned PAc had the same specific determinants as the *S. mutans* PAc. The cloned *pac* 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 *e* and *f* *S. mutans*. PAc-defective mutants were constructed by the insertion of an erythromycin-resistance gene into the *pac* 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 c *Streptococcus mutans* is most frequently isolated from human dental plaque (Hamada and Slade, 1980).

Serotype c *S. mutans* possesses various 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 *et al.*, 1980), IF (Hughes *et al.*, 1980) and P1 (Forester *et al.*, 1983). This high-molecular-weight protein antigen is produced by serotypes e and f *S. mutans* as well as serotype c. This protein antigen shows serological cross-reactivity with a protein of 210 kD named SpaA (Holt *et al.*, 1982) or PAg (Okahashi *et al.*, 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 *et al.*, 1981). In this regard, Scully *et al.* (1980) reported that antiserum directed against this antigen opsonizes *S. mutans* cells for phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. In addition, antiserum to this antigen has been reported to block adherence of saliva-coated hydroxyapatite *in vitro* (Douglas and Russell, 1984) and to reduce colonization *in vivo* (Lehner *et al.*, 1985). McBride *et al.* (1985)

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 *S. mutans*, we attempted to clone the structural gene for this protein. In this report, we refer to the 190 kD protein antigen as PAc (*p*rotein *a*ntigen serotype *c*).

Results

Cloning of the pac gene in E. coli

Fragments of PstI-digested chromosomal DNA of S. mutans MT8148 (serotype c) were ligated into the PstI site of pUC118. About 5000 recombinant Escherichia coli clones were screened for reactivity with rabbit antibody against the 190 kD protein antigen (PAc) of S. mutans MT8148 by colony immunoassay. Six clones were positive for antigen expression. Plasmid DNAs from these antibody-reactive clones were prepared, digested with PstI 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

estimated.

pPC12 DNA was digested with SacI or HindIII, self-ligated, and then transformed into E. coli 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 HindIII fragment of the right side of 3.8 kb inserted DNA (pPC12-del.H) did not affect the antigen expressed. On the other hand, deletion of the 0.7 kb SacI 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 E. coli MC1061. Their plasmid DNAs were extracted, digested with PstI, 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). E. coli harboring plasmid pPC12-del.1, -del.2 or -del.3 produced the antigen of 95 kD. However, E. coli 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 HindIII site toward the internal SacI site. The 3.8 kb insert fragment appeared to contain a promoter that was functional in E. coli, since clones containing the insert in either orientation with respect to the lacZ 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.

Construction of the complete pac gene

A preliminary Southern hybridization analysis of SacI-digested S. mutans MT8148 chromosomal DNA indicated that a single band of approximately 4 kb hybridized with the radiolabeled 0.7 kb PstI-SacI fragment of pPC12. Therefore, the 0.7 kb PstI-SacI fragment was used for the colony hybridization to screen an E. coli library which consisted of SacI 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 SacI, ligated into the SacI site of pPC12, and transformed into E. coli 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 PstI, SacI and HindIII 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

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 *S. mutans* PAc formed a fused precipitin line with cell extract of *E. coli* MC1061 (pPC41) and purified PAc of *S. mutans* MT8148. *E. coli* MC1061 (pUC118) extract, on the other hand, formed no precipitin line. Cell extract of *E. coli* 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 *E. coli* 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 *E. coli* 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 *pac* gene were present in other streptococcal species, hybridization studies with a specific probe were undertaken. To generate the *pac* gene probe, pPC41 was digested to completion with *Pst*I. 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 *Pst*I fragment encoded the central

region of PAc (see Fig. 3).

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

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 S. mutans MT8148 (serotype c) has been cloned. The cloned PAc reacted with antiserum directed against S. mutans PAc, and produced a fused precipitin line with S. mutans PAc in immunodiffusion test. When produced in recombinant E. coli, 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 S. mutans 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 E. coli (Scott and Fischetti, 1983; Kehoe et al., 1985).

