OUKA
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

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

大阪大学大学院歯学研究科
歯学臨床系歯科保存学専攻
川端　重忠

大阪大学歯学部歯科保存学講座
565　大阪府吹田市山田丘1-8

要　約

Streptococcus mutans MT8148 株の菌体結合型グルコシルトランスフェラーゼ (CA-GTase) 遺伝子を低コピー数のクローニングベクター pMW119 を用い，*Escherichia coli* DH5 α 株を宿主としてクローニングした．まず，MT8148 株精製 CA-GTase のアミノ末端のアミノ酸配列を決定し，その実験結果に基づいてオリゴヌクレオチドプローブを作成し，サザンハイブリダイゼイションによるスクリーニングを行った．CA-GTase 遺伝子を含む 5.6 kb の挿入断片をもつ組換えプラスミド pSK6 を選択し，この遺伝子産物 (組換え CA-GTase) を pMW119 由来の *lac* プロモーターによって発現させた．組換え CA-GTase はウェスタンブロット分析の結果，分子量 162,000 を示し，ウサギ抗 CA-GTase 抗体と強力に反応した．また，この組換えタンパクは高い GTase 活性を示し，生成されたグルカンのほとんどは非水溶性であった．一方，サザンブロット分析の結果，pSK6 に相同性を示す遺伝子が，制限酵素 *Spe* I，*Sph* I で切断した MT8148 株染色体 DNA 断片中にもう 1 つ認められた．そこで，MT8148 株の遺伝子ライブラリーからこの遺伝子をもつプラスミド (pSK16) を分離した．pSK16 の遺伝子産物はウサギ抗 CA-GTase 抗体に反応したが，その GTase 活性は pSK6 の 1/7 と低かった．これらの結果および pSK6，pSK16 の挿入断片の制限酵素地図により，MT8148 株の CA-GTase 遺伝子は *S. mutans* GS-5 株 *gtfB* 遺伝子に，また，pSK16 の挿入断片は GS-5 株 *gtfC* 遺伝子に極めて相同性の高いことが明らかになった．CA-GTase 遺伝子，*gtfC* 相当遺伝子 (*gtfC'*) に支配される各 GTase タンパクとスクロース依存性付着との関わりをみるため，CA-GTase 遺伝子にエリスロマイシン耐性遺伝子 (Em^r) を挿入して 3 種の GTase 遺伝子不活化株を作成した．これらの変異株は，いずれも強固なスクロース依存性付着は示さなかったものの，Em^r 遺伝子断片の挿入により CA-GTase 遺伝子を不活化された S2 株は，同様に *gtfC'* 遺伝子を不活化された R4 株よりも付着は有意に高かった．本研究の結果，スクロース依存性付着には，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が示唆された．

はじめに

ミュータンスレンサ球菌 (mutans streptococci, あるいは "*Streptococcus mutans*" group) は，ヒトや実験動物におけるう蝕の発生に主要な役割をはたすことが明らかにされてきた．ミュータンスレンサ球菌のこのような病原性はスクロース存在下で歯面へ強固に付着し，食餌中の様々な糖を発酵することによって酸を産生し，同菌が付着した歯面を強力に脱灰することによると考えられる．これらのう蝕原性を担う重要なビルレンス因子の1つであり，スクロースを基質としてグルカンを合成する酵素であるグルコシルトランスフェラーゼ (glucosyltransferase; 以下 GTase と略) が，多くの研究者にとって大きな関心の的となっている (Hamada と Slade, 1980)．

ミュータンスレンサ球菌は当初，細胞壁多糖抗原の免疫化学的特異性に基づいて *a* から *h* の8つの血清型に分類されたが，後にこれらは複数の菌種とみなすべきであるとの細菌分類学上の見解が支持されるに至った．ヒト口腔あるいはう蝕病巣から分類される大部分の菌株は *Streptococcus mutans* (血清型 *c*, *e*, *f* 型がこれに属する) と *Streptococcus sobrinus* (血清型 *d*, *g*) の2菌種であることが日本および欧米各国の研究者によって明らかにされてきた (Loesche, 1986；浜田, 1989)．ミュータンスレンサ球菌の GTase に関する研究は，まず *S. sobrinus* で進められた．血清型 *d* の菌株 (Fukushima ら, 1981；Koga ら, 1983) および血清型 *g* (Shimamura ら, 1983；Koga ら, 1986*b*) では，各菌株の培養上清から GTase が分離，精製された．これらの研究の結果，*S. sobrinus* の産生する GTase として非水溶性グルカン (insoluble glucan; IG) を合成する GTase (GTase-I) と，水溶性グルカン (soluble glucan; SG) を合成する2種の GTase (GTase-S) が分離された．さらに近年，*S. sobrinus* の産生する第3の GTase-S が報告された (Yamashita ら, 1989)．スクロース存在下での *S. sobrinus* 菌体の平滑面への強固な付着は，GTase-I と GTase-S が適当な比率で協調して作用することが必要であると報告されている (Koga ら, 1986*b*)．

一方，*S. mutans* の GTase についても，当初は *S. sobrinus* と同様に培養上清

を出発材料として研究が進められ，スクロースよりSGを合成するGTase-S (Mukasaら, 1986；Babaら, 1983) やIGを合成するGTase-I (KuramitsuとWondrack, 1983；Mukasaら, 1985) が精製され，それらの性状が検討されてきた．しかし，*S. mutans* のGTase-Iは *S. sobrinus* のそれと異なり，実際には菌体表面に結合して存在することが明らかにされた．この菌体結合型 (cell-associated，以下CA) GTaseの可溶化は，高濃度の尿素を用いると容易に達成されることが見い出された．そこで，*S. mutans* MT8148株 (血清型 *c*) の培養菌体を8 M尿素で処理するとCA-GTaseが効果的に抽出され，同抽出物を陰イオン交換クロマトグラフィーおよびヒドロキシアパタイトクロマトグラフィーを用いて純化すると，156 kDaのCA-GTaseタンパクが得られた．このCA-GTaseによって合成された全グルカン量の98.3%をIGが占めると報告されている (Hamadaら, 1989)．ついで，他のグループにおいてもSDSとTriton X-100を用いて *S. mutans* Ingbritt株 (血清型 *c*) 菌体よりGTase-Iを可溶化し，同酵素を分離している (Mukasaら, 1989)．CA-GTaseを欠落した *S. mutans* の突然変異株はスクロース依存性平滑面付着能を失い，ラットにおけるう蝕誘発能も著しく低下する (南, 1991) ことから，CA-GTaseは *S. mutans* の病原性に深く関わっていると考えられる．

最近の遺伝子組換え技術の発展に助けられて，主としてKuramitsuらのグループにより *S. mutans* のいくつかのGTaseタンパクを支配する遺伝子が分離され，その性状が比較，検討されてきた (Aokiら, 1986；Pucciら, 1987；HanadaとKuramitsu, 1988, 1989)．最初のGTase遺伝子として，*S. mutans* GS-5株よりGTase-Iを支配する遺伝子である *gtfB* がクローニングされた (Aokiら, 1986)．この *gtfB* 遺伝子は，"培養上清"から精製したIG合成GTaseであるGTase-A (KuramitsuとIngersoll, 1976) をウサギに免疫して得た抗血清を用いたイムノスクリーニングによって分離されたものである．ついで，*gtfB* 遺伝子のヌクレオチドシークエンスが決定され，この遺伝子のすぐ下流に *gtfB* と相同性を示すもう1つの遺伝子の存在が示唆された (Shirozaら, 1987)．そこ

で，この遺伝子をクローニングし，*gtfC* と命名した (Hanada と Kuramitsu, 1988)．この *gtfC* 遺伝子は IG および SG 双方を合成する GTase タンパクを支配しており，ヌクレオチドシークエンスの結果 (Ueda ら, 1988) より，*gtfB* 遺伝子とは構造遺伝子の中央領域で非常に高い相同性を示すことが明らかになった．さらに 3 番目の *gtf* 遺伝子として，GTase-S を支配する *gtfD* 遺伝子がクローニングされ (Hanada と Kuramitsu, 1989)，続いて同遺伝子のヌクレオチドシークエンスが決定された (Honda ら, 1990)．

しかし，*S. mutans* の GTase-I に関して酵素化学的研究と分子生物学的研究は互いに独立して行われており，遺伝子とその遺伝子が支配するタンパクとの関係はいまなお明らかにされていない．そこで，本研究では *S. mutans* MT8148 株 CA-GTase 遺伝子のクローニングを行い，得られた遺伝子を GS-5 株 *gtf* 遺伝子と比較するとともに，大腸菌に発現させた組換え GTase の性状についても検討を加えた．さらに，CA-GTase 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，これらの変異株のスクロース依存性付着能についても調べた．

材料と方法

1. 供試菌株と培養条件

Streptococcus mutans MT8148 株 (血清型 *c*) は，brain heart infusion (BHI; Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA) 液体培地，TTY 液体培地 (Hamada と Torii, 1978) または mitis-salivarius 寒天培地 (MS agar; Difco) で静置培養した．

表 1　菌株およびプラスミド

菌株あるいは プラスミド	特徴[a)]	由来
Streptococcus mutans		
MT8148	血清型 *c*	阪大歯学部口腔細菌学教室継代株
S2	MT8148 株由来，染色体上の CA-GTase 遺伝子の *Mlu* I サイトに Em^r 遺伝子が挿入されている，$CA\text{-}GTase^-$	本研究
R4	MT8148 株由来，染色体上の *gtfC'* 遺伝子の *Mlu* I サイトに Em^r 遺伝子が挿入されている，$GTFC'^-$，(*gtfC'* 遺伝子組換え GTase)	本研究
S5	MT8148 株由来，染色体上の CA-GTase，*gtfC'* 遺伝子にわたり Em^r 遺伝子が挿入されている，$CA\text{-}GTase^-$，$GTFC'^-$	本研究
Escherichia coli		
DH5 α	*supE*44, △*lacU*169 (Φ80*lacZ*△M15), *hsdR*17, *recA*1, *endA*1, *gyrA*96, *thi*-1, *relA*1	Life Technologies, Inc.
JM109	*recA*1, *endA*1, *gyrA*96, *thi*-1, *hsdR*17, *supE*44, *relA*1, △ (*lac-proAB*)/F' [*traD*36, $proAB^+$, $lacI^q$, *lacZ*△M15]	Yanisch-Perron ら (1985)
プラスミド		
pMW118	Ap^r, MCS, (L)	ニッポンジーン
pMW119	Ap^r, MCS, (L)	ニッポンジーン
pSP73	Ap^r, MCS, (M)	Promega
pTF37	pSP73の MCS を pMW119 の MCS に挿入，Ap^r, MCS, (L)	本研究
pVA838	Cm^r, Em^r, (M), *E. coli-Streptococcus* 属のシャトルベクター	Macrina ら (1982)
pSK6	Ap^r, MT8148 株 CA-GTase 遺伝子を含む *Spe* I, *Sph* I 断片を pMW119 に挿入したもの，(L)	本研究
pSK8	Ap^r, pSK6の *Mlu* I サイトに Em^r 遺伝子を挿入したもの，(L)	本研究
pSK14	Ap^r, MT8148 株 *gtfC'* 遺伝子を含む *Spe* I, *Sph* I 断片を pMW119 に挿入したもの，(L)	本研究
pSK16	Ap^r, pSK14 より *gtfC'* 遺伝子を含む *Kpn* I, *Sph* I 断片を pMW118 に挿入したもの，(L)	本研究

a) MCS, マルチクローニングサイト; (L), 低コピー数; (M), 中等度コピー数; Ap^r, アンピシリン耐性; Cm^r, クロラムフェニコール耐性; Em^r, エリスロマイシン耐性.

