OUKA
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

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分子生物学的解析

大阪大学大学院歯学研究科
歯学臨床系専攻
星野　倫範

大阪大学歯学部小児歯科学講座
〒565-0871　大阪府吹田市山田丘1-8
Tel. 06-6879-2962

要約

Streptococcus oralis は，口腔常在細菌叢を構成するα溶血性レンサ球菌の一菌種で，出産直後の乳児口腔からも検出される．*S. oralis* は，スクロースからグルカンを合成する酵素グルコシルトランスフェラーゼ（GTase）を産生し，その働きによりデンタルプラークの形成に関与すると考えられている．本研究では，*S. oralis* のGTaseを分離精製し，その生化学的および免疫化学的性状を明かにするとともに，分子生物学的解析を加えた．

S. oralis GTaseを培養上清からカラムクロマトグラフィーにより分離し，SDS-PAGE上で分子量173 kDaを示す単一のバンドにまで精製した．精製標品の生化学的性状を調べたところ，等電点は6.3，至適pHは6.5，スクロースを基質としたときの*Km* 値は2.49 mMであった．同GTaseは，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り，同活性は主に2価の金属イオンにより阻害を受けた．また*S. oralis* GTaseの添加は，*Streptococcus mutans* 静止菌体のガラス試験管壁への付着を明確に増強した．同標品を家兎に免疫して得られた抗*S. oralis* GTase抗体は，精製*S. oralis* GTaseのグルカン合成活性を濃度依存的に阻害した．また同種の*S. oralis* および近縁種である*Streptococcus sanguis*，*Streptococcus gordonii* のGTase活性も有意に阻害した．

S. oralis GTaseのN末端22アミノ酸のシークエンスを決定したところ，他の口腔レンサ球菌のGTaseの推定アミノ酸配列とは一致せず，またホモロジー検索をしても相同性が高いアミノ酸配列は存在しなかった．この配列をもとに合成オリゴヌクレオチドプローブを作製し，*S. oralis* GTaseをコードする遺伝子を含む8.1 kbのDNA断片をクローニングした．同DNA断片のDNA塩基配列を決定したところ2つのオープンリーディングフレーム（ORF）が含まれており，861 bpの塩基対からなる一つ目のORFは，*S. oralis* GTaseの正の制御遺伝子である*rgg* 遺伝子であった．4728 bpの塩基対からなる下流のORFは，*S. oralis* GTaseをコードする*gtfR* 遺伝子であり，その推定アミノ酸配列上のN末端側の55から186番目の配列は*S. oralis* GTaseに特異的な配列であった．抗生物質耐性遺伝子の挿入により作製された*S. oralis rgg*，*gtfR* 遺伝子欠失変異株の性状の解析から，*rgg*

遺伝子はGTaseの産生の正の制御遺伝子であること，*gtfR* 遺伝子は*S. oralis* GTaseを唯一コードする遺伝子であることが確証された．また*rgg*，*gtfR* 遺伝子欠失変異株のコロニーの形態の相異から，*S. oralis rgg* 遺伝子は他の遺伝子の発現にも影響を与えることが示唆された．

はじめに

血液寒天培地上でα溶血性を示すサングイスレンサ球菌は，口腔の常在細菌叢を構成する主要な細菌群であり（古賀と浜田, 1992），心内膜炎（Whiteら, 1946, Parkerら, 1976, Douglasら, 1993）や，敗血症（Parkerら, 1976, Gaudreauら, 1981）などとの関連が示唆されている．このサングイスレンサ球菌は，以前は“*Streptococcus sanguis*”と総称され，う蝕原性細菌のミュータンスレンサ球菌と同様に歯の萌出直後から検出されるものの，う蝕の発生が増加するに伴いその検出率が低下するというミュータンスレンサ球菌と相反する消長を示すことから，う蝕の発生にはネガティブに作用する菌種と考えられていた．しかしこの*S. sanguis*と総称される菌群は，生化学的，血清学的，さらには遺伝子的にも異なる性状を有する菌群の集まりであり，現在では*S. oralis*，*S. sanguis*，*S. gordonii*などに細分されている．このうち*S. oralis*は，スクロースから菌体外多糖を合成するという*S. sanguis*や*S. gordonii*と共通する性状を有するものの，アルギニン，エスクリンを加水分解せず，ラフィノースを分解して酸を産生するもののイヌリン，トレハロースから酸産生をきたさず，培養液中に3%塩化ナトリウムが存在すると増殖出来ないという，*S. sanguis*や*S. gordonii*とは異る生化学的性状を有している（BridgeとSneath, 1982）．この*S. oralis*は，出産直後の乳児の口腔内からも検出され（Pearceら, 1995），う蝕の有無に関わりなく形成途上のプラークからかなり高率に検出されることから（Frandsenら, 1991），う蝕の発生に重要な役割を演じていないものの（Nyvadら, 1990），デンタルプラークの形成には深く関与すると考えられている．

*S. oralis*は，他のサングイスレンサ球菌（Kilianら, 1989, Willcox, 1995）やミュータンスレンサ球菌（Fujiwaraら, 1992, Kuramitsu, 1993）と同じく，スクロースよりグルカンを合成する酵素グルコシルトランスフェラーゼ（GTase）を産生する．ミュータンスレンサ球菌の場合，スクロースからのグルカン合成はう蝕発生における主要な病原因子であることから，GTaseの精製とその生物学的性状の評価が詳細になされている（Hamadaら, 1989）．さらにGTaseをコードする遺伝子のDNA塩基配列も決定され，分子生物学的応用もなされている

（Fujiwaraら, 1992, 1996, 1998）．一方サングイスレンサ球菌のGTaseについては，これまで*S. gordonii* についての報告がなされているにすぎない．それによると*S. gordonii*のGTaseは，分子量174 kDaで主として水溶性グルカンを合成し，プライマー非依存性である（Grahameら, 1985）．また*S. gordonii* のGTaseをコードする遺伝子（*gtfG*）は，4734 bpのオープンリーディングフレーム（ORF）からなり，その上流にはGTaseの産生を正に制御する遺伝子（*rgg*）が存在する．同遺伝子の変異はGTaseの産生を消失させ，この変異がスクロース寒天培地上でのコロニー形態の変化をもたらす（培地に固く食い込んだ特徴的なコロニーから容易に釣菌できる軟らかいコロニーに変化する）ことが報告されている（Sulavikら, 1992, 1996, Vickermanら, 1997）．また*gtfG* 遺伝子には，口腔レンサ球菌のGTaseに特徴的な領域であるスクラーゼ活性部位とグルカン結合部位が保存されており，またそのN末端側には変化に富む領域も存在して他の口腔レンサ球菌のGTaseとは異なる配列が認められている．

本研究の目的は，*S. oralis* が産生するGTaseを分離精製し，その生化学的性状と免疫化学的性状を明かにするとともに，GTaseをコードする遺伝子のDNA塩基配列を決定し，ミュータンスレンサ球菌あるいは*S. gordonii* のGTaseとの相違点を分子生物学的に解析することである．

材料と方法

1．供試菌と培養条件

本研究では*S. oralis* ATCC10557株を主に用いた．この他に*S. oralis* SK23, ATCC9811, *S. sanguis* ATCC10556, ST3, ST7, *S. gordonii* ATCC10558, SK51, F90A, *Streptococcus mutans* MT8148, *Streptococcus sobrinus* 6715, *Streptococcus salivarius* HHT, *Streptococcus mitis* SK24, ATCC903の各株を実験に供試した．これらの菌株は大阪大学歯学部小児歯科学講座および口腔細菌学講座の保存菌株である．また遺伝子操作の宿主として*Escherichia coli* XL2（Stratagene Ltd., Cambridge, UK）を使用した．

レンサ球菌の培養には，Brain heart infusion（BHI ; Difco laboratories, Detroit, Mich.）培地，TTY培地（ HamadaとTorii, 1978）の透析外液，Mitis-salivarius寒天培地（MS; Difco），あるいは血液寒天培地（5% 羊脱繊血含有）を用い，37℃で静置培養した．*E. coli* は，Luria-Bertani 培地で震盪培養，あるいはこの培地に1.5%寒天末を添加したLB寒天培地を用いて37℃で培養した．また必要に応じてLB培地には，テトラサイクリン（7.5 μg/ml; 和光純薬），アンピシリン（100 μg/ml; 和光純薬），エリスロマイシン（500 μg/ml; 和光純薬），カナマイシン（30 μg/ml; 和光純薬）を，MS寒天培地にはエリスロマイシン（5 μg/ml），カナマイシン（250 μg/ml）を添加し，選択培地として用いた．

2．*S. oralis* 菌体遊離型GTaseの精製

S. oralis ATCC10557株由来のGTaseを以下の方法で精製した．ATCC10557株をTTY培地透析外液に接種し，培養液の濁度が波長550 nm（OD_{550}）で0.8に達するまで37℃で培養した．この培養上清を60%飽和硫酸アンモニウムで塩析後，10 mM リン酸ナトリウム緩衝液（NaPB, pH6.0）で透析し，粗GTase画分とした．同画分をQ Sepharose FF（Pharmacia Biotech AB Uppsala, Sweden）を用いた陰イオン交換カラムに添加し，10 mM NaPB（pH6.5）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させた．各フラク

ション毎に波長280 nmでの吸収（A_{280}）と下記に示す方法でグルカン合成活性を測定した．これらのフラクションのうちグルカン合成活性を示す画分を集めて80%飽和硫酸アンモニウムで塩析し，10 mM リン酸カリウム緩衝液（KPB, pH6.0）で透析したものをGTase部分精製標品とした．この標品をさらにハイドロキシアパタイトカラムBIO-Scale CHT10-I（BIO-RAD Laboratories, Hercules, Cal.）に添加し，吸着したタンパクを10-500 mM KPB（pH6.0）の直線濃度勾配によって溶出させた．上記と同様に各フラクション毎にA_{280}とグルカン合成活性を測定し，グルカン合成活性画分を回収してGTase精製標品（GTaseR）とした．また，精製各段階のGTase標品に対して，ウシ血清アルブミン（BSA; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mis.）を標準タンパクとしてLowryら（1951）の方法に基づいてタンパク定量を行った．

3．各口腔レンサ球菌GTaseの調製

本研究に供したすべての口腔レンサ球菌の菌体遊離型GTase画分を以下の方法により調製した．各供試菌をBHI液体培地にて37℃，一晩培養し，その培養上清を50%飽和硫酸アンモニウムで塩析後，10 mM NaPB (pH6.0) にて透析して菌体遊離型GTase画分とした．*S. mutans* の菌体結合型GTase画分の調製は以下のようにして行った．上記培養で得られた菌体を10 mM NaPB (pH6.0) で洗浄後，8 M 尿素を含む10 mM NaPB (pH6.0) で抽出したものを10 mM NaPB (pH6.0) にて透析して菌体遊離型GTase標品として用いた．各GTase画分はLowry法でそのタンパク量を，また下記の方法でグルカン合成活性を測定した．

4．*S. oralis* リコンビナントGTaseの調製

S. oralis GTase に対する組換え遺伝子を含む*E. coli* をLB液体培地で濁度がOD_{550}が0.6に達するまで37℃で培養し，遠心後*E. coli* 菌体を回収し，10 mM NaPB (pH6.0) で洗浄した．この菌体に1 mM フェニルメチルスルホニルフルオリドを含む10 mM NaPBを加えて懸濁し，氷上で10秒間，超音波発生機（Handy Sonic UR-20P, トミー精工, 東京）を用いて超音波破砕し，これをリコンビナン

トGTase（rGTase）とした．

5．グルカンおよびフルクタン合成活性の測定

（1）GTaseのグルカン合成活性の測定

GTase活性はKogaら（1986）の方法に従い，グルカン合成量を測定することにより行った．すなわち20 mMの[^{14}Cグルコース]スクロース（1.85 GBq/mol; New England Nuclear, Boston, Mass.）を含む0.1 M KPB（pH6.0）を等量のGTase試料と混和し，37℃で1時間反応させた．この反応液を濾紙片（1×2 cm, 514A , Advantec Toyo, 大阪）にスポットし，乾燥後，未反応のスクロースを十分量のメタノールで3回洗浄した．濾紙に残った放射活性を液体シンチレーションカウンター（LKB-Wallac, RackBeta 1241型, Wallac Oy., Turku, Finland）で測定し，総グルカン合成量とした．また反応液をスポットした濾紙を蒸留水で洗うことにより，非水溶性グルカン合成量を測定した．GTaseの酵素活性は，1分間に1 μmolのグルコース残基をスクロース分子からグルカンに転移する酵素活性を1単位（U）とした（Hamadaら, 1989）．

（2）FTaseのフルクタン合成活性測定

上記の反応系に用いた[^{14}Cグルコース]スクロースを[^{14}Cフルクトース]スクロース（1.85 GBq/mol; New England Nuclear）に代え，上記の反応を行った後メタノールで洗浄することにより[^{14}C]フルクタン合成量を測定した．

6．*S. mutans* 静止菌体のスクロース依存性平滑面付着に対する*S. oralis* GTaseの影響

BHI培地で培養した*S. mutans* MT8148株菌体を0.05％アジ化ナトリウム（NaN_3）を含む0.1 M KPB（pH6.0）で洗浄後，1％スクロースを含む同緩衝液に懸濁し，菌液の濁度がOD_{550}で1.0となるように調製した．同菌液3 mlと各酵素量の*S. oralis* GTase精製標品を混和してガラス試験管に加え，水平面に対して30°に傾斜させて，37℃，18時間静置させた．ついでガラス試験管をボルテッ

クスミキサーで撹拌して非付着菌体を除き，そのOD$_{550}$値を測定して非付着菌体量とした．付着した菌体はさらに試験管に蒸留水を加え，試験管壁より超音波発生機（Handy Sonic UR-20P）を用いて完全に剥離してその菌液のOD$_{550}$を測定して付着菌体量とした．これらのOD$_{550}$値から全菌体に対する*S. mutans* 静止菌体の付着率を計算した．

7．抗*S. oralis* GTase抗体の作製

S. oralis 精製GTase標品をフロイントの完全アジュバント（Difco）とともに超音波処理して混和し，油中水型乳剤を作製した．同乳剤を2週間毎に3回，ウサギ背部に筋注し，免疫を行った．2週間後に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2回塩析した後，リン酸緩衝生理食塩水（PBS; pH7.2）で透析したものを抗*S. oralis* GTase抗体とした．

8．抗*S. oralis* GTase抗体によるグルカン合成阻害作用

S. oralis 精製GTase（1 mU）に各タンパク量（0～32 μg）の抗*S. oralis* GTase抗体を加え，37℃で30分間反応させた．同反応液に [^{14}Cグルコース] スクロースを加えて37℃で1時間反応させ，上記の方法でグルカン合成活性を測定した．また各口腔レンサ球菌GTase標品（1 mU）に対しても抗*S. oralis* GTase抗体（タンパク量32 μg）を加え，37℃で30分間反応後，同じくグルカン合成活性を測定した．

9．SDS-ポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）

供試レンサ球菌のGTase標品に，等量の2×SDS-PAGE sample loading buffer [SL buffer; 100 mM Tris-HCl（pH6.8），100 mM ジチオスレイトール（和光純薬），2% SDS, 0.1% ブロモフェノールブルー（和光純薬），20% グリセリン（和光純薬）] を加え，95℃で5分加熱してSDS-PAGE用試料とした．またリコンビナントタンパクのSDS-PAGE用試料は以下のようにして調製した．GTase遺伝子を組換えた*E. coli* をLB液体培地でOD$_{550}$が0.6となるまで培養し，遠心分

離により回収した菌体を，10 mM NaPB（pH6.0）で2回洗浄後，精製水に懸濁した。これを等量のSL bufferと混和し，95℃で5分加熱してSDS-PAGE用試料とした．

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3.0%のゲルを用いた．分子量測定用マーカーとして，タンパク質分子量マーカー「第一」・II（第一化薬, 東京）を用いた．電気泳動は，室温，15 mA定電流で行った．

SDS-PAGE後のゲルを0.25% クマシーブリリアントブルーR-250（Sigma）を含むメタノール-酢酸-水（45%-10%-45%）混液で30分間染色後，メタノール-酢酸-水（45%-10%-45%）混液（脱色液）で脱色し，タンパク質のバンドを視覚化した．

GTaseの活性染色は，Mukasaら（1987）の方法を参考にして以下のように行った．SDS-PAGE後のゲルを5% スクロース，0.05% NaN_3，2% Triton X-100（和光純薬）を含む0.1 M NaPB（pH6.5）に浸し，37℃で1時間処理した．このゲルをMilliQ水で洗浄後，20% トリクロロ酢酸で25℃で5分間固定し，再びMilliQ水で洗浄した．さらにゲルを7% 過ヨウ酸ナトリウムを含む10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液（pH5.0）に浸し，遮光して37℃で10分間処理した．ゲルを0.1% 硝酸銀でヨウ化銀が検出されなくなるまで精製水でよく洗浄後，シッフ試薬（和光純薬）と反応させ，GTaseにより合成されたグルカンのバンドを視覚化した．

10．ウエスタンブロット分析

SDS-PAGE後のゲルをブロッティング緩衝液（39 mM グリシン, 48 mM Tris, 0.037% SDS, 20% メタノール）で平衡化したPolyvinilliden difluoride膜（PVDF膜: Immobilon; Millipore, Bedford, Mass.）にブロッティング緩衝液とセミドライ式ブロッティング装置（Trans-blot SD ; BIO-RAD）を使用して転写した．転写は10 Vの定電圧で1時間行った．転写したPVDF膜のブロッキングは，0.05% Triton X-100を含むPBS（PBST）に5% BSA，0.05% NaN_3を溶解した

ものを用いて室温で1時間震盪することにより行った．ブロッティング後のPVDF膜をPBSTで3回洗浄後，PBSTで1000倍希釈したウサギ抗*S. oralis* GTase抗体と室温で1時間反応させた．ついでPBSTで3回洗浄後，PBSTで1000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識のブタ抗ウサギ免疫グロブリン抗体（Dakopatts, Glostup, Denmark）と室温で1時間反応させた．反応後のPVDF膜をPBSTで5回洗浄後，100 mM NaCl，5 mM $MgCl_2$を含む100 mM トリス-塩酸緩衝液（pH9.5: AP緩衝液）で洗浄した．このPVDF膜に発色基質を添加したAP緩衝液を加えて発色させ，バンドを視覚化した（Sambrookら, 1989）．

