

学位論文

*Streptococcus mutans* の産生するペプチドグリカン  
加水分解酵素automutanolysinの機能解析

広島大学大学院歯学研究科  
歯学系（小児歯科学）専攻

学位申請者 吉村 剛

主任：香西 克之 教授

2004年度

## 謝辞

本研究に際し、終始御懇親なる御指導ならびに御校閲を賜りました広島大学大学院 医歯薬学総合研究科 展開医科学専攻 顎口腔頸部医科学講座 香西克之教授ならびに終始懇篤なる御指導を賜りました同大学院 創生医科学専攻 探索医科学講座 菅井基行教授に心より感謝致します。また、本論文作成上、御助言、御校閲を賜りました同大学院 創生医科学専攻 探索医科学講座 加藤幸夫教授に深謝致します。

研究遂行上及び本論文作成上、終始御助言を賜りますとともに常に直接実験の御指導を頂きました同大学院 創生医科学専攻 探索医科学講座 小松澤均助教授に厚くお礼申し上げます。

また、本研究遂行上および論文作成上、御指導および御協力いただきました同大学歯学部中央研究室 林幾江博士、同大学院 医歯薬総合研究科 探索医科学講座 小原勝博士、藤原環博士、山口隆之博士、川崎医科大学微生物学講座 山田作夫助教授、九州大学大学院歯学研究科口腔保健推進学講座 中野善夫助教授、Uniformed Services University of the Health Sciences 梶村順子博士に深く感謝します。

また、多大なる御支援、御協力を頂きました西裕美博士、札幌康之博士、應原一久先生、角本法子先生、富田優子技術補佐員を始めとする探索医科学講座（細菌学）及び顎口腔頸部医科学講座（小児歯科学）関係者各位に厚くお礼申し上げます。

最後に、私に勉学ならびに研究の機会を与える共に、常に私を支えてくれた両親ならびに家族に感謝します。

本論文の要旨は以下の学会および研究会において発表した。

第 75 回 日本細菌学会総会 (2002 年 4 月 横浜)

第 77 回 日本細菌学会総会 (2004 年 4 月 大阪)

第 42 回 日本小児歯科学会および総会 (2004 年 5 月 福岡)

第 37 回 広島大学歯学会総会 (2004 年 6 月 広島)

本論文の一部は以下の雑誌に掲載された。

1 : Zymographic characterization of bacteriolytic enzymes produced by oral streptococci.  
Yoshimura G, Komatsuzawa H, Kajimura J, Fujiwara T, Ohara M, Kozai K, Sugai M.:  
Microbiol. Immunol., **48** (6) : 465-469, 2004.

# 目次

	page
序論	1
第1章 <b>Zymography</b> を用いた溶菌酵素の検出	4
第1節 概要	4
第2節 材料および方法	4
第1項 使用菌株および培養条件	
第2項 粗酵素画分調整法	
第3項 <b>Zymography</b> を用いた溶菌酵素の検出法	
第3節 結果	6
第1項 粗酵素画分を用いた溶菌バンドの検出	
第2項 口腔レンサ球菌5菌種の溶菌バンドの同定	
第4節 考察並びに小括	7
第2章 <b><i>Streptococcus mutans</i></b> の産生する溶菌酵素の同定	13
第1節 概要	13
第2節 材料および方法	13
第1項 使用菌株および培養条件	
第2項 N末端アミノ酸配列の決定	
第3項 アミノ酸配列を用いた相同性検索	
第4項 DNA操作	
(1) PCR	
(2) 染色体DNAの精製法	
第5項 遺伝子組み換え蛋白発現株の作製	
第6項 遺伝子組み換え蛋白 ( <b>His-tag</b> 組み換え蛋白) の作製	
第7項 遺伝子組み換え蛋白の精製	
第8項 抗体作製方法	
第9項 <b>Western Blotting</b> 法	
第10項 遺伝子不活化株の作製	
第3節 結果	19
第1項 遺伝子の同定	

第2項	遺伝子組み換え蛋白の精製および活性の検討	
第3項	遺伝子不活化株における目的蛋白消失の確認	
第4節	考察並びに小括	22
<b>第3章</b>	<b>新規溶菌酵素 <i>automutanolysin</i> ( <i>Aml</i> ) の機能解析</b>	<b>35</b>
第1節	概要	35
第2節	材料及び方法	36
第1項	使用菌株および培養条件、使用蛋白	
第2項	光学顕微鏡及び電子顕微鏡を用いた <i>aml</i> 遺伝子不活化株の観察	
第3項	濁度の減少法を用いた酵素活性の検討	
第4項	ペプチドグリカン作製法	
第5項	<i>Aml</i> の酵素活性に影響を与える因子の検討	
第6項	<i>Aml</i> によるペプチドグリカン切断部位の検討	
第7項	<i>Aml</i> による糖鎖切断部位の検討	
第8項	RP-HPLC を用いたムロペプチド解析	
第9項	MALDI-TOF/MS を用いた質量分析	
第10項	各種の遺伝子組み換え蛋白の作製	
第11項	遺伝子組み換え蛋白 (MBP タグ組み換え蛋白) の作製	
第12項	遺伝子組み換え蛋白の結合能の測定	
第3節	結果	44
第1項	<i>aml</i> 遺伝子不活化株の性状解析	
第2項	<i>Aml</i> の酵素活性の検討	
第3項	<i>Aml</i> のペプチドグリカン切断部位の検討	
第4項	<i>S. mutans</i> および <i>S. sobrinus</i> のペプチドグリカン構造解析	
第5項	各種の遺伝子組み換え蛋白による <i>Aml</i> のドメイン機能解析	
第4節	考察並びに小括	48
総括		70
参考文献		72

## 序論

細胞壁は細菌の形態を維持し、内部構造を外部環境から保護する役割を果たしている。グラム陽性菌の細胞壁は厚い層として存在し、その大部分（60-90%）をペプチドグリカンと呼ばれる構造物で占めている。ペプチドグリカンは、細菌に特有の強固な巨大高分子であり、グリカン鎖と呼ばれる糖鎖に4つから5つのアミノ酸から構成されるペプチド鎖が結合して構成されるペプチドグリカンモノマーを一つの単位とし、これらが連なったペプチドグリカンポリマーは隣のポリマーと数個のアミノ酸により架橋している（図1）。ペプチドグリカンは合成系と分解系の酵素により動的平衡状態に保たれている。分解系の酵素の多くはペプチドグリカンを加水分解し、菌を溶菌する機能より溶菌酵素と呼ばれ [1-3]、溶菌酵素は細菌の分離、分裂、細胞壁の分解 [3-5] など細菌にとって重要な役割を果たしている。また溶菌酵素は、penicillin G (PCG) を始めとする抗生物質添加時にみられる溶菌現象にも関与しているといわれており [6]、*S. aureus* において増殖初期に $\beta$ -ラクタム系の抗生物質（PCG）の添加時に溶菌酵素による自己溶菌が報告されている [6]。ペプチドグリカン加水分解酵素はそのペプチドグリカン切断部位により *N*-acetylmuraminidase、*N*-acetylglucosaminidase、*N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase、endopeptidase に分類される [2, 3, 9, 10]。

*Streptococcus mutans* は *mutans group* に属するグラム陽性のう蝕原因細菌であるが [7]、*S. mutans* のペプチドグリカンの構成は、*N*-acetylglucosamine (GlcNAc)と *N*-acetylmuramic acid (MurNAc)の2種類のアミノ糖が交互に $\beta$ -1,4 グリコシド結合したグリカンポリマーに、L-Ala-D-iGln-L-Lys-D-Ala-D-Ala からなる、5つのアミノ酸のペプチド鎖が結合したものを1単位とした架橋構造物より構成されている [8]。このペプチドグリカン鎖は多数結合し、3番目のL-Lysと隣のペプチド鎖のD-AlaをAlaの二量体によって架橋されている（図1） [8]。

グラム陽性菌の溶菌酵素としては、*Staphylococcus aureus* [11-14] や *Bacillus subtilis* [15, 16]、*Streptococcus pneumoniae* [17, 18]、*Streptococcus agalactiae* [19] で詳細な研究がなされているが、*S. mutans* の産生する溶菌酵素の詳細については、いまだ明らかにされていない。