Escherichia coli DH5 α 株 (Life Technologies, Inc., Gainthersburg, Md., USA) およびJM109 株 (表 1) は，Luria-Bertani [LB; 1% トリプトン (Difco), 0.5% 酵母エキス (Difco), 0.5% NaCl] 液体培地で震盪培養し，またはこの培地に 1.5% の寒天末 (和光純薬, 大阪) を添加した LB 寒天培地で培養した．必要に応じて，アンピシリン (Ap; 和光純薬) を LB 培地に最終濃度 100 μg/ml の割合で，またエリスロマイシン (Em; 和光純薬) を *E. coli* の場合には 500 μg/ml の濃度で，および *S. mutans* には 10 μg/ml の濃度で添加したものを選択培地として用いた．

2. 使用プラスミドとその構築

プラスミド pMW118 および pMW119 (表 1) はニッポンジーン (東京) から，各種制限酵素は宝酒造 (京都)，東洋紡 (大阪)，New England Biolabs (Beverly,

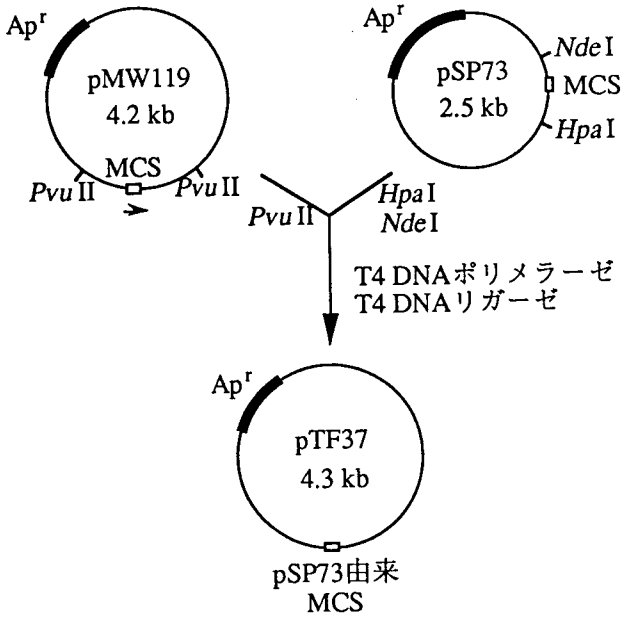

図 1　プラスミド pTF37 の構築．MCS (□)，マルチクローニング部位; Ap^r，アンピシリン耐性遺伝子; →，*lac* プロモーターの方向

Mass., USA) およびニッポンジーンより購入した．pMW119 を制限酵素 *Pvu* II で切断して *lac* プロモーターを含むマルチクローニング部位を除き，*Hpa* I, *Nde* I で消化して分離した pSP73 (Promega, Madison, Wis., USA) 由来のマルチクローニング部位を挿入置換して pTF37 を構築した (図 1)．DNA の制限酵素による消化は，各標品に添付されている指示書に従って行った．アガロースゲルからの DNA の回収は，DNA PREP (旭硝子，東京) を用いた．プラスミドの調製は，沸騰法 (Holmes と Quigley, 1981) あるいは QIAGEN ミニカラム (Diagen, Düsseldolf, Germany) を用いて行った．DNA の連結は DNA Ligation Kit (宝酒造) を用いて行い，DNA の末端の平滑化は T4 DNA ポリメラーゼを利用する DNA Blunting Kit (宝酒造) を用いて実施した．その他の DNA の操作は Sambrook ら (1989) の記述に従った．

3. CA-GTase の精製とアミノ酸分析

S. mutans MT8148 株の CA-GTase は Hamada ら (1989) の方法に従い，培養全菌体の 8 M 尿素抽出物を透析後，DEAE-Sephacel (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) およびヒドロキシアパタイト (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif., USA) を用いて精製した．すなわち，10 l の TTY 液体培地 (Hamada と Torii, 1978) で培養した菌体を 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (NaPB; pH 6.0) で 3 回洗浄した．ついで，その菌体を 8 M 尿素で 25 ℃，1 時間抽出した溶液を 10 mM NaPB (pH 6.0) で透析後，60% 飽和硫酸アンモニウムで塩析，濃縮した．再び同緩衝液で透析後，この粗 CA-GTase を DEAE-Sephacel カラム (2.6 x 17 cm，ベッド体積 90.3 ml) にかけ，50 mM の NaPB (pH 7.5) 250 ml で洗浄した後，吸着したタンパクを 0−1 M NaCl の直線濃度勾配によって溶出した．各フラクション(10 ml) の波長 280 nm での吸光度 (A_{280}) と GTase，およびフルクトシルトランスフェラーゼ (fructosyltransferase; FTase) の酵素活性を測定した (図 2)．GTase を含む画分を集めて 10 mM NaPB (pH 6.0) で透析後，これをヒドロキシアパタイトカラム (1 x 15 cm，ベッド体積 11.8 ml) にかけ，10 mM (170 ml)，0.2 M (90 ml)，0.26 M (90 ml) および 0.5

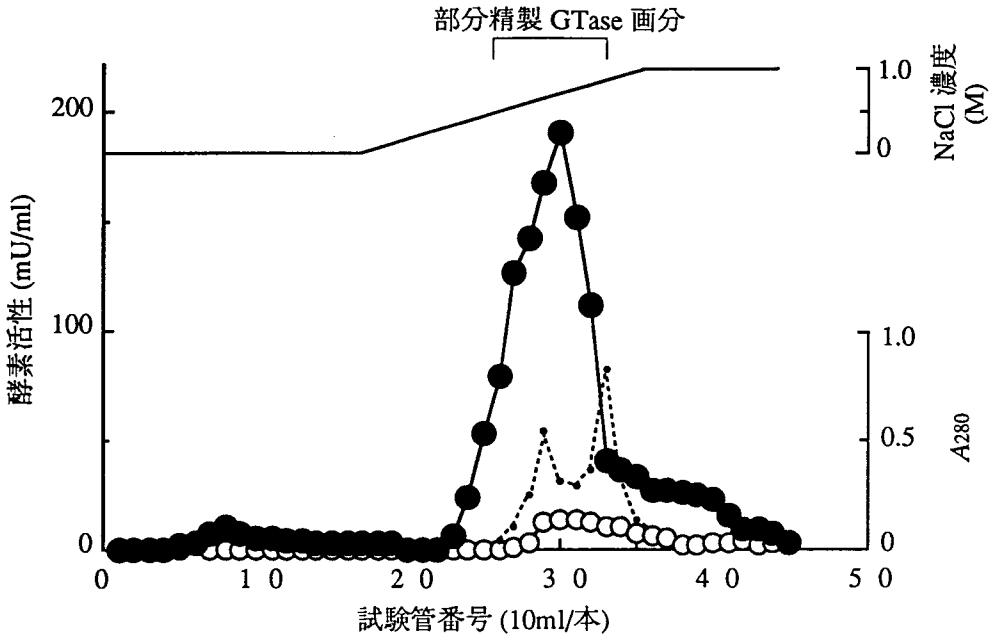

図 2　*S. mutans* MT8148 株 CA-GTase 粗標品の DEAE-Sephacel カラムクロマトグラム．TTY 液体培地 (10 l) で培養した菌体を 8 M 尿素を用いて 25℃，1 時間抽出した．抽出液を DEAE-Sephacel カラム (2.6 x 17 cm) にかけ，リン酸ナトリウム緩衝液 (50 mM, pH 7.5) で，つづいて0-1 M NaCl の直線濃度勾配によって溶出した．各フラクションの酵素活性は，[^{14}C] スクロースを用いて測定した．●，GTase；○，FTase；---，A_{280}；—，NaCl 濃度

M (110 ml) の NaPB (pH 6.0) で段階的に溶出した．各フラクション (10 ml) の A_{280} と酵素活性 (GTase, FTase) を測定し，GTase 活性を示す 0.5 M NaPB (pH 6.0) 溶出画分を精製 CA-GTase 標品とした (図 3)．精製 CA-GTase の N 末端アミノ酸配列は気相プロテインシークエンサー (PSQ-1 型, 島津製作所, 京都) によってエドマン法で決定した．アミノ酸組成は，精製 CA-GTase (50 pmol) を 110℃，24 時間，6 N 塩酸で加水分解後，アミノ酸自動分析装置 (L-8500 型, 日立製作所, 東京) により，ニンヒドリン発色法で分析した．

4. 抗体の作製

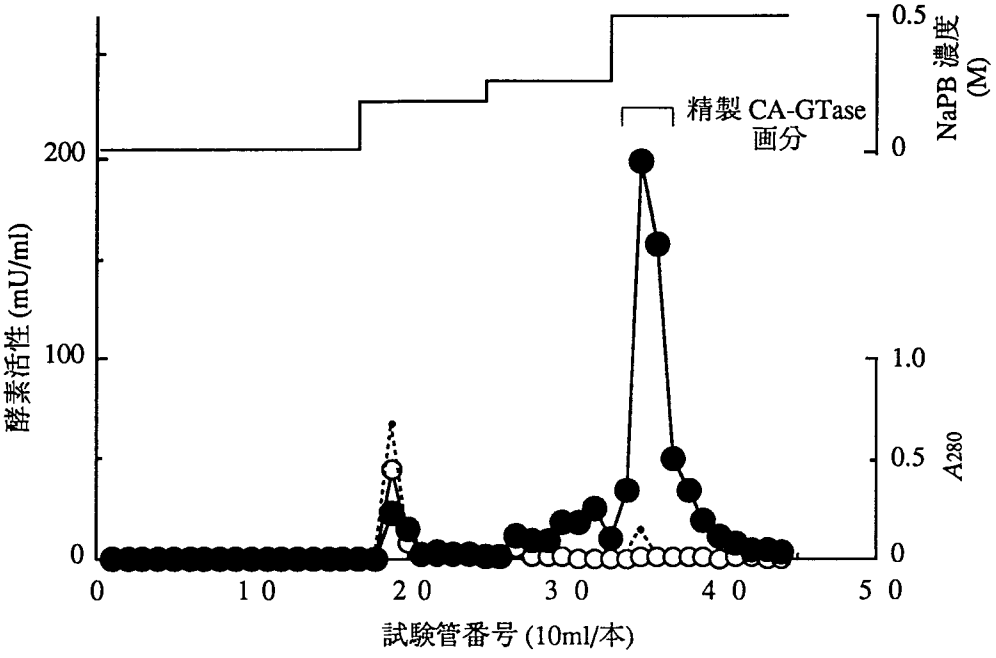

図3　*S. mutans* MT8148 株部分精製 CA-GTase のヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラム．部分精製 CA-GTase をヒドロキシアパタイトカラム (1.0 x 15 cm) にかけ，0.01, 0.2, 0.26, および 0.5 M リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.0) を用いて段階的に溶出した．各フラクションの酵素活性は，[^{14}C] スクロースを用いて測定した．●，GTase；○，FTase；---，A_{280}；—，NaCl 濃度

精製 CA-GTase (50 μg タンパク) を Freund の完全アジュバント (Difco) と混和し，氷冷中で超音波処理を行って油中水型乳剤を作成した．これをウサギ背部皮下に 2 週間おきに 3 回注射し，免疫を行った．耳介静脈より採血し，得られた血清を 33% 飽和硫酸アンモニウムで 3 回塩析を繰り返した後，リン酸緩衝生理食塩水 (PBS; pH 7.2) で透析したものをウサギ抗 CA-GTase IgG 画分とした．抗体のタンパク定量は，ウシ血清アルブミン (BSA; Sigma Chemical Co., St. Louis, Miss., USA) を標準タンパクとして Lowry ら (1951) の方法に基づいて行った．

5. オリゴヌクレオチドプローブの調製

サザンハイブリダイゼーション用のプローブとして用いるオリゴヌクレオチドは DNA 合成装置 (Cyclone Plus 型, MilliGene, Milford, Mass., USA) により β-シアノエチル法で行った．精製は高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography; HPLC) 逆相カラム (4.6 x 150 mm, cosmosil packed column, ナカライテスク, 京都) を用いた．

CA-GTase の N 末端アミノ酸配列から *gtfB* 遺伝子 (Shiroza ら, 1987) のコドン使用法に基づいて FK01－04 を作成した．また *gtfB* 遺伝子の 3' 末端側に由来する配列として FK06 を，さらに *gtfC* 遺伝子 (Ueda ら, 1988) の 5' 末端および 3' 末端側に相当する配列として FK05 と FK07 を以下の塩基配列で作成した．これらのオリゴヌクレオチド FK05－07 は *gtfB* と *gtfC* 遺伝子の相同性の高い中央領域をさけて設計した．

FK01; 5'-TCAAATGAATCGAAATCCCAAATTTCT-3'

FK02; 5'-AACGAGAGCAAGAGCCAGAT-3'

FK03; 5'-AATGAATCTAAGAGTCAGAT-3'

FK04; 5'-AACGAGAGCAAATCTCAAAT-3'

FK05; 5'-ACTGACGACCGTCAACAGGCG-3'

FK06; 5'-CTGTATCTCGGTGAAGATGGT-3'

FK07; 5'-AATACTATGATCCTAATTTCG-3'

6. アガロース電気泳動

アガロース (SeaKem ME Agarose, FMC BioProducts, Rockland, Maine, USA) を 0.8% になるように TBE 緩衝液 [89 mM Tris-HCl (pH 8.0) , 89 mM ホウ酸, 2 mM EDTA (pH 8.0)] に加熱溶解したものを泳動用ゲルとして用いた．泳動用緩衝液として TBE 緩衝液を用い，100 V で泳動を行った．マーカーとして λ ファージ DNA を制限酵素 *Hind* III で完全消化した λ /*Hind* III (ニッポンジーン) を使用した．泳動後，ゲルを臭化エチジウム (1 μg/ml; 和光純薬) 溶液で 10－30 分間染色後，波長 312 nm の紫外線で DNA のバンドを検出した．

7. 染色体 DNA の精製

S. mutans MT8148 株は BHI 液体培地に 37℃，18 時間培養後，遠心により菌体を回収した．その菌体を 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; TE緩衝液) で洗浄遠心した後，20% グルコースを含む TE 緩衝液に懸濁した．これにリゾチーム (8 mg/ml; Sigma) および RNase A (0.3 mg/ml; Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany) を加え 37℃，30 分間反応させた．つぎに，ムタノリジン (0.25 mg/ml; 大日本製薬, 大阪) で 50℃，30 分間，さらに，プロテイナーゼ K (0.5 mg/ml; Merck, Darmstadt, Germany) で 37℃，30 分間処理した．最後に *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℃，15 分間保温した．遠心により不溶物を除き，フェノール・クロロホルム (1 : 1, v/v) ついでクロロホルムによる DNA 画分の抽出を行った．さらに，エタノールを用いて DNA を沈殿させ，これをガラス棒に巻き付けて回収した．この DNA を TE 緩衝液に溶解後，同緩衝液に透析した．得られた染色体 DNA は波長 260 nm における吸光度 (A_{260}) を測定して濃度を決定するとともに，アガロース電気泳動で純度を調べた後，4℃ で保存した．

