

氏名	英 保 裕 和
学位の種類	歯 学 博 士
学位授与番号	博 甲 第 915 号
学位授与の日付	平成 3 年 3 月 28 日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻 (学位規則第 5 条第 1 項該当)
学位論文題目	<b>Peptide Sequences for Sucrose Splitting and Glucan Binding within <u>Streptococcus sobrinus</u> Glucosyl-transferase (Water-Insoluble Glucan Synthetase)</b> ( <u>Streptococcus sobrinus</u> の不溶性グルカン合成酵素分子内の蔗糖加水分解能及びグルカン結合能を持つペプチド配列)
論文審査委員	教授 松村智弘      教授 加藤慶二郎      教授 谷口茂彦

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

### 【 緒 言 】

Mutans streptococci (齧蝕原性連鎖球菌) が菌体外に産生するグルカン合成酵素 (GTFs) は  $\alpha$ -1, 6 及び  $\alpha$ -1, 3 グルコシド結合を有する不溶性グルカン (ISG) を合成する。この ISG は歯面に付着し口腔内細菌の蓄積を促進するため, GTFs は歯垢形成及び齧蝕誘発に主要な役割を果たしていると考えられている。

近年 GTFs の ISG 合成機構に関して数多くの研究が成されてきた。Streptococcus sobrinus (Streptococcus mutans 6715) の ISG 合成酵素 (GTF-I) は, ISG 産生の条件として, プライマーとしての  $\alpha$ -1, 6 グルカンと蔗糖を共に基質として要求する。ISG 合成過程では, 蔗糖は酵素結合型のグルコース残基とフルクトースに解裂される。 $\alpha$ -1, 6 グルカン存在下では前者のグルコース残基がグルカン鎖のグルコース残基の C-3 位の OH 基に転移されることにより  $\alpha$ -1, 3 グルカンの鎖が伸長して ISG となる (GTF-I 活性)。ところが, プライマー非存在下ではグルコース残基は水に転移されるので, グルコースもフルクトースも共に遊離する (蔗糖加水分解活性)。

一方, GTFs 構造と機能の関係が生化学的あるいは分子生物学的的方法によって研究されている。Ferretti らは S. sobrinus MFe28 株の GTF-I の塩基配列を決定し, GTF-I 活性の発現に必須な  $\alpha$ -1, 6 グルカン結合領域が C 末端側 1/3 に存在すると報告している。しかし, N 末端側 2/3 の機能や C 末端側との機能上の関係は未だ明らかにされていない。

本研究は S. sobrinus 6715 株の GTF-I の一次構造を明らかにすると共に機能との関係を

探ることを目的とした。

#### 【材料と方法】

〔GTF-I遺伝子のクローニング〕 *S. sobrinus* 6715の染色体DNAをSau 3 AIで部分消化して得られた3～5 kb画分をベクタープラスミドpUC18に挿入し、*E. coli* JM109で発現ライブラリーを構築し、GTF-Iに対する家兎抗血清と反応するクローンを選択した。

〔制限酵素地図の作成〕陽性クローンの組替えプラスミドを各種の制限酵素で消化後アガロースゲル電気泳動を行って、DNAサイズを決定し、制限酵素地図を作成した。

〔塩基配列の決定〕挿入DNA断片をM13ファージにショットガンクローニングし、Sangerのdideoxy法で塩基配列を決定した。

〔Deletion mutantの作成〕組替えプラスミドを制限酵素およびexonuclease IIIとmung bean nucleaseで処理して、挿入DNAの3'末端側が欠損したdeletion mutantを作成した。

〔遺伝子産物の解析〕形質転換された大腸菌を超音波破碎して粗抽出物を作成し、発現ペプチドをSDS-PAGEによって検出した。また、発現ペプチドの蔗糖加水分解活性、 $\alpha-1,6$ グルカン結合能、およびGTF-I活性を測定した。

〔アミノ酸配列の相同性の解析〕*S. sobrinus* 6715のGTF-Iと*S. sobrinus* MFe28および*S. mutans* GS5のGTFのアミノ酸配列の相同性をシーケンス解析システム(DNASIS program)によって比較した。

#### 【結果・考察】

遺伝子ライブラリーによる形質転換体約5000コロニーから抗GTF-I血清と反応する5クローン(AB1～AB5)を分離した。発現ペプチドの分子量から全GTF-I遺伝子を含むと考えられるAB1の中央5.1kbの塩基配列を解析し、GTF-I遺伝子の塩基配列を決定した。GTF-Iのopen reading frameは4,776bp(1,592a.a.)から成っていた。5つの免疫学的陽性クローン(AB1～AB5)の発現ペプチドはすべて $\alpha-1,6$ グルカンが結合した。これらの発現ペプチドのうち、2つの大きなペプチドのみにGTF-I活性が認められた。そのひとつはGTF-Iペプチドの全長に渡る約1,600アミノ酸残基から成っており(AB1クローン)、他のひとつは全GTF-IペプチドのうちN末端側の約80アミノ酸残基とC末端側の約260アミノ酸残基が欠損していた(AB2クローン)。AB2クローンの部分欠損変異株の解析の結果、GTF-I遺伝子の3'末端側の欠損が増大するにつれて、グルカンに対する特異的結合能が蔗糖加水分解活性に先だって欠損すること、およびグルカンに対する特異的結合能が不溶性グルカン合成に必須であることが明らかになった。

#### 【結 語】

GTF-Iペプチドは、N末端側から順に蔗糖加水分解能を持つペプチド断片(約1,100アミノ酸残基)、グルカン結合能を持つペプチド断片(約240アミノ酸残基)、機能不明なペプチド断片(約260アミノ酸残基)の3つのペプチド断片により構成されている。

AB1クローンの塩基配列から決定したGTF-Iペプチドの一次構造と、*S. sobrinus*の他の菌株の相同タンパク質の一次構造との間に高い類似性が認められる。

## 論文審査の結果の要旨

本研究は、Streptococcus sobrinus 6715の不溶性グルカン合成酵素（GTF-I）の一次構造と機能の関係を調べたものである。

S. sobrinus 6715のGTF-I遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定した。また、GTF-I遺伝子の部分欠損変異体を構築し、発現ペプチドの機能を解析した。その結果GTF-Iの一次構造が、N末端側から順に蔗糖加水分解能およびグルカン結合能を担う各セグメントと、機能未同定のC末端側のセグメントの3つのペプチド領域から構成されていること、およびGTF-Iタンパク分子の全一次構造と、S. sobrinusの他の菌株のGTFタンパク分子の一次構造との間に高い相同性が認められることが明らかになった。

本研究の結果は齲蝕と関係深いS. sobrinusのGTF-Iの構造と機能の関係の解明に寄与した点で価値ある研究である。したがって、本論文は歯学博士の学位授与に十分値するものと判断された。