11．等電点電気泳動（IEF-PAGE）

S. oralis 精製GTase の等電点電気泳動は，PhastSystem（Pharmacia）を使用して行った．泳動ゲルはPhastGel IEF3-9（Pharmacia）を，等電点（pI）マーカーはISOELECTRIC FOCUSING CALIBRATION KIT（pI 3-10; Pharmacia）を用い，添付の指示書に従い，泳動を行った．GTaseのバンドは活性染色を行うことにより視覚化し，GTaseの等電点はpIマーカーの移動度とGTaseのバンドの相対移動度から算出した．

12．*S. oralis* GTase のN末端アミノ酸配列の分析

S. oralis 精製GTase のSDS-PAGE後のゲルをPVDF膜（Problott; Applied Biosystems, Foster City, Cal.）に転写した．転写したPVDF膜を蒸留水で洗浄し，100％ メタノールに湿潤させた後，0.1％ クマシーブリリアントブルーR-250を含むメタノール-酢酸-水（40％-1％-59％）混液で1分間染色し，50％ メタノールで脱色後，蒸留水で洗浄して精製*S. oralis* GTase のバンドを視覚化した．同バンドを切り出してプロテインシークエンサー（Model 477A, Applied Biosystems）を用いて，精製*S. oralis* GTase のN末端アミノ酸配列を決定した．

13．染色体DNAの調製

S. oralis ATCC10557株を500 mlのBHI液体培地で37℃，18時間培養後，遠

心して菌体を回収した．菌体を$T_{10}E_1N_{100}$（10 mM Tris, 1 mM EDTA, 100 mM NaCl）緩衝液（pH8.0）で洗浄後，5 mlの同緩衝液に懸濁し，ムタノリジン（0.25 mg/ml; 大日本製薬, 大阪）を加え，50℃で1時間反応させた．同反応液にN-laurolyl sarcosine（最終濃度1.5％）とEDTA（最終濃度10 mM）を加え，10分間処理した．さらにRNase（0.3 mg/ml; 和光純薬）を添加し，37℃で1時間反応後，Proteinase K（0.3 mg/ml; Merck, Darmstadt, Germany）を加え，50℃で1時間反応し，染色体DNA粗画分を得た．ついでこの粗画分をTris-HCl（pH8.0）飽和フェノール，ついでTris-HCl（pH8.0）飽和フェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール（25：24：1），最後にクロロホルム-イソアミルアルコール（24：1）で処理することにより染色体DNA画分の抽出を行った．さらにこのDNA画分に100％ エタノールを加え，沈殿した染色体DNAをガラス棒に巻き付けて回収した．これを70％ エタノールで洗浄後，風乾し，1 mM EDTAを含む10 mM トリス-塩酸緩衝液（pH8.0; TE緩衝液）に溶解した．このようにして調製した染色体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し，4℃にて使用するまで保存した．また他の供試レンサ球菌の染色体DNAも上記と同様にして調製した．

14．DNAの電気泳動

（1）アガロースゲル電気泳動

TAE緩衝液（40 mM Tris, 40 mM 酢酸, 1 mM EDTA, pH8.0）に0.7％アガロースS（ニッポンジーン）を加えて加熱溶解したものを電気泳動用のゲルとして使用した．泳動用緩衝液にはTAE緩衝液を用い，100 V定電圧で電気泳動を行った．DNAサイズマーカーとしては1 kbラダー（New England Biolabs）を使用した．泳動後のゲルを臭化エチジウム（1 μg/ml; 和光純薬）溶液で15分間染色後，波長312 nmの紫外線でDNAのバンドを検出した．

（2）アクリルアミドゲル電気泳動

電気泳動用のゲルには12％ アクリルアミドをTBE緩衝液（89 mM Tris, 89

mM ホウ酸, 2 mM EDTA, pH8.0）に溶解し，重合したものを用いた．泳動用緩衝液にはTBE緩衝液を用い，100 V定電圧で電気泳動を行った．DNAサイズマーカーとしてはDNA Molecular Weigt Marker V（Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany）を使用した．泳動後のゲルにおけるDNAのバンドの視覚化はアガロースゲル電気泳動の場合と同様にして行った．

15．PCR

通常のPCRによるDNAの増幅には，Ampli Taq Gold（Perkin-Elmer Cooperation, Norwalk, Ct.）を用い，サーマルサイクラー（GeneAmp PCR System 2400, Perkin-Elmer）を使用して反応を行った．PCRの条件は添付の指示書に従い，設定した．また2 kbをこえるような増幅領域の長いlong and accurate PCR（LA PCR）には，Takara LA PCR Kit ver.2. 1（宝酒造）を使用した．LA PCRは，熱変性（96℃,30秒），アニーリング（48℃, 1分），伸長反応（72℃, 5分）を30サイクルと伸長反応（72℃, 7分）の条件で行った．

16．使用プラスミドとその構築

遺伝子操作に使用したプラスミドを表1に挙げる．各種制限酵素は，New England Biolabsおよび宝酒造から購入した．アガロースゲルからのDNAの回収にはQIAEX II Gel Extraction Kit（QIAGEN GmbH, Hilden, Germany）を用いた．アクリルアミドゲルからのDNAの回収は高塩抽出法により行った．すなわち目的とするバンドをゲルより切り出し，1 mM EDTA，0.2% ドデシル硫酸ナトリウム（SDS; 和光純薬）および0.3 M NaClを含む10 mM トリス-塩酸緩衝液（pH8.0; Tris-HCl）中に浸せきし，37℃で一晩静置抽出した後，エタノール沈殿させた．

プラスミドの調製は，必要とする精製度と収量に応じてHolmesとQuigley（1981）の沸騰法，BirnboimとDoly（1979）のアルカリ法とそれに続くポリエチレングリコール沈殿法，およびWizard Plus Minipreps DNA Purification System（Promega）さらにQIAGEN Plasmid Mega Kit（QIAGEN）を用いて行っ

表1　**本研究で使用したプラスミド.**

プラスミド	特性	由来
pUC19	*E. coli* に対するクローニングベクター，Amp^r，ハイコピー	宝酒造
pMW119	*E. coli*に対するクローニングベクター，Amp^r，ローコピー	ニッポンジーン
pGEM-T Easy	*E. coli*に対するPCR産物のクローニングベクター，Amp^r	Promega
pTHN01	*S. oralis* GTaseのN末端アミノ酸シークエンスに対応する60 bpの断片をpGEM-T Easyに組換えしたもの	本研究
pTH121	1.4 kbのpTHN01の挿入断片を含む*S. oralis*染色体DNA*Eco*R I完全消化物をpUC19に組換えしたもの	本研究
pTH171	6.1 kbのpTH121の挿入断片を含む*S. oralis*染色体DNA*Eco*R I部分消化物をpMW119に組換えしたもの	本研究
pTH181	2 kbのGTaseのC末端をコードする遺伝子を含む*S. oralis*染色体DNA*Kpn* I完全消化物をpUC19に組換えしたもの	本研究
pTH275	*S. oralis gtfR* 遺伝子の全長を含む5.5 kbの断片をpGEM-T Easyに組換えしたもの	本研究
pTHR8	*S. oralis rgg* 遺伝子を含むpTH171のサブクローン	本研究
pTH805	pTHR8にエリスロマイシン耐性遺伝子を挿入したもの，Em^r	
pTH808	*S. oralis gtfR* 遺伝子のN末側の一部を含む3 kbの断片をpGEM-T Easyに組み換えしたもの	本研究
pTH818	pTH808にエリスロマイシン耐性遺伝子を挿入したもの，Km^r	本研究

*Em^r，Km^r，Amp^r はエリスロマイシン耐性，カナマイシン耐性，アンピシリン耐性であることを示す.

た．DNA末端の平滑化はT4DNAポリメラーゼを利用するDNA Blunting Kit（宝酒造）を用いて行った．またDNAの連結は，T4リガーゼ（New England Biolabs）を用い，16℃で一晩反応させることにより行った．その他のDNAの操作はSambrookら（1989）の記述に従った．

17．サザンブロット分析

（1）合成オリゴヌクレオチドの標識

合成オリゴヌクレオチドの標識は，MEGALABEL Kit（宝酒造）および[γ-^{32}P] dATP（37 MBq/mmol; New England Nuclear）を用い，フォスフォリレーション反応により合成オリゴヌクレオチドの5' 末端を標識し，サザンハイブリダイゼーションのプローブとして用いた．

（2）DNA断片の標識

DNA断片の標識は，Random primer Labeling Kit Ver.2（宝酒造）および[α-^{32}P] dCTP（37 MBq/mmol; New England Nuclear）を用いて添付の指示書に従い，ランダムプライマー法によりDNA断片を標識した．

（3）サザントランスファー

泳動後アガロースゲルをアルカリ溶液（1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH）に30分間，ついで中和溶液（1.5 M NaCl, 1 M Tris-HCl; pH7.4）に30分間浸潤後，ナイロン膜（HYbond-N, Amersham, Buckinghamshire, England）を密着させ，20×SSPE（3 M NaCl, 173 mM NaH_2PO_4, 25 mM EDTA）を用い，毛細管現象を利用してDNA断片をナイロン膜に転写した．DNAの転写されたナイロン膜はUVクロスリンカー（CL-1000 ULTRAVIOLET CROSSLINNKER, UVP, INC., Upland, Cal.）を用いて紫外線を照射することによりDNAを膜上に固定した．

（4）コロニーブロット

組換え*E. coli* のスクリーニングはコロニーブロット法により以下のようにし

て行った．組換え*E. coli* を培養した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．これを上記と同じく紫外線の照射によりDNAを膜上に固定した．

（5）サザンハイブリダイゼーション

合成オリゴヌクレオチドをプローブとしたときのサザンハイブリダイゼーションは以下の方法で行った．DNAボトル（クラボウ, 倉敷）に転写後のナイロン膜を入れ，6×SSPEにナイロン膜を2分間浸した．ついで6×SSPEを捨て，ハイブリ溶液［5 μg/ml サケ精子DNA（和光純薬）, 6×SSPE, 0.5％ SDS, 5× Denhard試薬（0.1％ Ficoll 400（和光純薬）, 0.1％ ポリビニルピロリドン（Sigma）, 0.1％ BSA）］を加え，DNAオーブン（クラボウ）を用いて10-20 rpm で回転させながら68℃で2時間プレハイブリダイゼーションを行った．プレハイブリダイゼーション溶液を捨て，新しいハイブリ溶液と交換し，1-2 ng/mlの標識した合成オリゴヌクレオチドを加え，10-20 rpm で回転させながら42℃で一晩ハイブリダイゼーションを行った．ハイブリダイゼーション後のナイロン膜は，一次洗浄液（2×SSPE, 0.5％ SDS）を用いて42℃で10分間洗浄後，二次洗浄液（0.1×SSPE, 0.5％ SDS）を用いて55℃で30分間洗浄した．洗浄後のナイロン膜は，X線用フィルム（RX100, 富士フィルム, 東京）に−80℃，18時間露光した．

DNA断片をプローブとしたときのサザンハイブリダイゼーションは以下のようにして行った．50％ ホルムアミド（和光純薬）を添加したハイブリ溶液を用いて42℃で1時間以上プレハイブリダイゼーションを行った．プレハイブリダイゼーション後，新しい同ハイブリ溶液と交換し，標識したDNA断片を加え，上記と同じくハイブリダイゼーションを行った．ハイブリダイゼーション後のナイロン膜は，一次洗浄液を用いて42℃で10分間洗浄後，二次洗浄液を用いて68℃で1時間洗浄した．洗浄後のナイロン膜は，上記と同じくオートラジオグラフィーを行った．

18．*E. coli* の形質転換

（1）*E. coli* コンピテント細胞の作製

コンピテント細胞の作製には，InoueとNojimaら（1990, 1991）の方法を用いた．*E. coli* XL2株をテトラサイクリン（7.5 μg/ml）を含むLB寒天培地で37℃，一晩培養した後，単一のコロニーをSOB液体培地（2% Triptone, 0.5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 20 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$）に接種し，18℃でOD_{600}が0.6となるまで震盪培養した．この培養液を氷冷水中で10分間冷却し，遠心して菌体を回収した．培養液の1/3容量の氷冷TB緩衝液（10 mM PIPES, 15 mM $CaCl_2$, 250 mM KCl, 55 mM $MnCl_2$）に懸濁し，さらに10分間氷冷した．再び遠心して菌体を回収し，培養液の1/12.5容量の氷冷TB緩衝液に懸濁し，最終濃度7%になるようにジメチルスルホキシドを添加し，10分間氷冷した．この菌液を500 μlずつクライオジェニックバイアル（2.0 ml; Corning Coaster, Cambridge, Mass.）に分注し，直ちに液体窒素中に浸して使用時まで保存した．

（2）形質転換操作

上記の*E. coli* コンピテント細胞を氷上で融解し，同細胞200 μlと20 μlのプラスミド溶液（10 ng/ml）を混和し，氷水中で30分間保冷した．42℃で30秒間保持した後，氷水中で2分間冷却した．これに800 μlのSOC液体培地（2% Triptone, 0.5% Yeast Extract, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 20 mM $MgCl_2$, 10 mM $MgSO_4$, 20 mM Sucrose）を加え，37℃で1時間震盪培養した．培養液を必要に応じて各種抗生物質を加えたLB寒天培地に接種し，37℃で一晩培養した．

19．*S. oralis* GTase をコードする遺伝子のクローニング

（1）*S. oralis* GTase のN末端アミノ酸配列に対応するDNA塩基配列のクローニング

得られた*S. oralis* GTase のN末端アミノ酸配列からコドン表に基づき，混合ヌ

クレオチドプライマーTH57F，TH57Rを設計した．

TH57F; 5'-GTNAARCARGTNGTNGT-3'

TH57R; 5'-YTGYTGNCCNGGNCC-3'

これらのプライマーとAmpli Taq Goldを用い，*S. oralis* ATCC10557株の染色体DNAをテンプレートとしてdegenerate PCRを行った．degenerate PCRの反応は95℃で9分間の事前加熱後，熱変性（94℃, 30秒），アニーリング（36℃, 30秒），伸長反応（60℃, 30秒）を30サイクルで行った．増幅したDNA断片は12％アクリルアミドゲル電気泳動で分離し，目的のバンドを切り出して高塩抽出法により精製した．精製したDNA断片をpGEM-T Easyに組換えし，pTHN01を得，M13 ユニバーサルプライマーを用い，DNAシークエンスを決定した．

（2）*S. oralis* GTase をコードする遺伝子のクローニングとDNAシークエンス

まずpTHN01により決定したGTase のN末端アミノ酸配列に対応するDNA塩基配列をもとに合成オリゴヌクレオチド TH57NP ; 5'-GTAAAGCAGGTTGTAGTTCAAGAACCTGCTACAGCTCAGACTAGTGGTCCCGGTCAGCAA-3' を設計した．

TH57NPをプローブとして，*S. oralis* ATCC10557株の染色体DNAの制限酵素*Eco*R Iの完全消化物をpUC19に組換えしたライブラリーより，GTase のN末端をコードするクローンpTH121を得た（図1）．

ついで*S. oralis* ATCC10557株の染色体DNAを制限酵素*Eco*R Iで部分消化し，5-20％ スクロース密度勾配上［5-20％ スクロース, 20 mM Tris-HCl（pH8.0），5 mM EDTA（pH8.0）, 1 M NaCl］に重層した．RPS65T ローター（日立）を装着したCP70超遠心機（日立）を用いて20℃，55,000 rpm，3時間スクロース密度勾配遠心を行って，直ちに液面より200 μlずつ分取し，アガロースゲル電気泳動を行った．泳動後，pTH121の挿入断片をプローブとしてサザンブロット分析を行った．これよりこのプローブと反応する約6 kbのDNA断片を含む画分を*S. oralis* GTase をコードするDNA画分としてpMW119に組換えた．得られたクローンpTH171はシークエンスの結果，*S. oralis* GTase のC末端側をコードする遺伝子の一部が不足していた．そこで解析済みのpTH171のシークエンス中の

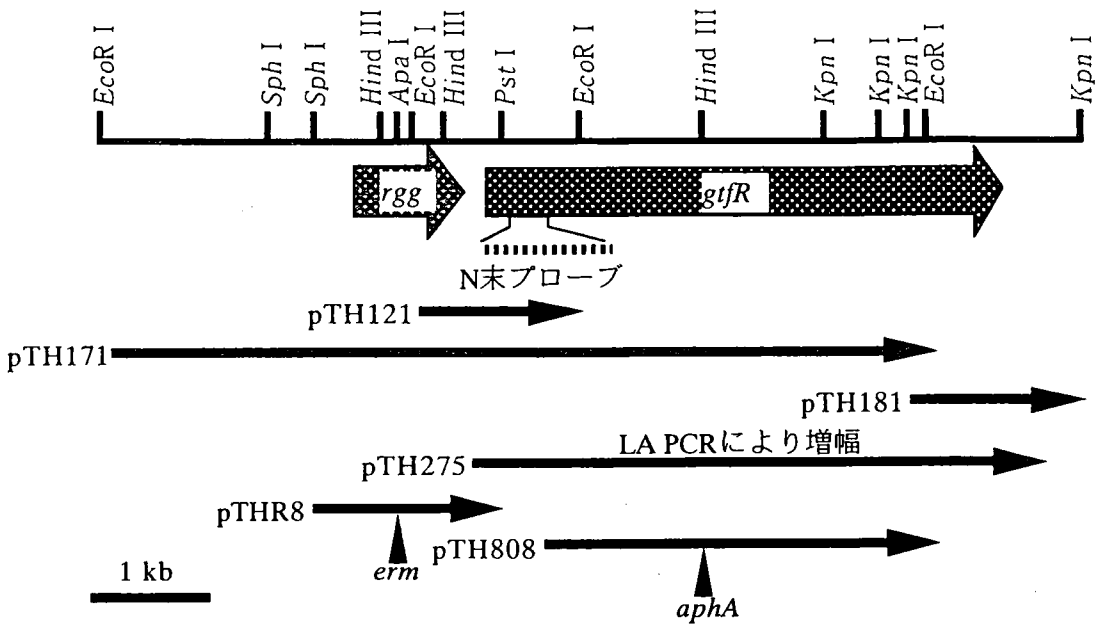

図1　***rgg, gtfR* 遺伝子のクローニングのストラテジーと制限酵素地図.**
破線は*S. oralis* GTaseに特異的なN末端側の55から186番目のアミノ酸配列に対応するDNAプローブの位置を示す．pTHR8，pTH808の矢印は，それぞれpTH805，pTH808におけるエリスロマイシン耐性遺伝子 (*erm*)，カナマイシン耐性遺伝子 (*aphA*) の挿入位置を示す．

