The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

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	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【3】

氏　　名	川　端　重　忠（かわばた しげただ）
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	***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**
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8M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はプロテインシークエンサーで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ブとした。

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pMW119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ブを用いて，コロニーハイブリダイゼイ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を家兎に免疫して得た抗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* MT8148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。

ウェスタンブロッティングによると，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S 2，R 4，S 5株が出現した。S 2，S 5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，S 2株はR 4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*gtf*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。