8. スクロース密度勾配遠心による分画

S. mutans MT8148 株染色体 DNA を制限酵素 *Spe* I および *Sph* I で消化後，5－20% のスクロース密度勾配 [5-20% スクロース, 1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) , 5 mM EDTA (pH 8.0)] に重層し，RPS65T ローター (日立工機, 勝田) を装着した CP70 超遠心機 (日立工機)を用いて 20℃ で，263, 800 *g*，3 時間遠心した．遠心後すぐに，液面より 100 µl ずつをマイクロチューブに分取し，-20℃ で保存した．

9. DNA の [^{32}P] 標識によるプローブの作成

上記の各オリゴヌクレオチド 50 pmol に [γ-^{32}P] ATP (～37 MBq/mmol; Amersham, Buckinghamshire, England) 50 pmol および T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (ニッポンジーン) 10 単位を加え，37℃ で 30 分間反応させて得た [^{32}P] オ

リゴヌクレオチドをプローブとして用いた．また，オリゴヌクレオチド以外のDNAフラグメントの標識は，ランダムプライマー法を応用したDNAラベリングキット(宝酒造)および[α-^{32}P] dCTP (～37 MBq/mmol; Amersham)を用いて添付の指示書に従い行った．

10．ブロッティング

制限酵素で切断したDNA断片をアガロース電気泳動した後，そのゲルをアルカリ溶液(1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH)に1時間，ついで中和溶液(3 M NaCl, 1 M Tris-HCl; pH 8.0)に1時間浸析した．このゲルにナイロン膜(Hybond-N, Amersham)を密着させ毛細管現象を利用して，DNA断片を膜に転写した(Southern, 1975；Sambrookら, 1989)．DNAの転写されたナイロン膜は6x SSC溶液(0.9 M NaCl, 90 mM クエン酸ナトリウム)で洗浄後，80℃で2時間処理してDNAを膜上に固定した．

平板培地に培養した組換え*E. coli*のコロニーに対しては，LB寒天培地上にナイロン膜を接着させ各コロニーを転写後，その膜を10% SDS溶液で5分間，アルカリ溶液で5分間，ついで中和溶液で5分間処理した．これを6x SSC溶液で洗浄後，80℃で2時間焼き付けてコロニー中の細菌のDNAを固定した(コロニーブロット法；Grunsteinと Hogness, 1975)．

11．ハイブリダイゼイション

1) [^{32}P] オリゴヌクレオチドプローブを用いた場合

上記のナイロン膜をガラスビンに入れ，VHP溶液[0.1% BSA (Sigma), 0.1% Ficoll-400 (Pharmacia), 0.1% ポリビニルピロリドンK-90 (和光純薬), 0.01% ヘパリン(Sigma), 5x SSC]を10 ml加えて密封し，保温オーブンを用いて42℃で，10－20 rpmで回転させながら1時間以上処理してプレハイブリダイゼイションを行った．つぎに，プレハイブリダイゼイション溶液を捨て，0.05% SDSを加えたVHP溶液に[^{32}P]で標識したオリゴヌクレオチドプローブを加え，上記ガラスビンを10－20 rpmで回転させ，42℃で1昼夜保温してハイブリダイゼイションを行った．ハイブリダイゼイション後の洗浄は，このナイロン膜を0.

05% SDSを含む 2x SSC 溶液 (0.3 M NaCl, 30 mM クエン酸ナトリウム) を用いて室温で 15 分間，ついで Sambrook ら (1989) の記載に従って求め，各オリゴヌクレオチドプローブに応じた温度でこの溶液を用いて 30 分間洗浄した．

2) [^{32}P] DNA フラグメントプローブを用いた場合

上記のナイロン膜をガラスビンに入れ，50% ホルムアミド (ナカライテスク) を添加した VHP 溶液を用い 42℃ で，1 時間以上プレハイブリダイゼイションを行い，ついで上記のプレハイブリダイゼイション溶液に 0.2% SDS を加えたものを用い，42℃ で 1 昼夜ハイブリダイゼイションを行った．

ハイブリダイゼイション後の洗浄は，このナイロン膜を 0.05% SDS を添加した 2x SSC 溶液 (0.3 M NaCl, 30 mM クエン酸ナトリウム) を用いて室温で 15 分間，ついで 0.2% SDS を添加した 0.1x SSC 溶液 (15 mM NaCl, 1.5 mM クエン酸ナトリウム) を用いて 68℃ で 30 分間洗浄した．

12. オートラジオグラフィー

洗浄後乾燥したナイロン膜と X 線用フィルム (RX100, 富士写真フィルム, 南足柄) を -70℃，18 時間接触露光させた．フィルムを現像，定着した後，結果を検討した．

13. 形質転換

1) *E. coli* の形質転換

a) コンピテント細胞の作成　　外来 DNA の受容能を高めた *E. coli* (コンピテント細胞) の作成は Hanahan (1983) の方法にいくつかの変更を加えて行った．すなわち，*E. coli* を 5 ml の 0.5% トリプトン (Difco)，2% 酵母エキス (Difco)，および 20 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ よりなる Ψ 液体培地に接種し，37℃ で一晩培養した．この菌液を 100 ml の Ψ 液体培地に移し，波長 550 nm (A_{550}) で測定し濁度が 0.48 になるまで振盪培養した．遠心によって菌体を回収し，40 ml の Tfb I (30 mM 酢酸カリウム, 100 mM 塩化ルビジウム, 10 mM 塩化カルシウム, 50 mM 塩化マンガン, 15% グリセロール; pH 5.8) を加え攪拌後，0℃，5 分間静置した．ついで遠心後，沈渣に Tfb II [10 mM 3- (N-モルフォリノ) プ

ロパンスルフォン酸 (MOPS; Sigma), 75 mM 塩化カルシウム, 10 mM 塩化ルビジウム, 15% グリセロール; pH 6.5] を加え，穏やかに攪拌後，0℃，15 分間静置した．この菌液を 200 µl ずつマイクロチューブに分注し急速凍結後，-70℃ で保存した．

b) 形質転換　　プラスミド DNA の導入は，このコンピテント細胞 200 µl を 0℃，15 分間放置後，0.1－1.0 µg のプラスミド DNA を加え，さらに 0℃，30 分間静置した．つぎに 42℃ で 1 分間熱ショックを与え，0℃，3 分間冷却した．800 µl の SOC 液体培地 [2% トリプトン (Difco), 0.5% 酵母エキス (Difco), 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 20 mM $MgCl_2$, 20 mM $MgSO_4$, 20 mM グルコース] を加え 37℃，1 時間振盪培養後，適当に希釈して抗生物質を添加した LB 寒天培地に接種し，生じた抗生物質耐性コロニーを形質転換株とした．

2) *S. mutans* の形質転換

S. mutans MT8148 株の形質転換は，Lindler と Macrina (1986) の方法に準じて行った．56℃，30 分間熱処理して非働化したウマ血清 (Life Technologies, Inc.) を 10% 含む Todd Hewitt ブロス (Difco) に MT8148 株を接種し，37℃，18 時間培養した．この 100 µl を 4 ml の同培地に接種し，37℃，4 時間培養後，10 µg のプラスミド DNA を加え，さらに 1 時間培養した．これを適当に希釈して，エリスロマイシン (10 µg/ml) を含む MS 平板培地に播種し，形質転換株を分離した．

14. クローニングの方法

スクロース密度勾配遠心で得られた *S. mutans* MT8148 株染色体 DNA 断片と *Xba* I および *Sph* I で消化したプラスミドベクター pMW118 あるいは pMW119 とを連結した．この組換え DNA をカルシウム処理によりコンピテントな状態にした *E. coli* DH5 α 株あるいは JM109 株に形質転換した．得られた形質転換株からコロニーハイブリダイゼーションによって，目的の組換え *E. coli* をスクリーニングした．

15. 組換え *E. coli* 菌体抽出物の調製

組換えプラスミドをもつ *E. coli* JM109 株をアンピシリンを含む LB 液体培地 (100 ml) で対数増殖前期になるまで培養し，最終 1 mM になるようにイソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド (IPTG; 和光純薬) を加えさらに 2 時間振盪した．遠心後，菌体を 5 ml の 1 mM フッ化フェニルメチルスルフォニル (PMSF; Sigma) と 30 mM 塩化ナトリウムを含む 30 mM トリス－塩酸緩衝液 (pH 7.5) に懸濁した．これを，0℃ に冷却した状態で超音波発生機 (UD102型, トミー精工, 東京)を用いて最大出力で懸濁液がほとんど透明になるまで十分に破砕後，遠心により不溶物を除き，上清を 200 µl ずつ分注し，-20℃ で保存した．凍結，融解によるタンパクの変性を防ぐため，試料は用時毎回調製した．

16. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) とウェスタンブロッティング

SDS-PAGE は Laemmli (1970) の方法に準じて行った．アクリルアミドの濃度は分離用として 7.5%, 濃縮用として 4.0% のゲルを用いた．分子量測定用マーカーとして高分子量および低分子量用電気泳動キャリブレイションキット (Pharmacia) を用いた．試料は 2% SDS，0.1% ブロムフェノールブルー (BPB; 和光純薬)，100 mM ジチオスレイトール (DTT; 和光純薬)，10% グリセロールを含む 50 mM トリス－塩酸緩衝液 (pH 6.8) 中で 95℃，1 分間処理した．また，泳動は 4℃，20 mA で行い，分離したタンパクバンドは 0.25% クーマシーブリリアントブルー R-250 (Sigma) を含むエタノール - 酢酸 - 水 (9 : 2 : 9) 混液で染色した．

ウェスタンブロッティング (Burnette, 1981) は SDS-PAGE 後，平板型転写装置 (NA-1512型，日本エイドー，東京) を用いて 120 mA，2 時間通電することによりアクリルアミドゲル層からポリビニリジン ジフルオライド(polyvinylidine difluoride; PVDF) 転写膜 (Immobilon, Millipore, Bedford, Mass., USA) へタンパクを転写した．この PVDF 膜を 3% BSA を含む PBST (0.14 M NaCl と 0.05% Tween 20 を含む 50 mM リン酸緩衝液; pH 7.4) 溶液中で 4℃，一晩放置した．

ついでPBST溶液で500倍希釈したウサギ抗CA-GTase IgGと室温で1時間反応させ，PBST溶液で3回洗浄後，PBST溶液で1,000倍希釈したアルカリフォスファターゼ結合ブタ抗ウサギIg抗体(Dakopatts, Glostrup, Denmark)と室温で1時間反応させた．さらにPBST溶液で膜を3回，アルカリフォスファターゼ発色液(100 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$, 100 mM Tris-HCl; pH 9.5)で1回洗浄後，発色基質(0.033%リン酸5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル, 0.016%ニトロブルーテトラゾリウム)(Sambrookら, 1989)を添加した上記のアルカリフォスファターゼ発色液を加えて発色させた．

17. 酵素活性の測定

1) GTase活性

*S. mutans*精製CA-GTaseおよび*E. coli*菌体抽出物中の組換えGTaseタンパクの活性は，Kogaら(1986*b*)の方法に従って測定した．10 µlの試料を同じく10 µlの20 mM [^{14}C-グルコース]スクロース(1.85 GBq/mol; New England Nuclear, Boston, Mass., USA)を含む0.1 Mリン酸カリウム緩衝液(pH 6.0)と混和し，37℃，1時間反応させた．この反応液を濾紙片(1 x 2 cm, 514A, Advantec Toyo, 大阪)に吸収させ乾燥後，メタノールあるいは蒸留水で3回洗浄し，合成された[^{14}C]グルカン量を液体シンチレーションカウンター(LKB-Wallac, RackBeta 1214型，Wallac Oy., Turku, Finland)で測定した．メタノールで洗浄後のカウントは全グルカン量を，また，蒸留水で洗浄後のカウントは非水溶性グルカン量を示しているものとして算定した．

*S. mutans*培養上清中および菌体表面上のGTase活性は，以下のように測定した．*S. mutans* MT8148株を10 mlのBHI液体培地に接種し，37℃，18時間培養した．この菌液を遠心して，培養上清と菌体に分離した．菌体は0.1%アジ化ナトリウムを含む0.89%生理食塩水を用いて3回洗浄した後，同生理食塩水1 mlに懸濁した．GTase活性は培養上清と菌体懸濁液それぞれ10 µlを試料として，同じく10 µlの20 mM [^{14}C-グルコース]スクロース溶液と反応させ，上記の方法に従って測定した．

2) FTase 活性

10 µl の試料と 20 mM [^{14}C-フルクトース] スクロース溶液 (1.85 GBq/mol; New England Nuclear) を含む 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) 10 µl とを混和し，37℃，1 時間反応させた．この反応液を濾紙片 (1 x 2 cm, Advantec Toyo) に吸収させ乾燥後，メタノールで 3 回洗浄し，合成された [^{14}C] フルクタン量を液体シンチレーションカウンターで測定した．

18. GTase に対する抗 CA-GTase 抗体の影響

S. mutans 精製 CA-GTase あるいは *E. coli* 組換え CA-GTase をウサギ抗 CA-GTase 抗体 (0-1 mg タンパク/ml)と混和し，37℃ で 30 分間保温した．ついで，最終濃度 10 mM [^{14}C-グルコース] スクロース溶液と 37℃，1 時間反応させ，上記の方法に従って GTase 活性を測定した (Hamada ら, 1991)．