Genes of several other surface proteins of mutans streptococci have been cloned by others. Holt et al. (1982) reported the cloning of a gene coding for a high-molecular-weight protein antigen SpaA of S. sobrinus (serotype g). However, the spaA 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 E. coli extracts containing the cloned gene has shown a protein band 210 kD. Although S. sobrinus SpaA protein is known to be immunologically related to S. mutans PAc protein (Okahashi et al., 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

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 S. sobrinus 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°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.

Although it has been reported that PAc is a potent vaccine against dental caries (Lehner et al., 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 S. mutans. Other properties of the PAc-defective mutants are now under investigation.

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

Experimental procedures

Bacterial strains and plasmid vectors

S. mutans MT8148, a typical strain of serotype *c* *S. mutans*, has been described previously (Okahashi *et al.*, 1984). Other streptococcal strains used in this study were as follows: *S. cricetus* E49 (mutans serotype *a*), *S. rattus* FA1 (serotype *b*), *S. sobrinus* strains B13 (serotype *d*), MT3791 (serotype *g*), *S. downei* MFe28 (serotype *h*), *S. mutans* strains MT703R (serotype *e*) and OMZ175 (serotype *f*), *S. sanguis* strains ATCC10557 and ST3, *S. salivarius* HHT, and *S. pyogenes* 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. *E. coli* K-12 strains MC1061 (Sasakawa *et al.*, 1983) and JM109 (Yanisch-Perron *et al.*, 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 *S. mutans* MT8148 grown in TTY medium according to the methods of Russell *et al.* (1980) and Forester *et al.* (1983), as modified by Okahashi *et al.* (1986). This protein had a molecular weight of about 190 kD and immunologically identical to

antigen B kindly supplied by Dr. R. R. B. Russell (R. Russell, 1979; Okahashi et al., 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

S. mutans 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^{-1} lysozyme for 30 min at 37°C, followed by N-acetylmuramidase SG (0.1 mg ml^{-1}, 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^{-1}) for 30 min, and with Pronase E (0.3 mg ml^{-1}, 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

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 XbaI and KpnI, 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 S. mutans MT8148 was digested with PstI (Toyobo Co., Osaka, Japan) and ligated with T4 DNA ligase (Takara Shuzo) to PstI-digested, calf intestine alkaline phosphatase (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, West Germany)-treated pUC118. E. coli JM109 was then transformed, and plated LB (Maniatis et al., 1982) agar containing ampicillin (50 $\mu g\ ml^{-1}$), 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside (40 $\mu g\ ml^{-1}$)(Boehringer Mannheim) and isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (0.2 mM)(Boehringer Mannheim). A similar procedure was employed to construct the SacI 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 $\mu g\ ml^{-1}$

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_2O_2 and 10 mM Tris-HCl (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 ^{32}P-labeled probe.

Preparation of sonic extract of recombinant E. coli

Recombinant E. coli cells were grown to a late logarithmic phase in 500 ml of LB medium containing ampcillin (50 μg ml^{-1}). 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

Seiko Co., Tokyo, Japan). After treatment with nuclease P1 (10 μg 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 *E. coli* 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 μl) 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 *p*-nitrophenyl phosphate as the substrate. After incubation for 60 min at 37°C, the

optical density at 405 nm (OD_{405}) was measured (Hamada et al., 1984).

Southern hybridization

Chromosomal DNAs from various streptococci were digested with PstI. The DNA fragments separated by agarose gel electrophoresis were transferred to nitrocellulose membranes by standard procedures (Maniatis et al., 1982). The 1.5 kb PstI fragment of the pac gene was radiolabelled by nick translation (Maniatis et al., 1982) using ^{32}P-labeled deoxycytidine triphosphate. Hybridization on nitrocellulose membranes was performed according to the procedure of Sasakawa et al. (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 BamHI cleavage of transposon MudE (Kuramitsu, 1987; Makino et al., 1988). The Em^r fragment was ligated into the BglII site of pPC12 (Fig. 6). The resultant plasmid $pPC12Em^r$ was used as the source of the defective pac gene. The linear 5.6 kb pac gene fragment with an Em^r insert was isolated from agarose gels after digestion of $pPC12Em^r$ with PstI. Transformation of S. mutans MT8148 with the defective pac gene was carried

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 *S. mutans* was determined by their adsorption to hexadecane (Rosenberg *et al.*, 1980). Cells grown in brain heart infusion broth (Difco) were suspended in PUM buffer (Rosenberg *et al.*, 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.

