

ミュータンス連鎖球菌の非水溶性多糖合成酵素遺伝子の DNA 塩基配列とアミノ酸配列

佐藤 節子

鹿児島大学歯学部附属病院口腔保健科

DNA and amino-acid sequences of water-insoluble-glucan synthetase produced from *Streptococcus sobrinus* ATCC 33478^T

Setsuko Sato

Department of Preventive Science,
Kagoshima University Dental School
Sakuragaoka 8-35-1, Kagoshima 890, JAPAN

Abstract

Mutans streptococci produce water-insoluble-glucan synthetase (glucosyltransferase-I), which is a pathogenic factor causing dental caries. The glucosyltransferase-I gene was isolated from *Streptococcus sobrinus* ATCC33478^T and analyzed. The analysis showed that the gene existed in the *Pst* I fragment (6838 bp) of the *S. sobrinus* chromosome. The data of the DNA sequence showed that one open reading frame (DNA position, 1033-5805) coded 1590 amino acids, ribosome binding site (RBS, AGGAGGA) and promoter sequences (TTGTAA for -35, TAAAAT for -10) were located prior to the coding region, and two termination sequences were found after TAA stop codon. The amino-acid sequence indicated that the enzyme molecular size was 176,049, thirty-eight amino-acid residues from N terminus was a signal peptide for the enzyme secretion, and DSIRVDAVD (amino-acid position, 442-450) was a binding site of glucose-residue of sucrose. In the C-terminal one third of the sequence 71 glycine residues constructed nine G-repeat units. That C-terminal region is known as a glucan-binding region.

Key words

Mutans streptococci, *Streptococcus sobrinus* ATCC33478^T, water-insoluble-glucan synthetase, DNA sequence, amino-acid sequence.

I. はじめに

ミュータンス連鎖球菌は齲蝕の最大原因菌として広く一般の人々にも知られている。ヒトの口腔内には種々のグラム陽性連鎖球菌が棲息しているにもかかわらず特にミュータンス連鎖球菌が齲蝕原因菌として注目されるのはなぜであろうか。それはこの菌がふたつの大きな特性を兼ね備えているからである。

特性の一つは他の連鎖球菌に比較し耐酸性性が優れていることである。一般に口腔内のグラム陽性連鎖球菌は食物や清涼飲料水に含まれている糖分（主にブドウ糖、果糖、砂糖、乳糖などの少糖類）を代謝して乳酸などの酸を産生しながらエネルギー（ATP）を得ているが、通常これらの酸は唾液などによって希釈されたり、その緩衝作用によって pH が低くならないように緩和されている。何らかの障害によって細菌の棲息場所である歯垢の酸が緩和されず pH がほぼ 5.4 以下になるとそれに接するエナメル質の脱灰が進行し齲蝕が始まることになるのだが、多くの連鎖球菌では菌周囲の pH が酸性に傾くと菌体内の代謝活性が弱まり代謝産物である乳酸などの産生量が落ちてくる。しかしミュータンス連鎖球菌は、自分が産生した乳酸によって歯垢中（菌体周囲）の pH が 5 以下になっても菌体内の糖代謝活性は影響されず引き続き活発に酸を産生することができるのである¹⁾。これがミュータンス連鎖球菌の耐酸性性である。

もう一つの特性は、グルコシルトランフェラーゼという酵素を分泌してエナメル質に強固に付着する粘着性非水溶性多糖（グルカン）を合成することである。粘着性で水に溶け難い（非水溶性）グルカンは菌のエナメル質への初期付着に続いておこる歯垢形成を促進するとともに、乳酸などの酸の貯留効果もあると考えられている²⁾。

ミュータンス菌以外にも粘着性非水溶性グルカンを産生するサングウイス菌やサリヴァリウス菌、また耐酸性性の優れたラクトバチラス菌などが口腔内には多数存在しているが、齲蝕の病原性という点ではミュータンス連鎖球菌に劣る。動物実験においてミュータンス連鎖球菌が最もよく齲蝕を誘発するのはこのふたつの性質を兼ね備えているからである³⁾。