GTase のC末端側の塩基配列をプローブとして*S. oralis* ATCC10557株の染色体DNAの制限酵素*kpn* Iの完全消化物をpUC19に組換えしたライブラリーから，pTH181を得た．pTH171とpTH181のシークエンスの結果を統合して*S. oralis* GTase をコードする遺伝子（*gtfR*）の全長を決定した．

（3）*gtfR* 遺伝子の全長を含むクローンの作製

決定したDNAシークエンスをもとに*gtfR* 遺伝子のオープンリーディングフレーム（ORF）とプロモーター配列を含んで増幅するようなPCRプライマーを作製した．

GR2683F; 5'-GCCTTTCATAGTTGTAGATGT-3'

GR7705R; 5-'GAATGTCCAATAGAGTGCAG-3'

このPCRプライマーを用い，*S. oralis* ATCC10557株の染色体DNAを鋳型とし

てLA PCRを行い，増幅断片をpGEM-T Easyに組換えし，*gtfR* 遺伝子の全長を含むクローンpTH275を得た．

20．*gtfR* 遺伝子のDNAシークエンス

シークエンスのテンプレートとなるプラスミドは精製後，0.2 μg/μlの濃度に調製したものを使用した．またPCR産物のダイレクトシークエンスのテンプレートはPCR産物をCentricon 100 spin column （Millipore）で精製したものを20 ng/μlの濃度で用いた．

サイクルシークエンス反応は，ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequensing Ready Reaction Kit（Perkin-Elmer）を用い，添付の指示書に従って行った．またサイクルシークエンス反応にはM13ユニバーサルプライマーあるいは表2に挙げるカスタムプライマーを使用した．

表2　**シークエンスに用いたカスタムプライマー．**

フォワードプライマー		リバースプライマー	
5'-GATCAACCGCATCTTGGCTTG-3'	GR348F*	5'-GAAGCAAGCCAGTCACTGCG-3'	GR704R
5'-GCAGTGACTGGCTTGCTTCCT-3'	GR686F	5'-CTCGTAAACTTTCTGCATCTCC-3'	GR1401R
5'-CACCTACGGGATAATCCA-3'	GR1110F	5'-GTTTCCAACATATCACTCCCC-3'	GR1840R
5'-CGTGTGAATTAATCTGCTTGTA-3'	GR1703F	5'-CATAACGTCCCCACTCCTCAA-3'	GR2292R
5'-CAATCATTGTCAGGGCCCTCT-3'	GR2179F	5'-GAATTTAGTATAAAGTTACGC-3'	GR2766R
5'-GCCTTTCATAGTTGTAGATGTGC-3'	GR2683F	5'-CTGTGATTGCATTAGCAGCTT-3'	GR3206R
5'-CCTGCTACAGCTCAGACT-3'	GR2939F	5'-GCAACCTTTGGATTTGCAAC-3'	GR3333R
5'-CAGAAGCAACAGTTCAAACCAATGC-3'	GR3090F	5'-CCGTCTACAGTTTCGATATCCTTG-3'	GR3684R
5'-CAGTTCCAACAAGGAACCAGCAG-3'	GR3590F	5'-CCAAGCTTCCAAGATAGACAA-3'	GR4447R
5'-CCGTCTGCTTAACCGTACCCC-3'	GR4111F	5'-GAGAGCATGAGGGCATGAGC-3'	GR4842R
5'-TTTGATGGAGTTCGTGTCGAT-3'	GR4307F	5'-TTGTGGGCTGCTCCCATATTG-3'	GR5202R
5'-CATGCGTAATCTATCTATCCG-3'	GR4537F	5'-CCTGTACATTGCTATAGCCTGC-3'	GR5360R
5'-GTGGACAAGACATGAAAGTCAC-3'	GR4974F	5'-CACTGTGAAGCGCACGAAGAG-3'	GR5768R
5'-GAGCTACCACCTCAGTATGTATC-3'	GR5606F	5'-GCACCACGACCTAAGATATTGG-3'	GR6099R
5'-GAGAAGATTACCAAGTGGTCG-3'	GR6038F	5'-GCCATCTTTAGCACTCACAA-3'	GR6604R
5'-GGCTATCTTGTAACAGGTGC-3'	GR6311F	5'-CGATTGATAACAGCATTCCCTG-3'	GR6651R
5'-GTGAGTGCTAAAGATGGCAAA-3'	GR6587F	5'-CCAGTTTGGTCAAAGTAATACC-3'	GR7092R
5'-CTCGAAGCAAATGGATTCAACT-3'	GR7422F	5'-GAGAATCTGTTGACCAACCTGCT-3'	GR7330R
		5'-GAATGTCCAATAGAGTGCAG-3'	GR7705R

*本研究で明かとなった*S. oralis* ATCC10557株のDNAシークエンスにおける位置を示す．

サイクルシークエンス反応後の試料を自動DNAシークエンサー（ABI 373A DNA Sequencer, Applied Biosystems）にかけることによって得られた塩基配列デ

ータはDNAシークエンス解析ソフトGene Works（Intelligenetics, Moutein View, Cal.）により解析した．また決定したDNA塩基配列およびその推定アミノ酸配列の相同性検索は日本DNAデータバンク（DDBJ）のホモロジー検索サービスFASTAとBLASTにより，系統樹は既知のGTaseの配列とのマルチプルアライメントをclustal W により行い，その計算値から系統樹作成ソフトTREE VIEW（Pageら, 1996）を用いて作成した．

決定したDNAシークエンスは，DDBJに登録した（Accesion No. AB025558）．

21．*S. oralis* の形質転換と変異株の作製

S. oralis GTaseの制御遺伝子である*rgg* 遺伝子，GTase をコードする*gtfR* 遺伝子の欠失変異株の作製のために，図1に示すようなプラスミドpTHR8およびpTH808を作製した．pTHR8は，*rgg* 遺伝子のORF全長を含むpTH171のサブクローンとして制限酵素*Sph* I，*Pst* I消化断片をpUC19へ組換えすることにより得た．またpTH808は，*gtfR* 遺伝子のN末端側の3 kbのDNA断片をPCRで増幅し，pGEM-T Easyに組換えして作製した．PCRで使用したプライマーを以下に示す．

GR3590F; 5'-CAGTTCCAACAAGGAACCAGCAG-3'

GR6651R; 5'-CGATTGATAACAGCATTCCCTG-3'

次にpTHR8，pTH808をそれぞれ特異的にその中間部で消化するような制限酵素*Apa* I，*Hin*d IIIで切断し，この部位にエリスロマイシン耐性遺伝子（*aphA*），カナマイシン耐性遺伝子（*erm*）を挿入してpTH805，pTH818を得た．これらのプラスミドDNAをQIAGEN Plasmid Mega Kit（QIAGEN）で精製し，ともに挿入断片中には認識部位が存在しない制限酵素*Pst* Iで直鎖化後，A_{260}を測定して濃度を決定し，形質転換に使用した．

S. oralis の形質転換は，*S. mutans* に対して行われたFujiwaraら（1996）の方法に準じて行った．65℃で30分間熱処理して非働化したウマ血清（Gibco BRL, Rockville, Md.）を10％含むTodd Hewitt（Becton Dickinson）液体培地に*S. oralis* ATCC10557株を接種し，37℃で18時間培養した．ついで培養液250 μlを同培

地10 mlに接種し，37℃で1.5時間培養後，最終濃度で25 μg/mlとなるようにプラスミドDNAを加え，さらに2時間培養することにより形質転換を行った．これを遠心して菌体を回収し，1 mlの同培地に懸濁した．形質転換に用いたプラスミドDNAに応じた抗生物質を添加したMS寒天培地にこの懸濁液100 μlを接種し，37℃で2～3日間キャンドルジャーで嫌気培養し，変異株を分離した．

変異株において相同組換えによる抗生物質耐性遺伝子の挿入が，*S. oralis* の染色体DNAの目的とする位置で行われていることを確認するために抗生物質耐性遺伝子をプローブとしたサザンブロット分析を行った．

抗生物質耐性遺伝子の挿入により*rgg* および*gtfR* 遺伝子が機能しないことを確認するために，変異株の培養上清中のGTaseのグルカン合成活性測定とウエスタンブロット分析を行った．また変異株の生化学的性状の変化を調べるためにレンサ球菌同定用キットAPI 20 STREP（bioMerieux sa, Marcyl'Etoile, France）を用い，添付の指示書に従ってその生化学的性状を同定した．さらに変異株の培養上清中のフルクタン合成活性の測定と血液寒天培地に接種して溶血性の判定を行い，これらの性状における変化を検討した．

親株である*S. oralis* ATCC10557株，および*rgg* ，*gtfR* 遺伝子欠失変異株をそれぞれMS寒天培地に接種して37℃で2日間キャンドルジャーで嫌気培養し，そのコロニー形態の比較を行った．

結果

1．*S. oralis* ATCC10557株のGTaseの精製と生化学的性状

予備実験では，*S. oralis* のGTase活性はその培養上清中にのみ存在し，菌体上にはほとんど認められなかった．また培養液の濁度（OD_{550}）が0.8に達した時に最も高い活性が認められ，それ以上培養を続け，培養液のpHが5.0以下になると培養液中のグルカン合成活性は著しく減少することが示された．そこで本研究では，培養液の濁度が0.8に達した時の培養上清を回収し，カラムクロマトグラフィーによる*S. oralis* GTaseの精製を行った（図2）．硫酸アンモニウム塩析物のQ Sepharose FF陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにおいてグルカン

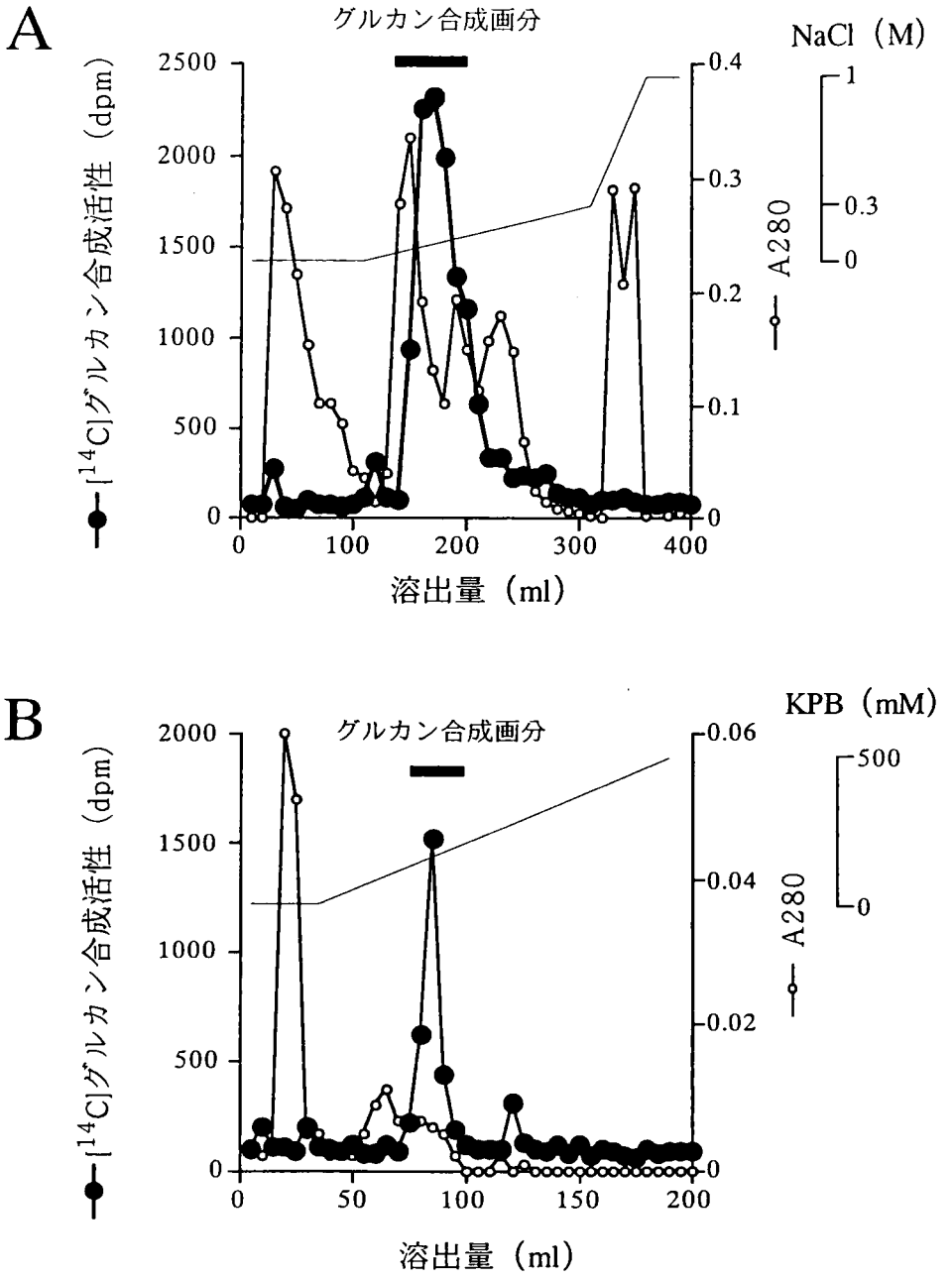

図2　*S. oralis* ATCC10557株GTase のカラムクロマトグラフィーによる精製.

A ; Q Sepharose FF カラム（bed.volume 10 ml，流速1 ml/min）
S. oralis ATCC10557株の培養上清の60％飽和硫酸アンモニウム塩析物を Q Sepharose FFイオン交換カラムに添加し，0から0.3 M NaClでグルカン合成活性画分を溶出した.

B ; Bio-Scale CHT10-Iカラム（bed.volume 10 ml，流速1 ml/min）
Aのグルカン合成画分をさらにBio-Scale CHT10-Iハイドロキシアパタイトカラムに添加し，0から500 mM KPBでグルカン合成活性画分を溶出した.

合成活性画分はNaCl 濃度200 mM 付近で溶出した（図2 A）．ついで同活性画分をBioScale CHT10-Iハイドロキシアパタイトカラムに添加したところ，KPB濃度160 mMで溶出したグルカン合成活性画分をGTaseRとした（図2 B）．
各精製過程におけるSDS-PAGEを図3に示す．GTaseRは，SDS-PAGE上で分子量

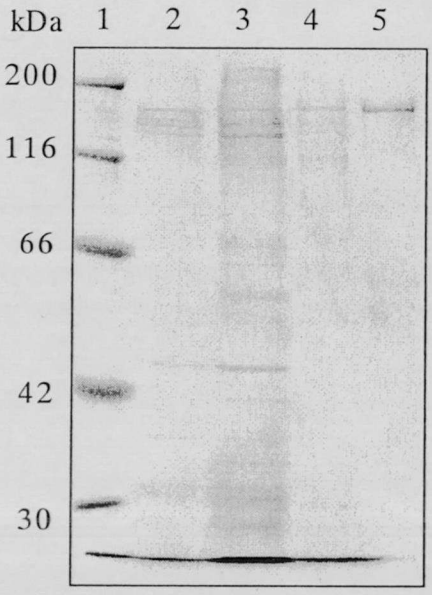

図3　**各精製段階におけるGTase標品のSDS-PAGE.**
泳動後のタンパクバンドをCBB染色により視覚化した．
レーン：1，分子量マーカー；2，培養上清；3，硫酸アンモニウム塩析物；4，Q Sepharose FF陰イオン交換カラムクロマトグラフィー後のGTase活性画分；5，Bio-Scale CHT10-Iハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー後のGTase活性画分

173 kDaの単一のバンドとして分離され，表3に示すように，回収率は1.7％，精製度42倍，特異的酵素活性は，8 mU/μgであった．またこのGTaseRの生化学的性状を調べたところ，グルカン合成活性が最大となる至適pHは6.5，等電点は6.3で，スクロースを基質としたときの*Km* 値は2.49 mMと算出された（図4）．表4に示すようにGTaseRは，主として水溶性グルカンを合成し，またグルカン合成のプライマーとなるdextran T10による依存性は認められなかった．GTaseRは，Cu^{2+}，Fe^{2+}，Zn^{2+}，Hg^{2+}などの2価の金属イオンとキレート剤であるEDTAから50％以上の阻害作用を受けた（表5）．

表3　*S. oralis* ATCC10557株GTaseの精製.

精製段階	総タンパク量 (mg)	総活性 (U)	特異的活性 (U /mg)	回収率 (%)	精製度 (-fold)
培養上清	736	140	0.19	100	1
硫安塩析	180	117	0.65	84.0	3.4
Q Sepharose FF	5.5	4.0	0.72	2.9	3.8
CHT10-I	0.3	2.4	8.00	1.7	42.0

S. oralis ATCC10557株を5リットルのTTY液体培地でOD550が0.8となるまで培養し，その培養上清を60%飽和硫酸アンモニウムで塩析濃縮した．GTaseの酵素画分はQ Sepharose FF陰イオン交換カラム，続いてBio-Scale CHT10-Iハイドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィーにより精製した.

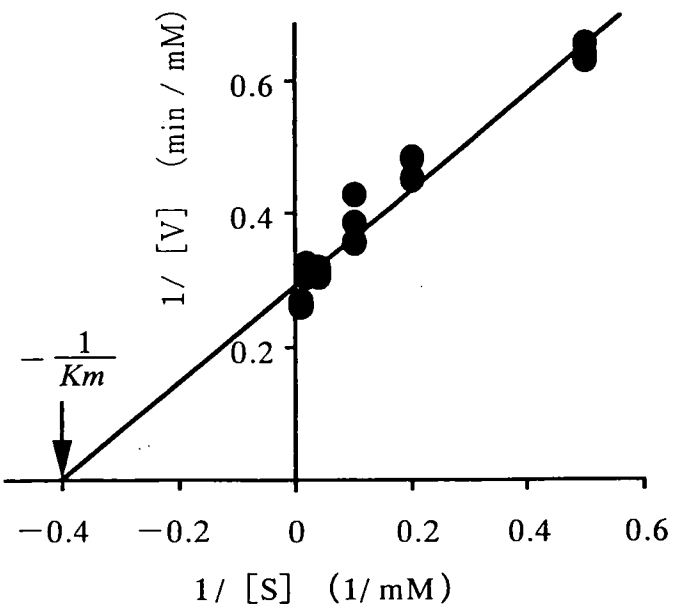

図4　GTaseRのLineweaver-Burkの逆数プロット.
1/［V］=0.726×1/［S］+0.292より，*Km* 値は2.49 mMと算出された.

