

*Streptococcus sobrinus* 菌体表層タンパク質抗原の分子遺伝学的解析

徳田 雅行

鹿児島大学歯学部歯科保存学講座(1)

(指導：川越昌宜教授)

Molecular Characterization of a Surface Protein Antigen Gene  
from Serotype *g* *Streptococcus sobrinus*

Masayuki TOKUDA

Department of Operative Dentistry and Endodontology, Kagoshima University Dental School

(Director : Prof. Masataka KAWAGOE)

8-35-1, Sakuragaoka, Kagoshima 890, Japan

日本歯科保存学雑誌 第35巻 第6号

平成4年12月発行 別刷

Reprinted from Japanese Journal of Conservative Dentistry

Vol. 35. No. 6 (1992)

キーワード

・ *S. sobrinus*  
 ・ 菌体表層タンパク質抗原  
 ・ 塩基配列

## *Streptococcus sobrinus* 菌体表層タンパク質抗原の分子遺伝学的解析

徳田 雅行

鹿児島大学歯学部歯科保存学講座(1)

(指導: 川越昌宜教授)

(受付: 平成4年9月28日)

### Molecular Characterization of a Surface Protein Antigen Gene from Serotype *g* *Streptococcus sobrinus*

Masayuki TOKUDA

Department of Operative Dentistry and Endodontology, Kagoshima University Dental School

(Director: Prof. Masataka KAWAGOE)

8-35-1, Sakuragaoka, Kagoshima 890, Japan

(Received for Publication: September 28, 1992)

*Streptococcus sobrinus* is known as a major causative organism of human dental caries. A high-molecular-weight surface protein antigen (PAG) of *Streptococcus sobrinus* has been given much attention as a candidate of dental caries vaccine. The complete nucleotide sequence of the gene for PAG of *Streptococcus sobrinus* MT 3791 (serotype *g*) was determined. The gene consisted of 4,698 bp and encoded a protein of 1,566 amino acid residues. A putative signal peptide was found in the amino-terminal end of the protein. A potential promoter sequence and a putative Shine-Dalgarno sequence preceded the open reading frame. Two internal

repeating amino acid sequences were present in the PAG. One repeating region, located in the amino-terminal region, was rich in alanine, and the other, located in the central region, was rich in proline. Membrane-anchor region, located in the carboxy-terminal region, was constructed with hydrophobic amino acids.

The deduced amino acid sequence showed a high degree of homology with those of cell surface adhesions from *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*.

(Request original article reprints to Dr. TOKUDA)

析結果に基づいて7つの菌種に分類されており、8つの血清型(*a-h*)からなる。このなかでヒトのう蝕病巣から検出されるのは、主に *c* 型の *Streptococcus mutans* と *d/g* 型の *Streptococcus sobrinus* である<sup>1,2)</sup>。

ミュータンスレンサ球菌がう蝕を惹起するには、まず同菌が歯面に付着する必要がある<sup>1)</sup>。歯面に付着したミュータンスレンサ球菌は、複数のグルカン合成酵素(Glucosyltransferase: GTase)の作用により、ス

### 緒言

う蝕は、主にミュータンスレンサ球菌(*mutans streptococci*)と総称される一群のレンサ球菌によって引き起こされる<sup>1,2)</sup>。これら一群のレンサ球菌は、DNA-DNA ホモロジーやDNAのGC含量などの分

本論文の要旨は、第95回日本歯科保存学会秋季学会(平成3年11月29日、岡山)において発表した。

クロースから  $\alpha$ -1,3 結合と  $\alpha$ -1,6 結合からなる非水溶性グルカンを合成する。歯面上で合成された非水溶性グルカンは、ミュータンスレンサ球菌の歯面への付着をより強力なものにし、同菌を歯面上で蓄積させる<sup>3)</sup>。歯面上に定着したミュータンスレンサ球菌は、スクロースなどの糖を代謝して、乳酸などの酸を産生する。産生された酸によってエナメル質の脱灰が始まり、う蝕の発生へと結びつく。このようにミュータンスレンサ球菌によるう蝕の誘発には、多くの病原因子が関わっている。特に、同菌と歯面との相互作用は、う蝕研究の大きな課題のひとつとして、さまざまな角度から研究されている。

ミュータンスレンサ球菌の歯面への定着には、細菌ならびに生体側の双方に多くの因子が関与している。細菌側の因子としては、菌体表層に存在する各種の成分、すなわち、血清型多糖抗原、リポタイコ酸、GTase等の酵素タンパク質、各種の構造タンパク質抗原などが挙げられる<sup>4)</sup>。一方、歯のエナメル質には唾液中のいくつかの糖タンパク質が吸着し、ペリクルが形成されている<sup>5)</sup>。このように、ミュータンスレンサ球菌の成分とペリクルとの相互作用には多くの成分が関与しており、その実体については不明な点が多い<sup>6)</sup>。

ところで、これらのミュータンスレンサ球菌の菌体表層に存在する各種の成分のうち、分子量190,000~210,000のタンパク質抗原が強い抗原性をもつこと、さらにサルを用いた実験系で、う蝕抑制のためのワクチンとしても有効であることが報告<sup>7-11)</sup>されている。このような経緯から、現在同菌の菌体表層抗原のなかでも、特に高分子量タンパク質抗原がう蝕抑制のための有効な成分として注目を集めている。

このタンパク質抗原は、MORO<sup>12)</sup>やAYAKAWA<sup>13)</sup>の免疫電顕法を用いた観察で、ミュータンスレンサ球菌菌体上の微線毛状構造物を構成していることがわかった。一方、MCBRIDE<sup>14)</sup>は、ミュータンスレンサ球菌の一種、*c*型 *S. mutans* を用い、その継代培養株から菌体疎水性の低下したものを選び、いくつかの性状を親株と比較した。その結果、疎水性の低下した変異株では、このタンパク質が欠落していることを見出した。これは、同抗原がミュータンスレンサ球菌と歯面との間の疎水的相互作用に関わっていることを示唆するものである。さらにKOGA<sup>15)</sup>は、菌体疎水性の低下した継代培養株では本抗原のmRNAの発現量が低下していることを明らかにしている。しか

し、これらの疎水性が低下した継代培養株では、タンパク質抗原だけでなく、リポタイコ酸や他の菌体表層物質にも量の変化が起こっていることから、菌体疎水性を本抗原とだけ関連づけるべきではないと考える研究者もいる<sup>16)</sup>。

この他、本抗原に対する抗体が、多形核白血球による *S. mutans* の貪食を促進するという報告もある<sup>17)</sup>。この知見は、本抗原が抗食作用をもっていることを示唆するものである。

このように、ミュータンスレンサ球菌の高分子量タンパク質抗原はう蝕ワクチンの候補として注目されている<sup>18)</sup>だけでなく、歯面を主な棲息地とするミュータンスレンサ球菌と生体との相互作用の面からも興味深い研究対象となっている。

*c*型 *S. mutans* のタンパク質抗原は、研究者間で抗原B<sup>19)</sup>、IF<sup>20)</sup>、I/II<sup>21)</sup>、PI<sup>22)</sup>およびPAC<sup>23)</sup>などとさまざまな名称で呼ばれており、同抗原に対する遺伝子工学的研究は、この数年間で大きな進展をとげた。特にこれらのうちでも、抗原PACと抗原I/IIの全塩基配列<sup>24,25)</sup>は既に明らかになり、その分子構造も解明された。しかしヒトのう蝕病原菌として、*c*型 *S. mutans* について重要な *g*型 *S. sobrinus* のタンパク質抗原遺伝子の塩基配列は現在のところ部分的にしか報告されておらず、特にその機能的な側面はほとんど明らかにされていない<sup>26-28)</sup>。

そこで本研究では、まず *g*型 *S. sobrinus* MT 3791株の菌体表層タンパク質抗原遺伝子の全塩基配列を決定し、その一次構造の分子遺伝学的解析を行った。ついで、最近報告<sup>29)</sup>のあった *g*型 *S. sobrinus* 6715株のタンパク質抗原(SpaA)の解析結果と比較した。さらに、*S. sobrinus* 以外のレンサ球菌の菌体表層タンパク質のアミノ酸配列との相同性も検索した。

なお本研究では、血清型 *g* の *S. sobrinus* (*S. sobrinus* MT 3791株)由来のタンパク質抗原をPAG(protein antigen serotype *g*)と呼ぶことにする<sup>30)</sup>。

### 材料および方法

#### 1. 供試菌株およびプラスミド

菌株は、国立予防衛生研究所口腔科学部で継代保存されている *S. sobrinus* MT 3791株(血清型 *g*)を用いた。プラスミドベクターの宿主には、同研究所で継代保存中の *Escherichia coli* JM 109株<sup>31)</sup>、MC 1061株<sup>32)</sup>、MV 1184株(宝酒造、京都)およびXL-1 Blue

株(Stratagene, La Jolla, Calif., USA)を用いた。クローニング用プラスミドベクターとしては、pUC 118/119(宝酒造)と pBluescript II SK±(Stratagene)を用いた。

## 2. 抗原および抗体

タンパク質抗原(PAg)は *S. sobrinus* MT 3791 株の培養上清から、DEAE-Sephacel イオン交換クロマトグラフィーで精製した<sup>26,30</sup>。この精製 PAg をマウスおよびウサギに Freund 完全アジュバント(Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA)とともに筋肉内に注射し、抗 PAg 血清を得た<sup>30</sup>。

## 3. *S. sobrinus* MT 3791 株染色体 DNA 由来の pag 遺伝子を含むプラスミドクローンの選択

pag 遺伝子を含むプラスミドクローン pPG 21 は、古賀敏比古博士(国立予防衛生研究所口腔科学部)より恵与されたものを用いた。クローニングの方法を以下に簡単に記す。まず最初に *S. sobrinus* MT 3791 株から染色体 DNA を調製し<sup>23,33</sup>、これを制限酵素 *Sau* 3A I で切断後、プラスミドベクター pUC 19 の *Bam* HI 部位に入れ、*E. coli* JM 109 株に形質転換した<sup>34</sup>。得られた形質転換株の中からコロニーイムノプロット法<sup>35</sup>を用いて抗 PAg ウサギ血清に反応するクローンを選択し、ウエスタンイムノプロット<sup>36</sup>とゲル内沈降反応<sup>37</sup>で *S. sobrinus* 由来の PAg と免疫学的に同一の組換えタンパク質を発現しているプラスミドクローン(pPG 21)を得た<sup>26</sup>。

## 4. 制限酵素と反応条件

使用した制限酵素 *Pst* I, *Sal* I, *Hind* III, *Kpn* I, *Xba* I, *Xho* I, *Apa* I および *Sph* I は、宝酒造および東洋紡(大阪)から購入した。反応条件は、各試薬に添付された指示書に従った。DNA 1 μg に対し制限酵素 1~5 単位を目安とし、反応は 37°C, 1 時間とした。DNA を各制限酵素で切断後、0.8% アガロースゲル(SeaKem ME; FMC Corp., Philadelphia, Pa., USA)に添加して電気泳動した。泳動用緩衝液は Howly 緩衝液 [1 リットルの蒸留水中にトリス(和光純薬, 大阪)4.84 g, 酢酸ナトリウム 3 水塩(和光純薬)2.72 g, EDTA 3 Na(和光純薬)0.79 g を溶解後、pH 7.8 に調整] を使用した。泳動装置は、Mupid-2(コスモバイオ, 東京)を用いた。DNA 分子量マーカーは、λDNA/*Hind* III(東洋紡)を用いた。泳動終了後、臭化エチジウム(0.5 μg/ml; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo., USA)で染色し、紫外線照射下で赤色フィルターを使用して写真撮影した。

## 5. *E. coli* からのプラスミド調製

### 1) 少量調製

少量(1.5 ml 程度)の培養から迅速にプラスミドの検出を行う方法として、BIRNBOIM と DOLY の方法<sup>38</sup>を用いた。プラスミドの入った *E. coli* を、アンピシリン(50 μg/ml)を含む LB 培地 [バクトトリプトン(Difco)10 g, 酵母エキス(Difco)5 g, NaCl 5 g を 1 リットルの脱イオン水に溶解後、pH 7.2 に調整] 中で 37°C 一晩培養した。得られた菌液 1.5 ml をマイクロチューブにとり、10,000×g, 5 分間遠心した。遠心後、菌液をリゾチム液(2 mg/ml リゾチム, 50 mM グルコースおよび 10 mM EDTA を含む 25 mM トリス塩酸緩衝液; pH 8.0)0.1 ml に懸濁し、4°C, 5 分間反応させた。ついでこれに、0.2 M NaOH を含む 0.1% ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)溶液を 0.2 ml 加え、4°C で 10 分間放置したのち、3 M 酢酸ナトリウム(pH 4.8)を加え、さらに 4°C で 10 分間放置した。これを遠心して、得られた上清 0.4 ml に冷エタノール 1 ml を加えて 4°C にて 10 分以上放置した。遠心して回収したプラスミドに 0.1 M 酢酸ナトリウムを含む 50 mM トリス酢酸緩衝液(pH 7.0)0.4 ml を溶かし、再度エタノール沈澱を行った。沈澱を 70% エタノールで洗ったのち、真空乾燥し、0.1 ml の TE 緩衝液(1 mM EDTA を含む 10 mM トリス塩酸緩衝液; pH 7.5)に溶解した。