References

Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res 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. Anal Biochem 112:195-203.

Coykendall, A. L., and Gustafson, K. B. (1986) Taxonomy of Streptococcus mutans. In Molecular Microbiology and Immunology of Streptococcus mutans. 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 Streptococcus mutans adherence to saliva-coated hydroxyapatite. FEMS Microbiol Lett 25:211-214.

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.

Gibbons, R. J. (1984) Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. J Dent Res 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. Proc Natl Acad Sci USA 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. Microbiol Immunol 28:1009-1021.

Hamada, S. and Slade, H. D. (1980) Biology, immunology, and cariogenicity of Streptococcus mutans. 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) Streptococcus mutans genes that code for extracellular proteins in Escherichia coli K-12. Infect Immun 38:147-156.

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. In Streptococcal Genetics. 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 Streptococcus mutans and human cardiac tissue. Infect Immun 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 Streptococcus pyogenes genome. Infect Immun 48:190-197.

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

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. Nature (London) 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. Infect Immun 50:796-799.

Lehner, T., Russell, M. W., Caldwell, J., and Smith, R. (1981) Immunization with purified protein antigens from Streptococcus mutans against dental caries in rhesus monkeys. Infect Immun 34:407-415.

Lindler, L. E., and Macrina, F. L. (1986) Characterization of genetic transformation in Streptococcus mutans by using a novel high-efficiency plasmid marker rescue system. J Bacteriol 166:658-665.

Loesche, W. J. (1986) Role of Streptococcus mutans in human dental decay. Microbiol Rev 50:353-380.

Makino, S., Sasakawa, C., Uchida, I., Terakado, N., and Yoshikawa, M. (1988) Cloning and CO_2-dependent expression of the genetic region for encapsulation from Bacillus anthracis. Mol Microbiol 2:371-376.

Maniatis, T., Fritsch, E. F., and Sambrook, J. (1982) Molecular Cloning; A Laboratory Manual. 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 Molecular Basis of Oral Microbial Adhesion. Mergenhagen, S. E., and Rosan, B. (eds). Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp.85-93.

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.

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.

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 Streptococcus mutans: purification and properties of a double antigen and its protease-resistant component. Infect Immun 28:486-493.

Russell, R. R. B. (1979) Wall-associated protein antigens of Streptococcus 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 IS50. Proc Natl Acad Sci USA 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 (Tn5)-mediated suppressive integration of ColE1 derivatives into the chromosome of

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 Streptococcus mutans. Immunology 41:467-473.

Scott, J. R., and Fischetti, V. A. (1983) Expression of streptococcal M protein in Escherichia coli. Science 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 Streptococcus mutans. 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.

Table 1. Cell-surface hydrophobicity of Em^r transformants.

Strain	Hydrophobicity[a] (% adsorbed to hexadecane)	ELISA for PAc[b] (OD_{405})
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

a. The relative surface hydrophobicity of cells was determined by their adsorption to hexadecane. Values are the mean ± 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 ± SD of triplicate assays. OD_{405}, 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 PstI fragment of S. mutans 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, HindIII; P, PstI; S, SacI.

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

Fig. 3. Endonuclease restriction map of pPC41. S. mutans DNA insert is indicated by the thick line. The broken bars indicate the plasmid vector pUC118. Abbreviations: B, BamHI; Bg, BglII; E, EcoRI; E14, EcoT14I; H, HindIII; P, PstI; S, SacI. There is no site in the insert for KpnI, SalI or XbaI.

Fig. 4. SDS-PAGE and Western bolt analyses of cell extracts of E. coli harvoring pUC118 and pPC41.
A: Coomassie blue staining of the gel.

B: Western blot showing the reaction of rabbit anti-PAc serum.
Lane 1, chromatographically purified PAc of S. mutans MT8148; lane 2, cell extract of E. coli MC1061 (pUC118); lane 3, cell extract of MC1061 (pPC41).

