

氏名	小 西 法 文
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博乙第 2864 号
学位授与の日付	平成 7 年 3 月 25 日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者（学位規則第 4 条第 2 項該当）
学位論文題名	<u>Streptococcus sobrinus</u> 不溶性グルカン合成酵素の構造と機能
論文審査委員	教授 井上 清 教授 福井一博 教授 滝川正春

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

Mutans streptococciが蔗糖（ α -D-グルコピラノシル- β -D-フラクトフラノシド）を基質として産生する不溶性グルカンは歯牙の平滑面に強固に付着し、歯垢形成に重要な役割を果たしていると考えられている。このようなグルカン合成を触媒する酵素はグルコシルトランスフェラーゼ（GTF）と呼ばれ、 α -1,6グルコシル結合からなる水溶性グルカンを生成する酵素（GTF-S）と α -1,3グルコシル結合からなる不溶性グルカンを生成する酵素（GTF-I）に分類されている。一般に、GTFの反応は、基質となる蔗糖を分割するステップと、生じるグルコースを任意の受容体へ転移するステップから成る。GTF-Iの反応では、このグルコースの受容体として、 α -1,6グルカン（デキストラン）の存在が必須であり、デキストランは酵素内部にあるグルカン結合領域に保持されてグルコースを受け取ると考えられている。これまでの酵素構造の解析より、このグルカン結合領域は酵素蛋白質のC末端側に局在すること、蔗糖分解を触媒する領域はN末端側に局在することがわかっている。

本研究は、当初、GTF-Iの反応でのグルコース受容体の種類について詳細な検討を行うことを目的とした。しかし、研究の過程で、受容体が存在しない条件（蔗糖のみを含む条件）でも不溶性グルカン合成が起こることが判明してきた。この結果は、従来、指摘されてきたグルカン結合領域の重要性を支持しないと言える。そこで、*Streptococcus sobrinus* GTF-Iの蔗糖分解の領域とグルカン結合領域の両方を有するサブフラグメント（GTF-I'）と、蔗糖分解の領域のみからなるサブフラグメント（GS）を遺伝子工学的手法で調製し、両サブフラグメントの酵素活性をグルコース受容体が存在する条件と存在しない条件で詳細に検討することによって、GTF-I蛋白質の構造と機能の関係の再検討を試みた。

【方法】

1. 酵素： *S. sobrinus* の GTF-I gene を挿入したプラスミドで形質転換した大腸菌を培養し目的の酵素を生産させた。大腸菌細胞より回収した酵素画分は、通常のカラムクロマトグラフィーで精製した。

2. 酵素反応の解析：不溶性グルカン合成反応は、反応液の光散乱強度（波長 350 nm）の増加を測定して解析した。蔗糖分解とグルコース転移の反応は、反応で生じるフラクトースとグルコースを酵素法（ベーリンガー・マンハイム社、ドイツ）で定量して計算した。すなわち、遊離したフラクトース量を蔗糖分解量とし、遊離フラクトース量から遊離グルコース量を減じたものをグルコース転移量とした。また、グルコース転移量を蔗糖分解量で除して、グルコース転移効率を算出した。

3. 生成グルカンの分析：生成グルカンの分子量はゲル濾過法で測定した。また、グルカン糖鎖の結合様式は、¹³C核磁気共鳴スペクトルの分析、過ヨウ素酸酸化での過ヨウ素酸消費量の測定、そして酸加水分解産物のペーパークロマトグラフィー分析によって決定した。

【結果と考察】

1. プライマーが存在しない条件での不溶性グルカン合成：GTF-I' は、蔗糖を単独の基質とした条件で、肉眼的に判別可能な不溶性グルカンを合成した。この生成グルカンは重合度が 30 以上の α -1,3 グルカンであった。

2. α -1,3 結合糖鎖の効果：ニゲロースの添加によって、蔗糖分解反応とグルコース転移反応の両方が濃度依存的に促進した。グルコース転移効率に及ぼすニゲロースの効果は、グルコースの場合よりも大きいことから、 α -1,3 結合糖鎖の長いオリゴ糖ほど効果が強いことが考えられた。 α -1,3 結合糖鎖の伸張とグルコース転移効率の上昇は相互に影響を及ぼしながら、不溶性グルカンが合成されると推察される。

3. GTF-I' と GS の酵素特性の比較：グルカン結合領域が欠如している GS も GTF-I' と同様に、蔗糖単独から不溶性グルカンを合成した。また、ニゲロースにより GS の不溶性グルカン合成反応も促進された。蔗糖分解の領域には、ニゲロースなどの α -1,3 結合糖鎖と相互作用する領域が存在すると推察される。

【結論】

S. sobrinus 6715 株 GTF-I による不溶性グルカン合成では、酵素蛋白質の蔗糖分解の領域が中心的に働き、グルカン結合領域は付加的な構造であることが明らかにされた。

論文審査結果の要旨

Mutans streptococciが蔗糖を基質として産生する不溶性グルカンは、歯垢形成に重要な役割をはたしていると考えられている。本研究は、このようなグルカン合成を触媒する酵素である不溶性グルカン合成酵素（GTF-I）の蔗糖分解の領域とグルカン結合領域が、デキストラン非依存性の不溶性グルカン合成反応においてどのような働きをしているのか検討したものである。従来、GTF-Iによる不溶性グルカン合成反応には、基質である蔗糖とともにデキストランの存在が必須であると考えられてきた。これに対し本研究は、デキストランが存在しない条件でも不溶性グルカンが合成されることを見出し、蔗糖分解の領域とグルカン結合領域を有するサブフラグメント（GTF-I）とグルカン結合領域のみからなるサブフラグメント（GS）を遺伝子工学的に調製して、両サブフラグメントの酵素活性をデキストランが存在する条件としない条件で詳細に検討した。その結果、デキストラン非依存性の不溶性グルカン合成反応では蔗糖分解の領域が中心的に働き、グルカン結合領域は付加的な構造であることが明らかになった。

本論文は、GTF蛋白質の構造と機能の解明に寄与したものであり学位論文として価値あるものと認める。