### 2) 大量調製

プラスミド DNA を用いて行う遺伝子の解析には、比較的大量の DNA が必要である。純度の高いプラスミドを得るために、SASAKAWA ら<sup>32</sup>の記載に従い、大量調製を行った。プラスミドの入った *E. coli* をアンピシリンを含む LB 培地 250 ml 中で 37°C, 18 時間培養し、遠心して菌体を集めた。この菌体を 5 ml の 25% スクロースを含む 50 mM トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)に懸濁し、0.05 ml のリボヌクレアーゼ A (5 mg/ml, Sigma)と 0.5 ml の リゾチム(10 mg/ml)を加えて 4°C, 5 分間反応させた。これに 2 ml の 0.25 M EDTA(pH 8.0)を加えて 4°C で 10 分間放置し、さらに 8 ml のトリトン溶液(0.1% トリトン X-100 および 0.6 mM EDTA を含む 50 mM トリス緩衝液; pH 8.0)を加えた。4°C で 15 分間放置後、遠心して不溶物を除き、上清に 1/9 容量の 5 M NaCl と 0.313 容量の 42% ポリエチレングリコール 6,000(和光純薬)溶液を加え、DNA を沈澱させた。4°C, 18 時間放置したのち、遠心して沈澱を回収し、0.5 M NaCl

および 50 mM EDTA を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液(pH 8.0)4 ml に溶かした。これに 3.6 g の塩化セシウム(和光純薬)と 0.3 ml の臭化エチジウム(10 mg/ml)を溶解し、Beckman SW 50.1 ローターを装着した Beckman L 8 M 超遠心機で 200,000×g, 40 時間遠心した。超遠心後、プラスミドのバンドを紫外線下で確認し、注射器を用いて回収した。イソプロピルアルコール抽出で臭化エチジウムを除き、これを TE 緩衝液に対して透析した。回収後、UV 260 nm で計測し DNA 濃度を算定した。

## 6. 一方向欠失変異遺伝子の作成

プラスミドクローン pPG 21(図 1)には、*S. sobrinus* MT 3791 株染色体由来の pag 遺伝子を含む 5,800 塩基対からなる DNA 断片が入っていた。これを制限酵素 *Pst* I, *Sal* I, *Hind* III および *Kpn* I で 4 つの断片に切断後、それぞれをプラスミドベクター pUC 118/119 と pBluescript II SK± に連結し、*E. coli* MC 1061 株に導入した<sup>34</sup>。一方向欠失変異遺伝子の作成には、HENIKOFF の方法<sup>39</sup>をもとにしたキロシークエンス用デレクションキット(宝酒造)を用いた。サブクローニングしたプラスミドを、上述の方法<sup>32</sup>で精製した。プラスミド 10 μg を同キットの指示に従い、制限酵素 *Xba* I, *Kpn* I, *Xho* I, *Apa* I, *Sal* I および *Sph* I で切断した。DNA を含む溶液を TE 緩衝液で飽和したフェノールとクロロホルムで各 1 回ずつ抽出した。水層を別の遠心管に移し、2.5 倍量のエタノールを加えて DNA を沈澱させた。これを遠心して回収し、さらに 70% エタノールで洗浄したのち真空乾燥した。この DNA を上記キットのエキソヌクレアーゼ III 緩衝液(0.1 ml)に溶かし、180 単位のエキソヌクレアーゼ III を加えた。1 分毎に 10 μl ずつ反応液を汲み出し、別に用意した同キットの Mung Bean ヌクレアーゼ用緩衝液(0.1 ml)に移した。65°C, 5 分間加熱して反応を止め、50 単位の Mung Bean ヌクレアーゼを入れて、37°C, 60 分間反応させた。反応終了後、上述のようにフェノールおよびクロロホルム抽出、エタノール沈澱を行い DNA を回収した。これを同キットの Klenow 酵素用緩衝液(50 μl)に溶解させ、2 単位の Klenow 酵素を加えて、37°C, 15 分間反応させた。反応終了後、エタノール沈澱を行い真空乾燥させたのち、40 μl の TE 緩衝液に溶かし、その 10 μl を T4 DNA リガーゼによる反応に用いた。反応後の DNA を *E. coli* MV 1184 株および XL-1 Blue 株に導入し<sup>34</sup>、アンピシリン(50 μg/ml)を含む LB 寒

天培地で形質転換株を選択した。得られた形質転換株のプラスミドを上述の方法<sup>38</sup>で抽出し、適当な制限酵素で切断後、アガロース電気泳動によって得られた各々のプラスミドの大きさを判定した。その結果、各断片ごとに両向きに約 100 塩基対ずつ長さの違う一方向欠失変異遺伝子群を得ることができた。

## 7. アミノ酸シークエネーターによるアミノ酸配列決定

*S. sobrinus* MT 3791 株の精製 PAg (50 μg) を、SDS-ポリアクリルアミド上で電気泳動(SDS-PAGE)した。SDS-PAGE は、分離用ゲルとして 7.5% ポリアクリルアミドゲルを、濃縮用ゲルとして 3% ポリアクリルアミドゲルを使い、LAEMMLI の方法<sup>40</sup>に従って行った。試料の電気泳動は 20 mA で行った。分子量マーカーには、低分子量用および高分子量用電気泳動キャリアレーションキット(Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)を用いた。泳動終了後、ゲルに Polyvinylidene difluoride(PVDF)メンブレン(Millipore Corp., Bedford, Mass., USA)を重ね、前後から濾紙、スポンジおよびプラスチック板でサンドイッチ状に圧接し、60 mA で終夜通電してゲル内のタンパク質を PVDF メンブレンに転写した。プロット法は、BURNETTE<sup>36</sup>の記載に従った。転写後のメンブレンをクマシーブリリアントブルー R 250 (Sigma)で染色し、PAg のタンパクバンドを切り出し、アミノ酸分析に用いた。N 末端アミノ酸配列の分析は、アミノ酸シークエネーター(モデル 470 A, Applied Biosystems, Forester City, Calif., USA)によって行った。

## 8. 塩基配列決定法

### 1) 一本鎖 DNA の調製

前述の一方向欠失変異遺伝子が入った *E. coli* を、アンピシリン(150 μg)とチアミン(0.01%)を含む 2×YT 培地(バクトトリプトン 16 g, 酵母エキス 10 g, NaCl 5 g を 1 リットルの脱イオン水に溶解後、pH 7.6 に調整)で、37°C, 18 時間前培養した。3 ml の 2×YT 培地にこの前培養液 30 μl を接種し、さらに培養を続けた。550 nm の吸光度が 0.2~0.3 になった時点で、ヘルパファージ M13 KO7(10<sup>10</sup> plaque forming unit/ml; 宝酒造)30 μl を加えた。37°C, 30 分間培養したのち、70 μg/ml となるようにカナマイシン硫酸塩(和光純薬)を加え、さらに 37°C, 18 時間培養した。

培養液を遠心(8,000×g, 5 分間)して得た上清

1 ml を別のマイクロチューブに移した。これに、0.2 ml の 20% ポリエチレングリコール 6,000 を含む 2.5 M NaCl を加え、20°C、15 分間静置した。遠心して得た沈澱を 0.1 ml の TE 緩衝液に溶解した。これをフェノールとクロロホルムで抽出し、エタノール沈澱を行って一本鎖 DNA を得た。

2) 塩基配列決定

塩基配列の決定には、Sequenase Ver. 2.0 キット (United States Biochemicals Corp., Cleveland, Ohio, USA) を用いた。これは、SANGER のジデオキシ法<sup>41)</sup>をもとにした MIZUSAWA らの改良法<sup>42)</sup>によるもので、方法はキットの指示書に従った。マイクロチューブに 5  $\mu$ l (1  $\mu$ g) の一本鎖 DNA、2  $\mu$ l の濃縮緩衝液、1  $\mu$ l のプライマー溶液および蒸留水を加えて、全量を 10  $\mu$ l とした。これとは別のマイクロチューブに、4 種類のデオキシヌクレオチド混合溶液をそれぞれ 2.5  $\mu$ l ずつ分注しておいた。上記の一本鎖 DNA プライマー混合溶液に、0.5  $\mu$ l の [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S] デオキシシチジン 3 リン酸 (10 mCi/ml; アマシヤム・ジャパン, 東京) と 2  $\mu$ l (2 U) の Sequenase 希釈液を加え混合したのち、3.5  $\mu$ l ずつ 4 種類のデオキシヌクレオチド溶液を加えた。37°C、5 分間反応させたのち、同キットの反応停止液 (95% ホルムアミド、20 mM EDTA、0.05% プロムフェノールブルー、0.05% キシレンシアノール FF) 4  $\mu$ l を加えた。

ついで、試料を 95°C、3 分間加熱したのち氷冷し、ただちに電気泳動に用いた。電気泳動用ゲルは、8% および 6% アクリルアミドゲルを用い、フジ水冷式電気泳動装置 (GW 2040; 富士写真フィルム, 東京) に装着して泳動を行った。試料は 2  $\mu$ l ずつ重層し、2,500 V で 3 時間泳動した。泳動終了後、ゲルを

10% 酢酸を含む 12% メタノール溶液で 10 分間洗浄し、濾紙に密着させ、ゲル乾燥機 (アトー AE 3700; アトー, 東京) で乾燥させたのち、サラップラップをかけ X線用フィルム (コダック X-Omat AR; Eastman Kodak, Rochester, N.Y., USA) を用いて、-70°C で 18 時間オートラジオグラフィーを行った。

3) PAg 分子の構造解析

塩基配列の解析には、DNASIS ソフトウェアパッケージ (日立ソフトウェアエンジニアリング, 東京) を使用した。疎水性プロットは、KYTE と DOOLITTLE の方法<sup>43)</sup>により、ポリペプチド中の各アミノ酸残基固有の疎水性度をもとにして表示した。タンパクの二次構造の確定には、CHOU と FASMAN の方法<sup>44)</sup>を用いた。これは、X線結晶構造解析されたタンパク質の二次構造のデータに基づいて、あるアミノ酸配列がどのような二次構造をとるかを推定するものである。

4) 各タンパク質間のアミノ酸配列の相同性解析  
アミノ酸配列の相同性の解析には、同じく DNASIS ソフトウェアパッケージを使用した。これは、NEEDLEMAN と WUNSCH<sup>45)</sup> の記載に従ったものである。すなわち、比較するアミノ酸配列を最大限に一致するように並べて、一致したアミノ酸残基の割合をパーセンテージ (%) で表した。

結果

1. *S. sobrinus* MT 3791 株染色体 DNA 由来の *pag* 遺伝子を含むプラスミドクローン pPG 21 (pPG 21<sup>26)</sup>) の制限酵素地図を図 1 に示す。*S. sobrinus* MT 3791 株染色体 DNA 由来の *pag* 遺伝子を含む挿入断片の大きさは 5,800 塩基対 (base pairs, bp)