19. エリスロマイシン耐性遺伝子の挿入による GTase 欠損株の作成

Streptococcus 属と *E. coli* のシャトルベクターである pVA838 (Macrina ら, 1982) を制限酵素 *Cla* I, *Hind* III で消化してエリスロマイシン耐性遺伝子 (Em^r) を含む 1.6 kb の断片を得た．また，CA-GTase 遺伝子を含むプラスミド pSK6 の CA-GTase 遺伝子中の *Mlu* I サイトを切断した．Em^r 遺伝子の断片および線状 pSK6 は DNA Blunting Kit (宝酒造) を用いて DNA の末端を平滑化し，両者を連結し，プラスミド pSK8 を得た．ついで，pSK8 を *Kpn* I で切断した後，*S. mutans* MT8148 株に形質転換した．形質転換株を Em を含む MS 平板培地に播種し，嫌気的に 37℃，48 時間培養した．生じた Em 耐性コロニーを再度 Em を含む MS 平板培地に接種し，純培養であることを確認した．

染色体 DNA 中に Em^r 遺伝子が挿入されていることを確認するため，得られた変異株の染色体 DNA を抽出し，これら DNA を制限酵素 *Pst* I, *Sac* I で消化した．ついで，[α-^{32}P] dCTP (～37 MBq/mmol; Amersham) で標識した Em^r 遺伝子をプローブとしてサザンハイブリダイゼイションを行った．

20. スクロース依存性平滑面付着能

S. mutans を 1% スクロースを含む BHI 液体培地 3 ml 入りの試験管 (13 x 100

mm, Corning Inc., Corning, N.Y., USA) に接種し，水平面に対して 30° 傾斜させて，37℃，18 時間培養した．培養菌体とグルカンのガラス管壁への付着能は Koga ら (1986*b*) の方法に改変を加え，下記のように行った．培養試験管を 3 回転させ移した液を画分 A，さらにこの試験管に蒸留水 3 ml を加え 3 回転させて得た洗浄液を画分 B，ついで蒸留水 3 ml を加えボルテックスミキサーで 3 秒間攪拌し除いた液を画分 C，および培養試験管に強固に付着した菌体に蒸留水 3 ml を加え超音波発生機 (Handy Sonic UR-20P型，トミー精工) を用いて付着菌体を完全に剥離したものを画分 D とした．各画分の A_{550} での濁度を求め，D/ (A+B+C+D) の % 比率を被験菌株の付着率とした．

21．菌体疎水性

被験菌の菌体疎水性は，ヘキサデカン法 (Rosenberg ら, 1980) および硫酸アンモニウム法 (Fives-Taylor と Thompson, 1985) で測定した．ヘキサデカン法は凍結乾燥菌体を 0.52 mg/ml の濃度になるように PUM 緩衝液 (30 mM 尿素, 0.8 mM 硫酸マグネシウムを含むリン酸カリウム緩衝液; pH 7.1) に懸濁し，同緩衝液 3 ml を試験管 (13 x 100 mm, Corning) に分注し，*n*-ヘキサデカン (東京化成，東京) 200 µl を加えボルテックスミキサーで 1 分間混和した．室温で 15 分間静置後，水層の A_{550} を測定し，ヘキサデカン非添加時の A_{550} に対する比率から，ヘキサデカン層に移動した菌量の % 比率を求めた．また，後者の方法では，凍結乾燥菌体を 0.52 mg/ml の濃度になるように 2 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.8) に懸濁し，その 30 µl を等量の 0.2 から 4 M の硫酸アンモニウムを含む同緩衝液と共に 96 穴 U 底マルチタイタープレート (MicroTest III, Becton Dickinson, Oxnard, Calif., USA) 中で 2 分間混和した．可視光イルミネーターを用いて凝集の有無を観察し，菌体疎水性は凝集の生じた最小の硫酸アンモニウム濃度で表した．

21．推計学的手法

測定結果は必要に応じて，市原 (1990) の記載に従ってStudent の *t* 検定を行い，各群間の有意差の有無を検討した．

結　果

1．アミノ酸分析

S. mutans MT8148 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 と決定した．CA-GTase のアミノ酸組成は GS-5 株 *gtfB*，*gtfC* 遺伝子 (Shiroza ら, 1987；Ueda ら, 1988) の DNA 配列から推定したアミノ酸組成と比較した結果，これらはいずれも親水性のポリペプチド組成を有し，類似のアミノ酸組成を示すことが明らかにされた (表 2)．

表 2　*S. mutans* MT8148 株精製 CA-GTase のアミノ酸組成および GS-5 株 *gtfB*, *gtfC* 遺伝子の推定アミノ酸組成の比較

アミノ酸	% アミノ酸組成の実測値 CA-GTase[a)]	% 推定アミノ酸組成 GS-5 株 *gtfB*[b)]	*gtfC*[c)]
Asx	16.8	15.8	15.1
Thr	6.6	7.1	8.3
Ser	5.8	6.2	7.0
Glx	10.0	9.7	8.2
Pro	2.6	2.2	3.1
Gly	9.0	7.8	6.8
Ala	8.6	8.0	8.6
Val	6.7	6.7	6.9
Met	1.5	1.6	1.6
Ile	4.9	5.0	4.6
Leu	6.2	6.0	7.0
Tyr	6.4	6.5	5.4
Phe	4.0	4.0	3.9
Lys	4.9	6.1	6.6
His	1.7	1.7	1.6
Trp	N. D.[d)]	1.2	1.2
Cys	N. D.	0.0	0.0
Arg	4.7	4.5	4.0

a) MT8148 株精製 CA-GTase (50 pmol) を 110℃, 24 時間, 6 N 塩酸で加水分解後，アミノ酸自動分析装置を用いてニンヒドリン発色法により測定した．
b) Shiroza ら (1987) の報告より推定したアミノ酸配列から Gly-34 までのシグナルペプチドを除いた GTase-I
c) Ueda ら (1988) の報告より推定したアミノ酸配列から Ser-34 までのシグナルペプチドを除いた GTase-SI
d) 検出されなかった

2. CA-GTase 遺伝子のクローニング

まず，オリゴヌクレオチドプローブ FK01－04 を用いて，*S. mutans* MT8148 株 DNA のサザンブロット分析を行った．その結果，FK01－04 のうち FK01 が，*S. mutans* MT8148 株染色体 DNA と最も強く反応したのでこの FK01 を以後のスクリーニングのプローブとして用いた．MT8148 株染色体 DNA を制限酵素 *Spe* I と *Sph* I で消化し，スクロース密度勾配遠心，ついでアガロース電気泳動により分子量の異なる DNA 断片に分画した．各画分に対して FK01 をプローブとしてサザンブロティングを行い，陽性反応を示す画分を CA-GTase 遺伝子のクローニングに用いた．この画分を *Sph* I と *Xba* I で消化したプラスミドベクター pMW119 と連結後，*E. coli* DH5 α 株に形質転換した．コロニーブロッティングにより約 5,000 個の組換え *E. coli* をスクリーニングし，32 個の陽性クローンを得た．これらのクローンからプラスミド DNA を抽出し，*Kpn* I と *Sph* I で消化後，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 5.6 kb のフラグメントが pMW119 に挿入されていることが明らかになっ

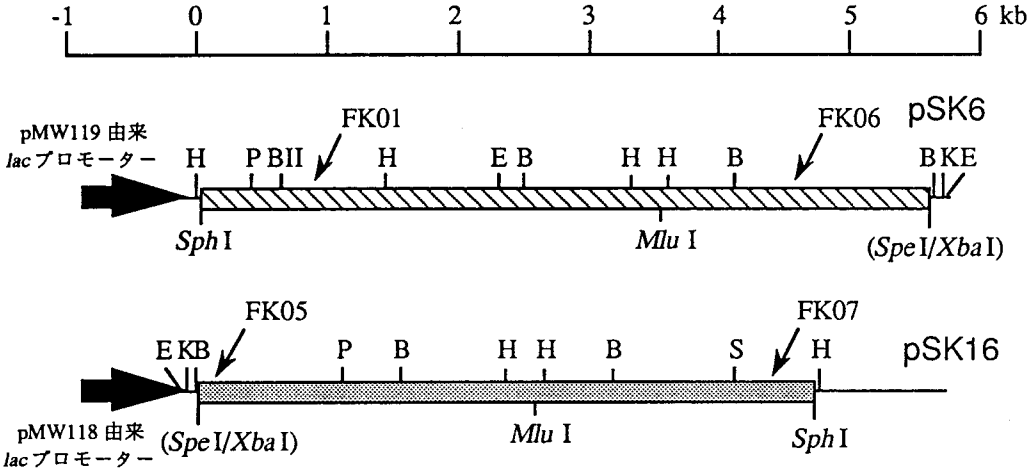

図 4　pSK6 および pSK16 の挿入断片制限酵素地図．太い矢印は pMW118 および pMW119 に存在する *lac* プロモーターの方向を示す．B, *Bam*H I; BII, *Bgl* II; E, *Eco*R I; H, *Hin*d III; K, *Kpn* I; P, *Pst* I; S, *Sac* I．オリゴヌクレオチドプローブ (FK01, 05, 06, 07) はその認識部位を矢印 (→) で示す．▨, CA-GTase 遺伝子; ▩, *gtfC'* 遺伝子

らのプラスミドのうち1つを選びpSK6と命名した．このpSK6の制限酵素地図(図4)の結果は，調べた限り制限酵素部位がGS-5株*gtfB*のそれと一致した．

3. *gtfC*相当遺伝子のクローニング

pSK6の挿入断片がMT8148株染色体DNA上に存在するか否かを確認するためpSK6をプローブとして，サザンハイブリダイゼイションを行ったところ，*Spe*Iと*Sph*Iで消化した染色体DNAとハイブリッドを形成する5.6 kbと4.7 kbの断片が存在した(図5)．GS-5株*gtfB*と*gtfC*遺伝子はその中央領域で高い相同性を示す(Uedaら, 1988)ため，この4.7 kb断片は*gtfC*に相当する遺伝子である可能性が示唆された．そこで，*gtfB*と*gtfC*に98%の相同性をもつ

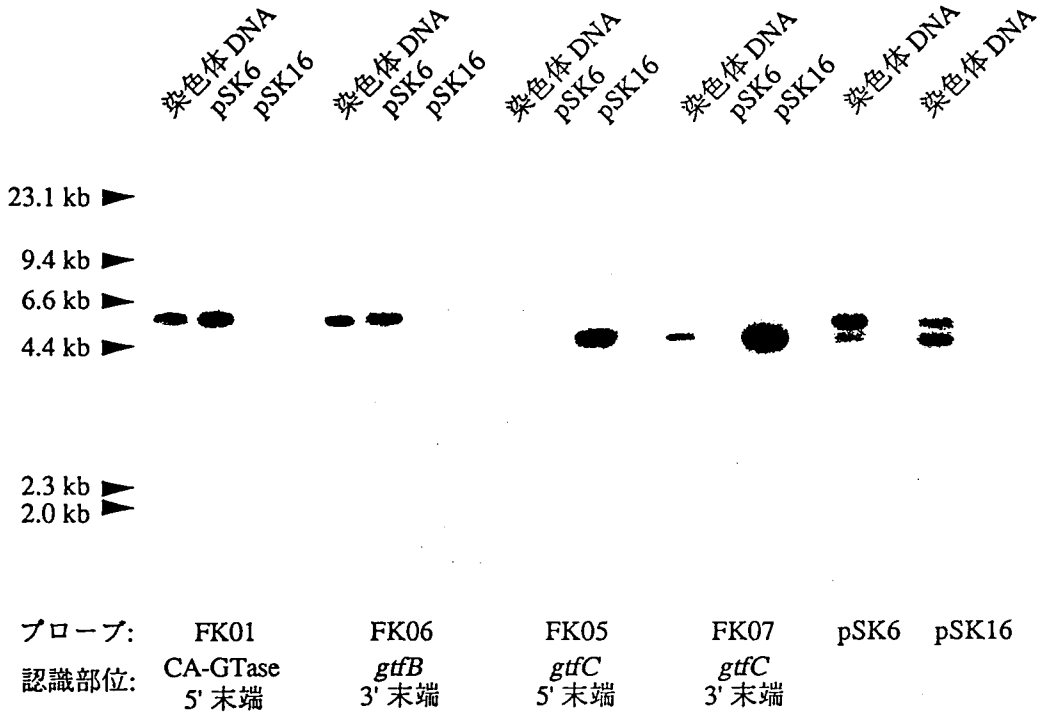

図5　*S. mutans* MT8148株染色体DNAと組換えプラスミドpSK6, pSK16のサザンブロット分析．染色体DNAは*Spe*I, *Sph*Iで消化した．pSK6およびpSK16は*Kpn*I, *Sph*Iで消化した．試料を0.8%アガロース電気泳動後，ナイロン膜に転写した．ナイロン膜を適当に切断し，それぞれ[^{32}P]で標識した特異的オリゴヌクレオチドプローブあるいはpSK6, pSK16を用いてハイブダイゼイションを行った．

