



Title	シグナル配列組換えによるデキストラナーゼ遺伝子の <i>Streptococcus gordonii</i> Challis株における発現と活性デキストラナーゼの分泌
Author(s)	久保, 茂正
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/38320
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。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏 名 久 保 茂 正

博士の専攻分野の名称 博 士 (歯 学)

学 位 記 番 号 第 1 0 3 0 1 号

学 位 授 与 年 月 日 平 成 4 年 4 月 3 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 名 シグナル配列組換えによるデキストラナーゼ遺伝子の *Streptococcus gordonii* Challis 株における発現と活性デキストラナーゼの分泌

論 文 審 査 委 員 (主査) 教 授 松矢 篤三

(副査) 教 授 浜田 茂幸 助教授 滝川 正春 講 師 玉川 裕夫

論 文 内 容 の 要 旨

Streptococcus mutans をはじめとするミュータンスレンサ球菌による不溶性グルカンの産生は、同菌の歯面への強固な付着を促し、う蝕の重要なビルレンス因子と考えられている。不溶性グルカンは主にグルコース分子が $\alpha-1, 3$ グルコシド結合および $\alpha-1, 6$ グルコシド結合した重合体である。これまでの研究により、 $\alpha-1, 3$ グルコシド結合はグルカンの不溶性に、 $\alpha-1, 6$ グルコシド結合は菌の付着性に関与している。そこでプラークの常在菌にデキストラナーゼ遺伝子を組み込み、歯面上で持続的にデキストラナーゼを分泌させれば、グルカン産生に基づくミュータンスレンサ球菌の歯面への付着、ひいてはプラークの形成が抑制されないだろうか、との作業仮説が成立する。

Okushima ら (1991) は強力なデキストラナーゼを分泌する土壤菌 *Arthrobacter* sp. CB-8 株からデキストラナーゼ遺伝子をクローニングし、全塩基配列の決定を行った。戸田 (1990) は同株のデキストラナーゼ遺伝子を *S. gordonii* Challis 株へ導入した。しかし、*S. gordonii* 菌体内でデキストラナーゼが生成されたが、菌体外への分泌は認められなかった。この現象は *S. gordonii* のシグナルペプチダーゼが、*Arthrobacter* sp. 由来のシグナルペプチドを認識していないため生じると考えられる。本研究は *S. gordonii* から持続的にデキストラナーゼを分泌させるため、*S. downei* のグルコシルトランスフェラーゼ *gtfI* 遺伝子のシグナルペプチドに対応する塩基配列をデキストラナーゼ遺伝子の上流への置換挿入を試みたものである。*S. downei* の *gtfI* 遺伝子のプロモーターとシグナルペプチドの塩基配列を *Arthrobacter* sp. のデキストラナーゼ遺伝子の上流へ置換挿入し、*E. coli* のリボゾーム RNA 遺伝子に由来する *rrnB* T₁ T₂ ターミネーターの塩基配列を同デキストラナーゼ遺伝子の下流に挿入したプラスミド pMNK-4 を構築した。pMNK-4 を *S. gordonii* Challis 株に形質転換した、*S. gordonii* Challis (pMNK-4) はデキストラナーゼを菌体外へ効率よく分泌することが示された。同菌の培養上清中のデキストラナーゼ活性は、菌体湿重量 1 g あたり 0.84 単位と算出された。この活性は *Arthrobacter* sp. CB-8 株培養上清を同一条件下で測定した場合の約 1/7 の活性に相当した。

S. gordonii Challis (pMNK-4) における培養上清画分と菌体画分におけるデキストラナーゼの局在およびシグナルペプチドの切断の有無を調べる目的で、*Arthrobacter* sp. デキストラナーゼに対するウサギ抗血清を使用した

ウエスタンプロティングをおこなった。その結果、培養上清画分では *Arthrobacter* sp. CB-8 株培養上清と同じ、69KDa タンパクが強く同抗体と反応することが示された。一方、菌体画分には 69KDa タンパクと共に 74KDa タンパクが同抗体と反応した。

これらの結果により、*S. gordonii* Challis (pMNK-4) 培養上清にはシグナルペプチドが切断されたデキストラナーゼが分泌されていることが示された。この理由は、*S. gordonii* のシグナルペプチダーゼが *S. downei* の *gtfI* 遺伝子のシグナルペプチドを切断する特異性を有するためと考えられる。菌体内画分の 74KDa のバンドは、その大きさより、シグナルペプチドが切断されていない、即ち、*gtfI* シグナルペプチドを持つペプチド前駆体と考えられる。デキストラナーゼ分泌能を獲得した、*S. gordonii* Challis (pMNK-4) の、ミュータンスレンサ球菌 *S. sobrinus* 6715 株のスクロース依存性平滑面付着に対する影響を *in vitro* において検討した。この結果 *S. gordonii* Challis (pMNK-4) のデキストラナーゼ分泌により、*S. sobrinus* 6715 株によるグルカンの形成量が抑制され、菌体の試験管壁への付着が抑制された。

論文審査の結果の要旨

Streptococcus mutans をはじめとするミュータンスレンサ球菌による不溶性グルカンの產生は、同菌の歯面への強固な付着を促し、う蝕の重要なビルレンス因子と考えられている。本研究は、歯面上で口腔常在菌から持続的にデキストラナーゼを分泌させて、グルカンの產生に基づくミュータンスレンサ球菌の歯面への付着、及びプラークの形成を抑制することをねらいとして、この不溶性グルカンを分解するデキストラナーゼ遺伝子を口腔常在菌にプラスミドとして導入することを目的としたものである。

強力なデキストラナーゼを分泌する *Arthrobacter* sp. CB-8 株からクローニングされたデキストラナーゼ遺伝子の上流に、宿主の *Streptococcus gordonii* と同じミュータンスレンサ球菌の *Streptococcus downei* のグルコシルトランスフェラーゼ *gtfI* 遺伝子のシグナルペプチドに対応する塩基配列を挿入した。このプラスミド pMNK-4 を *S. gordonii* Challis 株に形質転換した *S. gordonii* Challis (pMNK-4) はデキストラナーゼを効率よく菌体外へ分泌し、その培養上清はデキストラナーゼに対するウサギ抗血清を使用したウエスタンプロッティングで *Arthrobacter* 培養上清と同じ 69KDa タンパクが抗体と強く反応した。またこの菌は *in vitro* において、ミュータンスレンサ球菌 *Streptococcus sobrinus* 6715 株のスクロース依存性平滑面付着を抑制することが示された。

以上により、本研究者は博士（歯学）の学位を得る資格があるものと認める。