Fig. 5. Southern hybridization analysis of various streptococcal DNAs digested with PstI. ^{32}P-labeled 1.5 kb PstI fragment of pPC41 was used as the probe.
A: Lane 1, S. cricetus E49 (serotype a); lane 2, S. rattus FA1 (serotype b); lane 3, S. mutans MT8148 (serotype c); lane 4, S. sobrinus B13 (serotype d); lane 5, S. mutans MT703R (serotype e); lane 6, S. mutans OMZ175 (serotype f); lane 7, S. sobrinus MT3791 (serotype g); lane 8, S. downei MFe28 (serotype h); lane 9, S. sanguis ATCC10557; lane 10, S. sanguis ST3; lane 11, S. salivarius HHT; lane 12, S. pyogenes SF42.
B: The open bar represents the 7.5 kb insert DNA of pPC41. The fragment used as the probe (1.5 kb 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 BglII site of the pac gene (thick line) in pPC12. The resultant pPC12Em^r plasmid was cleaved with PstI, and transformed into S. mutans MT8148. The right portion of the figure depicts the recombinatial event between the inactivated pac gene and the homologous region of the MT8148 chromosome (open bar). Abbreviations: B, BamHI; Bg,

BglII; H, *HindIII*; P, *PstI*; S, *SacI*.

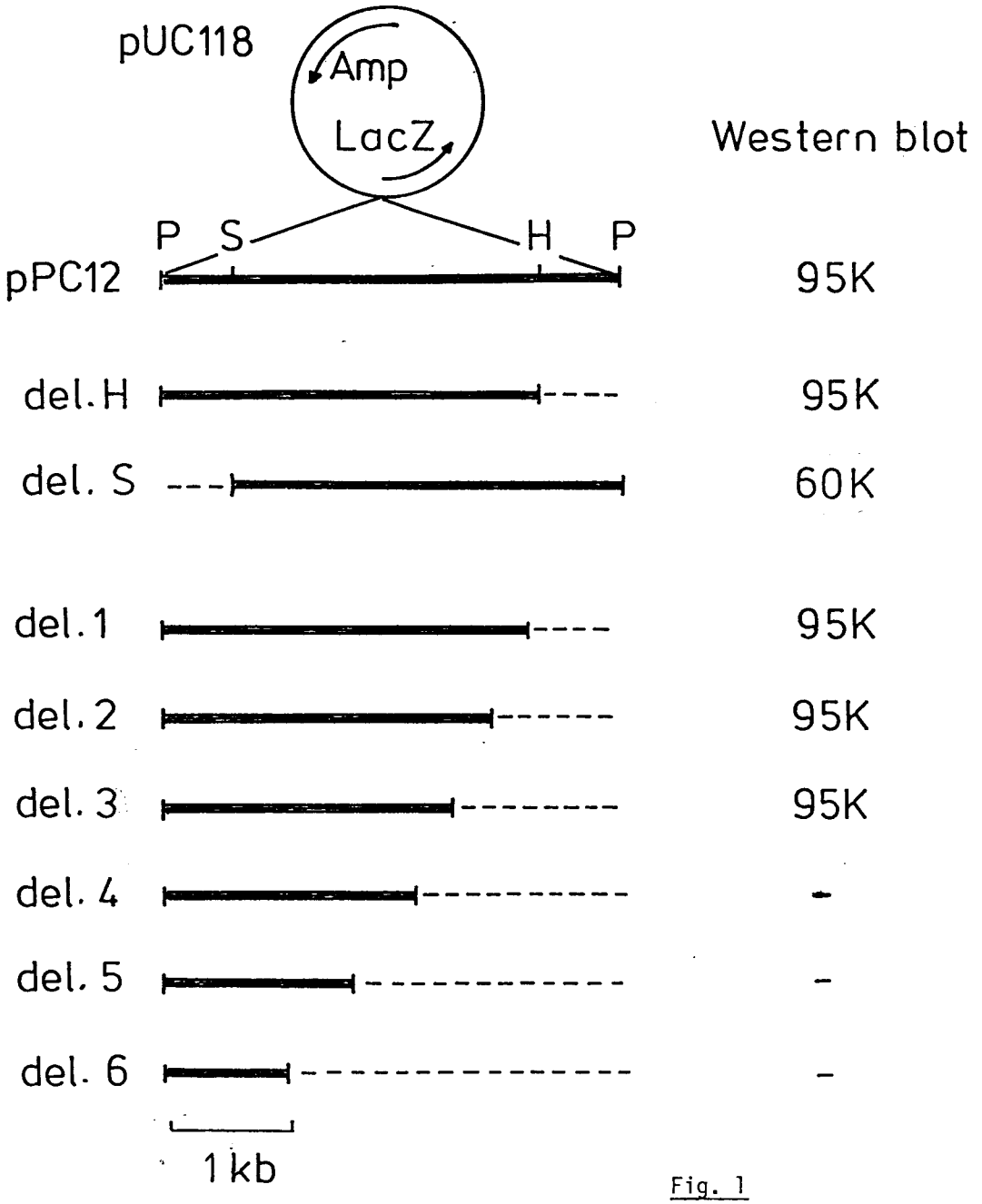
pUC118
Amp
LacZ
Western blot
P
S
H
P
pPC12
95K
del.H
95K
del. S
60K
del.1
95K
del.2
95K
del.3
95K
del.4
-
del.5
-
del.6
-
1 kb