伝子である可能性が示唆された．そこで，*gtfB* と *gtfC* に 98% の相同性をもつ 1.6 kb の *Bam*H I 断片 (Ueda ら, 1988) をプローブとして用いてこの遺伝子のクローニングを行った．CA-GTase 遺伝子のクローニングの場合と同様に DNA ライブラリーを作成し，pSK6 より分離した 1.6 kb の *Bam*H I 断片を [^{32}P] で標識したプローブを用いてコロニーサザンハイブリダイゼイションを行った．得られた陽性クローンのプラスミド DNA を分離し，*Kpn* I と *Sph* I で消化してアガロース電気泳動により挿入断片を分析した．約半数のクローンは 4.7 kb の挿入断片を保持し，残りのクローンは pSK6 の挿入断片に相当する 5.6 kb の断片を有していた．これら 4.7 kb の挿入断片を持つクローンの 1 つを pSK14 と命名した．pSK14 の制限酵素地図によると，*Eco*R I サイトが pSK14 に存在しないことを除いて GS-5 株の *gtfC* のそれと一致した．また，*gtfC* の制限酵素地図 (Ueda ら, 1988) との比較により，この pSK14 の挿入断片の翻訳方向は pMW119 のもつラクトース (*lac*) プロモーターの反対向きであると考えられた．このことは，以後の組換えタンパク発現時に *lac* プロモーターを利用できない点で不利であると考えられるので，pSK14 の 4.7 kb 挿入断片を *Kpn* I と *Sph* I で切り出し，マルチクローニングサイトのみが pMW119 と反対向きであるプラスミドベクター pMW118 にサブクローニングした．得られたプラスミド DNA を pSK16 と命名し，その制限酵素地図 (図 4) を作製した．

4. pSK6 および pSK16 のサザンブロット分析

pSK6 は FK01 とともに *gtfB* の3' 末端部のオリゴヌクレオチドプローブである FK06 ともハイブリッドを形成した (図 5)．この結果から，pSK6 挿入遺伝子即ち，CA-GTase 遺伝子は *gtfB* と極めて相同性の高いものであることが示唆された．一方，pSK16 はプローブ FK05 (*gtfC* の5' 末端部を認識) および FK07 (*gtfC* の3' 末端部) とハイブリッドを形成し (図 5)，この結果から pSK16 挿入断片は *gtfC* にほぼ相当する遺伝子 (*gtfC'*) であることが示唆された．

5. CA-GTase 遺伝子-*gtfC'* 遺伝子のクローニング

プラスミド pTF37 を *Bgl* II と *Sph* I で切断し，同様に *Bgl* II と *Sph* I で消化したMT8148 株染色体 DNA と連結して得られた組換えプラスミドを *E. coli* に

ザンハイブリダイゼイションによるスクリーニングを行った．その結果，9.7 kb の挿入断片をもつ組換えプラスミドが得られ，同プラスミドを pSK21 と命名した．その制限酵素地図を作製した結果が図 6 に示されている．

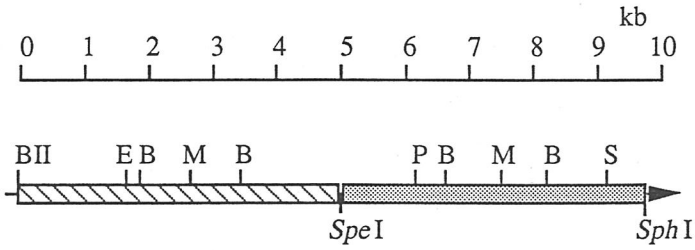

図 6　pSK21 の挿入断片の制限酵素地図．B, *Bam*H I; BII, *Bgl*II; E, *Eco*R I; M, *Mlu* I; P, *Pst*I; S, *Sac*I.　▨, CA-GTase 遺伝子;　▩, *gtfC'* 遺伝子;

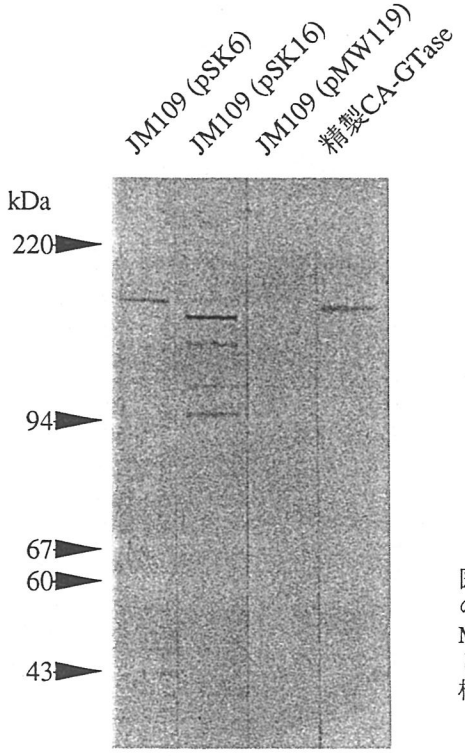

図.7　pSK6 および pSK16 の遺伝子産物のウェスタンブロット分析．*S. mutans* MT8148 株精製 CA-GTase を家兎に免疫して得たポリクローナル抗体を用いて検出した．

名した．その制限酵素地図を作製した結果が図6に示されている．

6．*E. coli* 組換え GTase の発現

GTase 遺伝子を挿入断片としてもつキメラプラスミドが *E. coli* DH5α 株を宿主とした場合，*E. coli* 中で合成された組換えタンパクはプロテアーゼの影響を受け，容易に分解されることが判明した．そこで，*lac* リプレッサータンパクを過剰に産生させる遺伝子である *lacI*^{q} を持つ *E. coli* JM109 株を宿主として以後の実験を行った．JM109 (pSK6) および JM109 (pSK16) が産生する組換え GTase のウェスタンブロティングのパターン (図 7) を比較すると，JM109 (pSK6) 菌体抽出物はウサギ抗 CA-GTase 抗体が 162 kDa タンパクとほぼ特異的に，かつ強力に反応するのに対して，JM109 (pSK16) 菌体抽出物は，152 kDa の主要なバンド以外に 138 kDa, 115 kDa, 96 kDa の中等度の反応性を示すバンドが観察された．

7．組換え GTase の性状

E. coli 組換え GTase および *S. mutans* 精製 CA-GTase の GTase 活性を表3に示す．JM109 (pSK6) 菌体抽出物は高い GTase 活性をもち，全グルカン産生量の 95.7% が IG より成ることが示され，CA-GTase 産生グルカンの 99.5% が IG

表3　pSK6 および pSK16 遺伝子産物のグルカン合成能

	[^{14}C] グルカン量[a] (cpm)	
	非水溶性グルカン	全グルカン
JM109 (pSK6) 溶菌液	2584 ± 22[b]	2695 ± 70
JM109 (pSK16) 溶菌液	356 ± 12	411 ± 12
JM109 (pMW119) 溶菌液	47 ± 9	45 ± 6
精製 CA-GTase	3604 ± 284	3621 ± 46

a) 10 µl の JM109 株溶菌液および精製 CA-GTase を 10 µl の 20 mM [^{14}C-グルコース] スクロース (1.85 GBq/mol) と反応させ，蒸留水で洗浄して非水溶性グルカンを，メタノールで洗浄して全グルカンを測定した．生成グルカンのカウントは，濾紙に残存した [^{14}C] グルカンの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した．

とする所見とよく一致した．これに対して，JM109 (pSK16) は JM109 (pSK6) と比較して，約 1/7 倍の活性しか示さなかった．非水溶性グルカンの全グルカンに対する割合も 84.4% で JM109 (pSK6) よりも低い値であった．

また，pSK6 組換え GTase および精製 CA-GTase は，抗 CA-GTase 抗体によりほぼ同じようにグルカン合成能が阻害された (図 8)．

8. Em^r 遺伝子挿入変異株の性状

組換えプラスミド pSK6 の CA-GTase 遺伝子に pVA838 由来の Em^r 遺伝子を

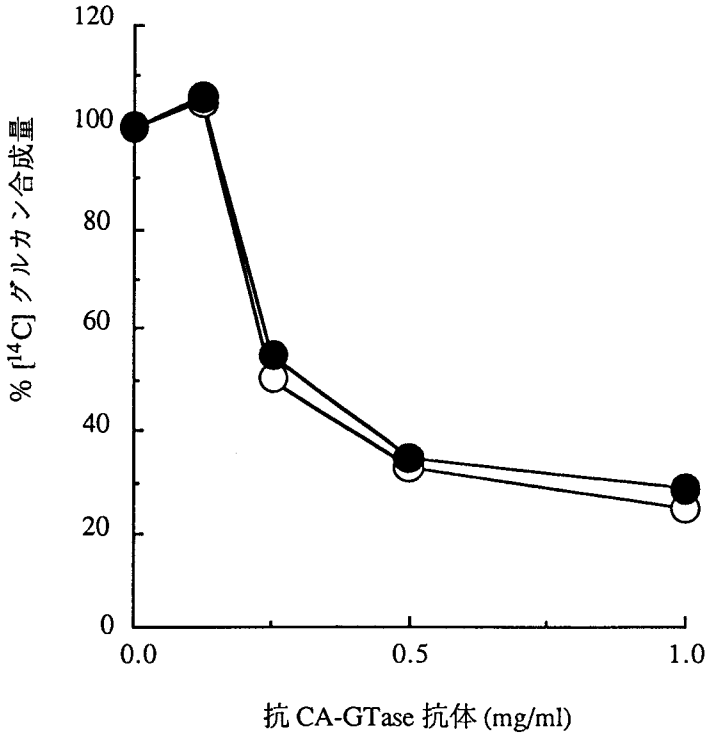

図 8　*S. mutans* 精製 CA-GTase および *E. coli* pSK6 組換え GTase のグルカン合成能に及ぼす抗 CA-GTase 抗体の抑制効果．精製 CA-GTase (●) および pSK6 組換え GTase (○) は抗 CA-GTase 抗体と 37℃，30 分間反応させた．その後，基質である [^{14}C-グルコース] スクロースと反応後，生じた [^{14}C] グルカンを放射能測定により定量した．縦軸は抗 CA-GTase 抗体を加えないときを 100% とし，その対照に対する値を示す．

挿入し，新たな組換えプラスミドpSK8を得た．pSK8は大腸菌由来のクローニングベクターであるpMW119を起源としており，また，制限酵素*Kpn*Iによって切断されて線状になり，*S. mutans*中では複製することができない．pSK8を*S. mutans* MT8148株に形質転換すると，Em^{r}遺伝子が挿入されたpSK8のCA-GTase遺伝子とMT8148株染色体DNA中の正常のCA-GTase遺伝子との間で相同遺伝子組換えが起き，形質転換株はEm耐性を獲得し，同時にGTase遺

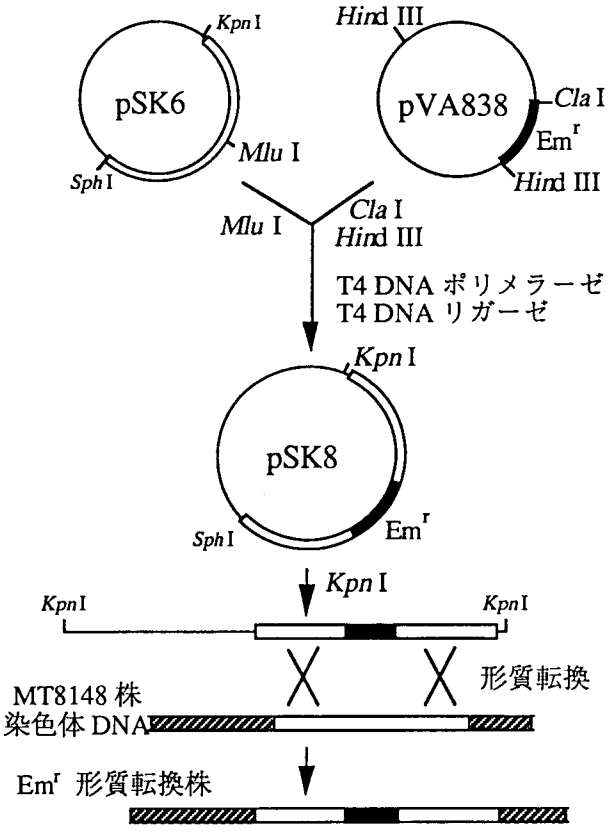

図9　エリスロマイシン耐性遺伝子の挿入によるCA-GTase欠損株の作成．—，プラスミドベクター；□，CA-GTase遺伝子；■，Em^{r}遺伝子；▨，MT8148株染色体DNA

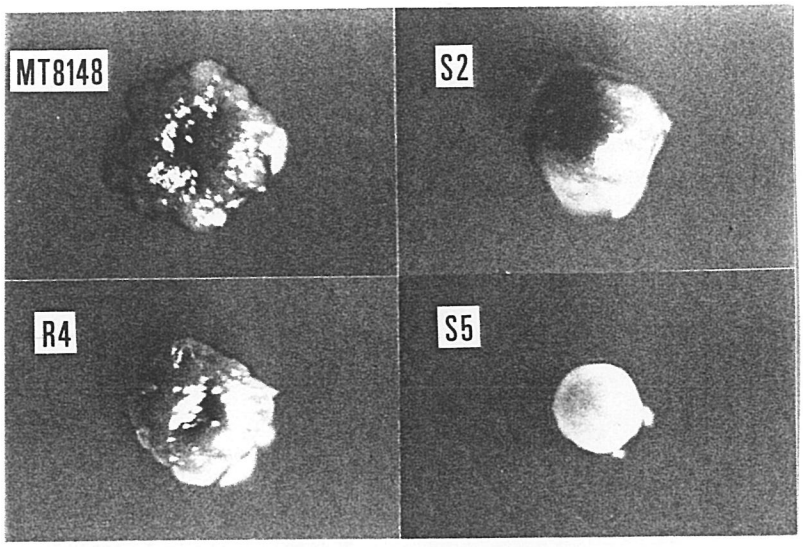

図 10　*S. mutans* MT8148 株およびその変異株の MS 平板培地上のコロニー形態．MS 平板培地 (Em; 10 μg/ml) に被験菌を播種し，37℃ で 2 日間嫌気培養後，コロニーを実体顕微鏡下で撮影した．