粘着性非水溶性グルカンを合成する酵素については、ここ 20 年間で多数の研究が報告されている。初期の 10 年間は酵素の精製とその性状について⁴⁾、後半の 10 年間は主に酵素遺伝子のクローニングについての報告が目立つ⁵⁻⁸⁾。私たちの研究室でも同様の過程を辿ってきた。本紀要には、ミュータンス連鎖球菌の中

で *Streptococcus sobrinus* に分類されている ATCC 33478^T 株の粘着性非水溶性多糖合成酵素を代表としてとりあげ、その遺伝子のクローニングについて概要する。

II. 粘着性非水溶性多糖合成酵素の DNA 塩基配列

Streptococcus sobrinus ATCC 33478^T 株の染色体 DNA を制限酵素 *Pst* I で切断し、断片を大腸菌のプラスミドベクター pUC 19 の *Pst* I サイトに連結させ、遺伝子ライブラリーを作製した。このライブラリーを利用して形質転換した大腸菌のなかから抗 *S. sobrinus* 粘着性非水溶性多糖合成酵素抗体と反応するものを選択し、その菌のプラスミドを抽出・分析した⁹⁾。その結果 *S. sobrinus* ATCC 33478^T の粘着性非水溶性多糖合成酵素遺伝子は全長 6,838 bp の *Pst* I 断片上に乗っていることが明らかになった。図 1 にこの断片の全塩基配列を示した。制限酵素 *Pst* I が認識する配列 (CTGCAG) の 5' 末端を 1 とし同配列の 3' 末端までの塩基数を右端の括弧内に示してある。

遺伝子のオープンリーディングフレームは 4,773 bp、アミノ酸コーディング領域は開始コドン 1,033-ATG Met から始まって終止コドン TAA-5,805 までで、1,590 個のアミノ酸がコードされている。開始コドンのすぐ上流には、m-RNA が翻訳されるときにリボソームと結合する配列 AGGAGGA (RBS) があり、さらに上流には転写時に m-RNA ポリメラーゼが認識するプロモーター配列 TTGTAA, TAAAAT (-35, -10) がある。一方、この酵素の産生の調節機構についてはほとんど調べられていないが、プロモーター領域のさらに上流に典型的な逆方向反復配列 (IR) が存在し (IR 1 ~ IR 5) なんらかの転写調節を行っている可能性が示唆された^{10, 11)}。また、終止コドンの下流には m-RNA の転写を終結させるターミネーター様配列が 2 つ見つかった (Termination 1, 2)。この 2 つの配列はどちらも 3' 端にそれぞれ 4 個と 3 個の T を連ねているが、配列の GC 含量が比較的少なく、転写終結にロー因子が関与しているかどうかはこの配列様式からは推定できなかった。

オープンリーディングフレームにコードされるアミノ酸配列を対応する DNA 塩基配列の上を示した (図 1)。右端の数字は開始コドンのメチオニン (M) を 1 番とし N 末から C 末にむかってかぞえたアミノ酸残基数を表している。

