Osaka University Knowledge Archive

Title	Arthrobacter CB-8 株のデキストラナーゼ遺伝子の Streptococcus sanguis への導入とその発現
Author(s)	戸田, 比佐志
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37343
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【1】

氏名・(本籍)	戸田比佐志（とだ ひさし）
学位の種類	歯学博士
学位記番号	第 9244 号
学位授与の日付	平成 2 年 6 月 4 日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	Arthrobacter CB－8 株のデキストラナーゼ遺伝子の Streptococcus sanguis への導入とその発現
論文審査委員	(主査) 教授 岡田 宏 (副査) 教授 鈴木不二男　助教授 大嶋 隆　講師 平地 慶行

論文内容の要旨

近年，*Streptococcus sanguis* を用いた遺伝子クローニングが，おもに口腔領域において行われ始めているが，デンタル・プラークの抑制を臨床の場でより効果的に行うための一つの戦略として，プラークを構成する主要な細菌の一つであるこの*S. sanguis*にデキストラナーゼ遺伝子をクローニングし，これを口腔内に移植してデキストラナーゼを歯面局所において持続的に作用させる方法が考えられる。本研究は，そのための基礎的な研究として，デキストラナーゼ遺伝子の分離と，同遺伝子の大腸菌および*S. sanguis* へのクローニングを試みたものである。

デキストラナーゼ産生菌としては *Arthrobacter* CB－8株を用いた（以下CB－8と略す)。CB－8の染色体DNAを制限酵素で部分切断し，pUC 19を用いて大腸菌を形質転換して，CB－8 の遺伝子ライブラリーを作製した。この遺伝子ライブラリーを，アンピシリンおよびブルーデキストランを含むLB寒天培地に接種し，ブルーデキストランにデキストラナーゼが作用した際に生じる透明なハローを指標として，デキストラナーゼ産生株をスクリーニングした。その結果，約1万の形質転換株のうち，3株に，ブルーデキストランの青色の培地上で透明なハローを形成する株を認めた。これらの株はいずれも，そのペリプラスム画分にデキストラナーゼ活性が認められ，制限酵素によるマッピングの結果，共通のDNAフラグメントを有していることが判明した。このうち一番活性の高かったフラグメントの両末端を制限酵素*Sma I*の認識部位とし(Dma カートリッジ、3.2kb)，以下のクローニング操作に利用した。

Dma カートリッジをシャトルベクターpVA 838に組み込んだプラスミドpVA－Dma を用いて，*S. sanguis* Challis 株を形質転換したところ，プラスミドは菌体内に導入されたが，菌体，上清いずれの画分にも，デキストラナーゼ活性は認められなかった。

次に，*S. sanguis* においてデキストラナーゼ遺伝子を発現させる目的で，新しいベクタープラスミドの構築を行った。まず，pUC 18 のポリクローニング部位を利用して，*Streptococcus mutans* のグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子のひとつである *gtfB* のプロモーター領域，および，大腸菌のリボゾーマル RNA 遺伝子のターミネーター領域（rrnBT$_1$T$_2$）を備えたプラスミドを構築した（pSAC 89，3.5 kb）。このプラスミドを利用することによって，大腸菌におけるデキストラナーゼ活性は著名に高められた。

さらに，pSAC 89 に組み込んだ *gtfB* のプロモーターを *S. sanguis* において利用するために，このプラスミドの *Hind* III 部位を利用して，Streptococcus 属に由来するプラスミドであるpVA749 を接続挿入した。この操作によって，Streptococcus 属のプロモータを備えたシャトルベクターpMNK が得られた（8.7 kb）。

pMNK に Dma カートリッジを挿入したプラスミドpMNK－1を用いて *S. sanguis* Challis 株を形質転換した。形質転換株をブルーデキストランを含む寒天培地で培養したところ，培養3日目から透明なハローの形成を認めた。この株のデキストラナーゼ活性を測定した結果，菌体画分にデキストラナーゼ活性を認めた。上清画分にデキストラナーゼ活性は認められなかった。

これまでの *S. sanguis* を用いた遺伝子のクローニングは，いずれも，同じStreptococcus 属の細菌の遺伝子を用いたものであり，異種細菌の遺伝子を用いた例は報告されていない。本研究によって，Streptococcus 属由来のプロモーターを備えたシャトルベクター（pMNK）を利用することにより，Streptococcus 属以外の細菌の遺伝子が *S. sanguis* において発現されることが明らかとなった。このような系の確立によって，S. sanguis を利用して様々な生物活性を持った形質転換菌が得られれば，特に，プラーク細菌を原因とする口腔疾患の病因や病態の解析に役立つものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は，*Arthrobacter* CB－8 株の有するデキストラナーゼの遺伝子の *Streptococcus sanguis* へのクローニングを試みたものである。

その結果，*Streptococcus mutans* のグルコシルトランスフェラーゼ遺伝子のひとつである *gtfB* のプロモーター領域，および大腸菌由来のターミネーター領域（*rrnB* T$_1$T$_2$）を備えたシャトルベクターpMNK を用いることによって，デキストラナーゼ遺伝子が *S. sanguis* Challis 株に導入され，同菌がデキストラナーゼ産生能を獲得することを明らかにした。

この業績は，形質転換した口腔常在菌を用いたプラーク抑制法開発の端緒を開くとともに，*Streptococcus* 属以外の細菌の遺伝子を *S. sanguis* において発現させ，これによって口腔常在菌の遺伝子操作をより幅広く行うことを可能にしたものであり，歯学博士の学位請求に十分値するものと認める。