伝子の遺伝子産物すなわち GTase タンパクの発現を停止する(図 9)．

MS 寒天培地に生育した形質転換株を実体顕微鏡で観察し，コロニー形態によって，ラフ型，スムーズ型，およびラフ型の中間型スムーズ型の 3 グループに分けた (図 10)．各グループから 5 株を選び，これらの各菌株から染色体 DNA を抽出し，制限酵素 *Pst* I，*Sac* I で消化後，[^{32}P] で標識した Em^r 遺伝子をプローブとして用いたサザンハイブリダイゼイションを行い，染色体 DNA 中に Em^r 遺伝子が挿入されていることを確認した．各グループの代表的な菌株である S2 株，R4 株，および S5 株はそれぞれ 8.0，4.6，6.4 kb でハイブリッドを形成した (図 11)．前述の制限酵素地図 (図 4) およびこのサザンハイブリダイゼイションの結果から，Em^r 遺伝子の挿入部位が推定できる (図 12)．即ち，コロニー形態がスムーズ型とラフ型の中間型を示す S2 株は CA-GTase 遺伝子に 1.6 kb の Em^r 遺伝子が挿入され，一方，親株と同様のラフ型の R4 株は *gtfC'* 遺伝子に Em^r 遺伝子が挿入されていた．また，スムーズ型で親株よりも小さめのコロニーである S5 株は CA-GTase 遺伝子の後半部と *gtfC'* 遺伝子の前

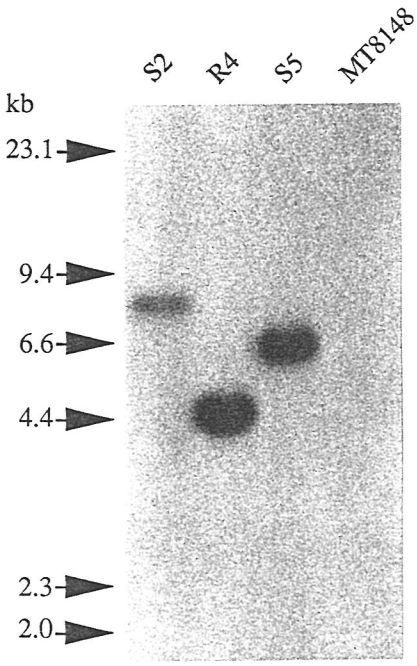

図 11　*S. mutans* MT8148 株およびその変異株のサザンブロット分析．被験菌の染色体 DNA を制限酵素 *Pst* I, *Sac* I で消化し，これらを 0.8% アガロース電気泳動にかけた後，ナイロン膜に転写した．ついで，[^{32}P] で標識した Em^r 遺伝子をプローブとしてこの遺伝子の挿入された DNA 断片を検出した．

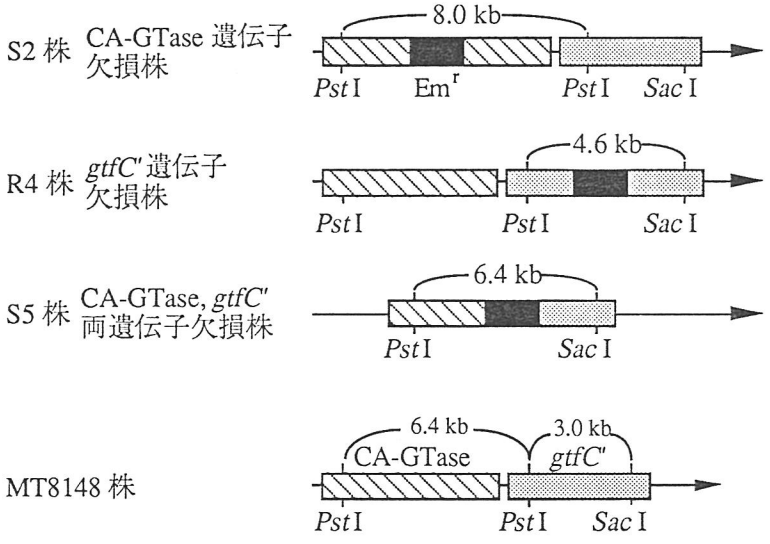

図 12　*S. mutans* MT8148 株の変異株 Em^r 遺伝子挿入部位．▨, CA-GTase 遺伝子; ▩ , *gtfC'* 遺伝子; ■ , Em^r 遺伝子

半部が欠落し，その間に Em^r 遺伝子が挿入されていることが明らかにされた．

8. GTase 欠損株の性状

GTase 欠損株の培養上清中および菌体表層上の GTase 活性 (図 13) に関して，親株である MT8148 株と比較して，S2 株，R4 株，および S5 株はいずれも有意に (P<0.001) 活性が低かった．特に，CA-GTase および *gtfC'* 遺伝子が不活化された S5 株は，ほとんど IG を合成しなかった．また，スクロース依存性付着能について，3 つの GTase 欠損株は親株に比べて有意に (P<0.001) 付着能が低下した (図 14)．しかし，S2 株の付着率は 34% と他の 2 つの変異株よりやや高く，MT8148 株のそれは約 1/2 の値を示した．一方，これらの菌株の菌体疎水性をヘキサデカン法と硫安法を用いて検討した結果，親株と 3 つの変異株との間に有意差は認められなかった (表 4)．

表 4　MT8148 株およびその変異株の菌体疎水性

	ヘキサデカン法[a] 疎水性 (%) (平均値±標準偏差)	硫安法[b] 硫安濃度 (M)
S2 株	27.8 ± 2.0	1.1
R4 株	27.1 ± 2.0	1.1
S5 株	27.2 ± 5.6	1.1
MT8148 株	26.7 ± 3.6	1.1

a) 菌体懸濁液 3 ml にヘキサデカン 200 µl を加え，ボルテックスミキサーで混和した．水層からヘキサデカン層へ移動した菌量を全菌量に対する % 比率で表した．

b) 菌体懸濁液を最終濃度 0.1 から 2.0 M の硫酸アンモニウム溶液と混和し，凝集を生じた最小硫安濃度を示した．

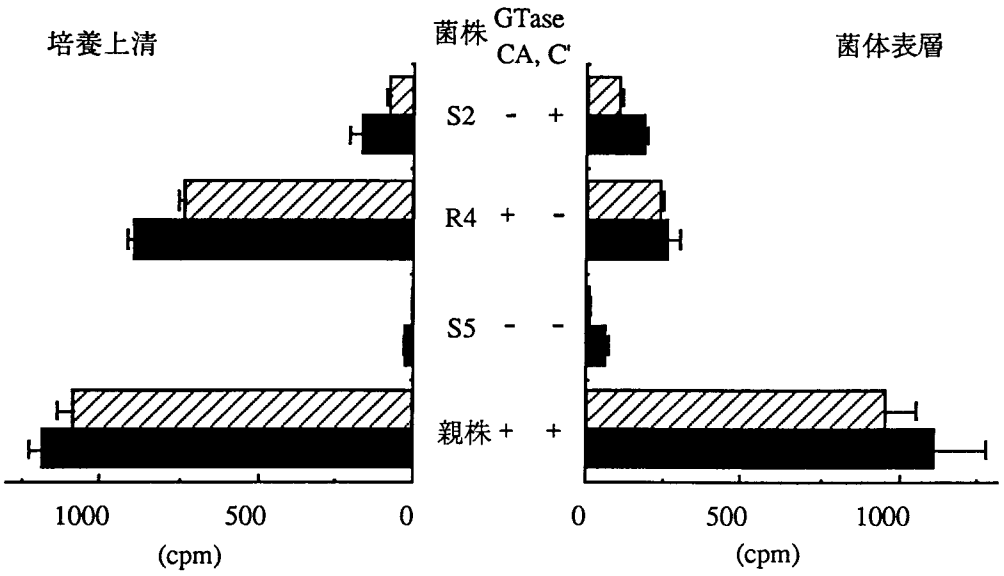

図 13　*S. mutans* MT8148 株およびその変異株の培養上清と菌体表層の GTase 活性．培養上清 (10 μl 培養分)と菌体抽出 GTase (100 μl 培養分) を [^{14}C-グルコース] スクロースと反応させ，メタノールで洗浄後，濾紙に残った [^{14}C] グルカンの放射活性を液体シンチレーションカウンターで測定した．▨，非水溶性グルカン；■，全グルカン．各値は平均値 ± 標準偏差を示す．

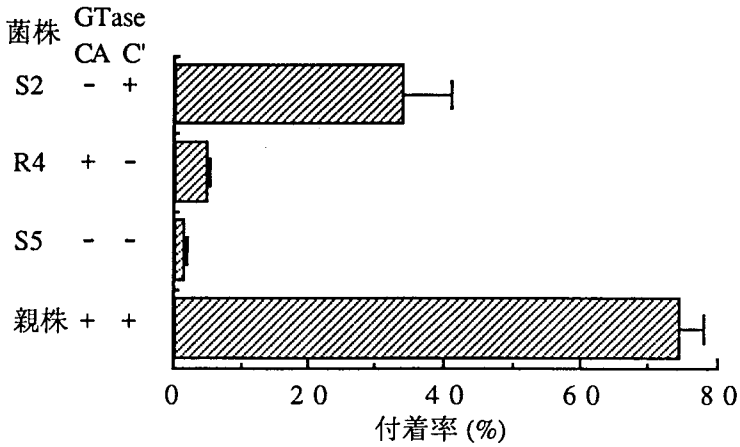

図 14　*S. mutans* MT8148 株およびその変異株のスクロース依存性平滑面付着能．被験菌を 1% スクロースを含む BHI 液体培地に接種し，試験管を水平面に対して 30° 傾斜させて 37℃，18 時間培養した．付着率は，ボルテックスミキサーによる撹拌でも残存する強固な付着菌体の，全菌量に対する % 比率として求めた．各値は平均値 ± 標準偏差を示す．

考　察

S. mutans は，スクロース非依存性および依存性作用によって歯面に付着する．前者のメカニズムは，静電気的，レクチン様，あるいは疎水性相互作用や水素結合によるものとされる (Gibbons, 1984)．一方，後者のメカニズムはスクロースから GTase によって非水溶性グルカンを *de novo* に合成することにより，不可逆的に生育菌体が歯面へ付着するものである (Hamada と Slade, 1980) そこで，*S. mutans* のスクロース依存性付着機能を探る目的で，本研究では *S. mutans* MT8148株 CA-GTase 遺伝子のクローニングを行い，得られた遺伝子を分子生物学的手法を駆使して操作した結果，いくつかの形質転換株あるいは GTase 遺伝子の修飾変異株を分離し，それらの性状を分析して興味ある知見を得ることができた．

精製 CA-GTase の N 末端アミノ酸配列の分析で得た Asp-Ser-Asn-Glu-Ser-Lys-Ser-Gln-Ile-Ser-Asn-Asp の 12 残基は GS-5 株 *gtfB* 遺伝子の塩基配列 (Ueda ら, 1988) から推定されるアミノ酸配列の Asp-39 から Asp-50 と一致する．これらの結果から示唆されるシグナル配列切断部位は Ala-38 と Asp-39 の間になる．また，塩基配列が報告されている他の GTase には *gtfB* 遺伝子の上記のアミノ酸配列に相当するものは認められていない．*gtfB* 遺伝子の推定アミノ酸配列において Gly-34 と Leu-35 の間をシグナル配列切断部位であるとする報告 (Shiroza ら, 1987) と今回得られた結果とは異なる．ところが，シグナルペプチドはアラニンのカルボキシ側で切断されるという報告 (Emr ら, 1980；Hollingshead ら, 1986；Vlasuk ら, 1983) や，*S. mutans* の菌体表層タンパクである PAc は Ala-38 と Asp-39 の間でシグナルペプチドが切断されるとの結果 (Okahashi ら, 1989)，あるいは，サル由来のミュータンスレンサ球菌の 1 種である *S. downei* MFe28 株 (血清型 *h*) の GTase-I は Ala-38 と Asp-39 の間で，同株の GTase-S は Ala-37 と Asp-38 の間でシグナルペプチドが切断されるとの報告 (Ferretti ら, 1987；Gilmore ら, 1990) を併せて考えると，CA-GTase のシグナル配列切断部位は Ala-38 と Asp-39 間であるようにみえる．

S. mutans MT8148 株の CA-GTase アミノ酸組成の実測値を *S. mutans* GS-5 株 *gtfB* および *gtfC* の推定アミノ酸組成の理論値と比較すると (表 2)，CA-GTase は *gtfB*，*gtfC* 遺伝子に支配されるタンパクと極めて類似性に高い組成で，これらはいずれも親水性のペプチドであることを示している．