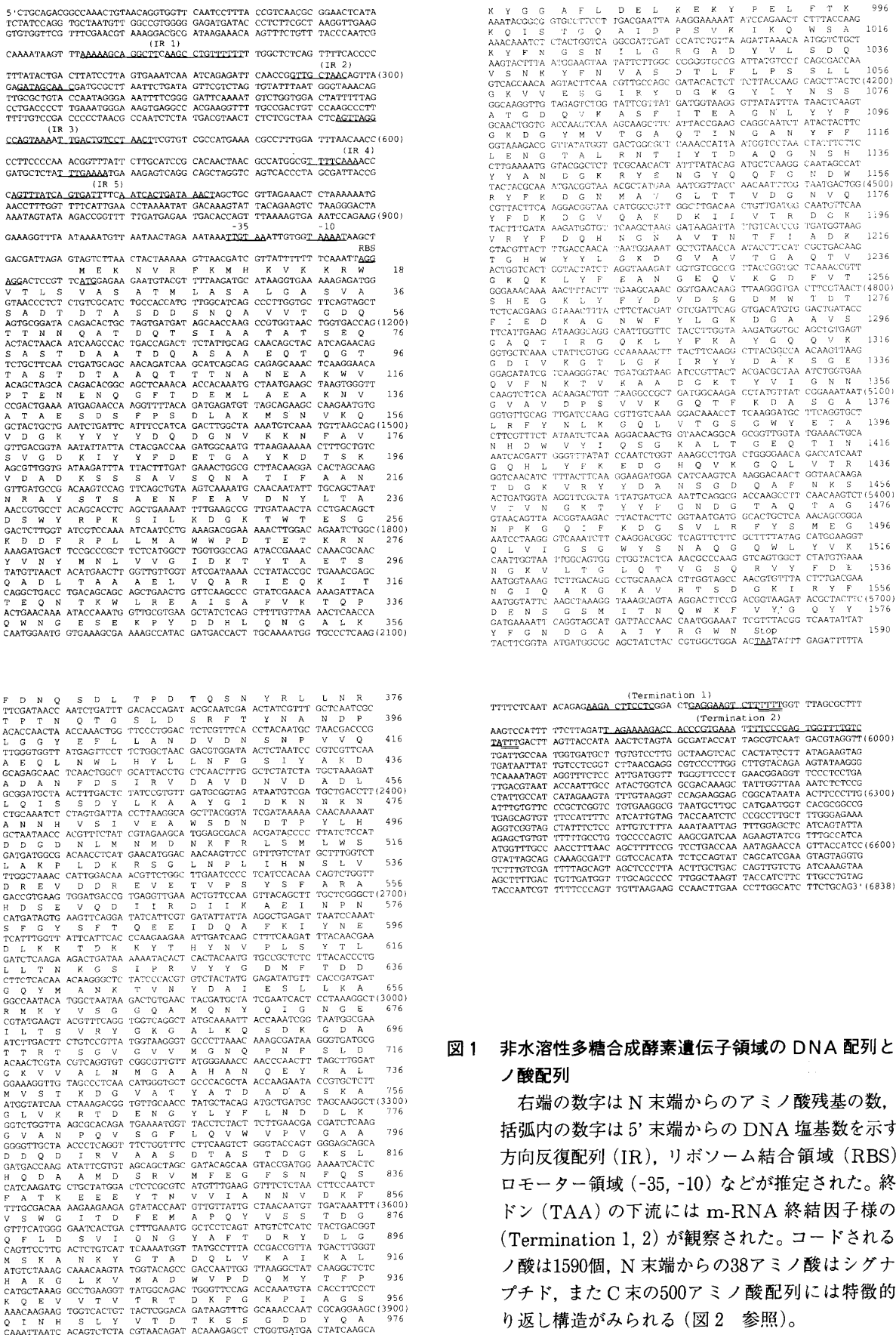


図1 非水溶性多糖合成酵素遺伝子領域のDNA配列とアミノ酸配列

右端の数字はN末端からのアミノ酸残基の数, また括弧内の数字は5'末端からのDNA塩基数を示す。逆方向反復配列(IR), リボソーム結合領域(RBS), プロモーター領域(-35, -10)などが推定された。終止コドン(TAA)の下流にはm-RNA終結因子様の配列(Termination 1, 2)が観察された。コードされるアミノ酸は1590個, N末端からの38アミノ酸はシグナルペプチド, またC末の500アミノ酸配列には特徴的な繰り返し構造がみられる(図2参照)。

Ⅲ. 粘着性非水溶性多糖合成酵素のアミノ酸配列

アミノ酸 1,590 個からなるこの酵素の分子量は 176,049 と計算された。実際には *S. sobrinus* が培地中に産生する酵素の分子量は若干小さめである。これは N 末のメチオニン (M) を含む 38 個のアミノ酸がシグナル配列となっており、これが取り除かれた後の分子量約 172,000 の蛋白質が菌から培地中に産生されてくるからである⁷⁾。