本研究では *S. mutans* を含む口腔レンサ球菌5菌種より、各菌種の死菌体を用いた

Zymography により溶菌酵素の検出を行った。そのうち *S. mutans* の産生する溶菌酵素について同定を行い、新規の溶菌酵素 automutanolysin (Aml) を見出した。そして、Aml についてそのペプチドグリカン切断部位を明らかにし、酵素の特異性及びその性状について検討した。



## 第1章 Zymography を用いた溶菌酵素の検出

### 第1節 概要

口腔内の各部位において、最も多く検出されるのがレンサ球菌 *Streptococci* であり、口腔内常在細菌叢の多数を占める主要な菌種である。口腔レンサ球菌と総称されるこれらの菌種には *mutans* 群、*mitis-sanguinis* 群、*salivarius* 群、*anginosas* 群などが存在し、口腔内に常在する事により、口腔内の恒常性の維持に寄与しているが、これらのうち、*mutans* 群に含まれる *Streptococcus mutans* と *S. sobrinus* はう蝕の原因菌として知られている [7]。

今回、代表的な口腔レンサ球菌である *Streptococcus mutans*、*S. sobrinus*、*S. sanguinis*、*S. mitis*、*S. salivarius* の 5 菌種について、それらの産生する細胞壁分解酵素（溶菌酵素）を検討するため、Zymography を用いた。

本研究では、まず、口腔レンサ球菌の産生する溶菌酵素を抽出する方法（粗酵素画分抽出法）について検討を行い、次に各種の菌 5 株ずつを用い、細菌の産生する溶菌酵素パターンについて検討を行った。また基質に用いる菌種を変えて、基質に対する各菌種の溶菌酵素のバンドパターンについて検討を行った。

### 第2節 材料及び方法

#### 第1項 使用菌株及び培養条件

今回、標準菌株として、*S. mutans* MT703R、*S. sobrinus* OMZ176a、*S. sanguinis* ATCC10556、*S. mitis* ATCC9811、*S. salivarius* ATCC9222 を用い、また、*S. mutans*、*S. sobrinus*、*S. sanguinis*、*S. mitis*、*S. salivarius* の臨床分離株各 4 株ずつを用いた。臨床分離株は徳島大学の三宅教授に分与譲渡していただいた。

これらの菌株は Brain Heart Infusion 培地（BHI, Becton and Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, USA）を用い、対数増殖期後期（ $OD_{660nm}=0.8$ ）まで 37°C にて振盪培養した。

#### 第2項 粗酵素画分調製法

細菌は対数増殖期後期 ( $OD_{660nm}=0.8$ ) に達するまで約 12 時間培養した。その後遠心 ( $8,000 \times g, 20 \text{ min}, 4^\circ\text{C}$ ) して得られた菌体及び上清より、粗酵素画分を調製した。

(1) LiCl 抽出画分

菌体を同量の 3M LiCl 溶液に懸濁し、水中にて 15 分静置後、遠心 ( $15,000 \times g, 10 \text{ min}, 4^\circ\text{C}$ ) して得られた上清画分を用いた。

(2) SDS 抽出画分

菌体を 2 倍量の 4% SDS 溶液に懸濁し、室温にて 30 分間静置後、遠心 ( $15,000 \times g, 10 \text{ min}, 4^\circ\text{C}$ ) して得られた上清画分を用いた。

(3) Urea 抽出画分

菌体を 2 倍量の 8M Urea 溶液に懸濁し、室温にて 30 分間静置後、遠心 ( $15,000 \times g, 10 \text{ min}, 4^\circ\text{C}$ ) して得られた上清画分を用いた。

(4) 上清濃縮画分

培養液を遠心 ( $8,000 \times g, 20 \text{ min}, 4^\circ\text{C}$ ) して得られた培養上清に硫酸アンモニウムを 80% 飽和になる様に加え、 $4^\circ\text{C}$ にて一晚振盪し、塩析を行った。その後遠心 ( $8,000 \times g, 20 \text{ min}, 4^\circ\text{C}$ ) し、沈渣を回収した。得られた画分を 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) に溶解し 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) にて 12 時間透析して、得られたサンプルを上清画分とした。

(5) 菌体破碎画分

菌体を 2 倍量の 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) に懸濁後、超音波破碎機 (TOMY SEIKO, 東京, 日本) にて破碎 ( $30 \text{ min}, 0.5 \text{ sec pulse}$ , レベル 4) し、遠心 ( $15,000 \times g, 20 \text{ min}, 4^\circ\text{C}$ ) して得られた上清を菌体破碎画分とした。

### 第 3 項 Zymography を用いた溶菌酵素の検出法

Zymography に封入する死菌体の作製を行った。BHI 培地 (Becton and Dickinson) 500 ml を用い、対数増殖期後期 ( $OD_{660nm}=0.8$ ) に達するまで約 12 時間培養を行った。その後遠心 ( $8,000 \times g, 20 \text{ min}, 4^\circ\text{C}$ ) し、得られた菌体について 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) にて 2 回洗浄し、10 倍量の 4% SDS を用いて懸濁し、30 分間煮沸した。その後、6 回蒸留水にて十分に洗浄し、得られた沈渣を蒸留水 2 ml に懸濁し、 $500 \mu\text{l}$  ずつ分注し、その後遠心 ( $9,000 \times g, 15 \text{ min}, 4^\circ\text{C}$ )

して上清を取り除き、死菌体を少量に分けた。ついで 40%フッ化水素酸を各々の 1 ml ずつ用いて 4℃にて 12 時間振盪した。フッ化水素酸にて処理した菌体を再び回収して、6 回蒸留水にて十分に洗浄し、ついで凍結乾燥を行ったものを加熱処理死菌体として実験に供した。

蛋白の電気泳動法である SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は Laemmli の方法 [20] に従い、電気泳動装置 (Mini-PROTEAN, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて行った。分離ゲルは 12%のアクリルアミドゲルの濃度で作製した。Zymography は SDS-PAGE を用いた既法 [21] に従い、ゲルには各菌種の加熱処理死菌体を 1 mg/ml になるように封入した。電気泳動後、分離ゲルを精製水中にて室温で 30 分間緩やかに洗浄し、0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) 中にて 12 時間振盪した。溶菌酵素活性が緩衝液中にて再生することにより、ゲル内に封入した菌体が溶解し、溶菌バンドとして検出、同定が可能となる。出現したバンドは間接光 (イムノビューアー-MU, JOKO SANGYOU, 東京) にて検出した。

### 第 3 節 結果

#### 第 1 項 粗酵素画分を用いた溶菌バンドの検出

*S. mutans* MT703R 株菌体より第 1 章、第 2 節、第 2 項の方法により、粗酵素画分を調製し、同菌死菌体を用いた Zymography によりその活性を検討した (図 2)。その結果、4% SDS 抽出画分及び 8M Urea 抽出画分より推定分子量 100 kDa と 80 kDa に明確な溶菌バンドを検出した。また、菌体破碎画分からも同様にバンドを検出したが、破碎された菌体成分やその他の蛋白が多く、ゲル中の溶菌バンドは明確ではなかった。一方、3M LiCl 抽出画分及び培養上清中からは Zymography において明確な溶菌バンドは得られなかった。また、今後の検討には明確な溶菌バンドが得られた 4% SDS 抽出画分を用いることとした。

#### 第 2 項 口腔レンサ球菌 5 菌種を用いた溶菌バンドの検出

口腔レンサ球菌 5 菌種の 4% SDS 抽出画分を用いて、Zymography による溶菌バンドの検出を行った。菌株は第 1 章、第 2 節、第 1 項に記した口腔レンサ球菌 5 菌種及びその臨床分離株を用いた。各菌種 5 株を用いて溶菌バンドの検出を行った結果、*S. salivarius* を除く他の 4 菌

種では同菌種間では溶菌活性を示すバンドパターンが非常に類似していた（データ示さず）。*S. salivarius* においては2種類の溶菌酵素パターンが示された。図3、表1に各菌種の Zymography 及びその検討結果を示している。

得られた溶菌バンドパターンは菌種間で異なっていた。*S. mutans* からは、*S. mutans* と *S. sobrinus* を基質に用いた場合、図2で示した分子量 100 kDa と 80 kDa の二本の活性の強い溶菌バンドが得られた。*S. sobrinus* からは両基質をもちいた場合、78 kDa に活性の強いバンドを得た。また、*S. sobrinus* を基質に用いた時のみ 90 kDa に活性の弱いバンドを得ている。これらの溶菌バンドのその他の3菌種に対する活性については、*S. sanguinis* 菌体に対しては活性を示さず、また *S. mitis* 及び *S. salivarius* 菌体に対する活性は弱かった。