表4　GTaseRにより合成されるグルカン．

	合成グルカン量（dpm）	水溶性グルカン（%）
総グルカン	16142.8±167.2	
		89.7
非水溶性グルカン	1662.7± 65.3	

3 mUのGTaseRを20 mMの［^{14}Cグルコース］スクロースと37℃で1時間反応した．合成された総グルカン量，非水溶性グルカン量を測定し，これより合成された水溶性グルカンの割合を算出した．

表5　金属イオンによるGTaseRのグルカン合成活性に対する影響．

金属塩	相対的グルカン合成活性 (%)
none	100.0
NaCl	95.8
KCl	96.4
$CaCl_2$	99.7
$MgCl_2$	80.6
$MnCl_2$	88.0
$CuSO_4$	49.8
$FeSO_4$	48.7
$Zn(CH_3COO)_2$	37.3
$HgCl_2$	47.1
$FeCl_3$	97.1
EDTA	48.6

（1 mM）

反応液に金属イオンを加えなかった場合のグルカン合成活性を基準として1 mMの金属イオンを加えたときの相対的グルカン合成活性 (%)を算出した．

2．*S. oralis* GTaseの免疫化学的特性

S. oralis ATCC10557株のGTaseの免疫化学的特性を調べるために，抗*S. oralis* ATCC10557 GTase抗体によるGTaseのグルカン合成活性阻害実験を行った．同抗体は，GTaseRのグルカン合成を濃度依存的に阻害し（図5），また*S. oralis* 菌株および近縁種である*S. sanguis*，*S. gordonii* 由来のGTase画分のグルカン合成を有意に阻害した（図6）．さらに水溶性グルカンを合成する*S. mutans*

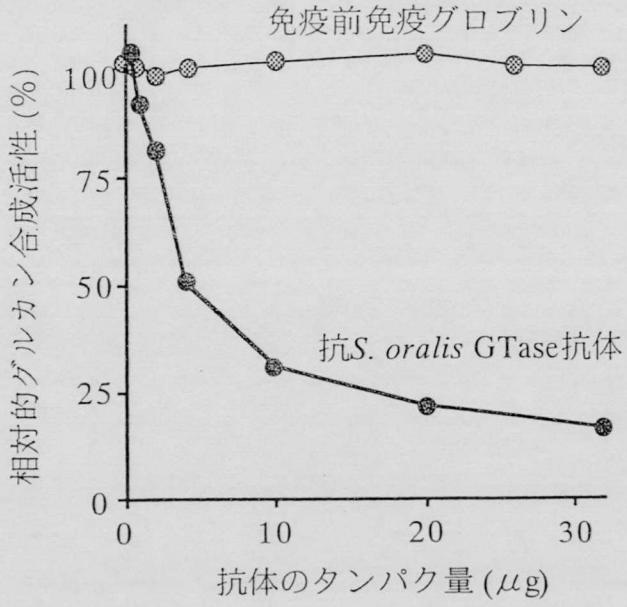

図5　抗***S. oralis*** **GTase**抗体による **GTaseR**のグルカン合成活性に及ぼす阻害効果.

反応液に抗*S. oralis* GTase抗体を加えなかった場合のグルカン合成活性を基準として抗*S. oralis* GTase抗体を加えたときの相対的グルカン合成活性 (%)を算出した.

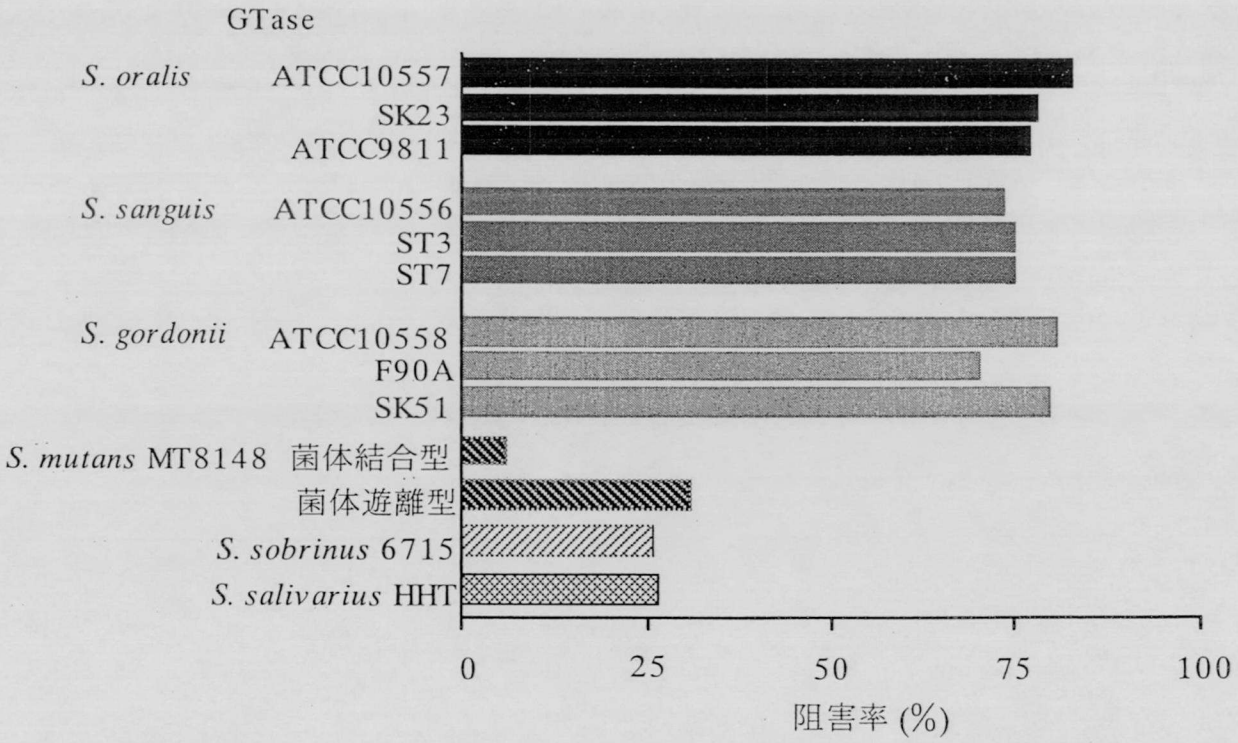

図6　抗***S. oralis*** **GTase**抗体の口腔レンサ球菌　**GTase**に対する阻害作用.

反応液に抗*S. oralis* GTase抗体を加えなかった場合のグルカン合成活性を基準として抗*S. oralis* GTase抗体（タンパク量32 μg）を加えたときの阻害率を算出した.

菌体遊離型，*S. sobrinus*，*S. salivarius* のGTase画分のグルカン合成も一部阻害したが，非水溶性グルカンを合成する*S. mutans* 菌体結合型のGTase画分のグルカン合成はほとんど阻害しなかった．

3．*S. oralis* GTaseの*S. mutans* 静止菌体のスクロース依存性付着に対する影響

S. mutans MT8148株の静止菌体をスクロース存在下で反応させた時に試験管壁に強固に付着する菌量は全菌量の43％であった．一方，この反応系に*S. oralis* GTaseを添加すると*S. mutans* 静止菌体の強固な付着は増加し，GTaseの添加量が1 mU/mlのとき最大となった（図7）．

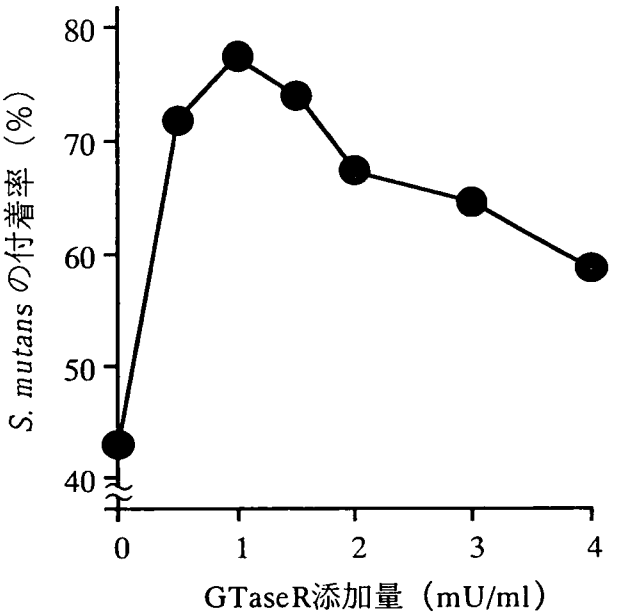

図7　GTaseRの*S. mutans* 静止菌体の付着に対する影響．
0.05％ NaN_3存在下で各酵素量の*S. oralis* GTaseを添加し，*S. mutans* 静止菌体のガラス試験管壁への付着率を算出した．

4．*S. oralis* GTaseをコードする遺伝子（*gtfR*）のクローニング

S. oralis GTaseのN末端のアミノ酸配列を調べたところ，22アミノ酸残基（D D V K Q V V V Q E P A T A Q T S G P G Q Q）が決定された（図8）．同配列をFASTAおよびBLASTでホモロジー検索した結果，相同性の高いペプチドは認められなかった．GTaseのN末端アミノ酸配列に対応する60 bpのDNA断片をdegenerate PCRにより増幅し，このDNA断片を含むプラスミドpTHN01を得た（図8）．pTHN01のDNAシークエンスの結果は，*S. oralis* GTaseのN末端アミノ酸配列と対応しており，これをもとに約1.4 kbpの挿入断片を含むプラスミドpTH121を，ついで約6.1kbpの挿入断片を含むプラスミドpTH171を得た（図1）．しかし表6に示すようにpTH171のリコンビナントタンパクはGTase活性をほとんど示さなかった．また

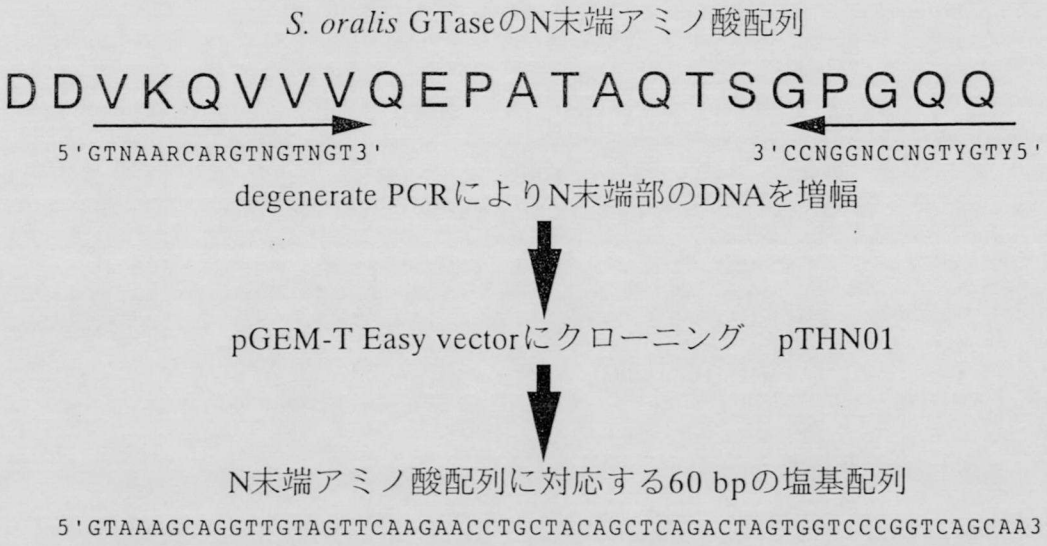

図8　*S. oralis* GTaseのN末端アミノ酸配列の決定とこれに対応するDNA塩基配列のクローニング.

ウエスタンブロット分析を行うと，pTH171はそのリコンビナントタンパクがGTaseRの分子量173 kDaよりも小さい128 kDaのバンドとして検出された（図9）．pTH171のDNAシークエンスの結果，pTH171の挿入断片上の*gtfR* 遺伝子のフレームには終始コドンが認められず，C末端側が欠落していることが示された．そこでさらに*S. oralis* GTaseのC末端側をコードする約1.8 kbpの挿入断片を含むプラスミドpTH181（図1）を作製し，pTH171とpTH181のDNAシークエンスの結果を統合して*gtfR* 遺伝子の全長を決定した．図9に示すようにLA PCRを行って得た*gtfR*

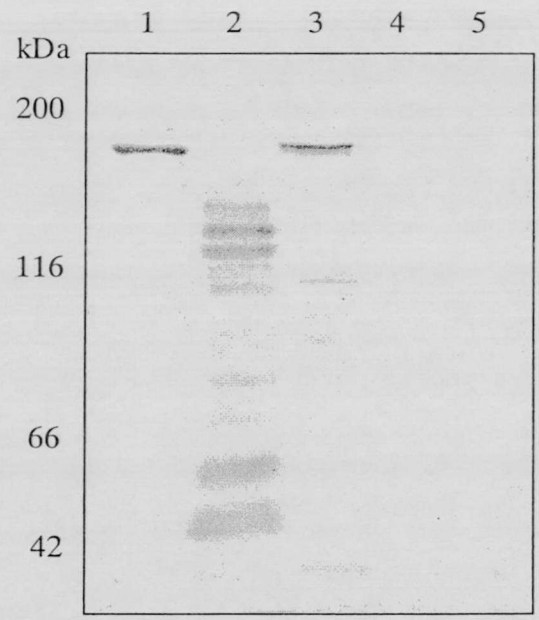

図9　*gtfR* 遺伝子リコンビナントタンパクのウエスタンブロット分析.
リコンビナントタンパクのサンプルは各プラスミドを形質転換した大腸菌を超音波破砕したものを用いた．また1次抗体には抗*S. oralis* GTase抗体を使用した．レーン：1，精製*S. oralis* GTase；2，pTH171；3，pTH275；4，pMW119；5，pGEM-T Easy

遺伝子の全長を含むクローンpTH275のリコンビナントタンパクは，精製*S. oralis* GTaseの分子量173 kDaとほぼ同等の175 kDaのバンドとして検出され，またGTase活性も認められた（表6）．

表6　***gtfR*遺伝子リコンビナントタンパクのグルカン合成活性．**

サンプル	グルカン合成活性（dpm）
pTH171	251.6 ± 63.4
pTH275	11570.0 ±154.0
pMW119	40.0 ± 3.0
pGEM-T Easy	58.3 ± 7.3
GTaseR	16142.8 ±167.2