またこの酵素は、シュクロースを基質にしてシュクロースのグルコース残基部分を次々に連結しグルカンを合成する反応を触媒するが、酵素とシュクロースが反応してシュクロースのグルコース部分が最初に酵素と結合する部位が特定されている¹²⁾。図 1 のアミノ酸配列で 442-DSIRVDAVD-450 のペプチドの中央の D (アスパラギン酸) がその部位である。D に結合したグルコース残基は、以下に述べるような繰り返し構造をもった C 末領域に転移し、この場所で次々にやってくるグルコース残基と重合してポリマーとなる。一般にミュータンス連鎖球菌のグルカンは、 α -1, 3, α -1, 6, α -1, 3, 6 結合を主体としているが¹³⁾、残念ながらこのポリマーの結合様式を決定するアミノ酸配列については今のところ全く解かっている。

さて、このアミノ酸配列全体をながめてみると、C 末 3 分の 1 の領域に繰り返し配列が見られる。そこでアミノ酸 1,091 番から C 末端の 1,590 番までの繰り返し配列を並列してみると、図 2 パネル A に示すように 9 つ (G1 ~ G9) の配列がグリシンを中心とした共通配列を保存していることが明らかになった。最下

A

```

#* * * * *
G1 1091 GNLYYFGKDGVMVTAQTLINGANYFFLENGTALRNTIYTDAGNSHYY-ANDGKRVYENGVOQF 1152
#* * * * *
G2 1153 GNDWRYFKDGNMVAVGLTVDGNVQVFDKDGVAQDKIIVTRDGVRYFDHNGNAVTFWTFIADKT 1217
#* * * * *
G3 1218 GHWYLLGKDGVAVTAQTVGKQLYFEANGQVKGDFVTSHEGKLYFYDVIDSGDMWTDTFIEDKA 1282
#* * * * *
G4 1283 GNWYFLGKDGAAVSGAQTIRGQKLYFKAYGQVQVKGDLVKGTDGKIRYDAKSGEQVFNKTVKAAD 1347
#* * * * *
G5 1348 GKT-YVGNNGVAVD-PSVVKGQ-TFKDASGALRFYNLKGQLVTG-----SGWYETAN 1397
#* * * * *
G6 1398 HDWVYI-QSGKALTEGQTLNGHLYFREDGHQVKGQLVTRTDGKVRYYDANSQDQAFNKSVTVN 1460
#* * * * *
G7 1461 GKTYYFGNDGTAQTAGN-SKGQ-IFKD-GSVLRFYSMEGQLVIG-----SGWYSNAQ 1509
#* * * * *
G8 1510 GQWLYV-KNGKVLTLGLTVGSRVYFDENGIQAKGAVRTSDGKIRYFDENSGSMITNQWKFVY 1572
#* * * * *
G9 1573 GQYVYFGNDGAA-----IYRGWN 1590
#* * * * *
G cons GNWYVFGKDGXAVTGAQTVXGQXLYFDANGXQVKGXIVTXDXGKXRYDANSGXNXXNXXXXXX (47)

```

B

```

G5 1348 GKT-YVGNNGVAVD-PSVVKGQ-TFKDASGALRFYNLKGQLVTGSGWYETAN 1397
#* * * * *
G7 1461 GKTYYFGNDGTAQTAGN-SKGQ-IFKD-GSVLRFYSMEGQLVIGSGWYSNAQ 1509
#* * * * *
G9 1573 GQYVYFGNDGAA-----IYRGWN 1590

```

図 2 グリシンを軸とした繰り返し構造 (G repeat)

(A) 非水溶性多糖合成酵素の C 末 (1091-11590) にみられる繰り返し配列を示した。G cons はコンセンサス配列で 65 のうち 47 アミノ酸を特定した。(B) G5, G7, G9 のアミノ酸配列を比較した。