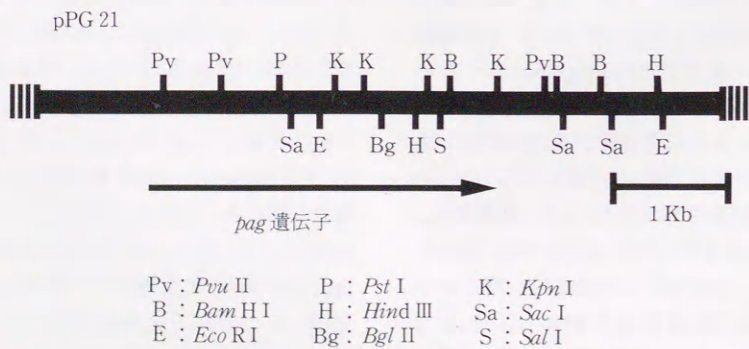


図 1 pPG 21 の制限酵素地図

太線(■)は *S. sobrinus* MT 3791 株由来の 5,800 塩基対からなる断片。破線(III)はプラスミドベクター pUC 19。各制限酵素を、上のように略して示した。

```

1  AGCTGTCACCATTTCTCAGCAAAGCTCTCTTTGACATGGTATGACGATATCGTTTAATTCAAGCAGATTAAATAGCTCCAGGAACTTCAA
103  ATAAAACGAAATAAACTGAAATTTTTTATAAAGCGTAGATTAAGCAATCGTTTGCAATGACAATCAGTAGAAGTGTTATTAGATAGATTGTAACGA
205  AACATTTCAGATGTTACAAAATGTAATTTGGAGGGAATTATAATATGCAACGAAAGAGACTTTTGGGTTTCGCAAAGTAAAACAGTAGGACCTTTGT
1  SD M Q R K E T F G F R K S K I S R T L C
307  GGTGCCTTACTAGGAAGTCTATCTTAGCGCTGTAACAGGTCAAAAGGCGCTCGTGAAGAAACAAGTACCACTTCAACTTGGGCGGTTAATACCGCAGCTC
20  G A L L G T A I L A S V T G Q K A L A E E T S T T S T S G V N T A V
409  GTTGGGACGGAGACTGGGAATCCCGCCACCACTGCTGACAAAAGAGCAATCCAAGTTCGCAAGCCGAGACAAGTCAAGCCCAAGCGGTTCAAAAGACA
54  V G T E T G N P A T N L P D K Q D N P S S Q A E T S Q A Q A G Q K T
511  GGGCAATGTGAGTGTGTACTAAGTGTGACGAGCTGACGAAAGTCAAAAGTCCCAAGCAAGCTGGTGACCGTTCCGAGGATGCTACCGTCAATAA
88  G A M S V D V S T S E L D E A A K S A Q E A G V T V S Q D A T V N K
613  GGGCAGTAGAACTTCTGACGAAAGTAAACCAAAAAGAAACGAAATCAAGGATGACTACAGCAAGCAAGCAGCAGCAGCATCCAAAAGCAACAGAGACTAC
122  G T V E T S D E A N Q K E T E I K D D Y S K Q A A D I Q K T T E D Y
715  AAGGACAGTGTGTGCTAACCAAGCCGAACAGCAGCAATCACTCAAGAAAACCGCGCTAAGAAGCCCAATACGACAAGATTTGGCGCCCAACAGGCA
156  K A A V A A N Q A E T D R I T Q E N A A K K A Q Y E Q D L A A N K A
817  GAAGTGGACGCAATTACCAATGAGAATGCGCAAGCGAAGGCTGATTACGAAGCTAAGTGGCTCAATCAAAGGACCTAGCAGCCTTCAACAAGCTAAT
190  E V E R I T N E N A Q A K A D Y E A K L A Q Y Q K D L A A V Q Q (A N
AI
919  AATGACAGTCAAGCAGCTACGCTGCGCCGCAAGGAGCTACGACAAGAAATTGGCTCGGTTCAAGTCTAATGCCGCTGCTAAGAAGAATAACGAAGAG
224  N D S Q A A Y A A A K E A Y D K E L A R V Q A A N A A A K K E Y E E
1021  GCTTACAGTCCAAACCCTAAGAATGAGCAATCAAGGAGCAAAAAGCGGCTTCCAGCAACCGAATGCCAAGCTAAGGCAAGTACGAAAGCCAAAGTGG
58  A L A A N T T K N E Q I K A E N A A I Q Q R N A Q A K A D Y E A K L
1123  GCTCAATAGAAAAGATTTAGCGCAGCCAGCTGGTAACTGCTACAATGAAGCGGACTACCAAGTAAAGAGGAGCTTAAGAACAGGTTAGCGCAGC
292  A Q Y E K D L A A A Q S)(G N A T N E A D Y Q A K K A A Y E Q E L A R
AI
1225  GTGCAAGCCGCTAATGCAAGTGCAGCAAGCGCTACGCAAGCTGACTGCAACAGCCGCAAGCAAGCAGCAGCTTAAGAACAGGTTAGGCTATCCAG
326  V Q A A N A A A K Q A Y E Q A L A A N T A K N A Q I T A E N E A I Q
1327  CAGCGCAATGCGCAAGCTAAGGCTAACTAAGAGTAAATAGCCCAATCAAAGGATTTGGCCGAGCTCACTGTTAAGCAGCCTAATGAGCGCAGC
360  Q R N A Q A K A N Y E A K L A Q Y Q K D L A A A Q S)(G N A A N E A D
AIII
1429  TACCAAGAAAATTAGCAGCCTAAGAAAAGAACTGGCTGCTGCAAGCAGCAATGCCGCTGCAAGCAAGCAATGAGCAGAAAGTCAAGCAAGCTAAT
394  Y Q E K L A A Y E K E L A R V Q A A N A A A K Q E Y E Q K V Q E A N
428  GCTAAAATGCCGAAATACGGAAGCAACCGTGTACTCGGTAACTCAAAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAGCAAG
530  A K N A E I T E A N R A I R E R N A K A K T D Y E L K L S K Y Q E E
1633  CTTGCTCAGTACAAGAGGCACTGCGGAAATACCAGCAACTCAAGCCTATCAAGTGAACAAGCCGCAATCAAGGCAAGCTGGAAGAGTTGGAAGAA
462  L A Q Y K K) D L A E Y P A K L Q A Y Q D E Q A A I K A A L E E L E K
1735  CACAAGAAGTGAAGTGGGAACCTCAGTGGCCCTCAGCCGAGCTGTGGTCTATGACTTGGAGCCCAATGCTCAGATTTCCCTAGTCAGGATGGGAAGCTA
496  H K N E D G N L S E P S A Q S L V Y D L E P N A Q I S L V T D G K L
1837  CTGAAAGCCTCCGCCCTTGTAGAACCTTGTAGCAGGACTACCAACAATAACAACAACAACCTGCAAGCAGATAATCTAATAAATCTCTGAGCAG
530  L K A S A L D E A F S H D T E Q Y N K H N L Q P D N L N I T Y L E Q
1939  GCTGATGATGTGGCCTCTCAGTGAAGCTTGTGTAATTTGGTGATAAGGCTGGTGGCAACCACTGTGCAAGTGGTTCAGAAAGTAAAGTTGCTCT
564  A D D V A S S V E L F G N F G D K A G W T T T V S N G S E V K F A S
2041  GTCCTCCTCAGCGGTGGCCAGAGTGCTACAGCCACCTATAACCACTGAAAACCTCTACTACAATGGTAAGAAATTTCAAGGTTGCTACAAGTATACG
598  V L L K R G Q S A T A T Y T N L K N S Y Y N G K K I S K V V Y K Y T
2143  GTTCAACCCTGACTCCAAAGTTTCAAAATCTACTGGAAGCTTTGGTTAGGATCTTACTGACCAACCTTAGGGGCTTTGCTCAGCCTATACGGGTCAA
632  V D P D S K F Q N P T G N V W L G I F T D P T L G V F A S A Y T G Q
2245  AACGAGAAGGATAACCTATCTTATCAAGAATGAATCACCTTCTACGATGAAGAGGTAATCCCATCGACTTTGATAATGCCCTTGTGTCAAGTGGCCTC
666  N E K D T S I F I K N E F T F Y D E D G N P I D F D N A L L S V A S
2347  CTTAACAGGGAAACACAATTCCATTGAGATGAGCCAGGACTACAGCGGTACCTCGTTAAGATTTCTGGCTCATCATTGGTGAACAAAATGGATGATCTAT
700  L N R E H N S I E M A K D Y S G T F V K I S G S S I G E K N G M I Y
2449  GCGACCGACCCCTCAACTTAAAAAGGGTGAAGCGGTTCCCTTACACCAATGATACCCAGAGCAAGTGAGCTGGTTGAGGTTGGGACTTGTGTGATG
734  A T D T L N F K K G E G S L H T M Y T R A S E P G S G W D S A D A
2551  CCTAATCTTGGTATGGTGTGGTGTGCTGAGAATGTCGGGCCAAACACATCACTTTGGGGCAACCTCAGCGACCAATGTTCTCAGCCTAGCTGAA
768  P N S W Y G A G A V R M S G P N N Y I T L G A T S A T N V L S L A E

```

図 2 *pag* 遺伝子の塩基配列とそれから推定されるアミノ酸配列  
アミノ酸は、一文字で表示した。下線-35 と-10 はプロモーターと考えられる領域。下線 SD は Shine-Dalgarno 配列。矢印(↑)はシグナルペプチドの切断位置と考えられる位置。2つの繰り返し領域はカッコで示した(A I, A II, A III および P I, P II, P III)。終止コドン(★)下流のターミネーター様配列を矢印(→)で示した。

2653 ATGCCACAGGTACCTGGTAAAGATAACTGCTGGTAAAAACCAATATCTGGTATCCCTTAATGGTAAAGTTCGGGCAGTCAATGTCCCTAAGGTGACC  
802 M P Q V P G K D N T A G K K P N I W Y S L N G K I R A V N V P K V T

2755 AAGGAAAACCAACCCACAGTTGAGCCAACAGCCAGCAGCAGTCTATGAAGTTGAGAAGGAATGGTAGATCTGCCAGTTGAACCAAGTACGAA  
836 K E K P T P P V E P T K P D E P V Y E V E K E L V D L P V E P S Y E

2857 AAGGAACCAACCAACCAAGCAAGCTCCAGACCAAAATATCCAGACAAACCCAGTAGAGCTCTATGAGTTGAAAAGGAGTGAACCGGCACAGCT  
870 K (E P T P P S K T P D Q N I P D K P V E P T Y E V E K E L E P A P V  
PI

2959 GAGCCAAGCTACGAAAAGGAAACCAACCCAGCAAGCAAGCTCCGGATCAAGCAGTCCAGACAAACCCAGTAGAGCAACCTATGAGTTGAAAAGGAGT  
904 E P S Y E K)(E P T P P S K T P D Q A I P D K P V E P T Y E V E K E L  
PII

3061 GAACCAAGTACCTGAGAACCAACTACGAAAAGGAAACCAACCCAGCCTCAGTCAACCCAGACCAAGAAAGCCACCAACCGGTGAACCAAGTACCAA  
938 E P V P V E P N Y E K)(E P T P P Q S T P D Q E E P T K P V E P S Y Q)  
PIII

3163 AGCTTCCAACCCACCAAGTGGCAGCAGCTTATGAAAAGGTTCTGGTCTGTGAGTGTGCAACCGGTCGGTACCCTACTATAAAGTAGCGGTCAACCC  
972 S L P T P P V A P T Y E K V P G P V S V P T V R Y H Y Y K L A V Q P

3265 GGCCTCACCAGGAAATCAAAACCAAGGATGACCTGGATTTGACAAGACCTGGTGGCTAGCAGTGCAGCGGTAAGTCCAATTGAAGCAGCAGCAGCTG  
1006 G V T K E I K N Q D L D I D K T L V A K Q S T V K F Q L K T A D L

3367 CCAGCGGTGCTCCAGAACGACCTCTTTGCTGATGGATCCTGCAAGCGGTTACCACTTAATCGGAAGTACCAAGTGCAGCGCCAGCGCTTT  
1040 P A G R P E T T S F V L M D P L P S G Y Q L N L E A T K V A S P G F

3469 GAAGTAGCTATGATCCATGACCCATACGGTAACTTACCGCAACCGCTGAGACTTGGCGGCTCAACAGGATGACCAAGGCCGTGGCGACTATC  
1074 E A S Y D A M T H T V T F T A T A E T L A A L N Q D L T K A V A T I

3571 TACCAACAGTTGGGCAAGTCTCAACGATGGCGTACCTACCAATAAATCCACCTGATGGTCAATGATCGTTACGTTAATAATCAATATCGTT  
1108 Y P T V V G Q V L N D G A T Y T N N F T L M V N D A Y G I K S N I V

3673 CGCGTACACACAGGAAACCTAACGACCCAGACCAACCAAGCAACCTACATCAACCCGCAAGGTCACCAAGTAAAGAACCGGTGGTATTGAT  
1142 R V T T P G K P N D P D N P S N N Y I T P H K V N K N E N G V V I D

3775 GGTAAAGTCCGCTAGCTGATCCACCACTACTATGAATGACTTGGGACCTGGACCAATACAAGGGGATAAATCGGCAAGGAGACCAATCAAAAGG  
1176 G K S V L A G T T N Y Y E L T W D L D Q Y K G D K S A K E I K S N I G

3877 TTCTTATGTGGTACTATCTGAAGAAGCGCTGACTTGGCAGCAGCTGATTAAGCTGACCGATGCCAAGCGGCTCACTGGTGTGAGCGT  
1210 F F Y V D D Y P E E A L D L R T D L I K L T D A N G K A V T G V S V

3979 GCTGACTACGCCAGTCTGGAGGCGCAGCAGCTGTTCAAGACATGCTCAAGAGGCGCAACATTACCCTAAGGAGCCTTCAAGTCTTACCGCTGAC  
1244 A D Y A S L E A A P A A V Q D M L K K A N I T P K G A F Q V F T A D

4081 GATCCTCAGGCTTCTACGATGCTATGGTTACCGAACTGACCTGACCTGCTCACTCCAAATGACGGTCAAGGCTGAGATGGGCAAGTCCGGTGGT  
1278 D P Q A F Y D A Y V V T G T D L T I V T P M T V K A E M G K I G G S

4183 TATGAAAACAGGCTACGATGACTTGGTAAAGGCTATGAATCAATATTGATTAACAATGTCGCGCAAAATCAATCTGAAAAGGATGACCTG  
1312 Y E N K A Y Q I D F G N G Y E S N I V I N N V P Q I N P E K D V T I

4285 ACCATGGATCCAGCGGATAGTACCAATGGATGGACAGACCATCGCCCTCAATCAGGCTTTAACTACCGTCTCATCGGTGGTATCATTCCAGCGGACCAT  
1347 T M D P A D S T N V D G Q T I A L N Q V F N Y R L I G G I E P A D H

4387 GCCAAGAGCTCTTGGATACGCTTACGATGACTATGACCAAACTGGAGACCATACAGCGGCAATACAAGGCTTGGCAAGGTTGACCTGACCTC  
1380 A E E L F E Y S F S D D Y D Q T G D Q Y T G Q Y K A F A K V D L T L