その他の3菌種について溶菌バンドパターンを検討した結果、*S. sanguinis* については、いずれの条件（基質、粗酵素の組み合わせ）においても、明確な溶菌バンドは見当たらなかった。また、*S. mitis* 及び *S. salivarius* 抽出画分は基質として *S. mitis* 及び *S. salivarius* の菌体に対し複数の弱い活性を示す溶菌バンドを認めた。また、*S. salivarius* は Zymography のパターンに従い、2つのタイプに分類された。

#### 第4節 考察ならびに小括

本研究では、*S. mutans*、*S. sobrinus*、*S. sanguinis*、*S. mitis*、*S. salivarius* の口腔レンサ球菌5菌種を使用し、溶菌酵素活性を示す蛋白バンド（溶菌バンド）の検出を行った。

*S. mutans* を用い、溶菌酵素の抽出法について検討した。*S. mutans* 菌体及び上清より様々な画分の蛋白を調製し、同菌死菌体を用いた Zymography を用いて活性を検討した。その結果、3M LiCl 抽出画分及び濃縮された培養上清中からは溶菌バンドは得られなかったが、4% SDS 抽出画分及び 8M Urea 抽出画分より分子量 100 kDa と 80 kDa に溶菌バンドを検出した。これらの結果より、*S. mutans* の分子量 100 kDa と 80 kDa の蛋白は細胞表面に電荷的にイオン結合しているのではなく、細胞壁あるいは細胞膜成分と比較的強固に結合している事が推定された。

次に、口腔レンサ球菌5菌種について 4% SDS 抽出画分を用いて、溶菌バンドの同定を行った結果、溶菌バンドパターンは菌種間で異なっていた。また、これらの溶菌バンドの感受性は基質によってかなり異なっていた。*S. mutans* 及び *S. sobrinus* 菌体に対して活性の強かった

*S. mutans* 及び *S. sobrinus* の溶菌酵素はその他の 3 菌種に対しては活性が非常に弱かった。以上の結果より、*S. mutans*、*S. sobrinus* の細胞壁は同じ *mutans* グループに属する *S. mutans* 及び *S. sobrinus* の産生する溶菌酵素に対して感受性があるが、他のグループ (*mitis-sanguinis* グループ、*salivarius* グループ) に属する菌種の細胞壁は *S. mutans* 及び *S. sobrinus* の産生する溶菌酵素に対して非常に感受性が弱く、これらの酵素の菌種特異性が推測された。

今回、*S. sanguinis* を用いた場合、いずれの条件においても明確なバンドは検出されなかった。しかし、細菌の恒常性の維持において、細胞壁の代謝は不可欠であり [3-5]、溶菌酵素は存在していると考えられる。また、*Streptococcus* 属においてはいくつかの菌種において全ゲノム塩基配列が明らかにされており [22-24]、それぞれ数種類の溶菌酵素の存在が予測されている。*S. sanguinis* のゲノム塩基配列決定は未だ完了していないが (<http://www.sanguis.mic.vcu.edu/blast.html>)、すでに一つの溶菌酵素 (*glucosaminidase*) をコードする遺伝子の存在が確認されている。

今回、*S. sanguinis* を用いた *Zymography* において、いずれの条件でも溶菌バンドが検出されなかった原因として、蛋白の SDS 化の影響が考えられた。今回の検出法である *Zymography* は酵素を SDS 化し、変性させて電気泳動を行っている。その後、リン酸緩衝液中にて酵素活性を再生させ、活性が再生した酵素のみ溶菌バンドとして検出が可能である。*S. sanguinis* の溶菌酵素は、今回の検出方法では酵素活性が再生されず、検出できなかった可能性もあると考えられる。また、同菌種および近縁の *Streptococcus* 属に対しては溶菌活性を示さないなどの基質特異性、菌種特異性を有する可能性も考えられる。

また、*S. salivarius* については分子量が異なった 2 種類の溶菌酵素パターンが得られた。コロニー形態及び *S. salivarius* の *gtf* 遺伝子を基に作成した *specific primer* を用いた PCR [25] によって同菌種に属することを検討している (データ示さず)。しかし、*S. salivarius* の溶菌酵素については報告が無く、2 種類の溶菌酵素パターンが検出された理由は不明である。

口腔レンサ球菌 5 菌種の産生する溶菌酵素は、菌種によりバンドパターン及び酵素の基質に対する感受性が異なった。得られた溶菌バンドについてさらなる解明を行うためには、個々の溶菌バンドの同定ならびに性状解析が必要であると考えられた。

## 小括

1. Zymography を用いて、口腔レンサ球菌の溶菌酵素の検討を行った結果、各粗酵素は菌種間で異なる溶菌バンドパターンを示した。また、溶菌バンドの感受性が基質に用いる菌種の違いにより異なった。
2. *S. mutans* の分子量 100 kDa と 80 kDa 及び *S. sobrinus* の分子量 78 kDa の蛋白が *S. mutans* 及び *S. sobrinus* に対して強い溶菌活性を示した。

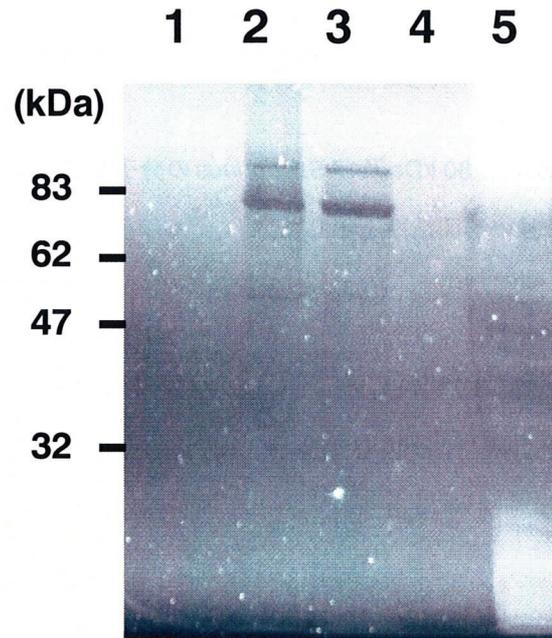
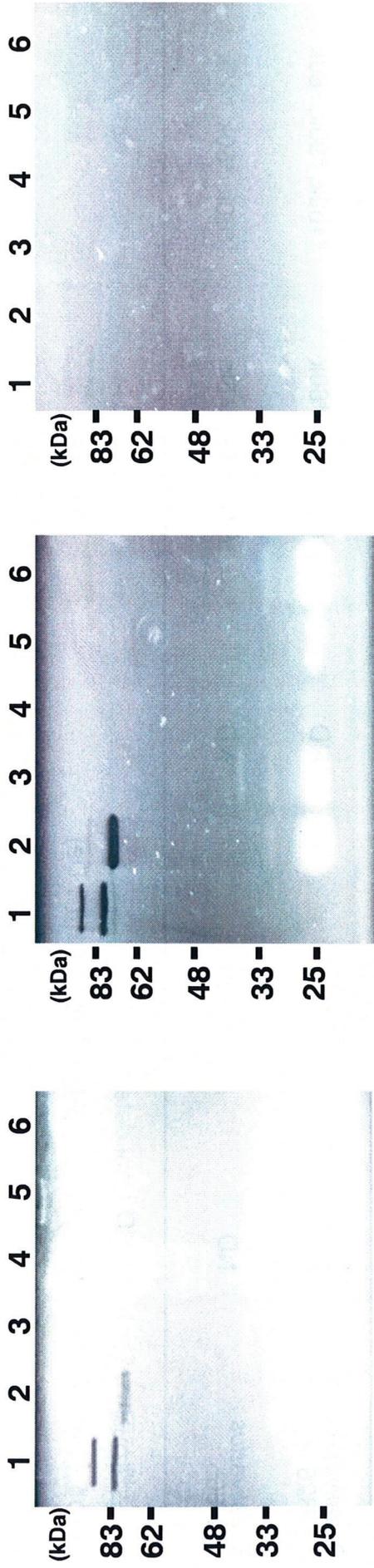