反応液中に含まれる総［^{14}C］量は19602.8 dpm，洗浄後の濾紙片に残留した［^{14}C］量は50.3 dpmであった．

5．*gtfR* 遺伝子のDNAシークエンス

本研究で決定した*gtfR* 遺伝子のDNAシークエンスを図10に示す．pTH171とpTH181のシークエンスを統合した結果得られた配列の全長は8005 bpであった．また*gtfR* 遺伝子をLA PCRで増幅したPCR産物のダイレクトシークエンスの結果はこれと一致した．このシークエンス中には，861 bpの287アミノ酸残基数をコードするORFとその下流に4728bpの*S. oralis* のGTaseをコードする*gtfR* 遺伝子のORFが含まれていた．上流のORFは，*S. gordonii* におけるGTaseの産生の制御遺伝子と報告される*rgg* 遺伝子（Accesion No. M89776）と推定アミノ酸で74％と高い相同性を示すことから（図11），このORFを*S. oralis rgg* 遺伝子とした．下流の*gtfR* 遺伝子のORFより推定されるアミノ酸残基数は1575，分子量は177 kDa，等電点は5.58であった．また*S. oralis gtfR* 遺伝子の推定アミノ酸配列（GtfR）と*S. gordonii gtfG* 遺伝子の推定アミノ酸配列（GtfG）の相同性は非常に高かったが，N末端側の55から186番目のアミノ酸配列は異なることが示された（図12）．

```
GAATTCATGAAGATTTCCTATATCTTGATGTTGGCTCGAGCCATTGTAAGATTCACTCAAAAACACAAGGAATGGCGACGGACTATTCCCTTGGATTTCCTACTGATTGGTTGGATGATT 120
GCCTTTACCATCCCAGTCTTGATCCTCTTAGCCCTACAAAGTGACTTGGGGACTGCCTTGGTCTTCGTAGCTATTTTTTCCGGTATGGTTCTCCTTTCAGGTGTTTCGTGGAAGATTATC 240
ATTCCTGTTTTTGCGACAGGAGTGACTGCTGTTGCAGGCTTCATGGCCATCTTTATAAGCAAGGATGGACGTGCCTTCTTGCATCAGATTGGGATGCCAACTTACCAGATCAACCGCATC 360
TTGGCTTGGCTCAATTCCCTTTGACTTTGCACAAACAACAACATATCAACAGGCGCAGGGACAAATTGCGATTGGAAGTGGTGGCTTGTTTGGACAAGGTTTCAATGTGTCCAATCTCCT 480
CATTCCAGTACGCGAGAGTGATATGATTTTCACAGTAATTGCGGAAGATTTCGGCTTCATTGGTTCAGTATTTGTCATTGCTTTGTACCTACTTCTTATCTATCGGATGTTGAAGATTAC 600
GCTCAGATCAAATAACCAGTTCTATACCTATATTTCGACTGGCTTTATCATGATGCTGCTCTTCCATATATTTGAAAATATTGGCGCAGTGACTGGCTTGCTTCCTCTGACAGGGATTCC 720
TTTACCTTTCATCTCTCAAGGGGGGTCCGCAATTATTAGTAACCTTATCGGAGTTGGTCTCCTCTTATCTATGAGTTACCAGACCAATCTAGCTGAAGAAAAGAGTGGGAAGATTTCATT 840
CAAACGAAAAAAAGTCATCCTAAAACAAATCAAATAAGGAGGTCGCTATGGCAAAAGTAGCAGTTATCTTAGCAAATGGCTTTGAAGAAATCGAAGCCTTGACAGTAGTCGATGTCTTGC 960
GTCGAGCAAACATTTCCTGTGATATGGTAGGATTTGAGGAGCAGGTGACGGGATCACATGACATTCAGGTAACAGCCGATCGTGTCTTTGATGGTGATTTATCCGACTATGACTTGCTCG 1080
TTCTTCCAGGTGGCATGCCAGGCTCAGCTCACCTACGGGATAATCCAGCCCTCATTTCTGAGATTCAAGCCTTTAACCAAGCAGGAAAGAAAATTGCAGCCATCTGTGCAGCTCCAATCG 1200
TCCTTCATCAAGCAGGTGTCCTGATAGACAAGCACTTCACCTGTTATGACGGTGTTCAGGAAAACATCAGTGATGGAATTTACCGAAAGGAAACAGTAGTTGTGGATGGCAATCTAACAA 1320
CCAGCCGAGGACCGTCAACTGCCCTTGCATTTGCCTATGAGTTGGTAGAGCAGTTGGGAGGAGATGCAGAAAGTTTACGAGACGGCATGCTCTATCGAGATGTCTTTGGAAATCAACAGT 1440
AAAACGAGAGGCGGACTCTCGTTTTCTTATTTACTCTATGTCTAAAAAATGTTTCAGATGATTGTCTTGCGATTTTATATCAATCTTTTCTAAATCAATCAAGTTTTGTCCAGAACTTTG 1560
TCTAGCATAAGAAGGAAATCTATCTCTAGAAATGTTAGTGTTTTCAAGTTGTTAGATAGAATACTTCAGATTGTTCTCTGAAATCAAAAGATTCTCGAAAAAGATAGAATATTCAACACA 1680
ATGTTATATTAAGATACTTTATCGTGTGAATTAATCTGCTTGTATTAATTTGAAATATAAAGTACTTTCTCTGTAATGTAATTGAAACGTGTTACTAGTATATTAAAATTAGTAAGAATT 1800
                                                                                    -35          -10

TTTTGCATATACGAAACTGGGGGAGTGATATGTTGGAAACTTTTGGAAAAATATTCAAAGTCATTAGAGAATCAAAAAAAAATGTCCCTGAAAGAGGTAGCTGCTGGTGATATTTCCGTGG 1920
                  SD       M  L  E  T  F  G  K  I  F  K  V  I  R  E  S  K  K  M  S  L  K  E  V  A  A  G  D  I  S  V  A  31

CTCAGCTATCCCGTTTTGAACGGGGAGTCAATGGAATCACACTTGATTCTTTTTATTGCTGTTTAAAAAATATGGCCGTTTCCCTAGAGGAGTTTCAGTATGTTTACCATAATTACATTG 2040
  Q  L  S  R  F  E  R  G  V  N  G  I  T  L  D  S  F  Y  C  C  L  K  N  M  A  V  S  L  E  E  F  Q  Y  V  Y  H  N  Y  I  D  71

ATTCAGATGATGTGCTGTTCTCAAAAAAAGTAGCTGATGCATATCAGGAAAACAATGTTGTCAAGCTCCAAAATATTTTGTCAAGCTCAGAAGCTTTGACCGAACAGTTTCCTGAGAAGA 2160
  S  D  D  V  L  F  S  K  K  V  A  D  A  Y  Q  E  N  N  V  V  K  L  Q  N  I  L  S  S  S  E  A  L  T  E  Q  F  P  E  K  K  111

AAAACTATAAACTCAATACAATCATTGTCAGGGCCCTCTTGTCCTCCTGTTGCTCAGATTTTCAGATTAGCAAGAAGGATATTGAATTCCTGACGGATCATCTCTATTCTGTTGAGGAGT 2280
  N  Y  K  L  N  T  I  I  V  R  A  L  L  S  S  C  C  S  D  F  Q  I  S  K  K  D  I  E  F  L  T  D  H  L  Y  S  V  E  E  W  151

GGGGACGTTATGAACTCTGGCTTTTTACAAACAGTGTTGATTTGATGACCTTGGAAACGCTGGAAACCTTCGCTAGTGAGATGATCAATCGTACCCAGTTTTATAATAACCTACCTGAAA 2400
  G  R  Y  E  L  W  L  F  T  N  S  V  D  L  M  T  L  E  T  L  E  T  F  A  S  E  M  I  N  R  T  Q  F  Y  N  N  L  P  E  N  191

ATCGCCGCCGTATTATCAAGATGCTACTTAATGTCATTAGCGTCTGTATCGAAGGAAACCATCTGCTAGTTGCTATGAGGTTTCTCAATTATCTCGACCACTCTAAAATTCCTGAAACAG 2520
  R  R  R  I  I  K  M  L  L  N  V  I  S  V  C  I  E  G  N  H  L  L  V  A  M  R  F  L  N  Y  L  D  H  S  K  I  P  E  T  D  231

ATCTATATGATCGAACGCTGATTAAGTATCATAGGGCTCTTTACTCCTACAAGGTGGGGAATACCAATGCTCTCAGTGACATCGAGCAATGCCTATCTTTTTTTGAATTTTTAGATTCCT 2640
  L  Y  D  R  T  L  I  K  Y  H  R  A  L  Y  S  Y  K  V  G  N  T  N  A  L  S  D  I  E  Q  C  L  S  F  F  E  F  L  D  S  F  271

TTGGTGTTGCTCAAAAGCTTAAAGAACAGTTTGAAAGAATTTGCCTTTCATAGTTGTAGATGTGCAACAAAAAAATGATCATTTTGAAAAATATACTAGAATAAGAGCGTAACTTTATACT 2760
  G  V  A  Q  K  L  K  E  Q  F  E  R  I  C  L  S  *  ---------><---------                    -35                -10 287

AAATTCAGAAGGAGGCTTTATGATGGAGAAAAAGATTCATTATAAGATGCATAAAGTTAAGAAAAACTGGGTAGCCATTGCTTTGACTACCTTGGCCCTTATTGTAGCACCAAAGGTACT 2880
            SD       M  M  E  K  K  I  H  Y  K  M  H  K  V  K  K  N  W  V  A  I  A  L  T  T  L  A  L  I  V  A  P  K  V  L  34

TGGTCTAGAATCAGGCGTTGTCCATGCGGATGATGTAAAGCAGGTTGTAGTTCAAGAACCTGCTACAGCTCAGACTAGTGGTCCCGGTCAGCAAACTCCAGCCCAAGCTAAAATAGCATC 3000
  G  L  E  S  G  V  V  H  A  D  D  V  K  Q  V  V  V  Q  E  P  A  T  A  Q  T  S  G  P  G  Q  Q  T  P  A  Q  A  K  I  A  S  74

TGAGCAAGAAGCAGAAAAAGTAACCCCTGCAGACAAGGTGACAGACGATGTTGCTGCTAGTGAAAAGCCTGCTAAACCAGCAGAAAATACAGAAGCAACAGTTCAAACCAATGCTCAAGA 3120
  E  Q  E  A  E  K  V  T  P  A  D  K  V  T  D  D  V  A  A  S  E  K  P  A  K  P  A  E  N  T  E  A  T  V  Q  T  N  A  Q  E  114

GCCTGCTAAACCAGCAGATACGAAAGAAGCATCTACAGAAAAGGCTGCTGTTGCTGAAGAAGTTAAAGCTGCTAATGCAATCACAGAAATTCCTAAAACTGAAGTAGCAGACCAGAATAA 3240
  P  A  K  P  A  D  T  K  E  A  S  T  E  K  A  A  V  A  E  E  V  K  A  A  N  A  I  T  E  I  P  K  T  E  V  A  D  Q  N  K  154

ACAAGCAAGGCCAACAACTGCCCAAGACCAAGAAGGCGACAAGCGAGAAAAAACGGCTGTTGAAGACAAGATTGTTGCAAATCCAAAGGTTGCAAAGAAAGATCGCTTGCCCGAACCTGG 3360
  Q  A  R  P  T  T  A  Q  D  Q  E  G  D  K  R  E  K  T  A  V  E  D  K  I  V  A  N  P  K  V  A  K  K  D  R  L  P  E  P  G  194

TTCAAAACAGGGAGCAATAGCTGAAAGAATGGTGGCAGATCAGGCTCAACCTGCACCTGTAAATGCTGACCATGATGATGATGTCCTATCTCATATTAAGACCATTGATGGTAAAAATTA 3480
  S  K  Q  G  A  I  A  E  R  M  V  A  D  Q  A  Q  P  A  P  V  N  A  D  H  D  D  D  V  L  S  H  I  K  T  I  D  G  K  N  Y  234

CTATGTTCAGGACGATGGTACAGTTAAAAAGAACTTTGCAGTTGAACTTAATGGGAGAAATACTTTATTTTGATGCAGAAACCGGTGCCTTAGTTGATTCAAATGAATATCAGTTCCAACA 3600
  Y  V  Q  D  D  G  T  V  K  K  N  F  A  V  E  L  N  G  R  I  L  Y  F  D  A  E  T  G  A  L  V  D  S  N  E  Y  Q  F  Q  Q  274

AGGAACCAGCAGTCTCAATAATGAATTCTCTCAAAAGAATGCTTTTTACGGTACGACTGACAAGGATATCGAAACTGTAGACGGTTATTTGACAGCAGATAGCTGGTATCGTCCAAAGTT 3720
  G  T  S  S  L  N  N  E  F  S  Q  K  N  A  F  Y  G  T  T  D  K  D  I  E  T  V  D  G  Y  L  T  A  D  S  W  Y  R  P  K  F  314

CATCTTAAAAGATGGAAAAACATGGACGGCTTCGACAGAAACAGACTTACGTCCCCTTTTGATGGCTTGGTGGCCTGATAAACGTACTCAGATTAATTACCTCAACTATATGAACCAACA 3840
  I  L  K  D  G  K  T  W  T  A  S  T  E  T  D  L  R  P  L  L  M  A  W  W  P  D  K  R  T  Q  I  N  Y  L  N  Y  M  N  Q  Q  354

AGGTCTGGGAGCAGGTGCTTTTGAAAACAAAGTTGAACAAGCTCTCCTGACAGGAGCTTCTCAGCAGGTTCAGCGCAAAATTGAGGAAAAAATTGGTAAAGAAGGCGATACCAAATGGTT 3960
  G  L  G  A  G  A  F  E  N  K  V  E  Q  A  L  L  T  G  A  S  Q  Q  V  Q  R  K  I  E  E  K  I  G  K  E  G  D  T  K  W  L  394

GAGAACGCTGATGGGTGCCTTTGTCAAAACCCAGCCAAACTGGAATATCAAGACAGAGTCTGAAACAACTGGTACTAAAAAGGACCACTTGCAGGGTGGAGCTTTGCTTTATACCAATAA 4080
  R  T  L  M  G  A  F  V  K  T  Q  P  N  W  N  I  K  T  E  S  E  T  T  G  T  K  K  D  H  L  Q  G  G  A  L  L  Y  T  N  N  434

TGAGAAGAGCCCTCATGCTGACTCTAAGTTCCGTCTGCTTAACCGTACCCCTACTAGTCAGACAGGTACACCTAAGTACTTCATTGACAAGTCAAATGGTGGTTATGAGTTCTTGCTCGC 4200
  E  K  S  P  H  A  D  S  K  F  R  L  L  N  R  T  P  T  S  Q  T  G  T  P  K  Y  F  I  D  K  S  N  G  G  Y  E  F  L  L  A  474

TAACGACTTTGACAACTCTAATCCAGCTGTTCAAGCCGAACAACTCAACTGGTTGCACTATATGATGAACTTTGGAAGCATCGTAGCCAATGATCCGACTGCTAATTTTGATGGAGTTCG 4320
  N  D  F  D  N  S  N  P  A  V  Q  A  E  Q  L  N  W  L  H  Y  M  M  N  F  G  S  I  V  A  N  D  P  T  A  N  F  D  G  V  R  514

TGTCGATGCGGTGGACAATGTCAACGCAGACTTGCTCCAAATCGCATCTGACTACTTCAAGTCTCGCTACAAGGTGGGAGAAAGTGAAGAAGAAGCTATCAAGCATTTGTCTATCTTGGA 4440
  V  D  A  V  D  N  V  N  A  D  L  L  Q  I  A  S  D  Y  F  K  S  R  Y  K  V  G  E  S  E  E  E  A  I  K  H  L  S  I  L  E  554

AGCTTGGTCTGATAACGATCCTGACTACAACAAAGATACTAAAGGTGCTCAACTAGCAATTGACAACAAGCTACGCTTGTCCTTGCTTTATTCATTCATGCGTAATCTATCTATCCGTAG 4560
  A  W  S  D  N  D  P  D  Y  N  K  D  T  K  G  A  Q  L  A  I  D  N  K  L  R  L  S  L  L  Y  S  F  M  R  N  L  S  I  R  S  594

CGGAGTAGAGCCTACGATTACAAATAGTCTAAATGACCGTTCTTCTGAAAAGAAAAATGGCGAACGGATGGCTAACTATATCTTTGTTCGGGCTCATGACAGTGAAGTACAAACTGTTAT 4680
  G  V  E  P  T  I  T  N  S  L  N  D  R  S  S  E  K  K  N  G  E  R  M  A  N  Y  I  F  V  R  A  H  D  S  E  V  Q  T  V  I  634

TGCTGACATCATCCGAGAAAATATCAATCCAAATACGGATGGTTTGACCTTTACCATGGATGAACTCAAGCAAGCCTTCAAGATCTACAACGAAGATATGCGTAAGGCAGACAAGAAGTA 4800
  A  D  I  I  R  E  N  I  N  P  N  T  D  G  L  T  F  T  M  D  E  L  K  Q  A  F  K  I  Y  N  E  D  M  R  K  A  D  K  K  Y  674

TACGCAGTTCAACATCCCAACTGCTCATGCCCTCATGCTCTCCAATAAAGACTCTATCACTCGGGTCTACTATGGTGACCTCTATACCGATGATGGTCAATACATGGAGAAAAAATCTCC 4920
  T  Q  F  N  I  P  T  A  H  A  L  M  L  S  N  K  D  S  I  T  R  V  Y  Y  G  D  L  Y  T  D  D  G  Q  Y  M  E  K  K  S  P  671
4
TTACCACGATGCTATCGATGCCTTGTTGCGTGCTCGTATTAAGTATGTAGCAGGTGGACAAGACATGAAAGTCACATATATGGGTGTACCTCGTGAGGCTGATAAATGGTCTTACAATGG 5040
  Y  H  D  A  I  D  A  L  L  R  A  R  I  K  Y  V  A  G  G  Q  D  M  K  V  T  Y  M  G  V  P  R  E  A  D  K  W  S  Y  N  G  754

TATTTTGACTTCTGTGCGCTACGGTACTGGTGCCAATGAAGCAACAGATGAAGGAACAGCAGAAACTCGTACTCAAGGGATGGCTGTTATTGCTTCTAACAACCCTAACCTGAAACTGAA 5160
  I  L  T  S  V  R  Y  G  T  G  A  N  E  A  T  D  E  G  T  A  E  T  R  T  Q  G  M  A  V  I  A  S  N  N  P  N  L  K  L  N  794

CGAATGGGATAAACTGCAAGTCAATATGGGAGCAGCCCACAAGAATCAATACTATCGCCCTGTGCTTTTGACGACCAAAGATGGCATTTCCCGCTATCTAACTGACGAAGAAGTGCCGCA 5280
  E  W  D  K  L  Q  V  N  M  G  A  A  H  K  N  Q  Y  Y  R  P  V  L  L  T  T  K  D  G  I  S  R  Y  L  T  D  E  E  V  P  Q  834

ATCGCTCTGGAAGAAGACAGATGCTAATGGTATTTTAACCTTTGATATGAATGATATTGCAGGCTATAGCAATGTACAGGTTTCTGGATATCTGGCTGTTTGGGTACCAGTTGGCGCTAA 5400
  S  L  W  K  K  T  D  A  N  G  I  L  T  F  D  M  N  D  I  A  G  Y  S  N  V  Q  V  S  G  Y  L  A  V  W  V  P  V  G  A  K  874

GGCAGATCAGGATGCTCGTACAACAGCAAGCAAGAAGAAAAACGCTAGTGGTCAGGTCTACGAATCTAGCGCAGCCCTTGATTCTCAGTTGATTTACGAAGGATTTTCTAACTTCCAAGA 5520
  A  D  Q  D  A  R  T  T  A  S  K  K  K  N  A  S  G  Q  V  Y  E  S  S  A  A  L  D  S  Q  L  I  Y  E  G  F  S  N  F  Q  D  914

CTTTGCAACCCGCGATGACCAATATACCAATAAAGTTATTGCTAAAAATGTCAACCTCTTCAAGGAATGGGAGTAACTTCATTTGAGCTACCACCTCAGTATGTATCTAGCCAAGACGG 5640
  F  A  T  R  D  D  Q  Y  T  N  K  V  I  A  K  N  V  N  L  F  K  E  W  G  V  T  S  F  E  L  P  P  Q  Y  V  S  S  Q  D  G  954

TACTTTCTTAGATTCTATCATTCAGAATGGTTATGCCTTTGAAGACCGCTATGATATGGCGATGAGCAAGAACAATAAATATGGTTCTTTAAAAGATTTGCTCAATGCTCTTCGTGCGCT 5760
  T  F  L  D  S  I  I  Q  N  G  Y  A  F  E  D  R  Y  D  M  A  M  S  K  N  N  K  Y  G  S  L  K  D  L  L  N  A  L  R  A  L  994
```

```
TCACAGTGTCAATATCCAAGCCATCGCGGACTGGGTACCAGACCAAATCTACAACCTACCAGGTAAGGAAGTGGTAACAGCAACACGTGTCAACAACTACGGAACCTACCGAGAAGGTGC  5880
 H  S  V  N  I  Q  A  I  A  D  W  V  P  D  Q  I  Y  N  L  P  G  K  E  V  V  T  A  T  R  V  N  N  Y  G  T  Y  R  E  G  A  1034

AGAAATCAAGGAAAAACTCTATGTAGCTAATAGTAAGACCAATGAAACTGATTTCCAAGGTAAGTACGGTGGCGCCTTCTTGGATGAGCTCAAAGCTAAATATCCAGAAATCTTTGAACG  6000
 E  I  K  E  K  L  Y  V  A  N  S  K  T  N  E  T  D  F  Q  G  K  Y  G  G  A  F  L  D  E  L  K  A  K  Y  P  E  I  F  E  R  1074

AGTACAGATTTCCAATGGTCAAAAGATGACAACAGATGAGAAGATTACCAAGTGGTCGGCTAAGTACTTCAATGGTACCAATATCTTAGGTCGTGGTGCTTACTATGTTCTTAAAGACTG  6120
 V  Q  I  S  N  G  Q  K  M  T  T  D  E  K  I  T  K  W  S  A  K  Y  F  N  G  T  N  I  L  G  R  G  A  Y  Y  V  L  K  D  W  1114

GGCTAGCAACGACTATCTCACTAACAGAAATGGCGAGATAGTATTGCCTAAGCAATTAGTTAATAAGAATTCTTACACAGGATTTGTTAGTGATGCCAATGGTACTAAGTTCTATTCAAC  6240
 A  S  N  D  Y  L  T  N  R  N  G  E  I  V  L  P  K  Q  L  V  N  K  N  S  Y  T  G  F  V  S  D  A  N  G  T  K  F  Y  S  T  1154

TAGTGGTTATCAAGCTAAAAATTCCTTTATCCAAGATGAAAATGGAAATTGGTATTACTTCGATAAACGAGGCTATCTTGTAACAGGTGCTCATGAAATTGATGGCAAGCACGTTTATTT  6360
 S  G  Y  Q  A  K  N  S  F  I  Q  D  E  N  G  N  W  Y  Y  F  D  K  R  G  Y  L  V  T  G  A  H  E  I  D  G  K  H  V  Y  F  1194

CTTGAAGAATGGTATTCAACTTCGTGATTCTATCCGTGAAGATGAAAATGGTAATCAGTACTACTATGATCAAACTGGTGCCCAAGTTCTCAACCGTTACTACACTACTGATGGTCAAAA  6480
 L  K  N  G  I  Q  L  R  D  S  I  R  E  D  E  N  G  N  Q  Y  Y  Y  D  Q  T  G  A  Q  V  L  N  R  Y  Y  T  T  D  G  Q  N  1234

CTGGCGTTACTTTGATGCCAAGGGCGTTATGGCTCGAGGTCTTGTCAAGATAGGAGATGGACAGCAATTCTTTGATGAAAACGGCTATCAGGTTAAGGGCAAGATTGTGAGTGCTAAAGA  6600
 W  R  Y  F  D  A  K  G  V  M  A  R  G  L  V  K  I  G  D  G  Q  Q  F  F  D  E  N  G  Y  Q  V  K  G  K  I  V  S  A  K  D  1274

TGGCAAACTTCGTTACTTTGACAAGGATTCAGGGAATGCTGTTATCAATCGTTTTGCTCAGGGTGATAACCCAAGTGATTGGTACTATTTCGGAGTAGAGTTTGCCAAGTTAACAGGTCT  6720
 G  K  L  R  Y  F  D  K  D  S  G  N  A  V  I  N  R  F  A  Q  G  D  N  P  S  D  W  Y  Y  F  G  V  E  F  A  K  L  T  G  L  1314

TCAAAAGATTGGTCAACAAACACTTTACTTTGACCAAGATGGCAAGCAAGTCAAGGGTAAAATCGTGACACTTTCAGATAAGAGTATCCGTTACTTTGATGCCAACTCAGGAGAAATGGC  6840
 Q  K  I  G  Q  Q  T  L  Y  F  D  Q  D  G  K  Q  V  K  G  K  I  V  T  L  S  D  K  S  I  R  Y  F  D  A  N  S  G  E  M  A  1354

GGTCGGCAAGTTTGCTGAAGGTGCCAAGAACGAATGGTATTACTTTGACAAAACTGGTAAAGCAGTGACAGGTCTTCAAAAGATTGGCAAACAAACACTTTACTTTGACCAAGATGGTAA  6960
 V  G  K  F  A  E  G  A  K  N  E  W  Y  Y  F  D  K  T  G  K  A  V  T  G  L  Q  K  I  G  K  Q  T  L  Y  F  D  Q  D  G  K  1394

GCAAGTCAAGGGTAAAGTAGTAACTTTGGCTGATAAATCCATCCGTTACTTTGATGCCGACTCAGGAGAAATGGCAGTCGGCAAGTTTGCAGAAGGTGCCAAGAACGAATGGTATTACTT  7080
 Q  V  K  G  K  V  V  T  L  A  D  K  S  I  R  Y  F  D  A  D  S  G  E  M  A  V  G  K  F  A  E  G  A  K  N  E  W  Y  Y  F  1434

TGACCAAACTGGTAAAGCAGTGACAGGCCTTCAAAAGATTGACAAACAAACACTTTACTTCGACCAAGATGGCAAGCAAGTCAAGGGTAAAATCGTGACACTTTCAGATAAGAGTATCCG  7200
 D  Q  T  G  K  A  V  T  G  L  Q  K  I  D  K  Q  T  L  Y  F  D  Q  D  G  K  Q  V  K  G  K  I  V  T  L  S  D  K  S  I  R  1474

TTACTTTGATGCTAACTCAGGAGAGATGGCAACCAACAAGTTTGTCGAAGGTTCCCAAAATGAGTGGTACTATTTTGATCAAGCCGGAAAAGCAGTGACAGGCTTGCAGCAGGTTGGTCA  7320
 Y  F  D  A  N  S  G  E  M  A  T  N  K  F  V  E  G  S  Q  N  E  W  Y  Y  F  D  Q  A  G  K  A  V  T  G  L  Q  Q  V  G  Q  1514

ACAGACTCTCTATTTCACGCAAGACGGCAAGCAAGTCAAAGGAAAAGTTGTTGATGTGAATGGAGTTAGTCGATATTTCGATGCCAATTCAGGGGATATGGCTCGAAGCAAATGGATTCA  7440
 Q  T  L  Y  F  T  Q  D  G  K  Q  V  K  G  K  V  V  D  V  N  G  V  S  R  Y  F  D  A  N  S  G  D  M  A  R  S  K  W  I  Q  1554

ACTTGAAGATGGAAGTTGGATGTATTTTGACCGCGATGGTAGAGGTCAAAACTTCGGAAGAAACTAATCGAATGTAGCTCAATAAAAATCAAACTTTATCTGACGATATACAAAAACGAT  7560
 L  E  D  G  S  W  M  Y  F  D  R  D  G  R  G  Q  N  F  G  R  N  *                                                          1575

AACTCCTTTAAAGGACGTTATCGTTTTTTGCCTGTTTGGAGAATAAATGACAATTGAAAAGAAAGAAGGAATCATTGGAAACTGAAATGAATTAACAAGAGATTCCATATTGCCATATCT  7680
--------><----------------------

TTTTTCTGCACTCTATTGGACATTCAAAGCAATGAGGATTCTATTTTTAAAGTTGGGAAATCCCAAATCGTTTCGTTTGCGAAAAATGACGCGGTTGTTAGTAGTTTCTATTTTTTTATT  7800
TGTACATTTGAGATAGGAAAGATTTTGCTTGATTATTCATAGAGGAGCTATTCTTCACAAAAAGGCTCCATCGATGCAATAGTGTTTTACTCTCTATAGAAATTATAGAGCCGAAAAATC  7920
TAGGAAATCATCGCTTTTTTCATAAAAAAAATGGTATAATGAAGGGTATGAAATATCACGACTATATATGGGATTTAGGTGGTACC                                    8005
```