4489 AAGGATGGTACAATCAAGGCGGGTACTGACTTACTATATACAGAAGCGCAAGTTGATGAAGATTAAGGCAAAATGGTGGTACCTCAAGGAAGAT  
1414 K D G T I I K A G T D L T S Y T E A Q V D E A N G Q I V V T F K E D

4591 TTCTTGGCTGTGTGTGACTCGGCTTCAAGCGGAAGTCTACCTACAGATGAAGCGGATAGCGGTCGGGACCTTGGCAATACCTATGCAATACG  
1448 F L R S V S V D S A F Q A E V Y L Q M K R I A V G T F A N T Y V N T

4693 GTCAATGGAATACCTATAGCTTAATACGGTAAGGACCGACACAGCAGCGCAAGTCAAGTGGATCCTAAGACCACTACTACGCTAGTCTTC  
1482 V N G I T Y S S N T V R T S T P E P K Q P S P V D P K T T T T V V F

4795 CAGCCTGTCAGGCAAGGCTTATCAGCCAGCGCGCAGCAGGAGCTCAATTGCGCAGCCAGGGGATAGTAAATGCTTACCTGCCACTTTAGGCTC  
1516 Q P R Q G K A Y Q P A P P A G A Q L P A T G D S S N A Y L P L L G L

4897 GTAAGCTGACTGCTGGCTTACGCTGTTAGGACTGCGCGGAAAGCAGGACTAAGAATCCAACAAGAAAATGGGAAAGTTGCTTCTCATTTTTAT  
1550 V S L T A G F S L L G L R R K Q D \*

4999 ATCCCAAGCTAGCTGAGTAGTCAAGAAGTACTCTTAGAAAACCTAGAGAACATTAGCTAACTTTTCCAAACCGATAGATGTTATTTTAGTCAAGTATGG

図2(つづき)

であり、タンパク発現の方向は右向きであった。pPG 21を含む形質転換株 *E. coli* JM 109(pPG 21)の菌体抽出成分を SDS-ポリアクリルアミド電気泳動で調べたところ *E. coli* JM 109(pPG 21)が発現している PAg の分子量(210,000)は、*S. sobrinus* PAg の分子量<sup>30)</sup>とほぼ同じ大きさであることがわかった。

2. pag 遺伝子の塩基配列

pPG 21 を 4 つの断片に分け、それぞれセンス側、アンチセンス側の両方向から塩基配列を決定した。図

2 に pag 遺伝子を含む 5,100 塩基対よりなる塩基配列を示した。pag 遺伝子に対応するタンパク質をコードしている領域(open reading frame)は、250 番目の ATG 開始コドンから、4,948 番目の TAA 終止コドンまでで、その大きさは 4,698 塩基対であった。ATG 開始コドンの 10 塩基上流には、Shine-Dalgarno(SD)配列<sup>46)</sup>とみられる GGAGG 配列が認められ、さらに Pribnow 配列(-10 領域)および-35 領域<sup>47)</sup>(以上、プロモーター領域)がその上流に存在していた

124 ATTTTTTTTAAAGCCTAGATTAAGCAATCGTTTTCATTTGACATCACT 171  
-35  
172 AGATAAGTGTATATAGATAGTATTTGTAACGAAACATTTTCAGATGTT 219  
-10  
220 ACAAAAATGTAATTTGAGGGAATTAATATGCAACGAAAAGAGACT 267  
1 SD (M Q R K E T 6  
268 TTTGGGTTTCGAAAAGTAAATCAGTAGGACCTTTTGGTGCCTTA 315  
7 F G F R K S K I S R T L C G A L 22  
316 CTAGGAACCTGCTATCTAGCGTCTGTAACAGGTCAAAGGCGCTGCT 363  
23 L G T A I L A S V T G Q K A L A 38  
364 GAAGAACCAAGTACCACCTCAACTTCGGGGTTAATACCGCAGTCGTT 411  
39 E E T S T T S T S G V N T A V V 54

図3 N末端の位置とその特徴

下線-35と-10はプロモーター配列。下線SDはShine-Dalgarno配列。シグナルペプチドと考えられる領域をカッコで示した。下線EETSTはアミノ酸シークエネーターで求めたアミノ酸配列。

(図2)。-35領域は転写酵素であるRNAポリメラーゼが認識する配列で、mRNAの合成開始点の約35塩基上流に存在し、その配列は一般にTTGACAである。Pribnow配列は、-35領域を認識したRNAポリメラーゼが実際に結合する領域であり、mRNAの合成開始点の約10塩基上流にあり、多くはTATA-ATのような配列をしている(図3)。またTAA終止コドンの下流には、ターミネーター様配列をした転写の終点と考えられる領域が存在した(図2)。一般に、終止コドンの下流には、ヘアピン構造をとれるような回文配列(palindrome)が存在し、これがRNAポリメラーゼの転写終結シグナルとなる。

3. PAgのアミノ酸配列とその構造

塩基配列から推定されるPAgのアミノ酸配列を、塩基配列と同時に示した(図2)。pag遺伝子がコードするタンパク質は、1,566アミノ酸からなる分子量170,202のポリペプチドに相当した。このアミノ酸配列の正当性を確認するために、前述した精製 *S. sobrinus* PAgのN末端アミノ酸配列の一部をアミノ酸シークエネーターで決定したところ、塩基配列から求めたアミノ酸配列の39番目から43番目(Glu-39~Thr-43)と一致していた(図3)。Met-1からAla-38までのアミノ酸配列には、グラム陽性菌のシグナルペプチドの特徴が認められた。すなわち、N末端側に塩基性アミノ酸が多く、その後には疎水性アミノ酸が並んでいた。さらにアラニンのカルボキシル基側で切断されることも多くの報告<sup>48,49)</sup>と一致した。アミノ酸シークエネーターによる分析結果と併せて考えると、Met-1からAla-38までがシグナルペプチドであると推定された(図3)。

PAg構成アミノ酸の自己相同性プロット(図4)の結果から、PAg分子中には2ヵ所の繰り返し領域、

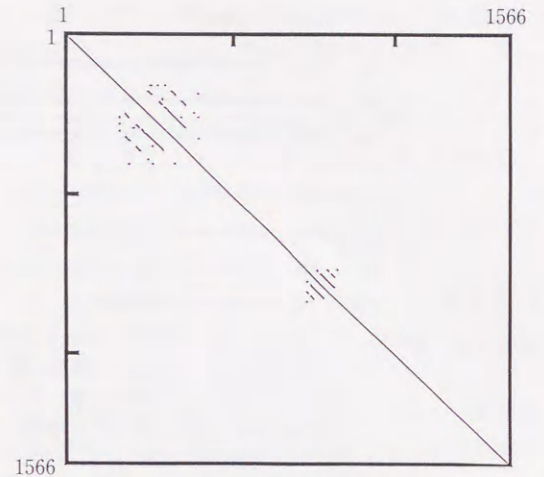


図4 PAgのアミノ酸配列の自己相同性プロット 縦軸、横軸ともPAgのアミノ酸配列を示す。数字はアミノ酸残基数。10個のアミノ酸のうち8個が一致する箇所が点で現われる。

すなわちA-リピート領域とP-リピート領域が存在することが明らかになった。A-リピート領域は、N末端側に存在し、82アミノ酸残基からなる構造単位が3つ(AI, AII, AIII)並んでいた(図5)。この領域にはアラニンが多く含まれ、この領域の全アミノ酸の30%を占めていた。一方、P-リピート領域は、PAgの中央C末端寄りに存在し、その内部には39アミノ酸残基からなる構造単位が2回反復して(PI, PII, PIII)存在した(図5)。またこの領域には、プロリンが多く含まれ、同領域の全アミノ酸の27%を占めていた。さらにコンピューターによる二次構造の解析(ChouとFasmanの方法<sup>44)</sup>)結果から、A-リピート領域を含むPAgのN末端側約1/4は、 $\alpha$ -ヘリックス構造をとることがわかった。 $\alpha$ -ヘリックスはラセン状の構造で、ポリペプチドの主鎖の水素結合で安定化された規則的な単位構造である。一般に球状のタンパク質の $\alpha$ -ヘリックスは、4残基から26残基のものが多く<sup>50)</sup>が、線維性の表層タンパク質ではもっと長くなることが多い<sup>51)</sup>。したがって、PAg分子のA-リピート領域に存在する同構造も約400残基と長く、 $\alpha$ -ヘリックスのコイル-コイル構造( $\alpha$ -helical coiled coil)<sup>52)</sup>をとっていることが示唆された。

PAgの疎水性プロットの結果を図6に示す。この図から、N末端側の一部とC末端側の一部に疎水性の高い領域があることがわかった。このうち、N末端側の疎水性領域は、シグナルペプチドに相当していた。

A-リピート領域

AI	222	AHNDQAAVAAKAEVDEKELARUQAANRAAKVEEALANTTKNEQIKAEHAAIQANNAQAKADYERKLAQVEKDLAARQS	303
AII	304	GNATNEADYQAKKAAVEQELARUQAANRAAKQVEQALANTAKNAQITRENERIQANNAQAKADYERKLAQVEKDLAARQS	385
AIII	386	GNAANEADYQEKLAAYEKELARUQAANRAAKQVEQKQEAHAKNAEITEANAAIIRANNAKAKTDVELKSKYQVEELAQYKK	467

P-リピート領域

PI	871	EPTPPSKTPDQHIPOKPUPTVEVEKELEPAPEPSYK	909
PII	910	EPTPPSKTPDQAIPOKPUPTVEVEKELEPUPPEPNYK	948
PIII	949	EPTPPSTPDQEEPTKPUPEVSQ	971

図5 PAgに存在する2つの繰り返し領域

N末端には、アラニンの豊富な繰り返し領域(A-リピート領域)、中央C末端側には、プロリンの豊富な繰り返し領域(P-リピート領域)が存在した。それぞれの繰り返し領域を構成する構造単位(AI, AII, AIIIおよびPI, PII, PIII)をアミノ酸配列で比較した。一致したアミノ酸残基を、コロン(:)で示した。アミノ酸残基番号は、左右両端に記した。

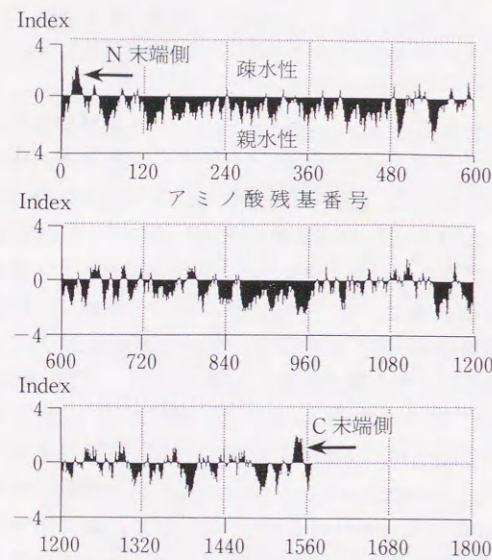


図6 PAgの一次構造から推定された疎水性プロット

KYTEとDOOLITTLEの方法<sup>43)</sup>により、PAgの疎水性をプロットした。縦軸のIndexは疎水性の指標。4がもっとも疎水性が高く、-4がもっとも親水性が高い。横軸は、アミノ酸残基数。左上がN末端側、右下がC末端側を示す。矢印は、疎水性の高いところを示す。

シグナルペプチドのアミノ酸は、その多くが疎水性であり、合成されたタンパク質が細胞膜を通過できるように機能していると考えられる。C末端側は、細胞膜にタンパク質抗原を固定する領域(膜アンカー領域)であり、疎水性のアミノ酸が多い。PAgのような菌体表層に固定して機能するようなタンパク質は、このよ

4729	ACCAGCACACCGAGCGGAGCGCCAGTCCAGTGGATCCTAAG	4773
1494	T S T P E P K Q P S P U D P K	1508
4774	ACCACTACTACGGTAGTCTCCAGCCTCGTCAGGGCARGGCTTAT	4818
1509	T T T U U F Q P R Q G K A V	1523
4819	CAGCCAGCGCCCGCAGCAGGAGCTCAATTGCCAGCCACAGGGGAT	4863
1524	Q P A P P A G A Q (L P A T G) D	1538
4864	AGTAGCAATGCTTACCTGCCACTTTTAGGCCCTCGTAGCCTGACT	4908
1539	S S N A V L P L L G L U S L T	1553
4909	GCTGGCTTTAGCCTGTTAGGACTGCCCGGAGCAGGACTAAGA	4953
1554	A G F S L L G L A R K Q D	1566

図7 C末端の位置とその特徴

破線(---)は細胞壁内通過領域、下線(—)は細胞膜内通過領域および太線(—)は細胞質内領域を示す。グラム陽性菌菌体表層タンパク質に共通の保存配列(LPXTG)をカッコで示した。左右両端の数字は、塩基番号およびアミノ酸残基番号を表す。

