

Title	Cloning and sequencing of the gene coding for dextranase from <i>Streptococcus salivarius</i>
Author(s)	大西, 祐一
Citation	大阪大学, 1996, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40367
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	おおにしゆういち 大西祐一
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 12677 号
学位授与年月日	平成 8 年 9 月 19 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	Cloning and sequencing of the gene coding for dextranase from <i>Streptococcus salivarius</i> (ストレプトコッカスサリバリウスにおけるデキストラナーゼ遺伝子のクローニングと塩基配列の決定)
論文審査委員	(主査) 教授 西宗 義武 (副査) 教授 山西 弘一 教授 北村 幸彦

論文内容の要旨

【目的】

不溶性グルカンは、*Streptococcus (S.) mutans* などのレンサ球菌により産生され、おもにグルカンの不溶性に関与する α -1.3グルコシド結合と、同菌の付着性に関与する α -1.6グルコシド結合した重合体であり、齶触の重要な因子であると考えられている。ところで、この α -1.6グルコシド結合を特異的に分解するデキストラナーゼを飼料や飲料水に添加することにより、*S. mutans* の平滑面への付着を阻害し、実験的に齶触を抑制することが報告されている。そこで、口腔内常在菌からデキストラナーゼを持続分泌することができれば *S. mutans* の歯面への付着が阻害でき、さらには齶触を抑制する可能性が推察される。

本実験は、その基礎的な研究として口腔内常在菌のうちデキストラナーゼ産生能を有する *S. salivarius* に着目し、そのデキストラナーゼ産生能の詳細を明らかにするため *S. salivarius* のデキストラナーゼ遺伝子のクローニングおよび塩基配列を決定しその解析を行った。

【方法ならびに成績】

菌株保存施設より *S. salivarius* 10株を選択し、デキストラナーゼ活性の検討を行った。その結果 *S. salivarius* 10株のデキストラナーゼ産生能は菌株によりまちまちであり、本実験では特に活性の強い M-33株を用いてデキストラナーゼ遺伝子の解析を行うことにした。次に *S. salivarius* M-33株から genomic DNA を抽出し、種々の制限酵素により切断を行い、これを同酵素にて切断を行ったプラスミドベクター pUC18を用いて遺伝子ライブラリーを作成した。このライブラリーをアンピシリンおよび0.2%ブルーデキストランを含む寒天培地に接種し、透明な脱色帯(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結果、*Kpn* I インサートをもつプレートにデキストラナーゼ産生株を認めた。この株よりプラスミド DNA を調製した結果、デキストラナーゼ遺伝子は4.3 kb DNA フラグメントに含まれていることがわかった。このフラグメントを各種制限酵素にて消化し、マッピングを行った。そして、pUC18ベクターヘサブクローニングを行い、デキストラナーゼ活性を調べたところ、*Kpn* I-*Ssp* I 3.1 kb フラグメントにはデキストラナーゼ活性が認められたが、*Kpn* I-*Hind* III 1.7 kb フラグメントには認められなかった。このことから塩

基配列の決定は、デキストラナーゼ遺伝子を含む *Kpn* I-*Ssp* I フラグメントを用いて行った。Sanger らのジデオキシ法により塩基配列を決定した結果、開始コドン392 bp、ストップコドン2,861 bp に位置する長さ2,478 bp のオープンリーディングフレームが認められ、その分子量は87,936 Da であった。

次に *S. salivarius* 培養上清からデキストラナーゼ蛋白の精製を行った。*S. salivarius* 培養上清を75%流安沈殿後、DEAE-セファロースを用いたイオン交換、さらにバイオゲル P-100カラムを用いたゲル濾過を行った。その後、リン酸緩衝液にて溶出させ後、凍結乾燥を行い精製デキストラナーゼ標品とした。精製デキストラナーゼ蛋白を10% SDS ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行ったところ、分子量約86 KDa の位置にバンドが認められた。この分子量は、塩基配列の結果から得られた分子量87,936 Da とほぼ一致するものであった。次に同精製デキストラナーゼ蛋白を4%ブルーデキストランを含む10% SDS ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動を行い、SDS の除去および変性、再生を行うことにより泳動蛋白の活性化を計ったところ、分子量86 KDa のバンドにデキストラナーゼ活性が認められたためデキストラナーゼ蛋白であることが確認された。

【総括】

1. *S. salivarius* 遺伝子ライブラリーを作成し、透明な脱色帯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。この株よりプラスミド DNA を調整した結果、デキストラナーゼ遺伝子は *kpn*I インサートをもつ4.3 kb DNA フラグメントに含まれていた。
2. *kpn*I フラグメントを各種制限酵素にて消化し、マッピングを行った。マップをもとにサブクローニングを行い塩基配列の決定を行った結果、開始コドン392 bp、ストップコドン2,861 bp に位置する長さ2,478 bp のオープンリーディングフレームを認め、分子量は87,936 Da であった。
3. *S. salivarius* の培養上清からデキストラナーゼ蛋白の精製を行い、4%ブルーデキストランを含む10% SDS-PAGE を行った結果、*S. salivarius* デキストラナーゼ蛋白の分子量は約86 kDa で DNA 塩基配列の分子量 (87,936 Da) の値とほぼ一致し、またこのバンドにデキストラナーゼ活性が認められた。

論文審査の結果の要旨

歯牙齲蝕の発生において、ストレプトコッカスミュータンスの産生する不溶性グルカンは重要な因子である。デキストラナーゼはこの不溶性グルカンを分解する酵素であるため齲蝕抑制作用があり、これまで数多くの研究がなされてきたが、そのほとんどが蛋白レベルであり多々不明な点が残されていた。

本研究は、歯牙齲蝕予防を目的にデキストラナーゼを分子レベルで解明するため、口腔内常在菌の一種でデキストラナーゼ産生能を有するストレプトコッカスサリバリウスのデキストラナーゼ活性の検討を行い、そしてデキストラナーゼ遺伝子のクローニングおよび塩基配列を決定し、さらにデキストラナーゼ蛋白の精製を行ったものである。その結果、サリバリウスのデキストラナーゼ活性は菌株によりまちまちであることがわかった。このことから各個人の口腔内におけるデキストラナーゼ活性の強さと齲蝕との関連性が示唆された。また塩基配列を決定することにより、この酵素の一次構造が明らかになった。精製蛋白による Optimum pH は5.5と低いものであったが、齲蝕が発生する際の pH とほぼ一致するものであり、サリバリウスのデキストラナーゼは齲蝕発生の際に最も有効に働くものと思われた。

本研究により得られた知見は、分子レベルでの歯牙齲蝕の予防に向けて貴重な情報を与えているもので、学位論文に値するものと考えられる。