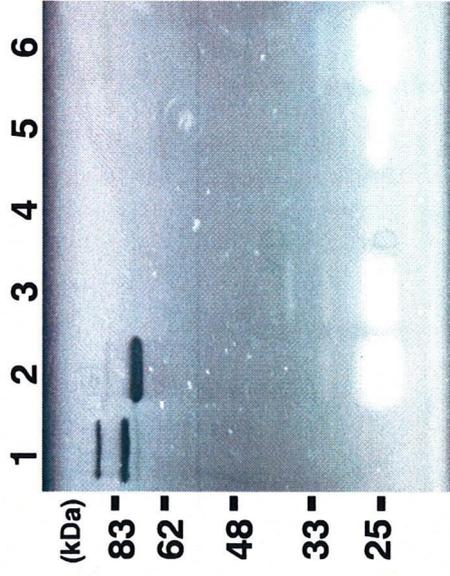
図2 *S. mutans* 死菌体を用いたZymographyによる粗酵素画分の検討

抽出した各粗酵素画分の溶菌活性について、*S. mutans* 死菌体を封入した12%ポリアクリルアミドゲルを用いたZymographyによって溶菌活性を示す蛋白バンド（溶菌バンド）の検討を行った。

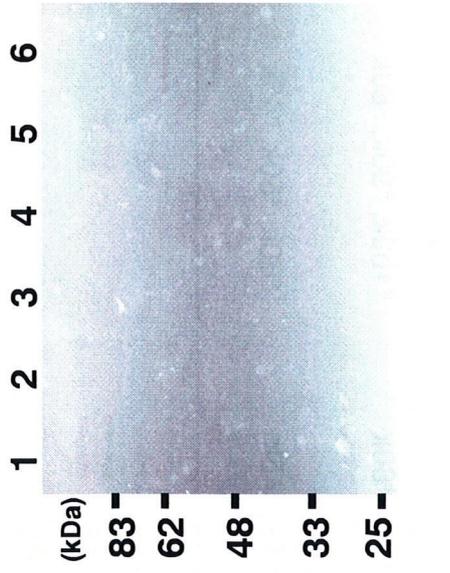
レーン1. 3M LiCl抽出画分    2. 4% SDS抽出画分    3. 8M Urea抽出画分  
 4. 培養上清                    5. 菌体破碎画分



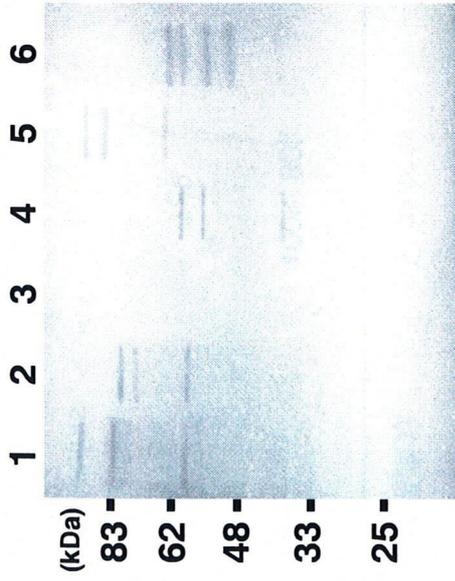
*S. mutans*



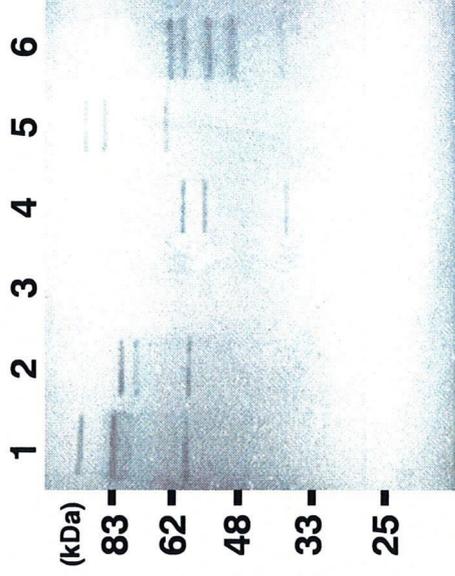
*S. sobrinus*



*S. sanguinis*



*S. mitis*



*S. salivarius*

図3 口腔レンサ球菌5菌種を用いた溶菌バンドの検出

HF処理した口腔レンサ球菌5菌種の菌体を基質に用い、4%SDS抽出画分を用いて、12%ポリアクリルアミドゲルを用いた Zymographyによる溶菌酵素の検出を行った。

レーン1. *S. mutans* MT703R    2. *S. sobrinus* OMZ176a    3. *S. sanguinis* H22    4. *S. mitis* H15  
5. *S. salivarius* H26    6. *S. salivarius* H665

表 1 口腔レンサ球菌 5 菌種を用いた溶菌バンドの検出

粗酵素画分	Zymographyに用いた基質				
	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. mitis</i>	<i>S. salivarius</i>
<i>S. mutans</i> MT703R	100k, 80k	100k, 80k	ND	*100k, *80k, *60k	*100k, *80k, *60k
<i>S. sobrinus</i> OMZ176a	78k	78k, *90k	ND	*78k, *60k, *50k	*78k, *60k, *50k
<i>S. sanguinis</i> H22	ND	ND	ND	ND	ND
<i>S. mitis</i> H15	ND	ND	ND	*60k, *45k, *30k	*60k, *45k
<i>S. salivarius</i> H26	ND	ND	ND	*100k, *90k, *60k	*100k, *90k, *60k
<i>S. salivarius</i> H665	ND	ND	ND	*60k, *50k, *45k	*60k, *50k, *45k

\* : 活性が弱いバンド ND : not detected

表の数値は得られた溶菌バンドの分子量を示す。(単位 : Da)

## 第2章 *Streptococcus mutans* の産生する溶菌酵素の同定

### 第1節 概要

第1章において、口腔レンサ球菌 5 菌種の 4% SDS 抽出画分を用いて、Zymography による溶菌バンドの検出を行った。その結果、各菌種において異なる溶菌バンドパターンを有する事が明らかとなった。*Streptococcus mutans* の粗酵素画分より、*S. mutans* 及び *S. sobrinus* 菌体に対して強い溶菌活性をもつ推定分子量 100 kDa と 80 kDa の溶菌バンドを検出した。

本章では *S. mutans* の産生する分子量 100 kDa と 80 kDa の溶菌バンドについて検討し、これらの蛋白をコードする遺伝子の同定を行った。その結果、これらの蛋白は共に *S. mutans* の染色体上に存在する一つの ORF (ORF : SMU689) にコードされていることが判明した。検索の結果、予想される蛋白は、推定分子量 107 kDa の分泌型の蛋白で、明らかにされているゲノム上では ORF の機能はいまだ判明しておらず、新規の溶菌酵素であることが明らかとなった。ORF の C 末端側は相同性検索の結果、既存の溶菌酵素 (muraminidase) [26-29] と相同性を示し、その予想される活性 (muraminidase 活性) 及び自己の細胞壁を溶解する活性より、ORF : SMU689 にコードされる蛋白を automutanolysin (Aml) と名付けた。本章では、この溶菌酵素の同定及び遺伝子組み換え蛋白、遺伝子不活化株を用いた検討について述べる。

### 第2節 材料及び方法

#### 第1項 使用菌株及び培養条件

実験に用いた菌株及びプラスミドを表2に示す。*S. mutans* 及び *E. coli* は Brain Heart Infusion (BHI ; Becton and Dickinson) 培地及び Luria-Bertani (LB) 培地を用いて培養した。菌株は、必要に応じて erythromycin (10 µg/ml) 及び ampicillin (100 µg/ml) を添加し、37°Cにて培養を行った。

## 第2項 N末端アミノ酸配列の決定

第1章の *S. mutans* の死菌体を用いた Zymography において検出された溶菌バンドについて、その責任タンパク質の N 末端のアミノ酸配列を決定した。*S. mutans* MT703R 株を 1 liter の BHI 培地を用いて培養し、約 2 g の菌体を得た。得られた菌体に第1章、第2節、第2項(3)に準じ 8M Urea 溶液を 4 ml 加え、Urea 抽出画分を得た。それを 1 mg/ml まで centricon YM-10 (Millipore, Bedford, USA) を用いて遠心濃縮を行い、粗酵素画分とした。得られた粗酵素について 7.5 %ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE を行い、ミニトランスブロット (Bio-Rad Lab., Hercules, USA) を用いて 0.02 % SDS 含有 30 mM Tris-borate buffer (pH 8.5) 中で Trans-Blot membrane (poly vinylidene difluoride membrane; Bio-Rad) に転写した。転写した membrane に Coomassie 染色を行い、ついで 50 %メタノールを用いて脱色し、溶菌バンドに相当する蛋白バンドを切り出し、ついで 100 %メタノールを用いて完全に脱色し、精製水にて洗浄した。得られた蛋白についてアミノ酸シーケンスを行った。