うにN末端とC末端に疎水性の高い領域が存在する<sup>49)</sup>。

図7に示したように、C末端の特徴として、以下のような領域の存在が確認できた。すなわち、プロリンの繰り返しからなる細胞壁内を通過する領域(アミノ酸残基番号1,497~1,541)、ロイシンなどの疎水性アミノ酸の多い細胞膜内を通過する領域(1,542~1,561)、および細胞質内領域(1,562~1,566)が存在した。さらに、グラム陽性菌の菌体表層タンパク質に共通の保存配列Leu-Pro-X-Thr-Gly(Xは任意のアミノ酸)<sup>53,54)</sup>が、細胞壁内を通過する領域に存在した。

表1にpag遺伝子の塩基配列から推定されたPAgのアミノ酸組成を示した。シグナルペプチドを除く成熟PAgは、1,528アミノ酸からなり、推定分子量は166,166であった。また、シグナルペプチドを含むPAg前駆体のアミノ酸組成をPACのそれと比較したところ、両者の組成はよく一致していた。また、全ア

表1 pag遺伝子の塩基配列から推定されるPAgのアミノ酸組成(Mol%<sup>a)</sup>)

アミノ酸 <sup>b)</sup>	PAg前駆体 <sup>c)</sup>	成熟PAg <sup>d)</sup>	PAC前駆体 <sup>e)</sup>
Gly	5.17	5.04	4.60
*Ala	12.83	12.82	12.32
*Val	6.57	6.67	6.96
*Lau	6.32	6.15	5.36
*Ile	3.45	3.40	3.96
Ser	5.68	5.62	5.11
Thr	8.49	8.44	9.58
Cys	0.06	0.00	0.06
*Met	0.96	0.92	0.89
Asp	6.32	6.47	6.19
Asn	6.25	6.41	7.34
Glu	7.85	7.98	6.58
Gln	6.00	6.02	4.79
Arg	1.85	1.70	1.98
Lys	8.04	7.98	9.20
His	0.57	0.59	0.70
*Phe	2.30	2.22	2.36
Tyr	4.98	5.10	5.04
*Trp	0.38	0.39	0.51
*Pro	5.87	6.02	6.39

推定分子量 170,202 166,166 170,772

- a) 全アミノ酸に対する分子量の割合(%)
  - b) 三文字記号で表示
  - c) シグナルペプチドを含むPAg前駆体
  - d) シグナルペプチドを除く成熟PAg
  - e) OKAHASHIら<sup>24)</sup>の記載による
- \*疎水性アミノ酸:全アミノ酸の38.6%を占める。

ミノ酸に対する疎水性アミノ酸(Ala, Val, Leu, Ile, Met, Phe, Trp, Pro)の割合は38.6%と高い値を示した。

以上の結果をまとめてPAg分子の構造をモデル化したものを図8に示した。S. sobrinusのPAgは以下のような構造上の特徴を有していた。

- 1) 38残基のアミノ酸からなるシグナルペプチドをもっていた。
- 2) N末端側(222~467)に、アラニンが豊富な82残基のアミノ酸からなる構造単位が3つ繰り返し領域(A-リピート領域)が存在した。
- 3) 中央C末端寄り(871~971)に、プロリンが豊富な39残基のアミノ酸からなる構造単位が2つと半分繰り返し領域(P-リピート領域)が存在した。
- 4) C末端に、タンパク質抗原を膜に固定する領域が存在した。特に、細胞膜内を通過する領域(1542~1561)は、ロイシンなどの疎水性アミノ酸が多く存在した。
- 5) A-リピート領域を含むN末端の約1/4は、 $\alpha$ -ヘリックス構造をとっていた。
- 6) 塩基配列から推定されるPAgは、1,566個のアミノ酸からなり、分子量は170,202であった。

4. S. sobrinus 6715株 SpaA との比較

最近、LAPOLLAら<sup>29)</sup>が報告した同じ血清型g(S. sobrinus 6715株)のタンパク質抗原(SpaA)の塩基配列から推定されるアミノ酸配列とPAgのそれとの比較を図9に示した。両者間には、96%のアミノ酸相

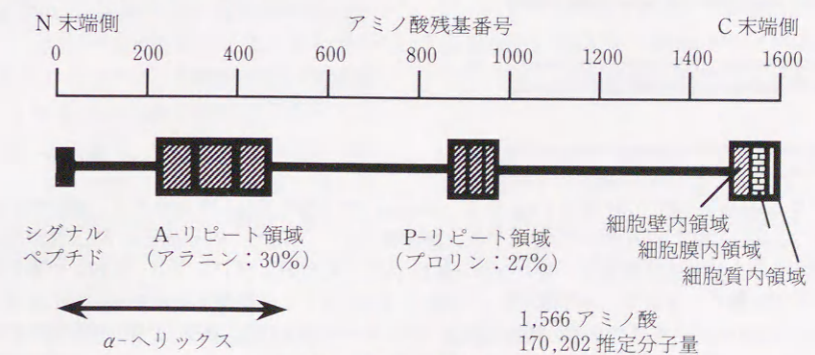


図8 PAgの構造モデル

上の数字は、アミノ酸残基番号。左端はN末端、右端はC末端を示す。N末端にシグナルペプチド、アラニンの豊富な(アラニン:30%)繰り返し領域(A-リピート領域、82アミノ酸残基が3回繰り返し)が存在する。中央C末端寄りに、プロリンの豊富な(プロリン:27%)繰り返し領域(P-リピート領域、39アミノ酸残基が2回と半分繰り返し)が存在する。C末端には、細胞壁内領域、細胞膜内領域および細胞質内領域がそれぞれ存在した。PAgは1,566個のアミノ酸よりなり、推定分子量は170,202と算定された。

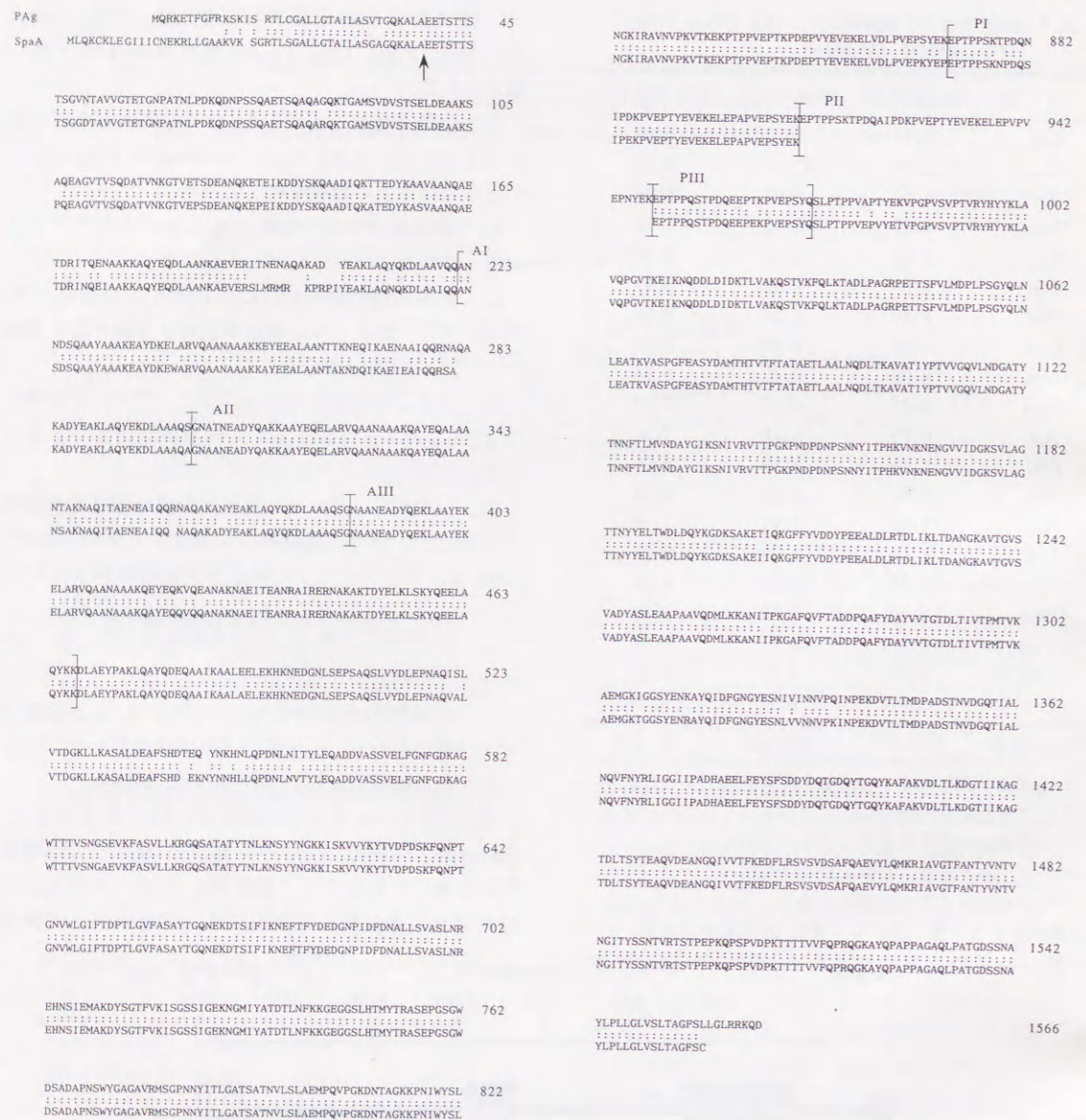


図9 *S. sobrinus* MT 3791株のPAgと*S. sobrinus* 6715株のSpaA<sup>29)</sup>とのアミノ酸配列の比較  
 上段が*S. sobrinus* MT 3791株のPAgのアミノ酸配列を示し、下段が*S. sobrinus* 6715株のSpaAのアミノ酸配列を示す。繰り返し領域は、角カッコ [A I, A II, A IIIおよびP I, P II, P III] で表した。両者に一致したアミノ酸を、コロンの(:)で示した。右端に、PAgのアミノ酸残基番号を示した。シグナルペプチドの部分(矢印はシグナルペプチドの切断部位)、P-リピート領域(P I, P II, P III)およびC末端のアミノ酸配列において、相違が認められた。これらの相違点を除くと、PAgとSpaAのアミノ酸相同性は96%であった。

同性がみられたが、特に以下の3点で大きな相違が認められた。

1) 開始コドンからシグナルペプチドの切断部分までのアミノ酸残基数が、PAgは38残基であるのに対して、SpaAは50残基であった。

2) P-リピート領域における両分子のアミノ酸配列を比較した結果、SpaAは同領域の構造単位が、PAgと比べて1単位(117塩基対, 39アミノ酸残基に

表2 PAgとSpaA<sup>29)</sup>の塩基配列および構造の比較

比較項目	<i>S. sobrinus</i> MT 3791株 PAg	<i>S. sobrinus</i> 6715株 SpaA <sup>29)</sup>
シグナルペプチドの長さ	38 残基	50 残基
A-リピート領域	82 残基×3	82 残基×3
P-リピート領域	39 残基×2.5	39 残基×1.5
膜アンカー領域	あり	なし
塩基数	4,698	4,584 <sup>a)</sup>
アミノ酸数	1,566	1,528 <sup>b)</sup>
推定分子量 (成熟タンパク質)	166,166	160,524 <sup>c)</sup>

a) b) c) : LaPolla ら<sup>29)</sup>の記載による。spaA 遺伝子は、4,584塩基対からなり、1,528個のアミノ酸をコードしていた。その推定分子量は、160,524であった。

相当)欠失していた。

3) SpaAは、タンパク質抗原を膜に固定する領域(膜アンカー領域)、特に細胞膜から細胞質内領域におけるアミノ酸がPAgに比べて8残基少なかった。

以上の理由により、同じ血清型gのタンパク質抗原であるPAgとSpaAは、塩基数、アミノ酸残基数およびそれより推定される分子量に違いがみられる結果となった(表2)。

5. *S. mutans* PAc との比較

図10に、*S. sobrinus*のPAgと*S. mutans*のPAc<sup>24)</sup>とのアミノ酸配列における相同性分析の結果を示した。両者間のアミノ酸相同性を各領域に分けて計算したところ、特に中央領域からC末端にかけて70%以上の高いアミノ酸相同性を示した。また分子全体では、塩基配列およびアミノ酸配列レベルでの相同性はともに66%であった。構造的には、いずれにも繰り返し領域が2ヵ所あり、N末端やC末端の特徴も非常に似ていた。すなわち両者に共通して、N末端側にはA-リピート領域(82アミノ酸が3単位)があり、中央C末端側寄りにはP-リピート領域(39アミノ酸が2.5単位)が存在していた。また、N末端のシグナルペプチドの切断部位やC末端の膜アンカー領域の構造も両者に共通性が認められた。

6. 他のレンサ球菌表層タンパク質との比較

図11は、*S. sobrinus* PAgのアミノ酸配列を、ヒトの唾液と結合する菌体表層タンパク質といわれている*S. mutans*(血清型f)のSR<sup>55)</sup>や*Streptococcus sanguis*のSSP-5<sup>56)</sup>のそれと、アミノ酸配列<sup>57,58)</sup>の相同性および構造モデルの面から比較したものである。