表 1 G リピートのホモロジー

Repeat unit	Homology (%)
G1 62 ^{a)}	57 (27) ^{b)}
G2 65	53 (25)
G3 65	77 (36)
G4 65	81 (38)
G5 50	32 (15)
G6 63	68 (32)
G7 49	28 (13)
G8 63	64 (30)
G9 18	17 (8)

- a) 繰り返し構造を構成しているアミノ酸残基数。
b) 括弧内には コンセンサス配列 (図 2 A, G cons) のアミノ酸残基と同じアミノ酸残基を持っているものの数を示した。ホモロジーは対照にしたアミノ酸残基数 (47 個) に対する比を % で示した。

段の G cons は G1 ~ G9 の 9 つの配列を基にしてコンセンサス配列を求めたものである。コンセンサス配列のなかで特定されたアミノ酸 (47 個) の位置とその残基が同じものにマークをしてあるが、その相同性は 57% (G1), 53% (G2), 77% (G3), 81% (G4), 32% (G5), 68% (G6), 28% (G7), 64% (G8), 17% (G9) で、G5, G7, G9 以外は高い相同性を示した (表 1)。さらに比較的相同性の低い G5, G7, G9 同志を比較してみると、G5 と G7 は 58% のホモロジーを、また G9 は 18 個のアミノ酸残基のうち 15 個が G7 と同じ配列を示し (図 2 B)、この 3 者が一つのサブグループを形成していると考えられた。これら繰り返し配列の相同性は酵素分子の進化を考えるうえで重要な知見となっている¹⁴⁾。この領域はまた酵素のなかでグルカン結合能を持っている場所としても重要である^{5, 15)}。

Ⅳ. アミノ酸組成

酵素蛋白質を構成しているアミノ酸残基の使用頻度を表 2 に示した。全体を通じてはアラニン (A), アスパラギン酸 (D), グリシン (G) の頻度が高く、この 3 つで 26% 以上を占めている。プロリン (P), メチオニン (M), トリプトファン (W), ヒスチジン (H) の含量は少なく 4 者を合計してもわずかに 6.5% にしかなかった。シトシン (C) 残基は含まれていなかった。またアミノ酸配列全体をほぼ 3 等分にしてそれぞれの特徴を見ると、N 末領域ではアラニン (A), アスパラギン酸 (D), スレオニン (T), グルタミン酸 (D), セリン (S) の含量が大きく、この 5 つでほぼ半分ちか

表2 アミノ酸組成

Amino acid	Count (Mol%)			
	1-1590 ^{a)}	1-545 ^{b)}	546-1090 ^{c)}	1091-1590 ^{d)}
A	145(9.1)	63(11.6)	48(8.8)	34(6.8)
D	139(8.7)	56(10.3)	46(8.4)	37(7.4)
G	136(8.6)	20(3.7)	45(8.3)	71(14.2)
T	118(7.4)	48(8.8)	35(6.4)	35(7.0)
K	118(7.4)	34(6.2)	43(7.9)	41(8.2)
V	114(7.2)	33(6.1)	42(7.7)	39(7.8)
N	109(6.9)	47(8.6)	28(5.1)	34(6.8)
S	109(6.9)	46(8.4)	44(8.1)	19(3.8)
Y	96(6.0)	22(4.0)	33(6.1)	41(8.2)
L	91(5.7)	38(7.0)	33(6.1)	20(4.0)
Q	87(5.5)	26(4.8)	28(5.1)	33(6.6)
F	64(4.0)	15(2.8)	23(4.2)	26(5.2)
E	60(3.8)	26(4.8)	21(3.9)	13(2.6)
I	57(3.6)	14(2.6)	25(4.6)	18(3.6)
R	45(2.8)	16(2.9)	14(2.6)	15(3.0)
P	30(1.9)	14(2.6)	14(2.6)	2(0.4)
M	28(1.8)	10(1.8)	13(2.4)	5(1.0)
W	25(1.6)	11(2.0)	4(0.7)	10(2.0)
H	19(1.2)	6(1.1)	6(1.1)	7(1.4)
C	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)

