

Title	Streptococcus mutansの菌体結合型グルコシルトランスフェラーゼ遺伝子のクローニングとその解析
Author(s)	川端, 重忠
Citation	大阪大学, 1993, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3065818
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	川 端 重 忠
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 10688 号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	<i>Streptococcus mutans</i> の菌体結合型グルコシルトランスフェラーゼ 遺伝子のクローニングとその解析
論文審査委員	(主査) 教授 土谷 裕彦 (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

(目的)

Streptococcus mutans はヒトあるいは実験動物におけるう蝕の主要な病原細菌とみなされている。*S. mutans* のう蝕原性を担う重要な因子の1つとして、グルコシルトランスフェラーゼ (GTase) が挙げられる。*S. mutans* のもつ数種の GTase は共同で、スクロースを基質として粘着性のグルカンを合成し、*S. mutans* 菌体を歯面へ強固に付着させると考えられている。近年、GTase をコードする遺伝子として、いくつかの *gtf* 遺伝子が報告されている。しかし、GTase に関する研究は、酵素化学および分子生物学の立場からそれぞれ独立に行われており、*S. mutans* のスクロース依存性付着に深く関与している菌体結合型 GTase (CA-GTase) と *gtf* 遺伝子との関係については未だ明らかにされていない。そこで本研究では、*S. mutans* MT8148株の CA-GTase 遺伝子をクローニングし、その特性を既報の *gtf* 遺伝子と比較、検討した。さらに CA-GTase 遺伝子にエリスロマイシン耐性遺伝子 (Em^r) を挿入することで、同酵素活性を失活させた変異株を作成し、得られた変異株のスクロース依存性付着能についても検討を加えた。

(研究方法)

S. mutans MT8148 株の CA-GTase は菌体から 8 M 尿素により抽出し、DEAE-Sephacel およびヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーにより、分子量 15.6 万のタンパクとして精製された。得られた CA-GTase はプロテインシーケンサーで N 末端アミノ酸配列を決定した。ついで、この配列に基づいて、オリゴヌクレオチドを合成し、これをスクリーニングのプロープとした。

S. mutans MT8148 株染色体 DNA を制限酵素 *Spe* I と *Sph* I で消化し、低コピー数のクローニングベクター pMW 119 を使用して *S. mutans* DNA ライブラリーを作製し、 $[^{32}P]$ で標識したオリゴヌクレオチドプロープを用いて、コロニーハイブリダイゼーションにより陽性クローンをスクリーニングした。得られた陽性クローンは制限酵素地図を作製するとともに、サザンブロット法によって解析した。組換えタンパクの分子量と抗原性は、CA-GTase を家兔に免疫して得た抗 CA-GTase 抗体を用いたウェスタンブロット法で分析した。また、組換えタンパクの GTase 活性は、組換えプラスミドをもつ大腸菌の溶菌液と $[^{14}C]$ -グルコース]スクロースを反応させ、合成された $[^{14}C]$ グルカン量として測定した。

さらに、CA-GTase の機能を解析する目的で、CA-GTase を欠失した *S. mutans* の変異株を作製した。CA-GTase 遺伝子中の *Mlu* I サイトに Em^r 遺伝子を挿入したプラスミドを構築し、このプラスミドを用いて、*S. mutans* MT 8148 株を形質転換して相同遺伝子組換えを行った。得られた変異株の変異をサザンブロット法で分析するとともに、

GTase 活性およびガラス管壁へのスクロース依存性付着を、親株と比較した。

(結果および考察)

MT 8148株精製 CA-GTase の N 末端アミノ酸配列は、Asp-Ser-Asn-Glu-Ser-Lys-Ser-Gln-Ile-Ser-Asn-Asp の12残基と決定された。この結果は、既報の *S. mutans* GS-5 株 *gtfB* 遺伝子の DNA 配列より推定されたアミノ酸配列の39から50番目に相当するものであった。MT 8148株 DNA ライブラリーのスクリーニングの結果、5.6 kb の挿入断片を持つ CA-GTase 遺伝子を含むプラスミドを選択し、pSK 6と命名した。CA-GTase 遺伝子の制限酵素切断部位は GS-5 株 *gtfB* 遺伝子のそれと調べた限り一致していた。また、CA-GTase 遺伝子は *gtfB* 遺伝子の3'末端を特異的に認識する合成オリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズしたが、GS-5 株 *gtfC* 遺伝子の5'および3'末端を特異的に認識するプローブとはハイブリッドを形成しなかった。以上の結果は、MT 8148株 CA-GTase 遺伝子が GS-5 株 *gtfB* 遺伝子と類似していることを示唆している。