アミノ酸シーケンスには Model 49X Procise Protein Sequencer (PE Applied Biosystems) を用い、Edman 分解法にて 100 kDa と 80 kDa の蛋白について、それぞれ N 末端の 10 アミノ酸残基を決定した。

## 第3項 アミノ酸配列を用いた相同性検索

得られたアミノ酸配列を用いて相同性検索を行った。検索には Web 上に公開されている TIGR Microbial Database 'Streptococcus mutans UAB 159' (<http://tigrblast.tigr.org/cmr-blast/>) を使用した。

## 第4項 DNA 操作

一般的な DNA 操作は Sambrook らの方法 [31] に従った。*E. coli* における electroporation 法による形質転換は既法に従った [32, 33]。*E. coli* からの plasmid DNA の精製には plasmid

mini-prep kit (Bio-Rad Laboratories) を、agarose gel からの DNA 回収には Gene clean III kit (BIO101) を用いた。

#### (1) PCR

PCR は High Fidelity System (Roche, Mannheim, Germany) を用い、PCR 反応には Gene Amp PCR system 9700 (PE Applied Biosystems, CA, USA) を用いた。PCR 条件は、94°C 2 min、(denature 94°C 15 sec、annealing 30 sec、extension 72°C 1 kbp あたり 1 min ) を 25 cycle、72°C 7 min、4°Cで行った。本章で使用した primer は表 2 に示した。annealing 温度及び伸長反応時間は目的の遺伝子に応じて条件設定を行った。

#### (2) 染色体 DNA の精製

染色体 DNA の精製は Sambrook らの方法 [31] に準じて行った。10 ml の BHI 培地にて *S. mutans* MT703R 株を培養後、遠心 (8,000×g, 20 min, 4°C) した後で集菌し、1 ml TE buffer (10 mM Tris-HCl [pH8.0] , 1 mM EDTA) に懸濁した。懸濁液に mutanolysin (10 mg/ml) を 10 µl 加え、37°Cで 1 時間インキュベートした。その後さらに proteinase K (10 mg/ml) を 10 µl、10% SDS を 12 µl加え 50°Cで 4 時間インキュベートした。次に等量の 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer 飽和フェノールで 3 回水層を抽出し、さらにフェノールクロロホルムで同様に 3 回水層を抽出し、蛋白成分を除去した。そこに 2 倍量のエタノールを加えて遠心して得られた沈殿物を TE buffer に溶解し、染色体 DNA として用いた。

### 第 5 項 遺伝子組み換え蛋白発現株の作製

得られた ORF : *SMU689* の遺伝子情報をもとに遺伝子組み換え蛋白発現株の作製を行った。シグナル配列を除いた ORF : *SMU689* の塩基配列の N 末端部分に pQE30 vector (Qiagen, Hilden, Germany) の His-tag sequence とフレームをあわせて primer を設計した (表 2 参照)。作製した primer Sm2 と Sm3 を用い、染色体 DNA を鋳型にして PCR 反応を行い、*SMU689* 遺伝子の増幅を行った。PCR 条件は、94°C 2 min、(denature 94°C 15 sec、annealing 47°C 30 sec、extension 72°C 4min ) を 25 cycle、72°C 7 min、4°Cで行った。これらの PCR 増幅産物を pGEM T-easy vector に組み込んだ後、*Bam*HI 及び *Sal*I (共に Roche) にて切断後、目的の遺伝子断

片を Gene clean III kit (BIO101) を用いて回収した。回収した遺伝子断片を、前述と同様の制限酵素で処理した pQE30 vector と T4 ligase (TOYOBO Co., Ltd., 大阪, 日本) を用いて Ligation 反応後、*E. coli* XL-II 株に形質転換し、His-tag 組み換え蛋白 (full SMU689) 発現株を得た。

また、Sm2 と Sm5 の primer (表 2 参照) を用いて PCR にて SMU689 蛋白の C 末端側 213 アミノ酸をコードする遺伝子領域を遺伝子を増幅し (PCR 条件 : 94°C 2 min、[denature 94°C 15 sec、annealing 47°C 30 sec、extension 72°C 1min] を 25 cycle、72°C 7 min、4°C)、上記と同様の手順により pQE30 vector に挿入し、SMU689 蛋白の C 末端側 213 アミノ酸部分を発現する His-tag 組み換え蛋白 (213aa) 発現株を作製した。

#### 第 6 項 遺伝子組み換え蛋白 (His-tag 組み換え蛋白) の発現及び粗精製

前項にて作製した大腸菌株を LB 培地 500ml で  $OD_{660nm} = 0.5$  になるまで 37°C で振盪培養し、His-tag 組み換えタンパクを発現させるため IPTG (Wako Pure Chemical Industries) を最終濃度 1 mM になるよう添加し、4 時間培養した。その後遠心 (8,000×g, 20 min, 4°C) し、得られた菌体を PBS にて 2 回洗浄した。その後、PBS10 ml を用いて懸濁し、超音波破砕器 (TOMY SEIKO, 東京, 日本) にて菌体を破砕 (30 min, 0.5 sec puls, レベル 4) した。破砕したサンプルを遠心 (8,000×g, 20 min, 4°C) し、得られた沈渣を 0.2% 含有 PBS10 ml を用いて懸濁し、30 分室温にて震盪した。振盪後、再度遠心 (8,000×g, 20 min, 4°C) し上清を取り除き、一連の過程で沈渣を十分に洗浄した。同じ手順で、再度洗浄を行い、得られた沈渣を inclusion body とした。inclusion body を Lysis buffer B (8 M Urea, 0.1 M  $NaH_2PO_4$ , 0.01 M Tris-HCl, pH 8.0) 10 ml に懸濁し、もう一度超音波破砕器を用いて (30 min, 0.5 sec puls, レベル 4) 沈渣を溶解した。遠心 (8,000×g, 20 min, 4°C) 後、上清に Ni-NTA Agarose (QIAGEN) を bed volume 1.0ml となるように加え、4°C にて 1 時間振盪して結合させた後、Ni-NTA Agarose を 5 倍量の wash buffer C (8 M Urea, 0.1 M  $NaH_2PO_4$ , 0.01 M Tris-HCl, pH 6.3) を用いて 3 回洗浄した。His-tag 組み換え蛋白の溶出は Elution buffer E (8 M Urea, 0.1 M  $NaH_2PO_4$ , 0.01 M Tris-HCl, pH 4.5) 1.0 ml x 10 を加え行った。得られた溶出画分は 1M Tris-HCl (pH8.0) を 80  $\mu$ l 加え、平衡化し

た。

#### 第7項 遺伝子組み換え蛋白の精製法

前項で作製した His-Tag 組み換え蛋白 (full SMU689) の精製度を向上させるため、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて精製を行った。カラムには疎水性クロマトグラフィーに使用する phenyl 5PW (5pHR0050 ; Tosoh, 東京, 日本) を使用した。また精製に使用する buffer は、A buffer として 1M NaCl、1M Urea、0.1M リン酸緩衝液 (pH8.0) を用い、B buffer として 1M Urea、0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) を用いた。精製はまず前項にて作製した His-tag 組み換え蛋白 (full SMU689) を HPLC に用いる A buffer にて透析し、ついで A buffer にて平衡化を行ったカラムに添加した。HPLC において A buffer を B buffer に 30 分間のリニアグラジエントを流速 1 ml/min で行いカラムを B buffer に置換後、B buffer 100% にて溶出される抽出画分を分画し、活性画分を得た。得られた活性画分を 30% のエチレングリコールを含む 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) にて透析を行い、精製標品としてその後の実験に使用した。

C 末端側の 213 アミノ酸部分の His-tag 組み換え蛋白 (213aa) は Disk preparative gel electrophoresis system (Nihon Eido, 東京, 日本) を用いて精製を行った。プラスチック中筒 (36×95 mm) 中に 12% アクリルアミドゲルを作製し、His-tag 組み換え蛋白 (213aa) を加え、80V 定電圧にて 15 時間泳動し、200  $\mu$ l ずつ分画した。分画されたサンプルについて 12% アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE を行い、目的の蛋白が含まれる画分を回収した。