Fig. 1

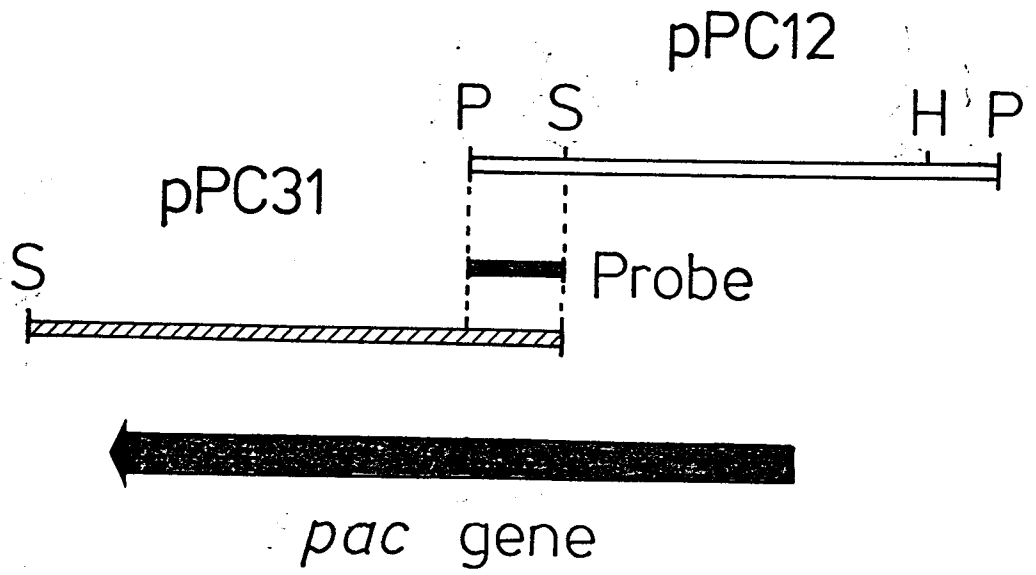

Fig. 2

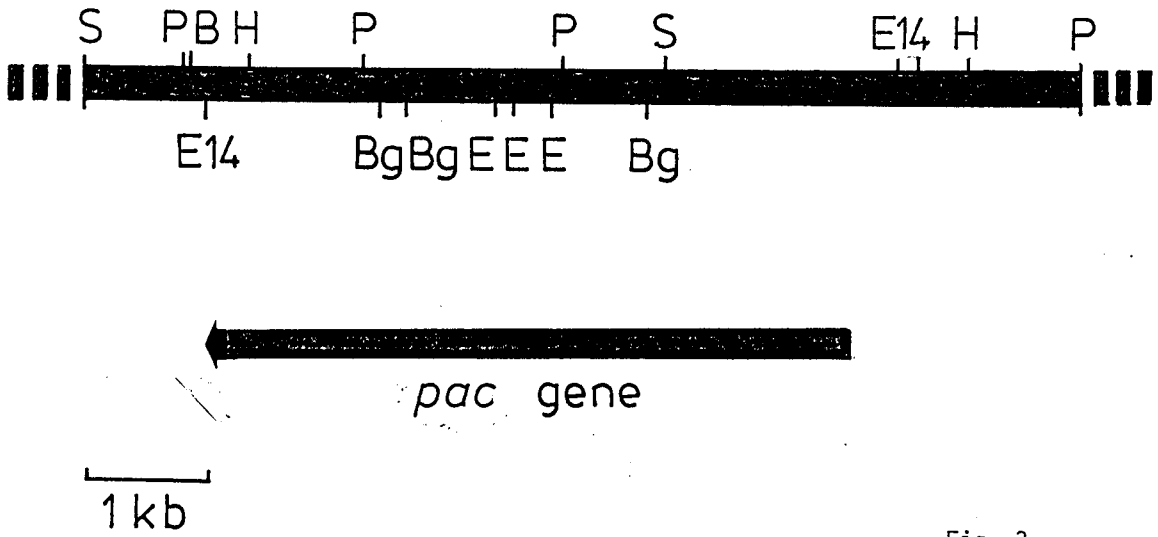

Fig. 3