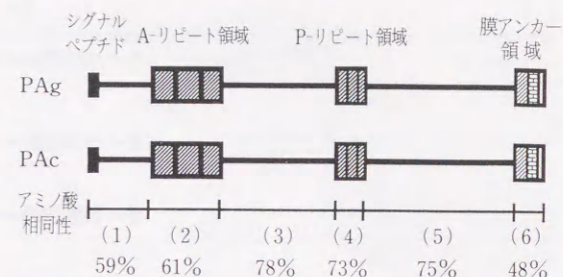


図10 PAgとPAcの構造の比較およびアミノ酸配列の相同性

構造的に特徴のある領域で区分けして、それぞれのアミノ酸配列の相同性を計算した。すなわち、シグナルペプチドを含むN末端からA-リピート領域まで(1)、A-リピート領域内(2)、A-リピート領域とP-リピート領域の間(3)、P-リピート領域内(4)、P-リピート領域と膜アンカー領域の間(5)、膜アンカー領域(6)に分けた。また全ての領域では、66%のアミノ酸相同性を示した。

アミノ酸配列の相同性は、それぞれPAgとSRの間で59%、PAgとSSP-5の間で47%であった。構造的にはSRもSSP-5も、PAgと同様に2つの繰り返し構造をとるなど互によく似ていた。なお、ヒトの心筋と免疫学的交差反応性を示し、最近ではスーパー抗原(superantigen)活性をもつことで注目されている<sup>59)</sup>A群レンサ球菌の菌体表層タンパク質である*Streptococcus pyogenes* Mタンパク<sup>48)</sup>とは、いくつかの繰り返し構造をもつこと、N末端側の大部分がα-ヘリックス構造であること、膜アンカー領域をもつことなど、構造的にPAgといくつかの共通点があったが、アミノ酸配列の相同性は認められなかった(図11)。

なお表3は、これらのレンサ球菌表層タンパク質抗原間のアミノ酸相同性をまとめたものである。この表からもわかるように、同じ血清型のタンパク質抗原間では、95%以上の高いアミノ酸相同性がみられた。一方、異種血清型のタンパク質抗原間のアミノ酸相同性は、60%程度であった。さらに、*S. mutans*のSRおよび*S. sanguis*のSSP-5とは、50%前後のアミノ酸相同性を示した。

考 察

*S. sobrinus*の菌体表層タンパク質抗原PAgは、*S. mutans*のPAcと免疫学的に交差反応を示すなど多

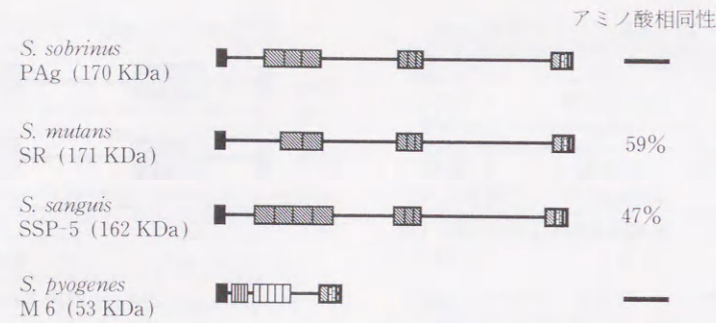


図 11 PAg と他のレンサ球菌菌体表面タンパク質との構造的な比較とアミノ酸配列の相同性

*S. mutans* SR<sup>57)</sup> と *S. sanguis* SSP-5<sup>58)</sup> は、どちらも唾液結合タンパク質として知られている。*S. pyogenes* の M6 タンパク<sup>48)</sup> は、A 群レンサ球菌の菌体表面タンパク質である。それぞれの塩基配列から推定されるタンパク質の構造上の特徴を示している。図に示す通り、いずれも N 末端にシグナルペプチド、アミノ酸配列における繰り返し構造、C 末端に膜アンカー領域を有していた。左端に、各タンパク質抗原の名称および推定分子量を、右端に *S. sobrinus* PAg に対するアミノ酸相同性を示した。

くの共通点をもっていることが知られている<sup>26,30)</sup>。したがって、ヒトのう蝕におけるこれら 2 つの主要細菌の菌体表面タンパク質抗原を遺伝子レベルで解析、比較することは、ミュータンスレンサ球菌のタンパク質抗原の機能を考える上で非常に重要である。そこで本研究では、遺伝子構造がまだ完全には解明されていない *S. sobrinus* の菌体表面タンパク質抗原遺伝子 (*pag*) の全塩基配列を決定し、その遺伝子レベルの構造解析を行って、*S. mutans* のそれと比較検討した。さらに、現在塩基配列のわかっている他のレンサ球菌の菌体表面タンパク質に対しても、これらの解析を試みた。

その結果、*S. sobrinus* PAg をコードする遺伝子は、4,698 塩基対からなる 1 つの大きなタンパク翻訳領域 (open reading frame) を構成していた。それ以外には、タンパク質をコードする領域は検出できなかった。この遺伝子は、1,566 個のアミノ酸に相当し、推定分子量は 170,202 であった (図 2)。この N 末端の Met-1 から Ala-38 までのアミノ酸配列には、これまで報告された他のグラム陽性菌のシグナルペプチド<sup>48,49)</sup> と同様に、N 末端側の塩基性アミノ酸に続いて疎水性アミノ酸が並び<sup>48)</sup>、切断部位にはアラニンが存在する<sup>49)</sup> という特徴がみられた。さらに、アミノ酸シークエネーターを用いて N 末端アミノ酸配列を調べた結果も、この推定アミノ酸配列を支持していた (図

3)。PAg がシグナルペプチドをもつことは、PAg が細胞膜透過性の分泌タンパク質であることを示している。シグナルペプチドが切断された後の成熟タンパク質抗原の分子量は 166,166 と算出された (表 1)。

また、PAg の推定アミノ酸配列から求められた同タンパク質抗原の分子量は、SDS-PAGE で決定した分子量 (210,000) と比べると、15~19% 小さかった。同様の知見は、A 群レンサ球菌の M タンパクや G 群レンサ球菌のプロテイン G でも報告されている。HOLLINGSHEAD ら<sup>48)</sup> は、A 群レンサ球菌の M6 タンパクにおいて推定アミノ酸配列から求めた分子量 (48,956) は、SDS-PAGE で決定した分子量 (57,000) より 17% 小さかったと報告している。彼らは、M タンパクの C 末端側にある高プロリン含有領域の存在に基づく立体構造が、SDS-PAGE 上で影響を及ぼすのではないかと考えている。また Guss ら<sup>60)</sup> は、推定アミノ酸配列から求めたプロテイン G の分子量 (51,871) が、SDS-PAGE 上の分子量 (67,000) より 23% 小さいことを見出している。彼らもまた、この原因として高プロリン領域の存在に注目している。さらに、*S. mutans* の PAc の場合も同様に、推定アミノ酸配列から求められた分子量と SDS-PAGE 上での分子量との間に 14~21% の差があると報告されている<sup>24)</sup>。PAg にも同様に高プロリン領域 (P-リピート領域) が存在するので、推定アミノ酸配列と SDS-PAGE 間の分子量の違

表 3 口腔レンサ球菌菌体表面タンパク質抗原間のアミノ酸相同性 (%)

タンパク質抗原	<i>S. sobrinus</i>		<i>S. mutans</i>		<i>S. sanguis</i>	
	血清型 g		血清型 c		血清型 f	
	PAg	SpaA <sup>29)</sup>	PAc <sup>24)</sup>	antigen I / II <sup>25)</sup>	SR <sup>57)</sup>	SSP-5 <sup>58)</sup>
<i>S. sobrinus</i> PAg	—	96*	66	66	59	47
<i>S. sobrinus</i> SpaA <sup>29)</sup>	96*	—	60	59	58	44
<i>S. mutans</i> PAc <sup>24)</sup>	66	60	—	97	85	45
<i>S. mutans</i> antigen I / II <sup>25)</sup>	66	59	97	—	85	47
<i>S. mutans</i> SR <sup>57)</sup>	59	58	85	85	—	41
<i>S. sanguis</i> SSP-5 <sup>58)</sup>	47	44	45	47	41	—

\* この値は、表 2 で示したアミノ酸配列上の差を除いて計算したものである。すなわち、シグナルペプチドの部分 (SpaA のアミノ酸残基番号 1-13)、P-リピート領域 (PAg のアミノ酸残基番号 915-953)、膜アンカー領域 (PAg のアミノ酸残基番号 1558-1566) を除いて、アミノ酸相同性を求めた。

いは、この高プロリン領域の存在による可能性が大きい。また、疎水性アミノ酸が多い繰り返し領域 (A-リピート領域) が存在することも、SDS-PAGE 上の分子量と推定アミノ酸配列から求めた分子量が異なる原因の 1 つであるかもしれない。なお、SDS-PAGE 上での分子量が必ずしも実際の分子量を反映しないことは、レンサ球菌の菌体表面タンパク質以外のタンパク質でも報告されている<sup>61)</sup>。

アミノ酸配列の分析から、PAg には 2 つの繰り返し領域が存在することが明らかになった (図 4)。N 末端側の A-リピート領域にはアラニンが多く、中央部の P-リピート領域にはプロリンが多かった。CHOU と FASMAN の方法<sup>44)</sup> による二次構造の推定によると、A-リピート領域を含む N 末端側約 1/4 は  $\alpha$ -ヘリックス構造であった (図 8)。 $\alpha$ -ヘリックス構造をもつタンパク質抗原の代表例は、A 群レンサ球菌の M タンパクである<sup>62)</sup>。M タンパクでは、N 末端側の約 70% が  $\alpha$ -ヘリックス構造を有している<sup>48)</sup>。本タンパクの機能の 1 つに、細菌が多形核白血球による貪食作用から逃れる抗食作用が挙げられている<sup>63)</sup>。アミノ酸配列上は、PAg と M タンパクの間に相同性は認められないが (図 11)、どちらも N 末端側が  $\alpha$ -ヘリックス構造をとることから、PAg にも食細胞の機能に抗する作用があるのかもしれない。また LAPOLLA ら<sup>29)</sup> は、SpaA の N 末端側の A-リピート領域が  $\alpha$ -ヘリックス構造をとると報告している。彼らは、この領域の繰り返し構造が、線維状の  $\alpha$ -ヘリックスのコイル-コイル構造 ( $\alpha$ -helical coiled coil) を構成していると考えている。PAg においても、この領域が  $\alpha$ -ヘリックス

のコイル-コイル構造をとっている可能性は大きい。

PAg の C 末端構造は、M タンパク、プロテイン G およびブドウ球菌のプロテイン A との間でいくつかの共通点が認められた。すなわち、これらのタンパク質の C 末端側にはプロリンの多い領域とそれに続く高疎水性領域とがそれぞれ存在した (図 7)。M タンパクでは、C 末端側の高プロリン領域は細胞壁のペプチドグリカン層に入り込んでいることが報告されている<sup>64)</sup>。そこで UHLÉN ら<sup>65)</sup> は、M タンパクでは C 末端側の高プロリン領域がタンパク質を細胞壁から外向きに配列させるのに必要ではないかと述べている。したがって、PAg の C 末端側 (Pro-1497 から Pro-1545) もこのような役割をもっていると思われる。またそれに続く高疎水性領域は、M タンパク、プロテイン G やプロテイン A などで示唆されているように<sup>64,65)</sup>、タンパク質を膜に固定するアンカー領域であろうと考えられる。このように PAg の構造には、M タンパクやプロテイン G とさまざまな面で共通点がみられた。

ところで、最近 LAPOLLA ら<sup>29)</sup> は、著者が本研究で用いたものと同じ血清型 g の別株 (*S. sobrinus* 6715 株) を用いて、その菌体表面タンパク質抗原 (SpaA) の全塩基配列を調べている。両者の塩基配列を比較したところ、主に以下の 3 点で相違が認められた (図 9、表 3)。第 1 点は、シグナルペプチドの長さが、PAg の 38 アミノ酸残基に対して、SpaA では 50 残基と長いことである。他の菌体表面タンパク質抗原 (PAc, I/II, SR, SSP-5) のシグナルペプチドは、いずれも 38 個のアミノ酸残基によって構成されている<sup>24,25,57,58)</sup> ことから考えて、SpaA のそれは例外的で



ある。第2点は、P-リピート領域の構造単位がPAgの2.5個に対してSpaAでは1.5個と1個短いことである。これは、SpaAのP-リピート領域におけるアミノ酸残基数がPAgのそれと比べて39個少ないことを意味する。おそらく、彼らは何らかの原因で繰り返し領域の塩基配列を読み落としたのではないかと考えられる。第3点は、SpaAにはアミノ酸配列において、細胞膜を通過する領域に相当するアミノ酸残基数が少ない。すなわち、PAgでみられたような細胞質内領域に相当する8アミノ酸残基が存在しない。同じように、細胞膜を通過するのに必要なアミノ酸配列をもたないものに、*S. mutans*のSR<sup>57)</sup>と*S. sanguis*<sup>58)</sup>のSSP-5がある。彼らは、これらのタンパク質は、この部分について何らかの転写後修飾があるのではないかと考えている。