当初，CA-GTase 遺伝子のクローニングの戦略として筆者は高コピー数のベクターである pUC19 を用い，ウサギ抗 CA-GTase 抗体によるイムノスクリーニングを繰り返し行った．しかしながら，50,000 個以上の形質転換株をスクリーニングしてもなお，陽性クローンを得ることができなかった．この時点では陽性クローンが得られなかった理由として，抗原である組換え CA-GTase タンパクの発現量少なく，その結果抗原抗体反応が弱いためであると考えた．

そこで，この難点を解消する目的でより感度の高いサザンハイブリダイゼイションを試みた．CA-GTase の N 末端アミノ酸配列に基づいて作成したオリゴヌクレオチド FK01 をプローブとして MT8148 株染色体 DNA のサザンブロットを行い，その陽性画分を挿入断片として高コピー数のプラスミドベクター pUC19 および中等度のコピー数のベクターである pBR322 を用いてライブラリーを作成し，それぞれ 10,000 コロニーをスクリーニングしたが，陽性クローンを得ることはできなかった．これらの結果は，CA-GTase 遺伝子を挿入断片とするプラスミドを保有する大腸菌は増殖できず，コロニーを形成するには至らないことを示唆している．この原因として，CA-GTase 遺伝子が支配するタンパクが大腸菌内で産生された場合，宿主の大腸菌にとっては毒性があり，その結果，増殖が困難になることが考えられる．このように，異種の菌種由来のタンパクが大腸菌にとって有害に働き，クローニングを困難にしている現象は，*Porphyromonas gingivalis* の線毛遺伝子 (Dickinson ら, 1988；藤原卓, 私信) や *Neisseria gonorrhoeae* の外膜タンパク遺伝子 (藤原, 私信) などでしばしば見受けられる．

以上の諸問題点を克服する方策として，組換えタンパクの発現を低レベル

にとどめるようなベクターを用いればクローニングが可能になるのではないかとの仮説が成立する．ベクターとしてプラスミドを用いる場合，組換えタンパクの発現量はそのコピー数によって左右される．そこで，組換えCA-GTaseの大腸菌における発現量を低下させるため，低コピー数のプラスミドベクターであるpMW119を用いてライブラリーを作成した．5,000個の形質転換株をスクリーニングすると32個の陽性クローンを得ることができた．このpMW119はpSC101 (HasunumaとSekiguchi, 1977) をもとに構成されたプラスミドであり大腸菌中でのコピー数は5個以下と報告されている (ニッポンジーン遺伝子工学総合カタログ, 1992)．LB寒天培地上でのCA-GTase遺伝子を含む *E. coli* DH5 α 株は，ベクターのみをもつ大腸菌に比べて生育がやや遅いこと，*lacI*^{q}をもつJM109株の方がこれをもたないDH5 α 株を宿主とするよりもキメラプラスミドが安定すること，さらにまたpMW119より*lac*プロモーターを除いたプラスミドpTF37をベクターとしてサブクローニングしたクローンはさらに安定であること (結果は示していない) などの結果より，組換えCA-GTaseが大腸菌にとって有害なタンパクであり，このことがクローニングベクターとしてpUC19およびpBR322を用いたクローニングが成功しなかった原因と考えられる．

得られたCA-GTase遺伝子 (図4) とGS-5株の*gtfB*遺伝子 (Uedaら, 1988) の制限酵素サイトは調べた限りにおいて一致した．また，サザンブロット分析 (図5) からCA-GTase遺伝子は*gtfB*遺伝子の3'末端を特異的に認識するプローブFK06と5.6 kbでハイブリッドを形成した．この結果はMT8148株CA-GTase遺伝子とGS-5株*gtfB*遺伝子が極めてホモロジーの高いことを示唆している．

*S. mutans*は菌株によって*gtf*遺伝子の制限酵素切断部位が異なるという多様性を示し (Chiaら, 1991)，また，*S. mutans*染色体DNA上で*gtfB*と*gtfC*遺伝子間で相同遺伝子組換えが起こる結果，両遺伝子が*gtfBC*の形で融合した菌株が報告されている (UedaとKuramitsu, 1988；Yamashitaら, 1992)．MT8148株はGS-5株と同様に*gtfB*と*gtfC*遺伝子が前後一列に並んでいるタイプであること

は，両遺伝子がつながったプラスミドを分離し，制限酵素を用いて分析することにより明らかになった (図 6)．この CA-GTase 遺伝子と *gtfC'* 遺伝子をもつ大腸菌は生育が非常に遅くコロニーの形成には 36－48 時間を要し，この組換えプラスミドは挿入断片の欠失が非常に起こりやすかった．前者の原因は CA-GTase 遺伝子と *gtfC'* 遺伝子の産生する組換えタンパクが大腸菌の細胞機能に対して阻害的に働くためだと考えられる．後者の原因として，2 つの遺伝子間で相同遺伝子組換えが生じ，その結果，合成される組換え GTase タンパクの毒性が低下することで，宿主大腸菌の生育にとって組換えタンパクは許容範囲内になると推定される．このように組換えプラスミドの欠失を受けた形質転換株が，CA-GTase 遺伝子と *gtfC'* 遺伝子をもつ大腸菌よりもより優位に生育すると考えられる．

ウェスタンブロット分析の結果 (図 7) より，CA-GTase 遺伝子を有する pSK6 遺伝子産物は，MT8148 株精製 CA-GTase の分子量 156, 000 よりもやや大きい 162, 000 の位置で 1 本のバンドを形成した．この分子量の大きさの相違は，試料である遺伝子産物が大腸菌の菌体を超音波で破砕抽出して得られたものであり，組換えタンパクのシグナルペプチドが切断されていない状態で分離された可能性がある．また，*gtfC'* 遺伝子を有する pSK16 遺伝子産物は，ウサギ抗 CA-GTase 抗体と 4 本のバンドを形成した．これは GS-5 株において *gtfB* と *gtfC* 遺伝子は互いに相同性が高いとする報告 (Ueda ら, 1988) から考えて，同様に MT8148 株の CA-GTase 遺伝子と *gtfC'* 遺伝子も互いに相同性が高く，ポリクローンのウサギ抗 CA-GTase 抗体では pSK6 と pSK16 遺伝子産物を区別できないことを示唆している．

組換え *E. coli* の菌体破砕物について GTase 活性を測定したところ，pSK6 遺伝子産物が高い GTase 活性を示すのに対して，pSK16 遺伝子産物は 1/7 の活性しか示さなかった (表 3)．これは pSK16 の組換え GTase が，ウェスタンブロット分析 (図 5) の結果に示されているように大腸菌のプロテアーゼの影響を受けやすいためか，あるいはこの酵素の GTase 活性が本質的に低いためと推測

される．これに関連して注目すべきことは，*S. mutans* からこれまでに *gtfC* 遺伝子が支配する GTase (GTFC') タンパクが活性な状態で分離・精製されていないことである．その理由としては，この GTase タンパクの発現量が低いのか，あるいはタンパクが発現しているにもかかわらず同 GTase の活性が，もしあるとしても天然の状態では極めて低い可能性が考えられる．また，pSK6 組換え GTase および精製 CA-GTase はともに，IG の全グルカンに占める比率が 95% 以上と極めて高く (表 3)，抗 CA-GTase 抗体による酵素活性の阻害作用も互いに類似している点 (図 8) からも，組換え CA-GTase は *S. mutans* 由来の CA-GTase の性状をよく反映しているといえる．

ニトロソグアニジンを用いて作成した *S. mutans* の GTase 欠損変異株が，MS 平板培地上でスムーズ型のコロニーを示すことが報告されている (Koga ら, 1986*a* ；南, 1991)．一方，*S. mutans* GS-5 株の *gtfB* あるいは，*gtfC* 遺伝子に Em^r 遺伝子を挿入することにより不活化するとコロニー形態がラフからスムーズへと変化する (Aoki ら, 1986 ; Hanada と Kuramitsu, 1988)．また，*E. coli* - *Streptococcus* 属のシャトルベクターに GS-5 株由来の *gtfB*, *gtfC* 遺伝子を挿入し，これらキメラプラスミドを GTase を産生しない *Streptococcus milleri* に形質転換したところ，*gtfC* 遺伝子を導入した *S. milleri* 変異株の MS 寒天培地上でのコロニー形態は親株と同様にスムーズ型であったが，*gtfB* 遺伝子を挿入した変異株は *S. mutans* 様のラフ型を示す (Fukushima ら, 1992)．これらの報告は本実験の結果 (図 10) とよく一致しており，特定の GTase をコードする遺伝子は *S. mutans* の特徴的なラフ型のコロニー形態に深く関与していることを示唆している．

変異株の培養上清および菌体表層の GTase 活性は親株である MT8148 株に比べて有意に低下した．BHI 液体培地で *S. mutans* MT8148 株を培養すると，*gtfC'* 遺伝子によって支配される GTFC' タンパクは天然の CA-GTase と同様に，培養上清中とともに菌体表層にも発現することが明らかになった．また，CA-GTase と GTFC' タンパクを産生しない S5 株は GTase 活性が非常に低く，

とくに非水溶性グルカンをほとんど合成しなかった (図 13)．同実験系にデキストラン T10 (20 μM) をプライマーとして加えても，S5 株の培養上清および菌体表層の IG 合成量は増加しなかった (結果は示していない)．これらの結果から考えて，*S. mutans* には CA-GTase および *gtfC'* 遺伝子以外に IG を合成する未知の GTase 遺伝子が存在する可能性は低いと考えられる．Munro ら (1991) は *gtfB*，*gtfC*，および *gtfD* 遺伝子に Em^r 遺伝子を挿入した変異株を作成し，この株がほとんど完全に GTase 活性を失ったことを報告している．このことから，S5 株の示すわずかな GTase 活性は，*gtfD* 遺伝子によって支配される GTase が合成する SG によるものであると考えられる．

S. sobrinus の産生する IG 合成 GTase である GTase-I の C 末端側の繰り返し構造がグルカン結合部位であり (Ferretti ら, 1987；Wong ら, 1990)，また，GTase-I の N 末端側 アミノ酸の 1, 100 残基はスクロース開裂部位である (Abo ら, 1991) と報告されている．さらに，*S. sobrinus* GTase-I の Asp-450 がスクロース結合に関与しているという報告もある (Mooser ら, 1991)．*S. mutans* の *gtfB* 遺伝子が支配する GTase-I は *S. sobrinus* のように詳細に研究されているわけではないが，Asp-456 がスクロース結合を，C 末端側の繰り返し構造がスクラーゼ活性と GTase 活性を担っていることが示唆されている (Russell, 1990；Kato と Kuramitsu, 1991；Kuramitsu ら, 1991)．これらの報告によると，S2 株，R4 株，および S5 株 *gtf* 遺伝子の *Mlu* I サイトの上流までの 1, 060 アミノ酸残基は合成されるので，スクロース結合能を保持している可能性がある．しかし，pSK8 の遺伝子産物および S5 株とウサギ抗 CA-GTase 抗体との非常に低い反応性 (結果は示していない) を考慮すると，3 つの変異株の産生する修飾を受けた GTase タンパクの 3 次構造は変化している可能性が高い．これによって，本来示すはずのスクロース結合能は発現されていないと考えられる．また，*S. milleri* 中で *gtfB*，あるいは *gtfC* 遺伝子を発現させ，これらの形質転換株の平滑面へのスクロース依存性付着能を検討した結果，*gtfC* 遺伝子を導入した *S. milleri* はガラス管壁に付着したと報告されている (Fukushima

ら, 1992)．以上の所見と図 14 の結果から，スクロース依存性付着には CA-GTase 遺伝子と *gtfC'* 遺伝子によって制御される 2 つGTaseの共存が不可欠であり，なかでも相対的に酵素活性の低い GTase を支配する *gtfC'* 遺伝子がより密接に関与している可能性が示唆された．

S. mutans 菌体表層の 190 kDa のタンパク抗原は菌体の疎水性に深く関与しており，このタンパク抗原の遺伝子を不活化された菌株は親水性を示すと報告されている (Okahashi ら, 1989；Kogaら, 1990)．しかし，3 つの GTase 変異株の菌体疎水性は，2 種類の方法を用いて検討したが有意差は示されなかった (表 4)．この結果より，CA-GTase 遺伝子と *gtfC'* 遺伝子によって制御される *S. mutans* 菌体表層の GTase タンパクは，菌体の疎水性にはほとんど関わっていないことが示唆された．

最近，Fukushima ら (1993) は *gtfB*，*gtfC* 遺伝子産物を特異的に認識するモノクローナル抗体を用い，菌の増殖過程と菌体表層，培養上清中の *gtfB*，*gtfC* 遺伝子産物の局在について報告している．しかしながら，CA-GTase の局在や菌体との結合様式はいまだに不明であり，今後の重要な研究課題であると考えられる．本研究で得られた組換えプラスミドや GTase 欠損株は，このような GTase 系の解明に有用な手段として役立つものであろう．

結　論

1. *S. mutans* MT8148 株 CA-GTase 遺伝子を低コピーベクターである pMW119 を用いてクローニングを行った.

2. この遺伝子の産物は抗 CA-GTase 抗体と反応し，高い GTase 活性を示した.