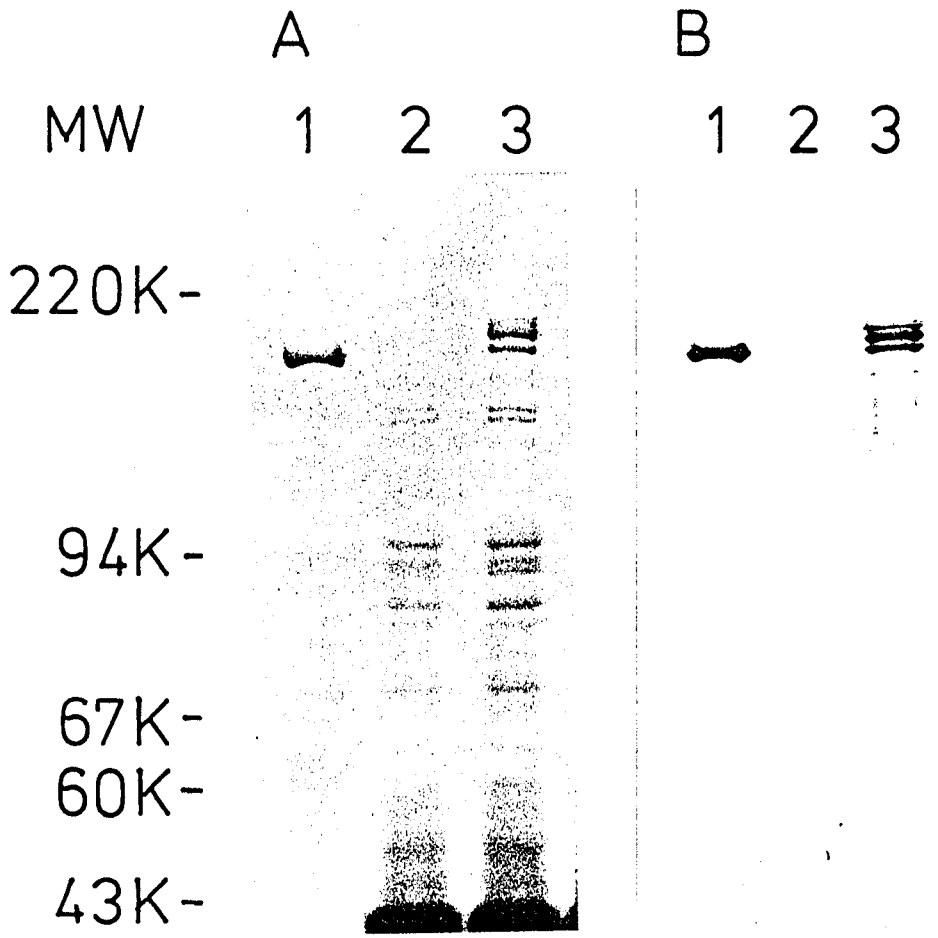

Fig. 4

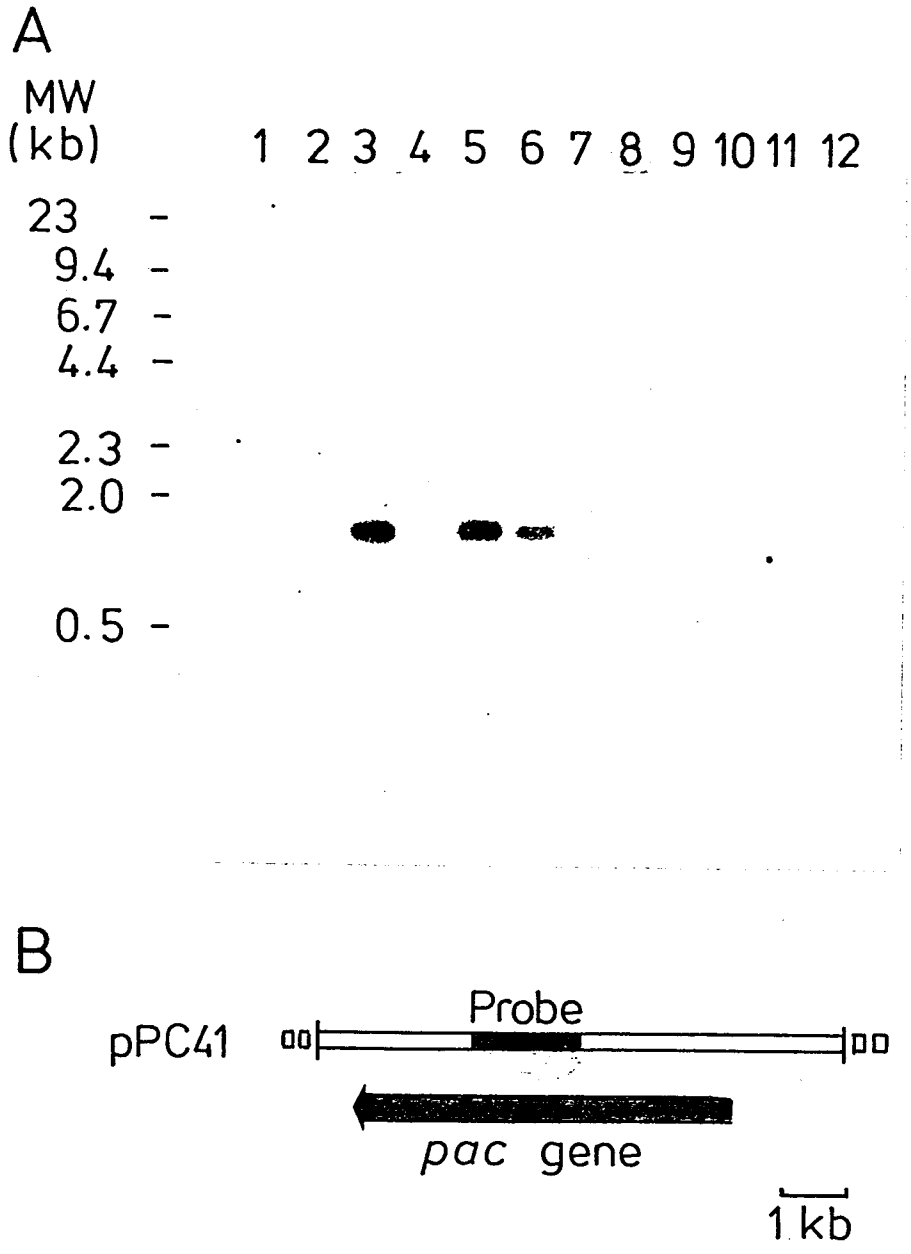
A
MW
(kb)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
23
9.4
6.7
4.4
2.3
2.0
0.5
B
pPC41
Probe
pac gene
1 kb