#### 第8項 抗体作製方法

抗体の作製には日本白色ウサギ (体重 2 kg) を用いた。前項にて精製した His-tag 組み換え蛋白 (213aa) を用いて抗血清を作製した。初回は蛋白 (50  $\mu$ g) に等量の Freund's complete adjuvant (Difco Laboratories, Detoit, Misigan, USA) を加え、エマルジョン化させた後、皮下に数か所注射した。2 回目 (2 週目) 以降は Freund's incomplete adjuvant (Difco) を用い、同様に皮下に注射した。4 回目 (8 週目) 以降は蛋白 (50  $\mu$ g) を PBS 500  $\mu$ l にて希釈し、静脈注射を行った。最終的に最初の接種から 14 週目に抗血清を採取した。抗体価のチェックは後

述する Western Blotting 法により行い、抗 SMU689 血清は 10 ng まで認識が可能であった。

#### 第 9 項 Western Blotting 法

アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE 後、ミニトランスブロット (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) により nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) に転写を行った。転写した membrane に対し、1 次抗体として 2,000 倍希釈の抗 SMU689 血清を、2 次抗体として peroxidase 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Amersham Life Science, Buckinghamshire, United Kingdom) を用い、37°C で 1 時間ずつ反応させた。抗血清に反応するバンドは ECL Western blotting reagents (Amersham pharmacia biotech, Buckinghamshire, England) を用いて発光させ、Fuji RX-U film (Fuji Film, 東京, 日本) に現像して検出した。

#### 第 10 項 遺伝子不活化株の作製

*SMU689* 遺伝子の発現を欠失させた遺伝子不活化株の作製を、Campbell 型挿入変異により行った (図 10)。第 2 章、第 2 節、第 4 項 (2) に準じ、primer Sm2 と Sm3 を用い、染色体 DNA を鋳型にして PCR 反応を行い、*SMU689* 遺伝子の増幅を行った。PCR 条件は、94°C 2 min、(denature 94°C 15 sec、annealing 47°C 30 sec、extension 72°C 4min) を 25 cycle、72°C 7 min、4°C で行った。増幅された PCR 産物を pGEM T-easy vector に組み込み、プラスミド pGY112 を得た。また、エリスロマイシン (EM) 耐性領域を含むプラスミド pRN3208 [34] より、primer tn2 と tn3 を用い同様の手順により PCR 反応を行い、EM 耐性領域の増幅を行った。PCR 条件は、94°C 2 min、(denature 94°C 15 sec、annealing 47°C 30 sec、extension 72°C 2min) を 25 cycle、72°C 7 min、4°C で行った。増幅された PCR 産物を pGEM T-easy vector に組み込み、プラスミド pGY143 を得た。得られたプラスミドより、*KpnI* (Roche) を用いて EM 耐性遺伝子を切り出し、Gene clean III kit (BIO101) を用いて回収した。回収した遺伝子断片を、前述と同様の制限酵素で処理した pGY112 の *KpnI* 切断部位に、T4 ligase (TOYOBO) を用いた Ligation 反応により組み込み、*SMU689* 遺伝子不活化株作製用プラスミド pGY145 を得た。

作製したプラスミド pGY145 を用いて *S. mutans* 5 株 (MT703R, MT403R, SE-11, LM-7,

C67-1 : 表 2 参照) について *SMU689* 遺伝子不活性化株の作製を試みた。BHI 培地を用いて一晚培養した *S. mutans* の培養液を 10% Horse Serum (Invitrogen, Grand Island, N.Y., USA) 含有 Todd Hewitt Broth (THB, Becton and Dickinson) 2 ml に 100  $\mu$ l 添加し、 $OD_{660nm}=0.3-0.4$  になる様に培養した。その後培養液に DNA 溶液 (pGY145) を 0.1mg 添加した。添加後、37°C にて 30 分インキュベートし、次に 10% Horse Serum (Invitrogen) 含有 THB 2 ml に 100  $\mu$ l 添加した。37°C にて 2 時間培養し、EM (10  $\mu$ g/ml) 含有 BHI 寒天培地に播種した。寒天培地を 37°C にて培養し、エリスロマイシンに耐性のコロニーを採取し、耐性株について、エリスロマイシン耐性領域挿入による不活性化を PCR にて検討した。primer には tn2 及び tn3 (表 2 参照) を用い、PCR 条件は 94°C 2 min、(denature 94°C 30 sec、annealing 49°C 30 sec、extension 72°C 2min) を 25 cycle、72°C 7 min、4°C で行った。得られた *SMU689* 不活性化株 (GY154) については *S. mutans* 死菌体を用いた Zymography 及び抗 *SMU689* 血清を用いた Western Blotting によって蛋白の発現の有無を確認した。

### 第 3 節 結果

#### 第 1 項 溶菌酵素遺伝子の同定

*S. mutans* MT703R 菌体より 8M Urea 溶液を用いて粗酵素画分を抽出し、*S. mutans* 死菌体を用いた Zymography において観察される 100 kDa と 80 kDa の溶菌バンドと一致する蛋白バンドを切り出し、protein sequencer を用いて N 末端アミノ酸配列を決定した (図 4)。

推定分子量 100 kDa と 80 kDa の溶菌バンドについて、それぞれの N 末端のアミノ酸配列を 10 残基決定した結果、100 kDa の溶菌バンドの配列は、“ DEQNSLSAS ” であり、80 kDa の溶菌バンドの配列は、“ VQARSSLTQD ” であった。得られたこれらの配列を用いて、Web 上に公開されている相同性検索サーチである TIGR Microbial Database “ *S. mutans* UAB159 ” を用いて相同性検索を行ったところ、100 kDa と 80 kDa の溶菌バンドは共に *S. mutans* 染色体 DNA 上に存在する一つの ORF : *SMU689* にコードされている事が判明した (図 5)。また、データベース上では得られた ORF の機能は判明していなかった。

ORF : SMU689 にコードされる蛋白は 979 アミノ酸残基からなり、推定分子量は 107.2 kDa、等電点は 5.45 であった。N 末端アミノ酸シーケンスにて得られた配列の 100 kDa の蛋白バンドは 25 番目の Asp (D) から、80 kDa の蛋白バンドは 167 番目の Val (V) から一致していた。また、Web 上に公開されているシグナルペプチド検索ソフトである signal-P (<http://www.cds.dtu.dk/services/signalP-3.0/>) をもちいてシグナル配列を検索した結果、1 番目の Met (M<sub>1</sub>) から 24 番目の Ala (A<sub>24</sub>) までがシグナルペプチドと推測された。また、100 kDa の蛋白バンドの N 末端アミノ酸残基が Asp (D<sub>25</sub>) と一致することより、M<sub>1</sub> から A<sub>24</sub> までがシグナルペプチドであると考えられた (図 5)。

相同性検索の結果、ORF : SMU689 についての機能はいまだ不明であったが、その C 末端側について BLAST、FASTA を用いて相同性を検索したところ、グラム陽性菌の *Streptococcus gordonii* [26]、*Enterococcus faecalis* [27]、*Lactobasillus sakei* [35]、*Lactobacillus plantum* [28]、放線菌である *Streptomyces coelicolor* [29] などの蛋白と相同性が得られた。相同性が得られた蛋白は主には溶菌酵素の muraminidase であり、一部はいまだ機能不明の蛋白であった (図 6-c)。ORF : SMU689 の C 末端側と 22% の相同性が見られた *Streptomyces coelicolor* の溶菌酵素 (muraminidase) は結晶構造解析まで行われており [29]、活性中心と考えられるアミノ酸 (アスパラギン酸 : D<sub>9</sub>、及び D<sub>98</sub>) が決定されている。SMU689 蛋白について相同性を検討した結果、活性中心と考えられるアスパラギン酸 D<sub>777</sub> 及び D<sub>869</sub> が SMU689 蛋白についても保存されていた (図 7)。また、N 末端半側においては、13 アミノ酸残基からなる 5 回の繰り返し構造が保存されている。これらの繰り返し構造は Val (V)<sub>212</sub>-Tyr (Y)<sub>225</sub>、V<sub>303</sub>-Y<sub>316</sub>、V<sub>408</sub>-Y<sub>421</sub>、V<sub>506</sub>-Y<sub>519</sub>、V<sub>597</sub>-Ile (I)<sub>610</sub> 部分で、構成するアミノ酸が高く保存されていた (図 6-b)。これらの繰り返し部分についても相同性検索を行ったが、既存のモチーフ等との相同性は認められなかった。しかし、このような繰り返し構造は他の溶菌酵素についても多く見られ、またそれらは菌体との結合に働いているとの報告があるため [36-39]、SMU689 蛋白においても繰り返し構造部分が酵素と菌体との結合に働いていると想定された。