図10　*S. oralis rgg , gtfR* 遺伝子のDNA塩基配列と推定アミノ酸配列.
-10，-35はプロモーター配列，SDはShine-Dalgano配列，向かい合う矢印は逆方向繰り返し配列を示す.

```
S. gordonii MLIVKSSGKI LKIIRESKNM SLKEVAAGDI SVAQLSRYER GISSLTVDSF    50
S. oralis   ML--ETFGKI FKVIRESKKM SLKEVAAGDI SVAQLSRFER GVNGITLDSF    48

S. gordonii YSCLRNMSVS LAEFQYVYHN YREADDVVLS QKLSEAQREN NIVKLESILA   100
S. oralis   YCCLKNMAVS LEEFQYVYHN YIDSDDVLFS KKVADAYQEN NVVKLQNILS    98

S. gordonii GSEAMAQEFP EKKNYKLNTI VIRATLTSCN PDYQVSKGDI EFLTDYLFSV   150
S. oralis   SSEALTEQFP EKKNYKLNTI IVRALLSSCC SDFQISKKDI EFLTDHLYSV   148

S. gordonii EEWGRYELWL FTNSVNLLTL ETLETFASEM INRTQFYNNL PENRRRIIKM   200
S. oralis   EEWGRYELWL FTNSVDLMTL ETLETFASEM INRTQFYNNL PENRRRIIKM   198

S. gordonii LLNVVSACIE NNHLQVAMKF LNYIDNTKIP ETDLYDRVLI KYHKALYSYK   250
S. oralis   LLNVISVCIE GNHLLVAMRF LNYLDHSKIP ETDLYDRTLI KYHRALYSYK   248

S. gordonii VGNPHARHDI EQCLSTFEYL DSFGVARKLK EQFERIQLTV VADLQIE      297
S. oralis   VGNTNALSDI EQCLSFFEFL DSFGVAQKLK EQFERICL               287
```

図11　*S. oralis rgg* 遺伝子と*S. gordonii rgg* 遺伝子の推定アミノ酸配列との比較.
推定アミノ酸配列上で一致するアミノ酸は影つきの四角で示した．*S. oralis* と*S. gordonii* の*rgg* 遺伝子の推定アミノ酸配列には，74％の相同性が存在した.

```
GtfG  MMEKKVHYKM HKVKKNWVAI AVTSLALLVA PKALGLESGV IYADDANQVT     50
GtfR  MMEKKIHYKM HKVKKNWVAI ALTTLALIVA PKVLGLESGV VHADDVKQVV     50
                    シグナルペプチド
GtfG  NVKEQSAVQS KDSEQTTSDK ATDSSQLEVK EQASSSKETY QASAATNPTA    100
GtfR  -VQEPATAQT SGPGQQTPAQ AKIASEQEAE KVTPADKVTD DVAASEKPAK     99
      N末端アミノ酸シークエンス
GtfG  NEQTTQQDKE VETSRTDSRH ELTQKTSDDS SEKSGSSQEP KVADQAESTD    150
GtfR  PAENTEATVQ TN-AQEPAKP ADTKEASTEK AAVAEEVKAA NAITEIPKTE    148

GtfG  KTQAALQAKQ DSRANDQEET TENVAKATVS DKIIATPKKE RLPEPAQRKE    200
GtfR  VADQNKQARP TTAQDQEGDK REKTAVEDKI VANPKVAKKD RLPEPGSKQG    198

GtfG  SITEKMLAAQ AQAAPVNTEH DDDVLAHIKT IDGKKYYVQD DGTVKKNFAV    250
GtfR  AIAERMVADQ AQPAPVNADH DDDVLSHIKT IDGKNYYVQD DGTVKKNFAV    248

GtfG  ELNGKILYFD AETGALVDSN EYQFQQGTSS LNNEFTQKNA FYGTTDKDIE    300
GtfR  ELNGRILYFD AETGALVDSN EYQFQQGTSS LNNEFSQKNA FYGTTDKDIE    298

GtfG  TVDGYLTADS WYRPKFILKD GKTWTASTET DLRPLLMAWW PDKRTQINYL    350
GtfR  TVDGYLTADS WYRPKFILKD GKTWTASTET DLRPLLMAWW PDKRTQINYL    348

GtfG  NYMNQENLGI GAFESKTEQV LLTNAVQQVQ RKIEERISKE GDTKWLRTLM    400
GtfR  NYMNQQGLGA GAFENKVEQA LLTGASQQVQ RKIEEKIGKE GDTKWLRTLM    398

GtfG  SAFVKTQPNW NIKTESETTG TNKDHLQGGA LLYTNSDKTS HANSRYRLLN    450
GtfR  GAFVKTQPNW NIKTESETTG TKKDHLQGGA LLYTNNEKSP HADSKFRLLN    448

GtfG  RTPTSQTGTP KYFIDKSNGG YEFLLANDFD NSNPAVQAEQ LNWLHYMMNF    500
GtfR  RTPTSQTGTP KYFIDKSNGG YEFLLANDFD NSNPAVQAEQ LNWLHYMMNF    498

GtfG  GSIVANDPTA NFDGVRVDAV DNVNADLLQI ASDYFKSRYK VGESEEEALK    550
GtfR  GSIVANDPTA NFDGVRVDAV DNVNADLLQI ASDYFKSRYK VGESEEEAIK    548
                    スクラーゼ活性中心
GtfG  HLSILEAWSD NDPDYNKDTK GAQLAIDNKL RLSLLYSFMR KLSIRSGVEP    600
GtfR  HLSILEAWSD NDPDYNKDTK GAQLAIDNKL RLSLLYSFMR NLSIRSGVEP    598

GtfG  TITNSLNDRS TENKNGERTA NYIFVRAHDS EVQTVIADII RENINPNTDG    650
GtfR  TITNSLNDRS SEKKNGERMA NYIFVRAHDS EVQTVIADII RENINPNTDG    648

GtfG  LTFTMDELKQ AFKIYNEDMR KADKKYTQFN IPTAHALMLS NKDSITRVYY    700
GtfR  LTFTMDELKQ AFKIYNEDMR KADKKYTQFN IPTAHALMLS NKDSITRVYY    698

GtfG  GDLYTDDGQY MEKKSPYHDA IDALLRARIK YVAGGQDMKV TYMGVPREAD    750
GtfR  GDLYTDDGQY MEKKSPYHDA IDALLRARIK YVAGGQDMKV TYMGVPREAD    748

GtfG  KWSYNGILTS VRYGTGANEA TDEGTAETRT QGMAVIASNN PNLKLNEWDK    800
GtfR  KWSYNGILTS VRYGTGANEA TDEGTAETRT QGMAVIASNN PNLKLNEWDK    798

GtfG  LQVNMGAAHK NQYYRPVLLT TKDGISRYLT DEEVPQSLWK KTDANGILTF    850
GtfR  LQVNMGAAHK NQYYRPVLLT TKDGISRYLT DEEVPQSLWK KTDANGILTF    848

GtfG  DMNDIAGYSN VQVSGYLAVW VPVGAKENQD ARVTASKKKN ASGQVYESSP    900
GtfR  DMNDIAGYSN VQVSGYLAVW VPVGAKADQD ARTTASKKKN ASGQVYESSA    898
```

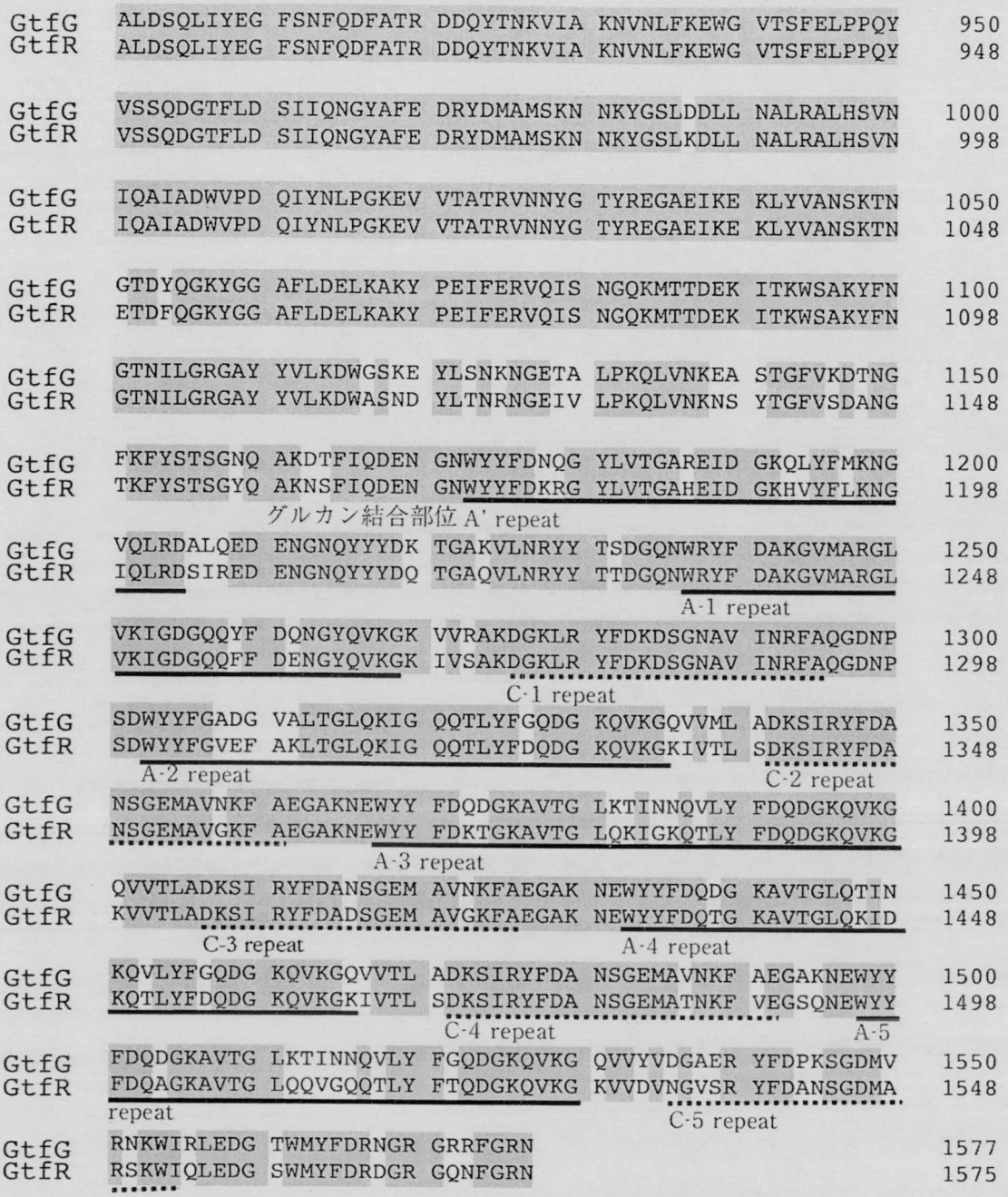

図12　***S. oralis gtfR* 遺伝子と*S. gordonii gtfG* 遺伝子の推定アミノ酸配列の比較.**
スクラーゼ活性部位の活性中心とグルカン結合部位における繰り返し構造を示す.