オープンリーディングフレームにコードされる各アミノ酸残基の個数を、a) アミノ酸配列全体(1-1,590)、b) N末3分の1(1-545)、c) 中央(546-1,090)、d) C末3分の1(1,091-1,590)とで比較した。また構成残基数に対する割合を括弧内に%で示した。

い48%を占めた。特徴的なのはC末領域のグリシン(G)残基の多さである。全グリシンの半分以上(52%)がこのC末領域に存在し、しかもこの領域のアミノ酸の14.2%を占めた。これは7回に1回の割合でグリシンが現われるということを示している。グリシン程ではないが、同じことがチロシン(Y)についても言える。N末領域に少ないチロシンがその分C末領域に多く現われている。図2に示した繰り返し構造の配列にもそれが現われており、我々のGリピートと同様にチロシンとグリシンを中心としたYGリピート説^{16, 17)}を提唱している人々もいる。一方中央領域はアミノ酸残基の種類といった点からは、とくに目立つ特徴は見つからなかった。この領域は両端の領域に比較し他の菌株の酵素とのホモロジーが一番高い部分であり⁷⁾、安定した配列領域といえる。

以上のように、多糖合成酵素ではN末領域とC末領域とでアミノ酸残基の頻度に片寄りが見られた。一

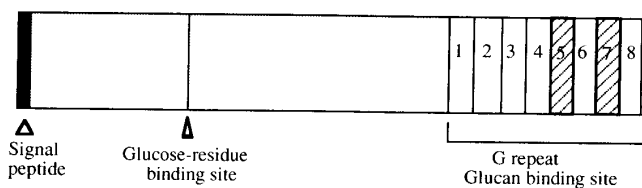


図3 非水溶性多糖合成酵素

つの蛋白質におけるアミノ酸残基の片寄りが、酵素としての機能の面から、また酵素蛋白を指令している遺伝子の進化といった面からみてどんな意味をもっているのか興味のあるところであるが、残念なことに今のところ明確に説明することができないでいる。

V. 非水溶性多糖合成酵素

アミノ酸配列をもとに酵素の全体像を図3に示した。歯垢に棲息している *S. sobrinus* の菌体内で分子量約176,000の蛋白質に翻訳された酵素は、シグナルペプチド(Signal peptide)をはずされて172,000の蛋白質となって菌体外に分泌されてくる。ここに我々が食物として摂取したシュクロースがやってきて酵素に触れると、酵素はシュクロースのグルコース部分をグルコース残基結合部位(Glucose-residue binding site)に捕捉し速やかにC末のG繰り返し配列(G repeat)領域に転移させる。そこでグルコースは次々とポリマーに繋がれて粘着性のある非水溶性グルカンに変えられていく。これら一連の反応は極めて瞬間的におこり、このときに遊離したフラクトース分子は菌体内に取り込まれて、乳酸産生の原料になる。

VI. おわりに

このように歯垢中のミュータンス連鎖球菌は反応性にとんでおり、しかもほとんど誰にでも感染している菌である。しかしながら、一方歯垢のないところにはこの菌は棲息していないのであるから、この菌によって引き起こされる齲蝕の予防は極めて簡単である。それは正しいブラッシングに尽きる。しかし世の中には色々な人がおり、時によってはブラッシングができない人もいる。残念ながらこれらの人たちのための特効薬は今のところ見つかっていない。グルカン合成酵素の遺伝子の解析が、まさにそういう人達にとっての特効薬の開発の一助になるなら研究者にとってはこれ以上ない喜びであろう。