う蝕細菌の分子遺伝学的研究は、ここ数年で飛躍的に発展した。菌体表層タンパク質抗原はもちろんのこと、グルカン合成酵素やスクロース代謝関連酵素など、う蝕細菌の主な病原因子の遺伝子は既にクローニングされ、その多くは塩基配列も決定されている<sup>66-73)</sup>。OKAHASHIら<sup>74)</sup>は、う蝕に関わる菌体表層タンパク質抗原、グルカン合成酵素およびスクロース代謝の遺伝子を使って、それらが*S. mutans*の染色体DNA上でどのように配置しているかを調べている。その結果、*S. mutans*の初期付着、グルカン合成、スクロース代謝というう蝕の発症に関わる病原因子遺伝子が、それぞれ染色体上の一領域に集まり、遺伝子集団(gene cluster)を形成していることが明らかになった。このことは、これら一群のタンパク質が同時に発現され、う蝕の発症に対してそれぞれが相補的に機能していることを示唆している。

タンパク質抗原については、まず1989年にOKAHASHIら<sup>23)</sup>が*S. mutans*の*pac*遺伝子のクローニングに成功し、その全塩基配列を決定した<sup>24)</sup>。さらに、それに続いてKELLYら<sup>25)</sup>も同一血清型の別の株で全塩基配列を発表し、*pac*と98%のホモロジーを示すことを報告している。しかし、*S. sobrinus*のタンパク質抗原PAgは、いままで*S. mutans*のPACとの免疫学的交差反応性を通じて塩基配列の一部が解明されていたにすぎず、今回初めてその全塩基配列を明らかにすることができた。すなわち本研究により、PAgのアミノ酸配列およびその構造上の特徴が明らかになり、これが分子遺伝学的にも*S. mutans*のPACと類似の構造をもつことがわかった。*S. sobrinus*のPAg

と*S. mutans*のPACがアミノ酸配列において高い相同性を有していることは、機能面でも両者に共通の性状が存在していることをうかがわせる。すでに、*S. mutans*のPACは、細菌の歯面への付着に関与しているという報告<sup>23,75)</sup>があることから、*S. sobrinus*のPAgも同様の機能を有している可能性が大きい。しかし、その詳細は不明である。

ところで、OKAHASHIら<sup>24)</sup>は、*S. mutans*の*pac*遺伝子と相同性のある遺伝子が他のレンサ球菌にどのように分布しているかをサザンプロット法<sup>76)</sup>を用いて調べている。結果は、通常のハイブリダイゼーション条件下では、*c*型*S. mutans*の他は、*e*型および*f*型*S. mutans*のDNAが*pac*遺伝子プローブとハイブリダイズしただけであった。しかし、ハイブリダイゼーションを65%程度の相同性でも検出できるように条件を緩めて行くと、*pac*遺伝子は*b*型*Streptococcus rattus*を除くすべてのミュータンスレンサ球菌のDNAと反応した。以上の結果から、彼らは、*S. mutans*のPACと類似のタンパク質が他のミュータンスレンサ球菌にも広く分布していると考えている。一方、HOLTら<sup>77)</sup>は、*S. sobrinus* 6715株(血清型*g*)からタンパク質抗原(SpaA)遺伝子のクローニングを行い、この遺伝子と相同性のある遺伝子は*d/g*型*S. sobrinus*に共通に存在すると報告している。同様にMAら<sup>78)</sup>も、他のミュータンスレンサ球菌に対する*S. mutans*(血清型*c*)のタンパク質抗原遺伝子の保存性をサザンプロット分析で調べた結果、完全な*pac*遺伝子と反応するのは血清型*c*、*e*、*f*の*S. mutans*染色体DNAだけであった。しかし、タンパク質抗原のC末端の一部と対応するDNAプローブとは*S. mutans*だけでなく*Streptococcus intermedius*や*Streptococcus oralis*の染色体DNAともハイブリダイズした。本研究においても、表3に示したように、同一血清型のタンパク質抗原間ではアミノ酸相同性が80%から100%と高く、他の血清型のミュータンスレンサ球菌との間では60%前後であった。

これとは別にSOMMERら<sup>59)</sup>は、血清型*f*の*S. mutans*の唾液結合タンパク質(SR)の研究を進めている。この*sr*遺伝子の塩基配列の解析結果<sup>57)</sup>から、そのアミノ酸相同性はPACとは88%、PAgとは55%であった。さらに、口腔内常在細菌のひとつである*S. sanguis*にもヒトの唾液と結合する菌体表層タンパク質(SSP-5)が存在することが知られている<sup>56)</sup>。このSSP-5についても、最近塩基配列の解析結果が報告

された<sup>58)</sup>。これとPACおよびPAgとのアミノ酸相同性は、それぞれ58%と47%であった。また、この両者の塩基配列から推測される構造上の特徴は、PACおよびPAgと非常によく似ていた。タンパク質に重要な機能や立体構造を保持するアミノ酸配列は保存されやすい。したがって、これらタンパク質分子間に共通の機能が保持されている可能性は高い。

以上のことから、*S. sobrinus*のPAgは、*S. mutans*のPACやその他のレンサ球菌の菌体表層タンパク質と同様に、細菌が歯面に付着する際に関わるタンパク質として機能していることが考えられた。今回得られた知見は、う蝕発症メカニズムの分子レベルにおける解明やう蝕予防の一助となるだろう。

## 結 論

う蝕病原性ミュータンスレンサ球菌の1つ、*S. sobrinus* MT 3791株(血清型*g*)の菌体表層タンパク質抗原(PAg)をコードする遺伝子(*pag*)の全塩基配列およびその一次構造を明らかにした。

1. *pag*遺伝子は、4,698塩基対からなっていた。これは、1,566個のアミノ酸をコードしており、推定分子量は170,202であった。
2. 構造上の特徴として、N末端と中央領域に2つの繰り返し構造、すなわちA-リピート領域とP-リピート領域が存在した。A-リピート領域は、82のアミノ酸残基からなる構造単位が3回繰り返されており、アラニンが豊富であった。P-リピート領域は、39のアミノ酸残基からなる構造単位が2回と半分繰り返されており、プロリンが豊富であった。また、N末端1/4は $\alpha$ -ヘリックス構造をとっていた。さらにシグナルペプチドの存在から、PAgは分泌型タンパク質であることがわかった。C末端は、MタンパクやプロテインGのそれらと共通の構造、すなわち、疎水性アミノ酸の多い領域からなり、タンパク質抗原を膜に固定する機能を有していた。
3. 最近報告のあった同一血清型*g*(*S. sobrinus* 6715株)のタンパク質抗原*spaA*遺伝子の塩基配列と今回決定した*pag*遺伝子の塩基配列を比較した。その結果、両タンパク質抗原のアミノ酸配列は96%と高い相同性が認められた。
4. *S. mutans* PACとの相同性は、塩基レベル、アミノ酸レベルともに66%であり、構造的にはかなりの類似性が認められ、機能上も類似していることが

推測された。さらに、PAgやPACはミュータンスレンサ球菌以外の口腔レンサ球菌の表層タンパク質とも構造的に似ており、これらはひとつの大きなファミリーを構成していることが示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究を実施する機会を与えてくださり、終始ご懇篤なるご指導と本論文のご校閲を賜った鹿児島大学歯学部歯科保存学講座(1)川越昌宜教授ならびに長岡成孝助教授に対し、深甚なる謝意を表します。

また、本研究の実施にあたり、絶えずご助言とご指導ならびにご校閲を賜りました国立予防衛生研究所口腔科学部古賀敏比古部長、直接のご指導を賜った岡橋暢夫博士に慎んで感謝の意を表します。

最後に、本研究に対し、絶えず温かいご支援ならびにご協力を頂きました鹿児島大学歯学部歯科保存学講座(1)ならびに国立予防衛生研究所口腔科学部の諸先生方に心より厚くお礼申し上げます。

## 文 献

- 1) HAMADA, S. & SLADE, H.D.: Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*; Microbiol. Rev., 44, 331-384, 1980.
- 2) LOESCHE, W.J.: Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay; Microbiol. Rev., 50, 353-380, 1986.
- 3) KOGA, T., ASAKAWA, H., OKAHASHI, N. & HAMADA, S.: Sucrose-dependent cell adherence and cariogenicity of serotype *c* *Streptococcus mutans*; J. Gen. Microbiol., 132, 2873-2883, 1986.
- 4) COHEN, B., PEACH, S.L. & RUSSELL, R.R.B.: Immunization against dental caries; Med. Microbiol., 2, 255-294, 1983.
- 5) HAY, D.I.: The adsorption of salivary proteins by hydroxyapatite and enamel; Archs oral Biol., 12, 937-946, 1967.
- 6) GIBBONS, R.J.: Adherent interactions which may affect microbial ecology in the mouth; J. Dent. Res., 63, 378-385, 1984.
- 7) LEHNER, T., RUSSELL, M.W. & CALDWELL, J.: Immunisation with a purified protein from *Streptococcus mutans* against dental caries in rhesus monkeys; Lancet i, 995-996, 1980.
- 8) LEHNER, T., RUSSELL, M.W., CALDWELL, J. & SMITH, R.: Immunization with purified protein antigens from *Streptococcus mutans* against dental caries in rhesus monkeys; Infect. Immun., 34, 407-415, 1981.
- 9) LEHNER, T., CALDWELL, J. & SMITH, R.: Local