6. GTaseを有する口腔レンサ球菌に対するサザンブロット分析

S. oralis GTaseのN末端側の55から186番目のアミノ酸配列に対応するDNA塩基配列をPCRで増幅した（図1）. ついでこれをプローブとしてGTaseを有する口腔レンサ球菌の染色体DNAの制限酵素*Eco* RI完全消化物に対してサザンブロット分析を行った（図13）. このプローブと反応を示したのは, *S. oralis* 菌

種のみであり，このS. oralis GTaseのN末端側の55から186番目のアミノ酸配列はS. oralis 菌種のGTaseに特異的な配列であることが示唆された．

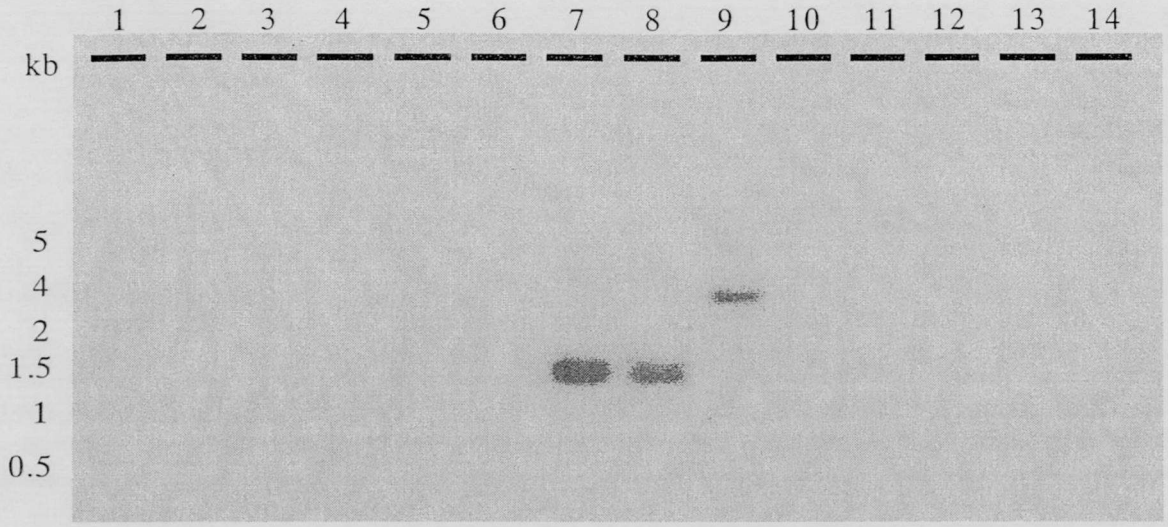

図13　**S. oralis GTase N末端部特異的塩基配列プローブによるサザンブロット分析．**
GTaseを有する各口腔レンサ球菌の染色体DNAを*Eco*R Iで消化したものをサンプルとした．
レーン：1，*S. mutans* MT8148；2，*S. sobrinus* 6715；3，*S. salivairus* HHT；4，*S. sanguis* ATCC10556；5，*S. sanguis* ST3；6，*S. sanguis* ST7；7，*S. oralis* ATCC10557；8，*S. oralis* SK23；9，*S. oralis* ATCC9811；10，*S. gordonii* ATCC10558；11，*S. gordonii* SK51；12，*S. gordonii* F90A；13，*S. mitis* SK24；14，*S. mitis* ATCC903

7．抗生物質耐性遺伝子の挿入による*S. oralis rgg*，*gtfR* 遺伝子欠失変異株の性状

S. oralis rgg 遺伝子がGTaseの産生の制御遺伝子であること，*gtfR* 遺伝子が*S. oralis* GTaseをコードする遺伝子であることを確証するために，抗生物質耐性遺伝子の挿入による*rgg*，*gtfR* 遺伝子欠失変異株を作製し，その性状を調べた．*rgg* 遺伝子に対して制限酵素*Apa* Iの認識部位に*erm*遺伝子を，*gtfR* 遺伝子に対して*Hin*d IIIの認識部位に*aphA*遺伝子を挿入することにより欠失変異株を作製した．サザンブロット分析において*rgg* 遺伝子欠失変異株では1.5 kbの断片中に0.8 kbの*erm*遺伝子が（図14），*gtfR* 遺伝子欠失変異株では3 kbの断片中に1 kbの*aphA*遺伝子が挿入されていることから（図15），抗生物質耐性遺伝子はそれぞれ染色体DNAの目的とする位置に挿入されていることが確認された．

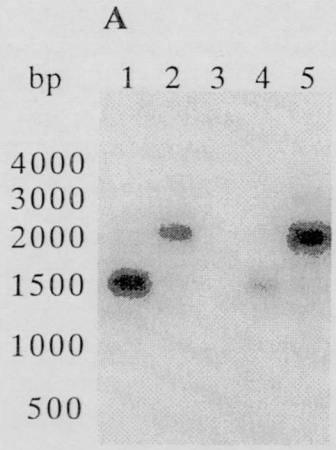

図14　*rgg* 遺伝子欠失変異株のサザンブロット分析．
AはpTHR8の挿入断片を，Bは*erm*をプローブとして用いた．サンプルDNAは*Sph* I，*Pst* Iの消化物を用いた．
レーン：1，pTHR8；2，pTH805；3，pUC19；4，*S. oralis* ATCC10557；5，*S. oralis rgg: erm*

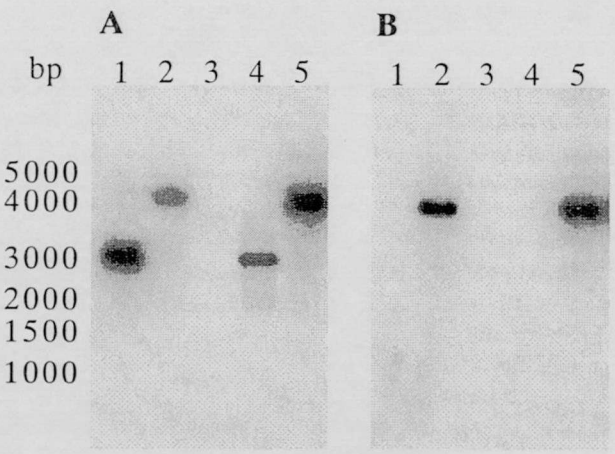

図15　*gtfR* 遺伝子欠失変異株のサザンブロット分析．
AはpTH808の挿入断片を，Bは*aphA*をプローブとして用いた．サンプルDNAは*Eco*R I消化物を用いた．
レーン：1，pTH808；2，pTH818；3，pGEM-T Easy；4，*S. oralis* ATCC10557；5，*S. oralis gtfR: aphA*

これら変異株の性状の変化をAPI 20 STREP，FTase活性測定，溶血性の判定を行うことにより調べた．しかし両変異株ともα溶血性を示し，生化学的性状の変化やFTase活性は認めらず，*S. oralis* 親株との差異は特に認められなかった．

また変異株と親株であるATCC10557株の2日間培養時におけるMS寒天培地上でのコロニー形態を比較したところ，ATCC10557株のコロニーは，直径約1.0 mm程度の大きさで，透明感のある露滴状層（ズーグレア）をもつ，釣菌時には寒天培地に食い込むかたいコロニーであった（図16）．これに対し，*rgg* 遺伝子欠失変異株のコロニーは，直径約1.5 mmと大きいがズーグレアをもたず，表面は滑沢であるが透明感のないもので，釣菌時には培地から容易に剥がれた．*gtfR* 遺伝子欠失変異株のコロニーは，直径約0.5 mm程度と小さく，親株のコロニーからズーグレアの被膜を取り除いたような形態を示すものであった．

rgg，*gtfR* 遺伝子欠失変異株のグルカン合成活性を測定したところ，ともに活性をほとんど示さなかった（表7）．また図17に示す培養上清のウエスタンブ

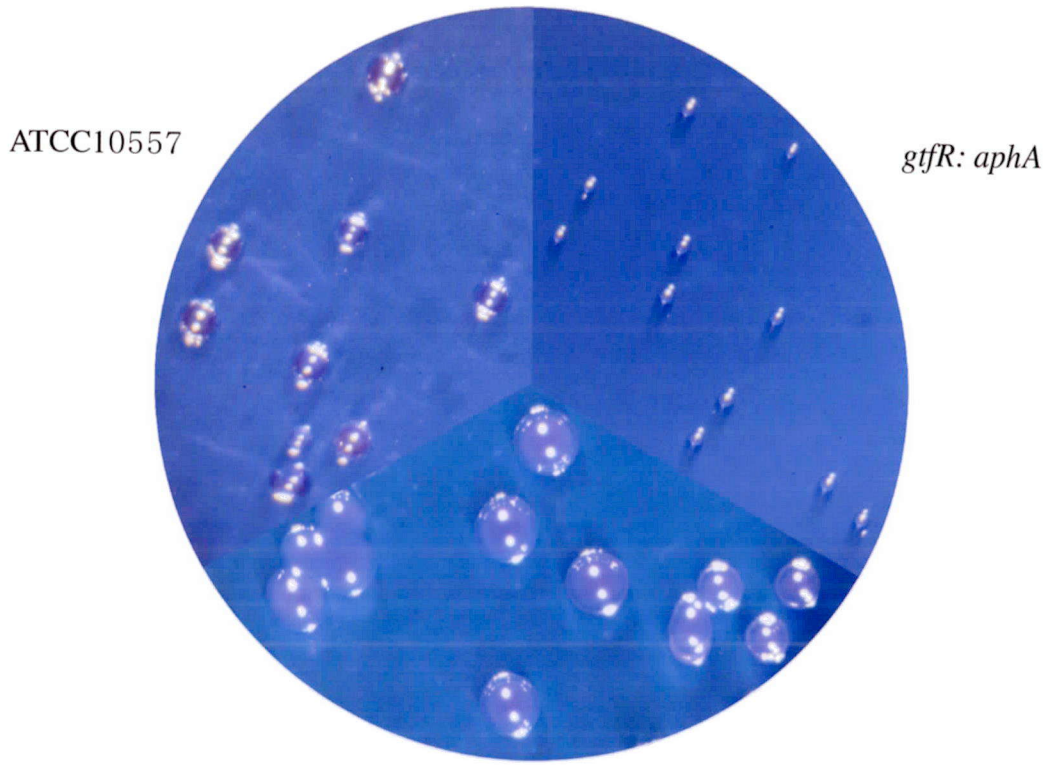

図16　***rgg*, *gtfR* 遺伝子欠失変異株のMS寒天培地上でのコロニー形態.**
BHI液体培地で培養した各菌株の培養液を1000倍希釈した．この希釈液100 μlをMS寒天培地に接種し，嫌気的に37℃で2日間培養した.

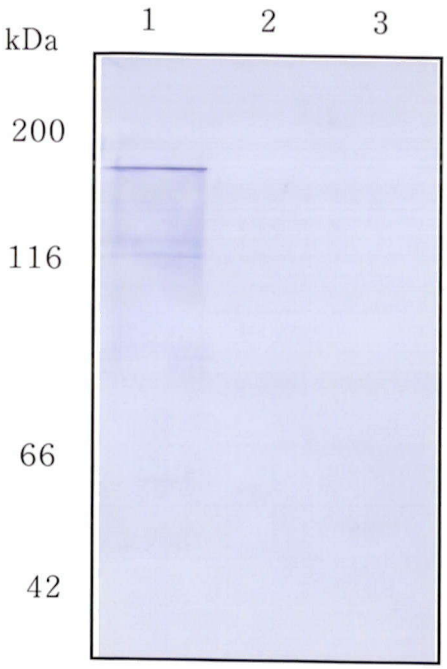

図17　***rgg*, *gtfR* 遺伝子欠失変異株のウエスタンブロット分析.**
各株をBHI液体培地でOD550が0.8となるまで培養し，その培養上清をGTase画分のサンプルとして使用した．また1次抗体には抗*S. oralis* GTase抗体を用いた.
レーン：1，ATCC10557；2，*rgg: erm*；3，*gtfR: aphA*

表7　***rgg* および*gtfR* 遺伝子欠失変異株のグルカン合成活性.**

菌株	グルカン合成活性（dpm）
S. oralis	
ATCC10557	4276.9±230.2
rgg: erm	433.8± 30.9
gtfR:aphA	209.2± 29.2

各菌株をBHI液体培地で培養液のOD_{550}が0.8となるまで培養した．その培養上清を60％飽和硫酸アンモニウムで塩析濃縮後，10 mM NaPB (pH6.0) にて透析し，タンパク定量したものをサンプルとした．反応液中に含まれる総［^{14}C］量は18675.4 dpm，洗浄後の濾紙片に残留した［^{14}C］量は49.5 dpmであった.

ロット分析の結果，両変異株とも抗*S. oralis* GTase抗体と反応を示すバンドが検出されなかった．これらのことから両変異株ともGTaseを発現しておらず，グルカン合成能が欠失していることがわかった．以上より*S. oralis rgg* 遺伝子はGTaseの産生の正の制御遺伝子であること，*gtfR* 遺伝子は*S. oralis* GTaseを唯一コードする遺伝子であることが確証された．

考察

サングイスレンサ球菌と総称される*S. oralis*，*S. sanguis*，*S. gordonii* は，菌体遊離型GTaseを産生して（Kilianら, 1989, Willcox, 1995），スクロースより菌体外多糖グルカンを合成する．また*S. sobrinus*（Furutaら, 1985），*S. salivarius*（Simpsonら, 1995）も菌体遊離型GTaseを，さらに主要なう蝕原性細菌である*S. mutans* は菌体遊離型GTaseの他に菌体結合型GTaseを産生する（Hamadaら, 1989, Kuramitsu, 1993）．これらの口腔レンサ球菌のGTaseは，水溶性グルカン合成GTaseと非水溶性グルカン合成GTaseに大別され，従来デンタルプラークの形成はこのうちの非水溶性グルカン合成GTaseによると考えられ，水溶性グルカン合成GTaseはそれほど注目されていなかった．しかし最近，*S. mutans* の菌体遊離型GTaseが合成する水溶性グルカンが菌体結合型GTaseにより合成される非水溶性グルカンと協調して菌体の歯面への付着を増強し，デンタルプラークを形成するという報告（Minamiら, 1999）がされ，水溶性グルカン合成GTaseの役割も見直されている．

S. oralis の産生するGTaseRは菌体遊離型で，主に水溶性グルカンを合成し，プライマー非依存性を示した．これらの性状は*S. mutans* の菌体遊離型GTaseと類似しており，*S. mutans* の歯面付着において同様の働きをすると考えられる．このことは*S. oralis* の産生するGTaseRが*S. mutans* 静止菌体のガラス試験管壁への付着を増強するという今回の結果（図7）からも支持される．同反応系には*S. mutans* の菌体結合型GTaseは存在するが，菌体遊離型GTaseは存在しない．それ故に*S. mutans* 静止菌体の付着率は42.7％と低いものであった．しかし1 mU/mlの*S. oralis* 由来の菌体遊離型GTaseRを加えた場合の付着率は上昇し，*S. mutans*

の菌体結合型GTaseと菌体遊離型GTaseが共存する生育菌体での付着率に近似した値を示した．これは*S. mutans* の菌体遊離型GTsaeの代わりにGTaseRが合成した水溶性グルカンと*S. mutans* の菌体結合型GTaseにより合成された非水溶性グルカンが協調して*S. mutans* の強固な付着を引き起こしたためと考えられる．また*S. oralis* は歯の萌出前からヒト口腔内に定着しており，菌体遊離型のGTaseRを産生している．このような条件下で，*S. mutans* が感染し，歯面に付着した時，*S. oralis* のGTaseRの作用により，*S. mutans* の歯面定着が増強する可能性は高い．

本研究では，GTaseRの解析にあたり，*S. oralis* ATCC10557株染色体DNAから*gtfR* 遺伝子全体をクローニングすることを試みた．すでに報告のある他の*gtf* 遺伝子のシークエンスの全長は5 kb以下であるので，各種制限酵素の組み合わせにより少なくとも5 kb以上となるようなDNA断片のライブラリーを作製した．しかし作製したプラスミドpTH171は*gtfR* 遺伝子の終止コドンを含まないクローンであった．GTaseのC末端側には繰り返し配列が存在することが知られており，*gtfR* 遺伝子のC末端側を含むクローンが得られないのはそのC末端側に繰り返し配列が存在し，これにより制限酵素の認識配列も繰り返して複数存在するか，あるいは全く存在しない配列が繰り返されているためと考えられた．そこでpTH171のDNAシークエンスをもとにプローブを作製し，*gtfR* 遺伝子のC末端側のクローンを分離した．これより得られたプラスミドpTH181には*gtfR* 遺伝子の終止コドンが含まれており，pTH171のシークエンスとあわせることで*gtfR* 遺伝子の全長を決定することができた．またこのシークエンスが一連のものであることを確認するために全*gtfR* 遺伝子をPCRで増幅してダイレクトシークエンスを行い，この結果と一致することを確認した．得られたシークエンスの制限酵素地図（図1）によれば，ATCC10557株の染色体DNA上には*gtfR* 遺伝子をクローニングするための適当な制限酵素の認識部位が存在しなかった．またデータには示さないが本研究で使用した*Eco*R Iの認識部位はサザンブロット分析の結果，*gtfR* 遺伝子中の認識部位からさらに5 kb下流にしか存在せず，また他の制限酵素についても同様に適当な位置での制限酵素の認識部位は存在し

なかった．したがって通常の制限酵素とプラスミドを用いたクローニング法では*S. oralis* ATCC10557株染色体DNAから*gtfR* 遺伝子をクローニングすることは困難であると考えられた．

GtfRには，口腔レンサ球菌のGTaseに特徴的な保存性の高い２つの機能部位，スクラーゼ活性部位（Mooserら, 1991）とグルカン結合部位（Shimamuraら, 1994）が存在した．約800アミノ酸残基からなるスクラーゼ活性部位はN末端側に存在し，スクロースの加水分解を行う．グルカン結合部位は繰り返し構造をとり，C末端側に存在する．GtfRのスクラーゼ活性部位の活性中心は水溶性グルカンを合成するGTaseの活性中心（Shimamuraら, 1994）と同じアミノ酸配列であった．またグルカン結合部位は水溶性グルカンを合成する*S. gordonii* GtfG（Vickermanら, 1997）と同じく6回の繰り返し構造をもつものであった．これらの結果は*S. oralis* GTaseRが口腔レンサ球菌の産生するGTaseのうち分子生物学的に水溶性グルカン合成GTaseの範疇に属するものであることを示唆している．またグルカン結合部位の存在するC末端領域を欠失したpTH171によるリコンビナントタンパクはGTase活性を示さなかった（表6）．KatoとKuramitsu（1991）はグルカン結合部位の繰り返し構造単位の欠失はGTase活性を減少すると報告しており，本研究の結果と一致するものであった．

得られたGtfRと既知の*gtf*遺伝子の推定アミノ酸配列による遺伝子分類学的系統樹を作製したところ（図18），GtfRは水溶性グルカンを合成する*S. mutans* GtfDをはじめとした水溶性グルカンを合成するGtfのクラスターに属することが明かとなった．

抗*S. oralis* GTase抗体は，同種の*S. oralis*，また相同性が高い*S. sanguis*，*S. gordonii* のGTase画分のグルカン合成活性を有意に阻害し，さらに水溶性グルカンを合成する*S. mutans* の菌体遊離型GTase，および*S. sobrinus*，*S. salivarius* のGTase画分のグルカン合成活性も一部阻害した（図5，図6）．このことから*S. oralis* GTaseは，免疫化学的にも水溶性グルカン合成GTaseの範疇に属するものともいえる．以上のことをまとめると*S. oralis* GTase は生化学的，分子生物学的，遺伝子分類学的，さらに免疫化学的に口腔レンサ球菌の水溶性グルカン合