また、CA-GTase 遺伝子をプローブとして MT 8148株染色体 DNA とサザンブロット分析を行うと、MT 8148株にも GS-5 株と同様に *gtfB* と相同性の高い *gtfC* に相当する遺伝子 (*gtfC'*) の存在が示唆された。この遺伝子を得るため、pSK 6 をプローブとして上記の DNA ライブラリーを再度スクリーニングし、4.7 kb の挿入断片を含むクローンを選択して、これを pSK 16と命名した。pSK 16の挿入断片は GS-5 株 *gtfB* 遺伝子の5'および3'末端を特異的に認識する合成オリゴヌクレオチドプローブとはハイブリッドを形成しなかったが、*gtfC* 遺伝子の5'および3'末端を認識するプローブにはハイブリダイズした。さらに、CA-GTase 遺伝子と *gtfC* 遺伝子が前後一列につながったクローンを選択し、その制限酵素部位を調べた結果、MT 8148株は GS-5 株と同じく *gtfB-gtfC* 遺伝子がタンデム配列していることが明らかになった。

ウェスタンブロットニングによると、pSK 6 の遺伝子産物はウサギ抗 CA-GTase 抗体と162 kDa の1本のバンドを形成した。一方、pSK 16の遺伝子産物は152, 138, 115, 96 kDa の4本のバンドが現われた。いずれの遺伝子産物も、GTase 活性を示したが、高い活性を示した pSK 6 に対し、pSK 16は1/7の活性しか示さなかった。また、pSK 6 遺伝子産物の非水溶性グルカンの全グルカン量に対する割合は、精製 CA-GTase と同様に95%以上を占めることが明らかにされた。

CA-GTase 遺伝子に Em^r 遺伝子を挿入したプラスミドを MT 8148株に形質転換すると、CA-GTase 遺伝子、*gtfC'* 遺伝子、および両者に Em^r 遺伝子が挿入された3種の変異株 S2, R4, S5 株が出現した。S2, S5 株のコロニー形態は親株である MT 8148株のそれとは異なっていた。菌体上および培養上清中の GTase 活性も親株と比較して低下し、とくに、両者に Em^r 遺伝子が挿入された株は活性が非常に低かった。さらに、スクロース存在下でのガラス管壁への付着について調べると、3種の変異株はいずれも強固な付着は示さなかったものの、S2 株は R4 株よりも付着は有意に高かった。以上の結果は、スクロース依存性付着に、CA-GTase 遺伝子および *gtfC'* 遺伝子によって制御される2つの GTase の共存が不可欠であり、*gtfC'* 遺伝子がより重要な役割を担っていることを示唆している。

論文審査の結果の要旨

本研究は、*S. mutans* MT 8148株菌体結合型グルコシルトランスフェラーゼ (CA-GTase) 遺伝子をクローニングし、その特性を既報の GTase 遺伝子と比較・検討した。さらに、同遺伝子にエリスロマイシン耐性遺伝子を挿入することで、同酵素活性を失活させた変異株を作成し、得られた変異株のスクロース依存性付着能についても解析をしたものである。

その結果、CA-GTase 遺伝子を低コピー数のプラスミドベクターである pMW 119を用いてクローニングしたところ、この遺伝子産物はウサギ抗 CA-GTase 抗体と反応し、高い GTase 活性を示した。また、同遺伝子は、*S. mutans* GS-5 株の *gtfB* 遺伝子に極めて相同性の高いことが明らかになった。さらに、スクロース依存性付着には、CA-GTase 遺伝子および同遺伝子の下流に存在するもう1つの GTase 遺伝子によって制御される2つの GTase の共存が不可欠であることが示唆された。

これらの知見は、CA-GTase 遺伝子のスクロース依存性付着機構の一端を明らかにしたものである。また、得られた組換えプラスミドや GTase 欠損株は、CA-GTase の局在や菌体との結合様式の解明に有用な手段として役立つものであり、本研究は博士(歯学)の学位請求に十分に値する業績であると認める。