3. CA-GTase 遺伝子はサザンブロット分析および制限酵素地図から GS-5 株の *gtfB* 遺伝子に極めて相同性の高いことが示唆された.

4. スクロース依存性付着には，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'* 遺伝子がより関与している可能性が示唆された.

謝　辞

本研究を行う機会を与えて頂き，終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜わった歯科保存学講座　土谷裕彦教授に深く感謝します．本研究課題を与えていただき，終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜わった口腔細菌学講座　浜田茂幸教授に心から謝意を表します．また，本研究を進めるにあたり，様々な御指導と御教示をいただいた口腔細菌学講座　藤原卓博士および京都大学微生物学講座倉園久生博士に深謝します.

最後に，本研究を行うに際し，幅広い御援助と御協力をいただいた歯科保存学講座ならびに口腔細菌学講座の皆様に厚く御礼申し上げます.

文 献

Abo, H., Matsumura, T., Kodama, T., Ohta, H., Fukui, K., Kato, K., and Kagawa, H. (1991) : Peptide sequences for sucrose splitting and glucan binding within *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase (water-insoluble glucan synthetase). *Journal of Bacteriology*, 173, 989-996.

Aoki, H., Shiroza, T., Hayakawa, M., Sato, S., and Kuramitsu, H. K. (1986) : Cloning of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene coding for insoluble glucan synthesis. *Infection and Immunity*, 53, 587-594.

Baba, T., Ogawa, T., Okahashi, N., Yakushiji, T., Koga, T., Morimoto, M., and Hamada, S. (1986) : Purification and characterisation of the extracellular D-glucosyltransferase from serotype *c Streptococcus mutans*. *Carbohydrate Research*, 158, 147-155.

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. *Analytical Biochemistry*, 112, 195-203.

Chia, J. -S., Hsu, T. -Y., Teng, L. -J., Chen, J. -Y., Hahn, L. -J., and Yang, C. -S (1991) : Glucosyltransferase gene polymorphism among *Streptococcus mutans* strains. *Infection and Immunity*, 59, 1656-1660.

Dickinson, D. P., Kubiniec, M. A., Yoshimura, F., and Genco, R. J. (1988) : Molecular cloning and sequencing of the gene encoding the fimbrial subunit protein of *Bacteroides gingivalis*. *Journal of Bacteriology*, 170, 1658-1665.

Emr, S. D., Hall, M. N., and Silhavy, T. J. (1980) : A mechanism of protein localization : The signal hypothesis and bacteria. *Journal of Cell Biology*, 86, 701-711.

Ferretti, J. J., Gilpin, M. L., and Russell, R. R. B. (1987) : Nucleotide sequence of a

glucosyltransferase gene from *Streptococcus sobrinus* MFe28. *Journal of Bacteriology*, 169, 4271-4278.

Fives-Taylor, P. M., and Thompson, D. W. (1985) : Surface properties of *Streptococcus sanguis* FW213 mutants nonadherent to saliva-coated hydroxyapatite. *Infection and Immunity*, 47, 752-759.

Fukushima, K., Ikeda, T., and Kuramitsu, H. K. (1992) : Expression of *Streptococcus mutans gtf* genes in *Streptococcus milleri*. *Infection and Immunity*, 60, 2815-2822.

Fukushima, K., Motoda, R., Takada, K., and Ikeda, T. (1981) : Resolution of *Streptococcus mutans* glucosyltransferases into two components essential to water-insoluble glucan synthesis. *FEBS Letters*, 128, 213-216.

Fukushima, K., Okada, T., and Ochiai, K. (1993) : Production, characterization, and application of monoclonal antibodies which distinguish three glucosyltransferases from *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity*, 61, 323-328.

Gibbons, R. J. (1984) : Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth. *Journal of Dental Research*, 63, 378-385.

Gilmore, K. S., Russell, R. R. B., and Ferretti, J. J. (1990) : Analysis of the *Streptococcus downei gtfS* gene, which specifies a glucosyltransferase that synthesizes soluble glucans. *Infection and Immunity*, 58, 2452-2458.

Grunstein, M., and Hogness, D. S. (1975) : Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72, 3961-3965.

浜田茂幸 (1989) : ミュータンスレンサ球菌 (mutans streptococci) の細菌学的性状とビルレンス因子. 医学細菌学4 巻 (中野昌康, 吉川昌之介, 竹田美文編) . 菜根出版, 東京, 271-314.

Hamada, S., Horikoshi, T., Minami, T., Kawabata, S., Hiraoka, J., Fujiwara, T., and Ooshima, T. (1991) : Oral passive immunization against dental caries in rats by

use of hen egg yolk antibodies specific for cell-associated glucosyltransferase of *Streptococcus mutans*. *Infection and Immunity*, 59, 4161-4167.

Hamada, S., Horikoshi, T., Minami, T., Okahashi, N., and Koga, T. (1989) : Purification and characterization of cell-associated glucosyltransferase synthesizing water-insoluble glucan from serotype *c Streptococcus mutans*. *Journal of General Microbiology*, 135, 335-344.

Hamada, S., and Slade, H. D. (1980) : Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiological Reviews*, 44, 331-384.

Hamada, S., and Torii, M. (1978) : Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surfaces. *Infection and Immunity*, 20, 592-599.

Hanada, N., and Kuramitsu, H. K. (1988) : Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans gtfC* gene, coding for synthesis of both soluble and insoluble glucans. *Infection and Immunity*, 56, 1999-2005.

Hanada, N., and Kuramitsu, H. K. (1989) : Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans gtfD* gene, coding for primer-dependent soluble glucan synthesis. *Infection and Immunity*, 57, 2079-2085.

Hanahan, D. (1983) : Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166, 557-580.

Hasunuma, K., and Sekiguchi, M. (1977) : Replication of plasmid pSC101 in *Escherichia coli* K12: Requirement for *dnaA* function. *Molecular and General Genetics*, 154, 225-230.

Hollingshead, S. K., Fischetti, V. A., and Scott, J. R. (1986) : Complete nucleotide sequence of type 6 M protein of the Group A Streptococcus. *Journal of Biological Chemistry*, 261, 1677-1686.

Holmes, D. S., and Quigley, M. (1981) : A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analytical Biochemistry*, 114, 193-197.

Honda, O., Kato, C., and Kuramitsu, H. K. (1990) : Nucleotide sequence of the *Streptococcus mutans gtfD* gene encoding the glucosyltransferase-S enzyme. *Journal of General Microbiology*, 136, 2099-2105.

市原清志. (1990) : バイオサイエンスの統計学, 南江堂.

Kato, C., and Kuramitsu, H. K. (1990) : Carboxyl-terminal deletion analysis of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-I enzyme. *FEMS Microbiology Letters*, 72, 299-302.

Kenny, A. C., and Cole, J. A. (1983) : Identification of a 1, 3- α glucosyltransferase involved in insoluble glucan synthesis by a serotype *c* strain of *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiology Letters*, 16, 159-162.

Koga, T., Asakawa, H., Okahashi, N., and Hamada, S. (1986*a*) : Sucrose-dependent cell adherence and cariogenicity of serotype *c Streptococcus mutans*. *Journal of General Microbiology*, 132, 2873-2883.

Koga, T., Okahashi, N., Asakawa, H., and Hamada, S. (1986*b*) : Adherence of *Streptococcus mutans* to tooth surfaces. *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, 111-120.

Koga, T., Okahashi, N., Takahashi, I., Kanamoto, T., Asakawa, H., and Iwaki, M. (1990) : Surface hydrophobicity, adherence, and aggregation of cell surface protein antigen mutants of *Streptococcus mutans* serotype *c*. *Infection and Immunity*, 58, 289-296.

Koga, T., Sato, S., Yakushiji, T., and Inoue, M. (1983) : Separation of insoluble and soluble glucan-synthesizing glucosyltransferases of *Streptococcus mutans* OMZ176 (serotype *d*). *FEMS Microbiology Letters*, 16, 127-130.

Kuramitsu, H. K., and Ingersoll, L. (1976) : Immunological relationships between glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* serotypes. *Infection and Immunity*,

14, 636-644.

Kuramitsu, H. K., Kato, C., Jin, H., and Fukushima, K. (1991) : Genetic analysis of *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. *Genetics and Molecular Biology of Streptococci, Lactococci, and Enterococci.* (Dunny, G. M., Cleary, P. P., and McKay, L. L. editors). American Society for Microbiology, Washington, D.C., 253-255.

Kuramitsu, H. K., and Wondrack, L. (1983) : Insoluble glucan synthesis by *Streptococcus mutans* serotype *c* strains. *Infection and Immunity*, 42, 763-770.

Laemmli, U. K. (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.

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. *Journal of Bacteriology*, 166, 658-665.

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

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) : Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.

Macrina, F. L., Tobian, J. A., Jones, K. R., Evans R. P., and Clewell, D. B. (1982) : A cloning vector able to replicate in *Escherichia coli* and *Streptococcus sanguis*. *Gene*, 19, 345-353.

南貴洋. (1991) : *Streptococcus mutans* の菌体表層タンパク抗原と菌体結合型グルコシルトランスフェラーゼの相互作用とう蝕原性への関与. 大阪大学歯学雑誌, 36, 187-202.

Mooser, G., Hefta, S. A., Paxton, R. J., Shively, J. E., and Lee, T. D. (1991) : Isolation and sequence of an active-site peptide containing a catalytic aspartic acid from two *Streptococcus sobrinus* α -glucosyltransferases. *Journal of Biological*

Chemistry, 266, 8916-8922.

Mukasa, H., Shimamura, A., and Tsumori, H. (1989) : Purification and characterization of cell-associated glucosyltransferase synthesizing insoluble glucan from *Streptococcus mutans* serotype *c*. *Journal of General Microbiology*, 135, 2055-2063.

Mukasa, H., Tsumori, H., and Shimamura, A. (1985) : Isolation and characterization of an extracellular glucosyltransferase synthesizing insoluble glucan from *Streptococcus mutans* serotype *c*. *Infection and Immunity*, 49, 790-796.

Munro, C., Michalek, S. M., and Macrina, F. L. (1991) : Cariogenicity of *Streptococcus mutans* V403 glucosyltransferase and fructosyltransferase mutants constructed by allelic exchange. *Infection and Immunity*, 59, 2316-2323.

Okahashi, N., Sasakawa, C., Yoshikawa, M., Hamada, S., and Koga, T. (1989) : Cloning of a surface protein antigen gene from serotype *c Streptococcus mutans*. *Molecular Microbiology*, 3, 221-228.

Okahashi, N., Sasakawa, C., Yoshikawa, M., Hamada, S., and Koga, T. (1989) : Molecular characterization of a surface protein antigen gene from serotype *c Streptococcus mutans*, implicated in dental caries. *Molecular Microbiology*, 3, 673-678.

Pucci, M. J., Jones, K. R., Kuramitsu, H. K., and Macrina, F. L. (1987) : Molecular cloning and characterization of the glucosyltransferase C gene (*gtfC*) from *Streptococcus mutans* LM7. *Infection and Immunity*, 55, 2176-2182.

Rosenberg, M., Gutnick, D., and Rosenberg, E. (1980) : Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiology Letters*, 9, 29-33.

Russell, R. R. B. (1990) : Molecular genetics of glucan metabolism in oral streptococci. *Archives of Oral Biology*, 35, Suppl., 53S-58S.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) : *Molecular Cloning*, 2nd ed.,

Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Habor, New York.

Shimamura, A., Tsumori, H., and Mukasa, H. (1983) : Three kinds of extracellular glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* 6715 (serotype *g*). *FEBS Letters*, 157, 79-84.

Shiroza, T., Ueda, S., and Kuramitsu, H. K. (1987) : Sequence analysis of the *gtfB* gene from *Streptococcus mutans*. *Journal of Bacteriology*, 169, 4263-4270.

Southern, E. M. (1975) : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98, 503-517.

Stern, A., Nickel, P., Meyer, T. F., and So, M. (1984) : Opacity determinants of *Neisseria gonorrhoeae*: Gene expression and chromosomal linkage to the gonococcal pilus gene. *Cell*, 37, 447-456.

Ueda, S., and Kuramitsu, H. K. (1988) : Molecular basis for the spontaneous generation of colonization-defective mutants of *Streptococcus mutans*. *Molecular Microbiology*, 2, 135-140.

Ueda, S., Shiroza, T., and Kuramitsu, H. K. (1988) : Sequence analysis of the *gtfC* gene from *Streptococcus mutans* GS-5. *Gene*, 69, 101-109.

Vlasuk, G. P., Inouye, S., Ito, H., Itakura, K., and Inouye, M. (1983) : Effects of the complete removal of basic amino acid residues from the signal peptide on secretion of lipoprotein in *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 258, 7141-7148.

Wong, C., Hefta, S. A., Paxton, R. J., Shively, J. E., and Mooser, G. (1990) : Size and subdomain architecture of the glucan-binding domain of sucrose: 3- α -D-glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus*. *Infection and Immunity*, 58, 2165-2170.

Yamashita, Y., Bowen, W. H., and Kuramitsu, H. K. (1992) : Molecular analysis of a *Streptococcus mutans* strain exhibiting polymorphism in the tandem *gtfB* and *gtfC* genes. *Infection and Immunity*, 60, 1618-1624.

Yamashita, Y., Hanada, N., and Takehara, T. (1989) : Purification of a fourth glucosyltransferase from *Streptococcus sobrinus. Journal of Bacteriology*, 171, 6265-6270.

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.