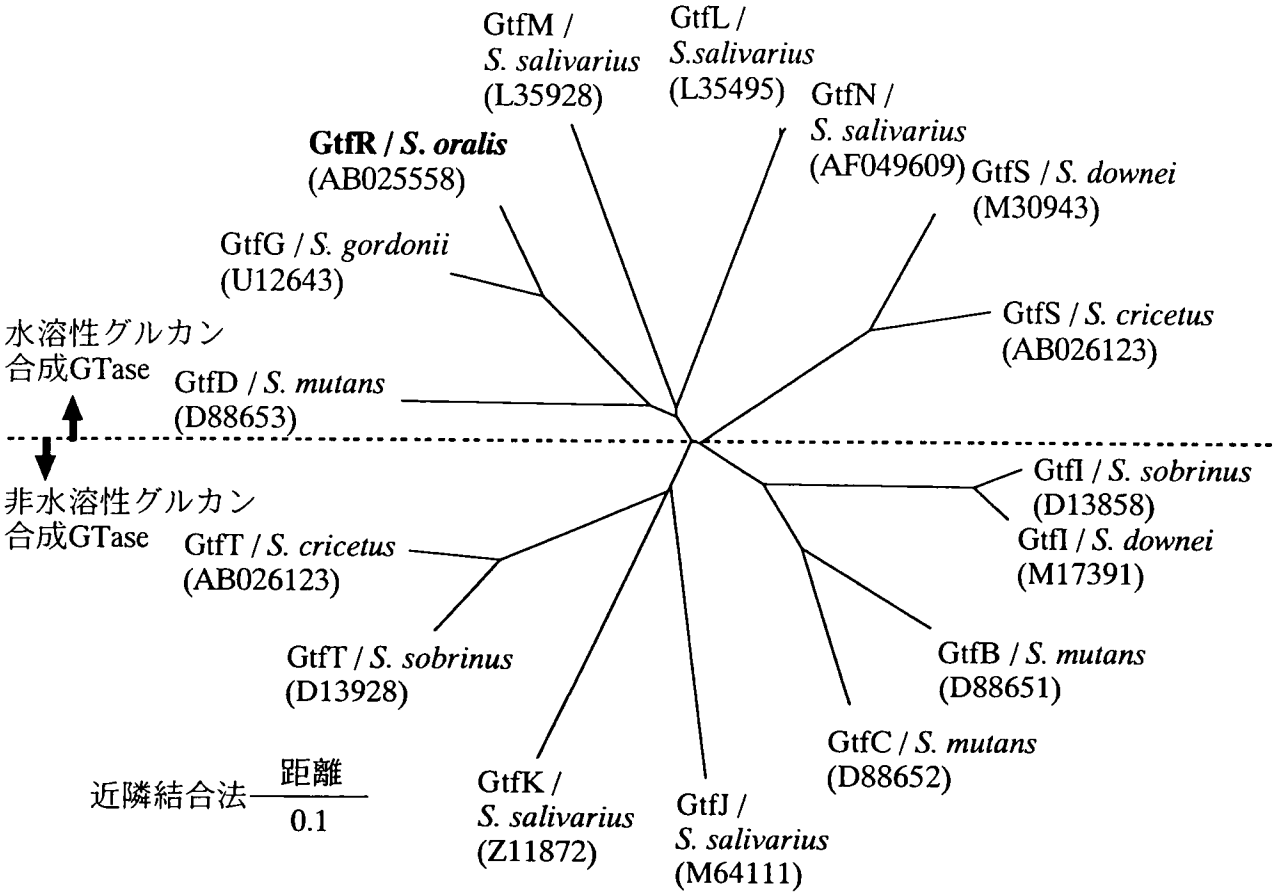

図18　口腔レンサ球菌GTaseの推定アミノ酸配列による遺伝学的系統樹.
系統樹における遺伝学的進化距離の算出は近隣結合法により行った.
カッコ内に各*gtf* 遺伝子のAccesion No.を示す.

成GTaseの範疇に属するものであることが明かとなった.

本研究で決定したGTaseRのN末端アミノ酸シークエンスは，79.9％と一番相同性の高いGtfGのみならず他の口腔レンサ球菌のGtf上にも存在しなかった．さらにGtfRのN末端側の55から186番目のアミノ酸配列に対応するDNA塩基配列をプローブとしたサザンブロット分析は*S. oralis* 菌種のみに反応性がみられた（図13）．このことからGTaseRのN末端部の配列は，他の口腔レンサ球菌のGTaseに存在しない，*S. oralis* 菌種に特異的な配列であることを示唆している．またこのサザンブロット分析で*S. oralis* ATCC9811株は，約4 kbで反応を示すバンドが検出され，ATCC10557株，SK23株の1.4 kbよりも大きいものであった（図13）．これは染色体DNAの消化に用いた制限酵素*Eco* RIの認識部位がATCC9811株には存在しなかったためと考えられる．これは*S. mutans* の*gtf* 遺伝子でも菌株間で多少の差異が存在したこと（Fujiwaraら, 1998）からも支持

される．

近年，サングイスレンサ球菌種の分類は，DNA-DNA ハイブリダイゼーション（Ezakiら, 1988）や16S rRNAの塩基配列（Kawamuraら, 1995）の結果に基いて行われ，より細かく分類が進められている．しかしこのような方法では相同性が非常に高い場合には正確に分類することがしばしば困難である．そこで *S. oralis* 菌種に特異的な配列をプローブとしたサザンブロットにより，あるいはこの部分を特異的に増幅するプライマーを用いたPCRを行うことにより，サングイスレンサ球菌種を分類することが可能となる．

本研究では*S. oralis rgg* 遺伝子の機能についても解析するため同遺伝子の欠失変異株を作製した．変異株の生化学的性状を調べたところ親株であるATCC 10557株との変化は認められなかったが，*rgg: erm* 株はGTaseをほとんど発現しておらず，*S. oralis rgg* 遺伝子は*S. gordonii rgg* 遺伝子（Sulavickら, 1996）と同様にGTaseの正の制御遺伝子であることが示唆された．ATCC10557株，*rgg: erm* 株，*gtfR: aphA* 株でコロニー形態を比較したところ，親株はズーグレアをもち，培地に食い込むかたいコロニーであったのに対し，*rgg: erm* 株は釣菌時に培地から容易に剥がれるやわらかいコロニーに変化していた．これは，Sulavickら（1992）が*S. gordonii rgg* 遺伝子変異株において報告している知見と一致するものであった．一方，*gtfR: aphA* 株はGTaseを発現していないという点では*rgg: erm* 株と同じであったが，コロニー形態は親株と比べると小さくズーグレアを欠き，*rgg: erm* 株とは全く異なる形態を示した．ズーグレアの成分にグルカンが含まれると考えると，GTaseが欠失したときに生ずるコロニーは *gtfR: aphA* 株の形態を示すと考えられる．*S. mutans* の*gtf* 遺伝子欠失変異株においても同様の小さいコロニーを示すことが報告されている（Fujiwaraら, 1996）．このように*rgg*欠失変異株と*gtfR*欠失変異株でコロニー形態が異なるという結果は，*S. oralis rgg* 遺伝子はGTaseの産生の正の制御ばかりではなく，他の因子の発現にも関与している可能性を示唆している．

Sulavickら（1992）は*S. gordonii rgg* 遺伝子欠失変異株の溶血性や合成グルカンの組成が変化すると報告しているが，本研究での*S. oralis* 変異株は溶血性の

変化は認めらず，また合成グルカンの組成に関しては変異株でのグルカン合成活性がほとんど認められないので論じることは出来なかった．ついで*rgg: erm*株のコロニーがフルクタンの被膜をもつ*S. salivarius*のコロニーと類似点があると考え，*rgg: erm*株のフルクタン合成活性をその培養上清および菌体で測定したが，親株，変異株ともにフルクタン合成活性は認めらず，MS寒天培地上でのコロニー形態の変異はフルクタンによるものではないことが判明した．

*Streptococcus pyogenes*のシステインプロテアーゼであるSPE B（Lyon, 1998, Chaussee, 1999）や*Lactococcus lactis*のグルタミン酸脱炭酸酵素（Sanders, 1998）にも*rgg*遺伝子と相同性のある制御遺伝子が存在することが最近報告されている．これらの菌種はGTaseを産生していないので，これらの報告は*rgg*遺伝子がGTaseの産生の制御だけではなく，他の因子の発現にも関与する可能性があることを示唆するものである．GTaseRの至適pHは6.5であり，5.0ではその活性が25％程度低下した．一方，*S. oralis*のグルカン合成活性はその予備実験において培養液のOD_{550}が1.2を越え，pHが5.0以下となるとほとんど活性を示さなかった．したがって*S. oralis*のグルカン合成活性は低pHでその活性が低下すること以外に，GTaseRを分解するプロテアーゼや合成されたグルカンを分解するデキストラナーゼのような酵素の産生，あるいはGTaseの産生を抑制する機構が働きのために低下したと考えられる．GTase産生抑制機構については*L. lactis*の*rgg*様の制御遺伝子がpH感受性をもつという報告（Sanders, 1998）が最近されているので，*S. oralis rgg*遺伝子についてもpH感受性が関係しているかもしれない．このように*S. oralis*のGTaseの発現の転写機構は*rgg*遺伝子によって正の制御がされるということが判明しているのみで，負の制御，あるいはpHのような環境因子による影響が解明されていない．したがってこれら*rgg*，*gtfR*遺伝子の転写発現機構の解明が必要であると考えられる．

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．

謝辞

本研究を行うにあたり，終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った大阪大学歯学部小児歯科学講座　祖父江鎭雄教授に心から謝意を表します．本研究を進めるにあたり，終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜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．本研究を進めるにあたり，様々な御指導と御教授をいただいた大阪大学歯学部小児歯科学講座　大嶋　隆助教授および藤原卓講師に厚く御礼申し上げます．またアミノ酸シークエンスの決定にあたり，御指導と御教示をいただいた国立循環器循環器病センター研究所　脈管生理部　血栓研究室　室長　宮田敏行博士に心から感謝申し上げます．

最後に終始研究に際し，御援助，御助力いただいた大阪大学歯学部小児歯科学講座，口腔細菌学講座の皆様に厚く御礼申し上げます．

文献

Birnboim, H. C., and J. Doly. 1981. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucleic Acids Res **7 (6)** : 1513-1523.

Bridge, P. D., and P. H. A. Sneath. 1982. *Streptococcus gallinarum* sp. nov. and *Streptococcus oralis* sp. nov. Int J Syst Bacteriol **32**: 410-415.

Chaussee, M. S., D. Ajdic, and J. J. Ferretti. 1999. The *rgg* gene of *Streptococcus pyogenes* NZ131 positively influences extracellular SPE B production. Infect Immun **67:** 1715-1722.

Douglas, C. W., J. Heath, K. K. Hampton, and F. E. Preston. 1993. Identity of viridans streptococci isolated from cases of infective endocarditis. J Med Microbiol **39:** 179-182.

Ezaki, T., Y. Hashimoto, N. Takeuchi, H. Yamamoto, S. L. Liu, H. Miura, K. Matsui, and E. Yabuuchi. 1988. Simple genetic method to identify viridans group streptococci by colorimetric dot hybridization and fluorometric hybridization in microdilution wells. J Clin Microbiol **26:** 1708-1713.

Frandsen, E. V., V. Pedrazzoli, and M. Kilian. 1991. Ecology of viridans streptococci in the oral cavity and pharynx. Oral Microbiol Immunol **6:** 129-133.

Fujiwara, T., S. Kawabata, and S. Hamada. 1992. Molecular characterization and expression of the cell-associated glucosyltransferase gene from *Streptococcus mutans*. Biochem Biophys Res Commun **187:** 1432-1438.

Fujiwara, T., M. Tamesada, Z. Bian, S. Kawabata, S. Kimura, and S. Hamada. 1996. Deletion and reintroduction of glucosyltransferase genes of *Streptococcus mutans* and role of their gene products in sucrose dependent cellular adherence. Microb Pathog **20:** 225-233.

Fujiwara, T., Y. Terao, T. Hoshino, S. Kawabata, T. Ooshima, S. Sobue, S. Kimura, and S. Hamada. 1998. Molecular analyses of glucosyltransferase genes among strains of *Streptococcus mutans*. FEMS Microbiol Lett **161:** 331-336.

Furuta, T., T. Koga, T. Nishizawa, N. Okahashi, and S. Hamada. 1985. Purification and characterization of glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* 6715. J Gen Microbiol **131**: 285-293.

Graudreau, C.,G. Delage,D. Rousseau, and E. D.Canter. 1981. Bacteremia caused by viridans streptococci in 71 children. Can Med Assoc J **125**: 1246-1249.

Grahame, D. A., and R. M. Mayer. 1985. Purification, and comparison of two forms of dextransucrase from *Streptococcus sanguis*. Carbohydr Res **142:** 285-298.

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

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

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

Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama. 1990. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. Gene 96: 23-28.

Kato, C., and H. K. Kuramitu. 1991. Molecular basis for the association of glucosyltransferases with the cell surface of oral streptococci. FEMS Microbiol Lett **63**: 153-157.

Kawamura, Y., X. G. Hou, F. Sultana, H. Miura, and T. Ezaki. 1995. Determination of 16S rRNA sequences of *Streptococcus mitis* and *Streptococcus gordonii* and phylogenetic relationships among members of the genus Streptococcus. Int J Syst Bacteriol **45:** 406-408.

Kilian, M., L. Mikkelsen, and J. Henrichsen. 1989. Taxonomic study of viridans streptococci: description of *Streptococcus gordonii* sp. nov. and emended descriptions of *Streptococcus sanguis* (White and Niven 1946), *Streptococcus oralis* (Bridge and Sneath 1982), and *Streptococcus mitis* (Andrewes and Horder 1906). Int J Syst Bacteriol **39:** 471-484.

Koga, T., H. Asakawa, N. Okahasi, and S. Hamada. 1986. Sucrose-dependent cell adherence and cariogenicity of serotype *c Streptococcus mutans*. J Gen Microbiol 132: 2873-2883.

古賀敏比古，浜田茂幸． 1992. 口腔レンサ球菌. レンサ球菌感染症（中）（塩川優一, 吉岡守正, 浜田茂幸編）廣川書店, 東京: 413-434.

Kuramitsu, H. K. 1993. Virulence factors of mutans streptococci: role of molecular genetics. Crit Rev Oral Biol Med **4:** 159-176.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **277**: 680-685.

Lowry, O. H, N. J.Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein mesurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem **193**: 265-275.

Lyon, W. R., C. M. Gibson, and M. G. Caparon. 1998. A role for trigger factor and an rgg-like regulator in the transcription, secretion and processing of the cysteine proteinase of *Streptococcus pyogenes*. EMBO J **17:** 6263-6275.

Minami, T., T. Fujiwara, Y. Terao, S. Kawabata, T. Ooshima, and S. Hamada. 1999. In vitro reconstraction of sucrase-dependent cellular adherence of Streptococcus mutans with recombinant glucosyltransferases. XIV Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseas. Abstract and Information Book, Newzealand: P10. 23.

Mooser, G., S. A. Hefta, R. J. Paxton, J. E. Shively, and T. D. Lee. 1991. Isolation and sequence of an active-site peptide containing a catalytic aspartic acid from two *Streptococcus sobrinus* α-glucosyltransferases. J Biol Chem **266:** 8916-8922.

Mukasa, H., H. Tsumori, and A. Shimamura. 1987. Sodium dodecyl sulfate electrophresis in the first dimension and isoelectric focusing in the second dimension in a single thin-layer gel, folloed by activity stain for glucosyltransferases. Electrophresis **8**: 29-34.

野島　博. 1991. 高効率コンピタントセル調製法. 遺伝子工学ハンドブック, 実験医学, 羊土社, 東京: 46-51.

Nyvad, B., and M. Kilian. 1990. Microflora associated with experimental root surface caries in humans. Infect Immun **58:** 1628-1633.

Page, R. D. M. Tree View: An application to diplay phylogenic trees on personal computers. Computer Applications in the Biosciences **12**: 357-358.

Paker, M. T. and L. C.Ball. 1976. Streptococci and Aerococci associated with systemic infection in man. J Med Microbiol **9**: 275-302.

Pearce, C., G. H. Bowden, M. Evans, S. P. Fitzsimmons, J. Johnson, M. J. Sheridan, R. Wientzen, and M. F. Cole. 1995. Identification of pioneer viridans streptococci in the oral cavity of human neonates. J Med Microbiol **42:** 67-72.

Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanders, J. W., K. Leenhouts, J. Burghoorn, J. R. Brands, G. Venema, and J. Kok. 1998. A chloride-inducible acid resistance mechanism in *Lactococcus lactis* and its regulation. Mol Microbiol **27:** 299-310.

Shimamura, A., Y. J. Nakano, H. Mukasa, and H. K. Kuramitsu. 1994. Identification of amino acid residues in *Streptococcus mutans* glucosyltransferases influencing the structure of the glucan product. J Bacteriol **176:** 4845-4850.

Simpson, C. L., N. W. Cheetham, P. M. Giffard, and N. A. Jacques. 1995. Four glucosyltransferases, *GtfJ, GtfK, GtfL* and *GtfM*, from *Streptococcus salivarius* ATCC 25975. Microbiology **141**: 1451-1460.

Sulavik, M. C., and D. B. Clewell. 1996. Rgg is a positive transcriptional regulator of the *Streptococcus gordonii gtfG* gene. J Bacteriol **178:** 5826-5830.

Sulavik, M. C., G. Tardif, and D. B. Clewell. 1992. Identification of a gene, *rgg*, which regulates expression of glucosyltransferase and influences the Spp phenotype of *Streptococcus gordonii* Challis. J Bacteriol **174:** 3577-3586.

Vickerman, M. M., M. C. Sulavik, J. D. Nowak, N. M. Gardner, G. W. Jones, and D. B. Clewell. 1997. Nucleotide sequence analysis of the *Streptococcus gordonii* glucosyltransferase gene, *gtfG*. DNA Seq **7:** 83-95.

White, J. C. and C. F. Niven. 1946. *Streptococcus* S. B. E. : streptococcus associated with subacute bacterial endocarditis. J Bacteriol **51**: 717-722.

Willcox, M. D., M. Patrikakis, and K. W. Knox. 1995. Degradative enzymes of oral streptococci. Aust Dent J **40:** 121-128.