最後に、遺伝子解析の研究を行うにあたって科研費(#06672062)を有効に使えたことは本当にありがた

いことであった。また、たくさんの人に色々なことを教えて戴いたことには感謝の言葉もありません。

なお、この酵素の遺伝子は日本DNAデータバンクに登録してある(登録番号はD 63570)。

文 献

- 1) van Houte, J. & Russo, J.: Factors influencing the cariogenicity of *Streptococcus mutans*, In; Molecular microbiology and immunology of *Streptococcus mutans*, S. Hamada, S. M. Michalek, H. Kiyono, L. Menaker, and J. R. McGhee, Eds., 157-169, Elsevier Science Publishers, New York, 1986
- 2) Koga, T., Okahashi, N., Asakawa, H. & Hamada, S.: Adherence of *Streptococcus mutans* to tooth surfaces., In; Molecular microbiology and immunology of *Streptococcus mutans*, S. Hamada, S. M. Michalek, H. Kiyono, L. Menaker, and J. R. McGhee, Eds., 111-120, Elsevier Science Publishers, New York, 1986
- 3) Loesche, W. J.: Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.* 50, 353-380, 1986
- 4) Mukasa, H.: Properties of *Streptococcus mutans* glucosyltransferases., In; Molecular microbiology and immunology of *Streptococcus mutans*, S. Hamada, S. M. Michalek, H. Kiyono, L. Menaker, and J. R. McGhee, Eds., 121-132, Elsevier Science Publishers, New York, 1986
- 5) Abo, H., Matsumura, T., Kodama, T., Ohta, H., Fukui, K., Kato, K. & Kagawa, H.: Peptide sequences for sucrose splitting and glucan binding within *Streptococcus sobrinus* glucosyltransferase (Water-insoluble glucan synthetase). *J. Bacteriol.* 173, 989-996, 1991
- 6) 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
- 7) Sato, S., Inoue, M., Hanada, N., Aizawa, Y., Isobe, Y. & Katayama, T.: DNA sequence of the glucosyltransferase gene of serotype d *Streptococcus sobrinus*. *DNA Seq.* 4, 19-27, 1993
- 8) Shiroza, T., Ueda, S. & Kuramitsu, H. K.: Sequence analysis of the *gtfB* gene from *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 169, 4263-4270, 1987
- 9) Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T.: *Molecular cloning*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989
- 10) Smorawinska, M. & Kuramitsu, H. K.: Primer extension analysis of *Streptococcus mutans* promoter structures. *Oral Microbiol. Immunol.* 10, 188-192, 1995
- 11) Vickerman, M. M., Sulavik, M. C. & Clewell, D. B.: Oral streptococci with genetic determinants similar to the glucosyltransferase regulatory gene, *rgg*. *Infect. Immun.* 63, 4524-4527, 1995
- 12) Mooser, G., Hefta, S. A., Paxton, R. J., Shively, J. E. & Lee, T. D.: 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, 1991
- 13) Inoue, M. & Yakusiji, T.: Chemical and morphological properties of *Streptococcus mutans* glucans., In; Molecular microbiology and immunology of *Streptococcus mutans*, S. Hamada, S. M. Michalek, H. Kiyono, L. Menaker, and J. R. McGhee, Eds., 133-143, Elsevier Science Publishers, New York, 1986
- 14) Giffard, P. M., Allen, D. M., Milward, C. P., Simpson, C. L. & Jacques, N. A.: Sequence of the *gtfK* gene of *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 and evolution of the *gtf* genes of oral streptococci. *J. Gen. Microbiol.* 139, 1511-1522, 1993
- 15) Lis, M., Shiroza, T. & Kuramitsu, H. K.: Role of the C-terminal direct repeating units of the *Streptococcus mutans* glucosyltransferase-S in glucan binding. *Appl. Env. Microbiol.* 61, 2040-2042, 1995
- 16) Giffard, P. M. & Jacques, N. A.: Definition of a fundamental repeating unit in streptococcal glucosyltransferase glucan-binding regions and related sequences. *J. Dent. Res.* 73, 1133-1141, 1994

- 17) Simpson, C. L., Giffard, P. M. & Jacques, N. A.: *Streptococcus salivarius* ATCC 25975 possesses at least two genes coding for primer-independent glucosyltransferases. *Infect. Immun.* 63, 609-621, 1995