- passive immunization by monoclonal antibodies against streptococcal antigen I/II in the prevention of dental caries; *Infect. Immun.*, 50, 796~799, 1985.
- 10) MA, J.K.-C., SMITH, R. & LEHNER, T.: Use of monoclonal antibodies in local passive immunization to prevent colonization of human teeth by *Streptococcus mutans*; *Infect. Immun.*, 55, 1274~1278, 1987.
  - 11) RUSSELL, R.R.B., BEIGHTON, D. & COHEN, B.: Immunisation of monkeys (*Macaca fascicularis*) with antigens purified from *Streptococcus mutans*; *Br. Dent. J.*, 152, 81~84, 1982.
  - 12) MORO, I. & RUSSELL, M.W.: Ultrastructural localization of protein antigens I/II and III in *Streptococcus mutans*; *Infect. Immun.*, 41, 410~413, 1983.
  - 13) AYAKAWA, G.Y., BOUSHELL, L.W., CROWLEY, P. J., ERDOS, G.W., MCARTHUR, W.P. & BLEIWEIS, A.S.: Isolation and characterization of monoclonal antibodies specific for antigen P1, a major surface protein of mutans streptococci; *Infect. Immun.*, 55, 2759~2767, 1987.
  - 14) MCBRIDE, B.C., SONG, M., KRASSE, B. & OLSSON, J.: Biochemical and immunological differences between hydrophobic and hydrophilic strains of *Streptococcus mutans*; *Infect. Immun.*, 44, 68~75, 1984.
  - 15) KOGA, T., ASAKAWA, H., OKAHASHI, N. & TAKAHASHI, I.: Effect of subculturing on expression of a cell-surface protein antigen by *Streptococcus mutans*; *J. Gen. Microbiol.*, 135, 3199~3207, 1989.
  - 16) RUSSELL, R.R.B. & SMITH, K.: Effect of subculturing on location of *Streptococcus mutans* antigens; *FEMS Microbiol. Lett.*, 35, 319~323, 1986.
  - 17) SCULLY, C.M., RUSSELL, M.W. & LEHNER, T.: Specificity of opsonizing antibodies to antigens of *Streptococcus mutans*; *Immunology*, 41, 467~473, 1980.
  - 18) MCGHEE, J.R. & MICHALEK, S.M.: Immunobiology of dental caries: microbial aspects and local immunity; *Ann. Rev. Microbiol.*, 35, 595~638, 1981.
  - 19) RUSSELL, R.R.B.: Wall-associated protein antigens of *Streptococcus mutans*; *J. Gen. Microbiol.*, 114, 109~115, 1979.
  - 20) HUGHES, M., MACHARDY, S.M., SHEPPARD, A.J. & WOODS, N.C.: Evidence for an immunological relationship between *Streptococcus mutans* and human cardiac tissue; *Infect. Immun.*, 27, 576~588, 1980.
  - 21) RUSSELL, M.W., BERGMEIER, L.A., ZANDERS, E.D. & LEHNER, T.: Protein antigens of *Streptococcus mutans*: purification and properties of a double antigen and its protease-resistant component; *Infect. Immun.*, 28, 486~493, 1980.
  - 22) FORESTER, H., HUNTER, N. & KNOX, K.W.: Characteristics of a high molecular weight extracellular protein of *Streptococcus mutans*; *J. Gen. Microbiol.*, 129, 2779~2788, 1983.
  - 23) OKAHASHI, N., SASAKAWA, C., YOSHIKAWA, M., HAMADA, S. & KOGA, T.: Cloning of a surface protein antigen gene from serotype *c* *Streptococcus mutans*; *Mol. Microbiol.*, 3, 221~228, 1989.
  - 24) OKAHASHI, N., SASAKAWA, C., YOSHIKAWA, M., HAMADA, S. & KOGA, T.: Molecular characterization of a surface protein antigen gene from serotype *c* *Streptococcus mutans*, implicated in dental caries; *Mol. Microbiol.*, 3, 673~678, 1989.
  - 25) KELLY, C., EVANS, P., BERGMEIER, L., LEE, S.F., PROGULSKE-FOX, A., HARRIS, A.C., AITKEN, A., BLEIWEIS, A.S. & LEHNER, T.: Sequence analysis of the cloned streptococcal cell surface antigen I/II; *FEBS Lett.*, 258, 127~132, 1989.
  - 26) TAKAHASHI, I., OKAHASHI, N., SASAKAWA, C., YOSHIKAWA, M., HAMADA, S. & KOGA, T.: Homology between surface protein antigen genes of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*; *FEBS Lett.*, 249, 383~388, 1989.
  - 27) GOLDSCHMIDT, R.M., THOREN-GORDON, M. & CURTISS, R., III.: Regions of the *Streptococcus sobrinus spaA* gene encoding major determinants of antigen I; *J. Bacteriol.*, 172, 3988~4001, 1990.
  - 28) STAFFILENO, L.K., HENDRICKS, M., LAPOLLA, R., BOHART, C., VAN HOOK, P., ROSEN, J.I., WARNER, J., HOEY, K., WEGEMER, D., NASO, R.B., SUBLETT, R.D., WALDSCHMIDT, B., LEONG, M., THORNTON, G.B., LEHNER, T. & HARON, J.A.: Cloning of the amino terminal nucleotides of the antigen I/II of *Streptococcus sobrinus* and the immune responses to the corresponding synthetic peptides; *Archs oral Biol.*, 35, 47s~52s, 1990.
  - 29) LAPOLLA, R.J., HARON, J.A., KELLY, C.G., TAYLOR, W.R., BOHART, C., HENDRICKS, M., PYATI, J., GRAFF, R.T., MA, J.K.-C. & LEHNER, T.: Sequence and structural analysis of surface protein antigen I/II (SpaA) of *Streptococcus sobrinus*; *Infect. Immun.*, 59, 2677~2685, 1991.
  - 30) OKAHASHI, N., KOGA, T. & HAMADA, S.: Purification and immunochemical properties of a protein antigen from serotype *g* *Streptococcus mutans*; *Microbiol. Immunol.*, 30, 35~47, 1986.
  - 31) YANISCH-PERRON, C., VIEIRA, J. & MESSING, J.: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors; *Gene*, 33, 103~119, 1985.
  - 32) SASAKAWA, C., CARLE, G.F. & BERG, D.E.: Sequences essential for transposition at the termini of IS50; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80, 7293~7297, 1983.
  - 33) YOKOGAWA, K., KAWATA, S., NISHIMURA, S., IKEDA, Y. & YOSHIMURA, Y.: Mutanolysin, bacteriolytic agent for cariogenic streptococci: partial purification and properties; *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 6, 156~165, 1974.
  - 34) MORRISON, D.A.: Transformation in *Escherichia coli*: cryogenic preservation of competent cells; *J. Bacteriol.*, 132, 349~351, 1977.
  - 35) GRUNSTEIN, M. & HOGNESS, D.S.: Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 72, 3961~3965, 1975.
  - 36) BURNETTE, W.N.: "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A; *Anal. Biochem.*, 112, 195~203, 1981.
  - 37) HAMADA, S. & SLADE, H.D.: Purification and immunochemical characterization of type *e* polysaccharide antigen of *Streptococcus mutans*; *Infect. Immun.*, 14, 68~76, 1976.
  - 38) BIRNBOIM, H.C. & DOLY, J.: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA; *Nucleic Acids Res.*, 7, 1513~1523, 1979.
  - 39) HENIKOFF, S.: Unidirectional digestion with exonuclease III creates targeted breakpoints for DNA sequencing; *Gene*, 28, 351~359, 1984.
  - 40) LAEMMLI, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4; *Nature*, 227, 680~685, 1970.
  - 41) SANGER, F., NICKLEN, S. & COULSON, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 5463~5467, 1977.
  - 42) MIZUSAWA, S., NISHIMURA, S. & SEELA, F.: Improvement of the dideoxy chain termination method of DNA sequencing by use of deoxy-7-deazaguanosine triphosphate in place of dGTP; *Nucleic Acids Res.*, 14, 1319~1324, 1986.
  - 43) KYTE, J. & DOOLITTLE, R.F.: A simple method for displaying the hydropathic character of a protein; *J. Mol. Biol.*, 157, 105~132, 1982.
  - 44) CHOU, P.Y. & FASMAN, G.D.: Prediction of protein conformation; *Biochemistry*, 13, 222~245, 1974.
  - 45) NEEDLEMAN, S.B. & WUNSCH, C.D.: A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins; *J. Mol. Biol.*, 48, 443~453, 1970.
  - 46) SHINE, J. & DALGARNO, L.: Determinant of cistron specificity in bacterial ribosomes; *Nature*, 254, 34~38, 1975.
  - 47) HAWLEY, D.K. & McCLURE, W.R.: Compilation and analysis of *Escherichia coli* promoter DNA sequences; *Nucleic Acids Res.*, 11, 2237~2255, 1983.
  - 48) HOLLINGSHEAD, S.K., FISCHETTI, V.A. & SCOTT, J.R.: Complete nucleotide sequence of type 6 M protein of the group A *Streptococcus*; *J. Biol. Chem.*, 261, 1677~1686, 1986.
  - 49) VLASUK, G.P., INOUE, S., ITO, H., ITAKURA, K. & INOUE, M.: Effects of the complete removal of basic amino acid residues from the signal peptide on secretion of lipoprotein in *Escherichia coli*; *J. Biol. Chem.*, 258, 7141~7148, 1983.
  - 50) BARLOW, D.J. & THORNTON, J.M.: Helix geometry in proteins; *J. Mol. Biol.*, 201, 601~619, 1988.
  - 51) COHEN, C. & PARRY, D.A.D.:  $\alpha$ -Helical coiled coils—a widespread motif in proteins; *Trends Biochem. Sci.*, 6, 245~248, 1986.
  - 52) COHEN, C. & PARRY, D.A.D.:  $\alpha$ -Helical coiled coils and bundles: how to design an  $\alpha$ -helical protein; *Proteins Struct. Funct. Genet.*, 7, 1~15, 1990.
  - 53) PANCHOLI, V. & FISCHETTI, V.A.: Identification of an endogenous membrane anchor-cleaving enzyme for group A streptococcal M protein; *J. Exp. Med.*, 170, 2119~2133, 1989.
  - 54) FISCHETTI, V.A., PANCHOLI, V. & SCHNEEWIND, O.: Conservation of a hexapeptide sequence in the anchor region of surface proteins from Gram-positive cocci; *Mol. Microbiol.*, 4, 1603~1605, 1990.
  - 55) SOMMER, P., BRUYÈRE, T., OGIER, J.A., GARNIER, J.-M., JELTSCH, J.-M. & KLEIN, J.-P.: Cloning of the saliva-interacting protein gene from *Streptococcus mutans*; *J. Bacteriol.*, 169, 5167~5173, 1987.
  - 56) DEMUTH, D.R., DAVIS, C.A., CORNER, A.M., LAMONT, R.J., LEBOY, P.S. & MALAMUD, D.: Cloning and expression of a *Streptococcus sanguis* surface antigen that interacts with a human salivary agglutinin; *Infect. Immun.*, 56, 2484~2490, 1988.
  - 57) OGIER, J.A., SCHÖLLER, M., LEPROIVRE, Y., PINI, A., SOMMER, P. & KLEIN, J.P.: Complete nucleotide sequence of the *sr* gene from *Streptococcus mutans* OMZ 175; *FEMS Microbiol. Lett.*, 68, 223~228, 1990.
  - 58) DEMUTH, D.R., GOLUB, E.E. & MALAMUD, D.: Streptococcal-host interactions. Structural and functional analysis of a *Streptococcus sanguis* receptor for a human salivary glycoprotein; *J. Biol. Chem.*, 265, 7120~7126, 1990.
  - 59) TOMAI, M., KOTB, M., MAJUMDAR, G. & BEACHEY, E.H.: Superantigenicity of streptococcal M protein; *J. Exp. Med.*, 172, 359~362, 1990.
  - 60) GUSS, B., ELIASSON, M., OLSSON, A., UHLÉN, M., FREJ, A.-K., JÖRNVALL, H., FLOCK, J.-I. & LIND-

- BERG, M. : Structure of the IgG-binding regions of streptococcal protein G ; EMBO J., 5, 1567~1575, 1986.
- 61) TAKANO, E., MAKI, M., MORI, H., HATANAKA, M., MARTI, T., TITANI, K., KANNAGI, R., OOI, T. & MURACHI, T. : Pig heart calpastatin : identification of repetitive domain structures and anomalous behavior in polyacrylamide gel electrophoresis ; Biochemistry, 27, 1964~1972, 1988.
- 62) PHILLIPS, G.N., Jr., FLICKER, P.F., COHEN, C., MANJULA, B.N. & FISCHETTI, V.A. : Streptococcal M protein ;  $\alpha$ -Helical coiled-coil structure and arrangement on the cell surface ; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 4689~4693, 1981.
- 63) SCOTT, J.R., GUENTHNER, P.C., MALONE, L.M. & FISCHETTI, V.A. : Conversion of an M<sup>-</sup> group A streptococcus to M<sup>+</sup> by transfer of a plasmid containing an M6 gene ; J. Exp. Med., 164, 1641~1651, 1986.
- 64) PANCHOLI, V. & FISCHETTI, V.A. : Isolation and characterization of the cell-associated region of group A streptococcal M6 protein ; J. Bacteriol., 170, 2618~2624, 1988.
- 65) UHLÉN, M., LINDBERG, M. & PHILIPSON, L. : The gene for staphylococcal protein A ; Immunol. Today, 5, 244~248, 1984.
- 66) FERRETTI, J.J., GILPIN, M.L. & RUSSELL, R.R. B. : Nucleotide sequence of a glucosyltransferase gene from *Streptococcus sobrinus* MFe 28 ; J. Bacteriol., 169, 4271~4278, 1987.
- 67) FERRETTI, J.J., HUANG, T.-T. & RUSSELL, R.R. B. : Sequence analysis of the glucosyltransferase A gene (*gtfA*) from *Streptococcus mutans* Ingbritt ; Infect. Immun., 56, 1585~1588, 1988.
- 68) HANADA, N. & KURAMITSU, H.K. : Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans gtfD* gene, coding for primer-dependent soluble glucan synthesis ; Infect. Immun., 57, 2079~2085, 1989.
- 69) LUNSFORD, R.D. & MACRINA, F.L. : Molecular cloning and characterization of *scrB*, the structural gene for the *Streptococcus mutans* phosphoenolpyruvate-dependent sucrose phosphotransferase system sucrose-6-phosphate hydrolase ; J. Bacteriol., 166, 426~434, 1986.
- 70) SATO, Y. & KURAMITSU, H.K. : Sequence analysis of the *Streptococcus mutans scrB* gene ; Infect. Immun., 56, 1956~1960, 1988.
- 71) SHIROZA, T. & KURAMITSU, H.K. : Sequence analysis of the *Streptococcus mutans* fructosyltransferase gene and flanking regions ; J. Bacteriol., 170, 810~816, 1988.
- 72) SHIROZA, T., UEDA, S. & KURAMITSU, H.K. : Sequence analysis of the *gtfB* gene from *Streptococcus mutans* ; J. Bacteriol., 169, 4263~4270, 1987.
- 73) UEDA, S., SHIROZA, T. & KURAMITSU, H.K. : Sequence analysis of the *gtfC* gene from *Streptococcus mutans* GS-5 ; Gene, 69, 101~109, 1988.
- 74) OKAHASHI, N., SASAKAWA, C., OKADA, N., YAMADA, M., YOSHIKAWA, M., TOKUDA, M., TAKAHASHI, I. & KOGA, T. : Construction of a *NotI* restriction map of the *Streptococcus mutans* genome ; J. Gen. Microbiol., 136, 2217~2223, 1990.
- 75) KOGA, T., OKAHASHI, N., TAKAHASHI, I., KANAMOTO, T., ASAKAWA, H. & IWAKI, M. : Surface hydrophobicity, adherence, and aggregation of cell surface protein antigen mutants of *Streptococcus mutans* serotype c ; Infect. Immun., 58, 289~296, 1990.
- 76) SOUTHERN, E.M. : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis ; J. Mol. Biol., 98, 503~517, 1975.
- 77) HOLT, R.G. & OGUNDIPE, J.O. : Molecular cloning in *Escherichia coli* of the gene for a *Streptococcus sobrinus* surface protein containing two antigenic determinants, In Streptococcal genetics (FERRETTI, J.J. & CURTISS R., III, editors) ; American Society for Microbiology, Washington, D.C., 217~219, 1987.
- 78) MA, J.K.-C., KELLY, C.G., MUNRO, G., WHILEY, R. A. & LEHNER, T. : Conservation of the gene encoding streptococcal antigen I/II in oral streptococci ; Infect. Immun., 59, 2686~2694, 1991.