また、ORF : SMU689 の周辺領域の ORF について相同性検索 (BLAST) を用い解析した結果、ORF : SMU689 周辺には細胞壁の合成に関わる *murM*、*murN* operon や、代謝に関わる phosphoenolpyruvate や phosphoglycerate mutase (共に糖のリン酸化酵素)、などの菌にとつ

て生存に必要な遺伝子が多い領域に存在する事が判明した (図 8、表 3)。

## 第 2 項 遺伝子組み換え蛋白の精製及び活性の検討

得られた遺伝子情報を基に遺伝子組み換え蛋白を作製し精製を行い、full SMU689 組み換え蛋白の酵素活性について検討した。*S. mutans* の染色体 DNA を用いて目的の遺伝子を増幅し、大腸菌の蛋白発現ベクターである pQE30 に組み込み、大腸菌 (*E. coli* XL-II) にて発現を行った。得られた蛋白は、pQE system 及び phenyl を用いた疎水クロマトグラフィーにより精製を行った。その結果、目的の蛋白がほぼ単一バンドとして精製され (図 9)、1 liter の培養液より、約 1 mg の精製蛋白が得られた。また、得られた精製標品について *S. mutans* 死菌体を封入した Zymography を用いて溶菌活性を検討したところ、溶菌バンドとして検出され (図 9)、full SMU689 組み換え蛋白の溶菌酵素活性が確認された。

## 第 3 項 遺伝子不活化株における目的蛋白発現消失の確認

ORF : SMU689 遺伝子の発現を欠失させた遺伝子不活化株の作製を、Campbell 型挿入変異により行った (図 10)。ORF : SMU689 遺伝子にエリスロマイシン耐性領域を組み込んだプラスミドを作製し、*S. mutans* 5 株 (MT703R, MT403R, SE-11, LM-7, C67-1) に対して、形質転換を試みた。実験に使用した *S. mutans* 5 株における 100 kDa と 80 kDa の溶菌バンドの発現を Zymography において、また遺伝子の存在を PCR において確認している (データ示さず)。形質転換の結果、使用した 5 菌株のうち、C67-1 株について遺伝子不活化株 (GY154 株) が得られ、PCR にて挿入変異を確認した (データ示さず)。

次に *S. mutans* C67-1 株及び遺伝子不活化株 (GY154 株) より 4% SDS を用いて粗酵素画分を抽出し、*S. mutans* 死菌体を用いた Zymography 及び抗 SMU689 血清を用いた Western Blotting によって目的蛋白の発現消失を検討した。その結果、遺伝子不活化株 (GY154 株) において、100 kDa と 80 kDa の溶菌バンド及び抗 SMU689 血清に反応するバンドは認められなかった (図 11)。また ORF : SMU689 遺伝子の不活化により、*S. mutans* の産生する 100 kDa

と 80 kDa の溶菌バンドが共に消失した。従って、これらの溶菌バンドが共に *ORF: SMU689* 遺伝子にコードされている事が実験的に確かめられた。

#### 第4節 考察ならびに小括

本章において、*S. mutans* の産生する分子量 100 kDa と 80 kDa の溶菌酵素について同定を行い、遺伝子組み換え蛋白及び遺伝子不活化株を用いて検討を行った。その結果、これらの溶菌バンドが *ORF: SMU689* 遺伝子にコードされている事が確かめられた。また、*ORF: SMU689* 遺伝子組み換え蛋白 (full SMU689) が、自己の細胞壁を溶解する活性をもち、また相同性検索の結果 (図 6、図 7) から、その活性様式は muraminidase 活性が予想されることより、この新規の溶菌酵素を Automutanolysin (Aml) と名付けた。

Aml の C 末端側ドメインは相同性検索の結果、グラム陽性菌の *Streptococcus gordonii* [26]、*Lactobacillus sakei* [35]、*Lactobacillus plantum* [28]、放線菌である *Streptomyces coelicolor* [40] などの muraminidase 活性を有する蛋白と相同性が得られた。また、結晶構造解析まで行われている *Streptomyces coelicolor* の mutanolysin [29] とは 22% の相同性を有していた。Astrid Rau らは結晶構造解析により判明した mutanolysin の活性様式について、酸性アミノ酸が電気的にマイナスにチャージされた溝をつくり、ペプチドグリカンはその溝を通過することによって切断されるというモデルを呈示しており、その活性中心が 2 つのアスパラギン酸 (D) であると述べている [29]。今回 Aml においても活性中心と考えられるアスパラギン酸 (D) が保存されており、Aml がペプチドグリカンに対して同様の切断様式をとる可能性が高いと考えられた。

多くの溶菌酵素において、細胞壁との結合ドメインとして繰り返し配列が存在する。*S. pneumoniae* の LytA 蛋白は C 末端に、LytB 蛋白においては N 末端に繰り返し構造が保存され、これらは細胞壁の構成成分であるタイコ酸の成分のコリンとの結合に働いているとの報告がある [37, 41]。また、*Bacillus subtilis* の CwIB amidase と CwIG glucosaminidase の N 末端に存在する繰り返し配列は細胞壁との結合に関わるとの報告 [38] があり、*S. aureus* の ATL については中央付近に 3 回の繰り返し構造を有し、それが細胞壁との結合に関わっている [39]。*S.*

*mutans* の Aml の N 末端半側に見られる 5 回の繰り返し構造は、これらのモチーフと相同性を示さなかったが、このような繰り返し構造は細胞壁と結合する蛋白にしばしば認められる。従って Aml の N 末端半側を菌体との結合ドメインと想定した。Aml の N 末端半側ドメインの菌体との結合性については次章において一部検討を行い確認をした。

なぜ Aml が 100 kDa と 80 kDa の 2 本のバンドとして認められるかは現在のところ不明である。切断される N 末端部分の Asp (D<sub>25</sub>) -Ser (S<sub>166</sub>) 部分について検索を行ったが、既存のドメイン、モチーフ等との相同性が認められなかった。しかし、*S. simulans* のペプチドグリカン分解酵素 (glucosaminidase と endopeptidase) において、産生後にプロテアーゼにより分解されて活性型となるとの報告 [42] があり、*S. aureus* の ATL は産生後にプロセッシングを受け、分解され成熟型になるとの報告 [43] がある。Aml においても分解されプロセスされることで何らかの機能を付加する可能性があり、wild type において観察される 100 kDa と 80 kDa の蛋白について、次章において相当する遺伝子組み換え蛋白を作製し、一部検討を行った。

#### 小括

1. *S. mutans* より検出された分子量 100 kDa と 80 kDa の 2 本の溶菌バンドについて同定を行った結果、これらは共に一つの ORF : SMU689 に由来した。
2. ORF : SMU689 の相同性検索の結果、細菌、放線菌等の溶菌酵素と相同性が見られた。
3. ORF : SMU689 の遺伝子組み換え蛋白は *S. mutans* の死菌体を用いた Zymography において溶菌活性が認められた。
4. *S. mutans* の ORF : SMU689 遺伝子不活化株を作製した結果、100 kDa と 80 kDa の溶菌活性を示すバンドが消失した。
5. 以上の結果から得られた ORF : SMU689 が *S. mutans* の 100 kDa と 80 kDa の溶菌酵素をコードする目的の遺伝子である事が証明され、この ORF を automutanolysin (Aml) と名付けた。

表 2-1 使用した菌株

Strain	Relevant characteristics	Source or reference
<i>S. mutans</i>		
703R	clinical strain	clinical isolate
403R	clinical strain	clinical isolate
SE-11	clinical strain	Bratthall [67]
LM-7	clinical strain	Bratthall [67]
C67-1	clinical strain	Bratthall [67]
GY154	GY145 integrate to C67-1 ( <i>EM<sup>r</sup> ::orf SMU689</i> )	This study
<i>E. coli</i>		
XLII-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac fZΔM15 Tn10 (Tet)</i> Amy Cam]	Bullock et al. [30]
GY122	pGY122 / XLII-Blue	This study
GY142	pGY142 / XLII-Blue	This study
GY145	pGY145 / XLII-Blue	This study

