The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Streptococcus oralisグルコシルトランスフェラーゼの精製とDNA塩基配列の決定およびその分子生物学的解析
Author(s)	星野, 倫範
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3169317
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏　　名	星（ほし）　野（の）　倫（とも）　範（のり）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　15353　号
学位授与年月日	平成12年3月24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 oralis* グルコシルトランスフェラーゼの精製と DNA 塩基配列の決定およびその分子生物学的解析
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　祖父江鎮雄 （副査） 教　授　浜田　茂幸　　助教授　西村　理行　　講　師　河合　啓次

論　文　内　容　の　要　旨

【研究目的】

Streptococcus oralis は小児を含むヒト口腔から高頻度に検出されるα溶血性口腔レンサ球菌の一種で、*Streptococcus sanguis*、*Streptococcus gordonii* とともにサングイスレンサ球菌に属している。*S.oralis* は歯の萌出前からヒト口腔内に定着し、グルコシルトランスフェラーゼ（GTase）の作用によりスクロールからグルカンを合成することから、デンタルプラークの形成に関与する有力な菌種のひとつと考えられている。さらにう蝕原性細菌である *Streptococcus mutans* の歯面への付着にも影響を及ぼす可能性が示唆されている。本研究では、*S.oralis* の GTase を精製してその生化学的性状と *S.mutans* の平滑面付着に与える影響を調べるとともに、同酵素をコードする遺伝子の DNA 塩基配列を決定し、分子生物学的解析を行った。

【材料と方法】

S.oralis ATCC10557株の培養上清からグルカン合成活性を指標としてカラムクロマトグラフィーにより GTase を精製した。グルカン合成活性は［^{14}C グルコース］スクロースを用いて測定した。精製 *S.oralis* GTase（GTaseR）を家兎に免疫して抗 GTase 抗体を作成し、これによる各種 GTase に対するグルカン合成阻害を調べた。SDS－PAGE および等電点電気泳動によりその分子量、等電点を決定した。*S.mutans* 菌液に GTaseR を添加し、静置後試験管壁に付着した菌体量を測定した。GTaseR の N 末端アミノ酸配列をプロテインシークエンサーを用いて決定した。これをもとに縮合オリゴヌクレオチドプライマーを作成して同配列に対応する DNA 断片を PCR により増幅した。この DNA 断片の塩基配列を DNA シークエンサーを用いて決定し、これをプローブとして *S.oralis* の染色体ライブラリーより GTase をコードする遺伝子のクローンを選択し、全塩基配列を決定した。決定した DNA 塩基配列中に各種抗生物質耐性遺伝子を挿入し、これを *S.oralis* に形質転換して相同遺伝子組換えによる *S.oralis* 挿入欠失変異株を作成した。

【結果と考察】

GTaseR は、分子量173kDa、等電点6.3、至適 pH6.5の主に水溶性グルカンを合成するプライマー非依存性の酵素であった。抗 *S.oralis* GTase 抗体は *S.oralis* 菌種のみならず、他のサングイスレンサ球菌のグルカン合成も阻害した。また GTaseR は *S.mutans* 静止菌体の平滑面付着を微量で増強した。決定した *S.oralis* GTase の N 末端側22アミノ酸残基の配列はホモロジー検索の結果、相同性を示す配列は認められなかった。本研究で決定した全長 8 kbp の

DNA塩基配列中には861bpのオープンリーディングフレーム（ORF）とその下流に4728bpのORFが存在した。上流のORFは*S.gordonii*のGTaseの制御遺伝子である*rgg*遺伝子と高い相同性が認められ、同遺伝子の変異体はGTase活性をほとんど示さないことから、*S.oralis* GTaseの発現を正に制御する*rgg*遺伝子であった。一方下流のORFは、GTaseのN末端アミノ酸配列に対応するDNA塩基配列を含み、同遺伝子のリコンビナントタンパクはグルカン合成活性を示すことから、*S.oralis* GTaseの遺伝子をコードする*gtfR*遺伝子であった。*S.oralis gtfR*の推定アミノ酸配列のN末端側55番目から186番目に対応するDNA塩基配列はサザンブロット分析の結果、他の口腔レンサ球菌の*gtf*遺伝子には存在せず、*S.oralis*菌種に特異的な配列であった。また*S.oralis rgg*遺伝子欠失変異株は*gtfR*遺伝子欠失変異株とは異なるコロニー形態を呈することから、*S.oralis rgg*遺伝子はGTaseの産生の制御のみならず、他の遺伝子の発現にも影響を与えることが示唆された。

【結論】

1．*S.oralis* GTaseは生化学的、免疫化学的、分子生物学的、遺伝子分類学的に口腔レンサ球菌の水溶性グルカン合成酵素に属するものであった。

2．*S.oralis gtfR*は*S.gordonii gtfG*と高い相同性を示したが、N末端部の55番目から186番目のアミノ酸配列はS.oralis菌種に特異的な配列であった。

3．*rgg*、*gtfR*遺伝子の変異株の解析から、*rgg*遺伝子はGTaseの産生を正に制御する遺伝子であり、*gtfR*遺伝子は*S.oralis*の単一のGTase遺伝子であった。

4．*S.oralis* GTaseは*S.mutans*静止菌体の付着を増強することより、*S.mutans*の歯面への付着に影響を与えることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、ヒト歯面に定着する細菌の有力メンバーである*Streptococcus oralis*が産生する酵素グルコシルトランスフェラーゼ（GTase）の精製と、同酵素をコードする*gtfR*遺伝子のDNA塩基配列の決定および分子生物学的解析を行うことを目的としたものである。

その結果、*S.oralis* GTaseはいくつかの口腔レンサ球菌が産生する水溶性グルカン合成GTaseのグループに属すること、また同酵素をコードする*gtfR*遺伝子の5'末端側の配列は、*S.oralis*菌種に特異的であることを解明した。また*gtfR*遺伝子は*S.oralis*に唯一のGTase遺伝子で、同酵素の発現は*rgg*遺伝子により正に制御されることを明らかにした。

以上より、本研究は*S.oralis* GTaseの生化学的性状を明らかにするとともに、*gtfR*遺伝子における5'末端側の特異的塩基配列の分類学的重要性と同酵素の発現の制御を分子生物学的に解明したものであり、博士（歯学）の学位請求に値するものと認める。