Fig. 5

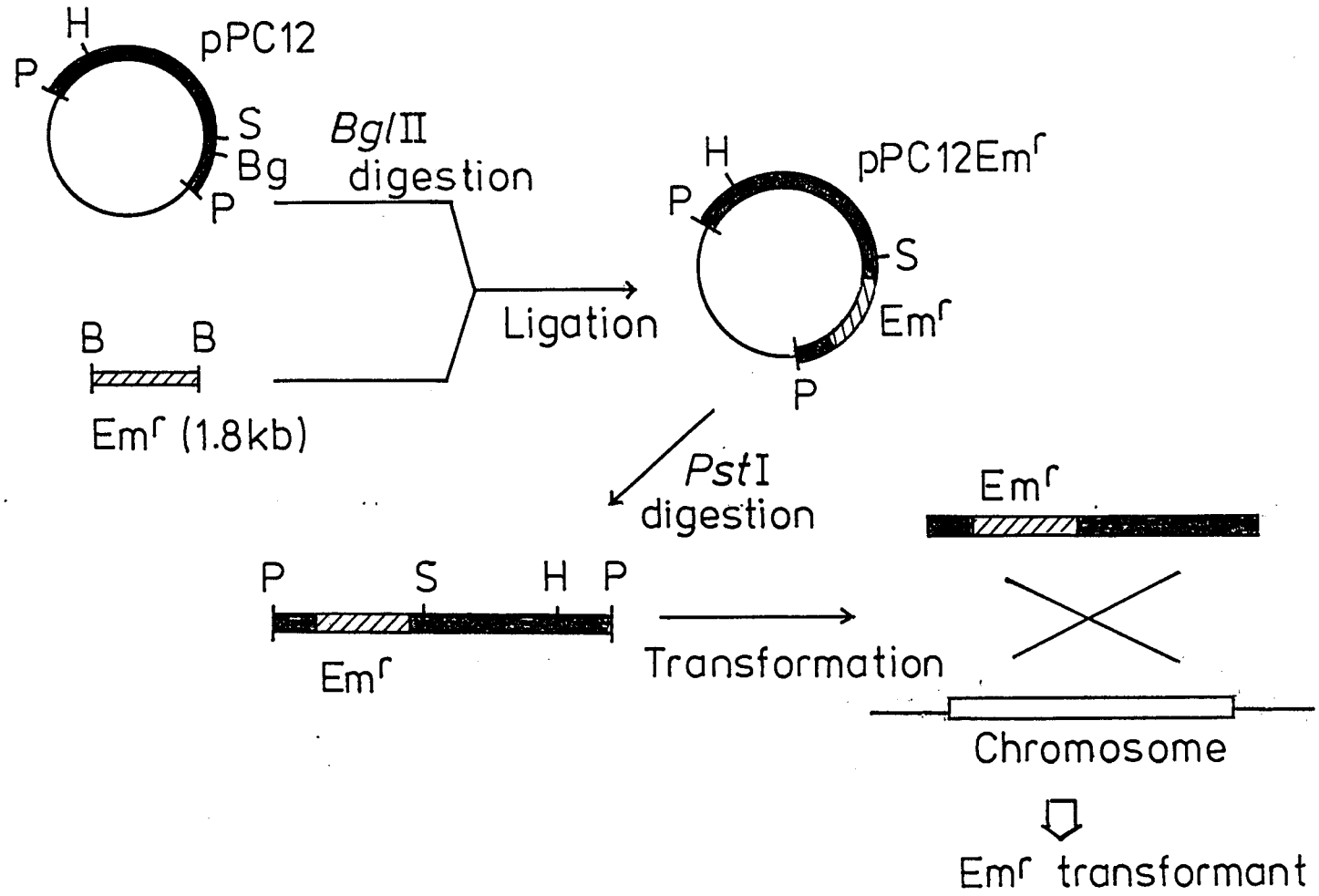
H
pPC12
P
S
Bg
P
BglII
digestion
B
B
Emr (1.8kb)
Ligation
H
pPC12Emr
P
S
Emr
P
PstI
digestion
P
S
H
P
Emr
Transformation
Emr
Chromosome
Emr transformant

Fig. 6