表 2-2 使用したプラスミド

Plasmids	Vector	Cloning site	Relevant properties	Reference or source
pGEM-T Easy			<i>E. coli</i> cloning vector for PCR products	Promega
pQE30			<i>E. coli</i> expression vector	QIAGEN
pRN3208			containing erythromycin resistance gene of Tn551	A.Tomasz [34]
pGY112	pGEM	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	pGEM containing PCR fragment [Sm2 + Sm3] of <i>aml</i>	This study
pGY113	pGEM	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	pGEM containing PCR fragment [Sm5+ Sm3] of C-term <i>aml</i>	This study
pGY122	pQE30	<i>Bam</i> HI/ <i>Sal</i> I	pQE-30 containing PCR fragment [Sm2 + Sm3] of <i>aml</i>	This study
pGY142	pQE30	<i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III	pQE-30 containing PCR fragment [Sm5+ Sm3] of C-term <i>aml</i>	This study
pGY143	pGEM	<i>Kpn</i> I/ <i>Kpn</i> I	pGEM containing PCR fragment [tn2 + tn3] of pRN3208	This study
pGY145	pGY115	<i>Kpn</i> I/ <i>Kpn</i> I	pGY115 containing <i>Kpn</i> I fragment of pGY143	This study

表 2-3 使用したプライマー

Gene	number	name	Sequence (5' to 3')	size of amplified products (kbp)
<i>aml</i>	GY15	Sm2	AGT TCC TGC CAT ACT ACT GT	
	GY19	Sm3	TAG GAT CCG ATG AGC AAA ATC AAT CCT	Sm2+Sm3 2.9kbp
	GY20	Sm5	ACG GAT CCG CGG TTG GTT TAG	Sm2+Sm5 0.9kbp
Tn551	GY22	tn2	TGG TAC CAT TCA AAT TTA TCC T	
	GY26	tn3	GGG TAC CGA GCG CCT ACG AGG A	tn2+tn3 1.5kbp

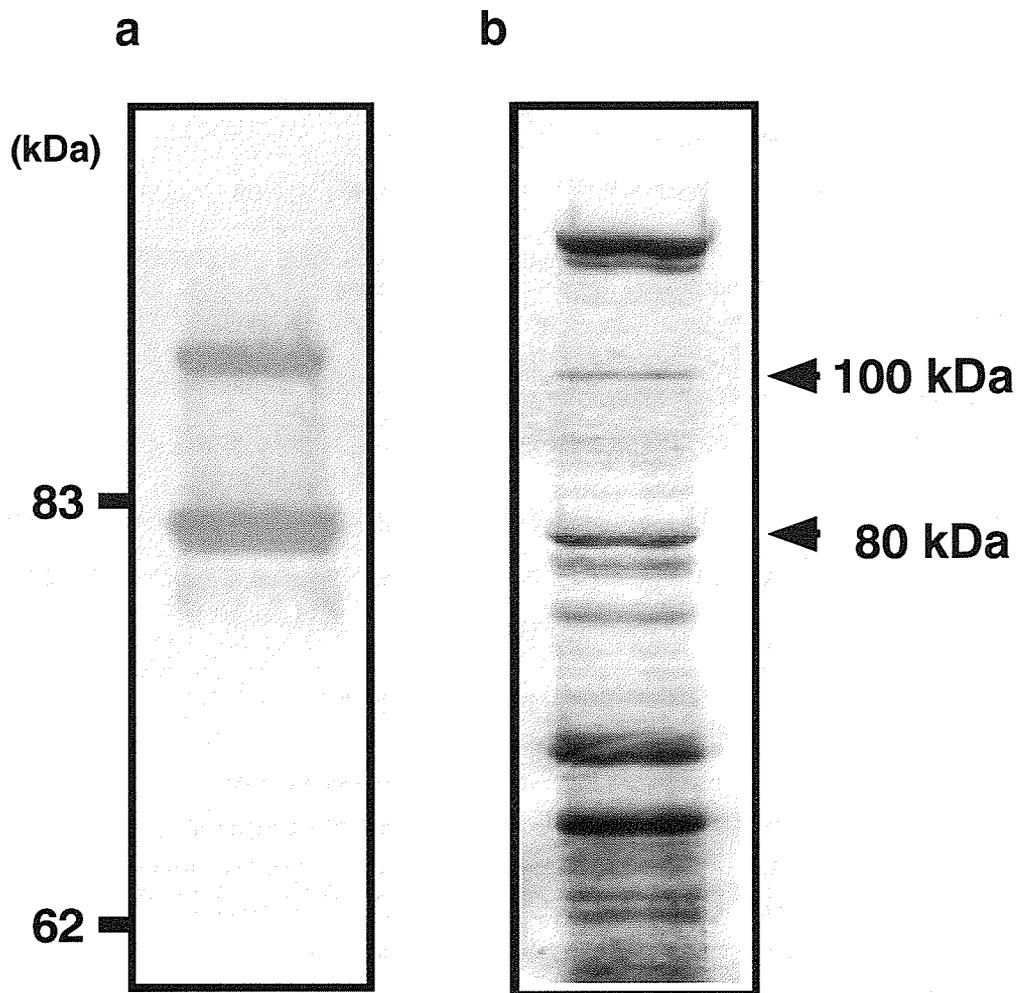


図4 *S. mutans* のSDS画分を用いた ZymographyおよびCoomassie染色

*S. mutans* 菌体より8M Urea 抽出画分を調製し、*S. mutans* 死菌体を用いた Zymography (a) およびSDS-PAGE後Coomassie染色 (b) (共に7.5%アクリルアミドゲル) を行った。そして、Zymographyにて溶菌活性が認められたバンドと一致する蛋白バンドをCoomassie染色を行ったメンブレンより切り出した。

AATTATTGGAATATATAGCACAAATGCTTAATCTTTGAGACGTCCTGATAAACATGATATAA

-35

-10

TGAACAAATAATATTTTTAAGGAAATTAGGAAAAAGAATGAAAAGCAAACTTATTTGATG

SD

M K S K T Y L M

ATTCCATTAGCATTTGACCCTATTTATGGCTGCTAATAAAAATATCTGCAGATGAGCAAAAT

I P L A L T L F M A A N K I S A D E Q N

CAATCCTTAAGTGCATCAGAAGTTATTTCTTCTGATGCGACATCAGTATCTGAATTACCA

Q S L S A S E V I S S D A T S V S E L P

GCGACAACAGCACAGATAAGTCAGGAAGTCAGAAAATAATGGACAAGACAGTACTATTCAA

A T T A Q I S Q E V R N N G Q D S T I Q

TTGCAGCAAAACACAGGAACAGTCTGATCCGATAACAAGTACGTCTGAGACAACCTGTTTCC

L Q Q T Q E Q S D P I T S T S E T T V S

TCTATGAAGGCGGTCACAAATGGCTCACCTGCCAAAGCAAATGAGACTGAAACAGTTCCG

S M K A V T N G S P A K A N E T E T V P

TCTCAGGCAAGTACTGCTAGTTCTGTGCAGACTCCTGATCAGATTTGACTGTTCCCTCT

S Q A S T A S S V Q T P D Q I S T V P S

GTAAGAAGCAGAAACCACTTCTACCGCAGATCAATTACAATCAACATCATCTGCTCCTTTG

V K A E T T S T A D Q L Q S T S S A P L

GATCAACAACTGADGCTAAACGCTTTTCCAATAAAAATGACTCCAGCAAGCAGCGTACAA

D Q Q T D A K R L S N K M T P A S S V Q

GCTCGTCTTCTCTTACACAAGACAAGCAAGTACAGGCACAGGAAGTCACAAGTGTGTA

A R S S L T Q D K Q V Q A Q E V T S A V

GTGGAAGAAAAAGGGATTAAGCTACAGTATAACGGTCAGATCGCTCGAAATACTAAGATT

V E E K G I K L Q Y N G Q I A R N T K I

CAATTTGCTGTCTGGTCAGCTCGAAATGATCAAGATGATCTTCAATGGTATACGGCAAAT

Q F A ~~V V S A E M D Q D L Q N X~~ T A N

AATATGGGAGCGGCCTATGCTGAATTCAGAATCATCGTGAGTATGGGACCTATTATGTT

N M G A A Y A E F K N H R E Y G T Y Y V

CATACTTATGCTAATCAAAATGGCAAGATGATAGGACTTAACGCAACCACTCTTACAATT

H T Y A N Q N G K M I G L N A T T L T I

GCTCAACCTCAGGTGCAAACTAATATTCAAAGAAAATCAGCAACGAATTTTGAGTTAACC

A Q P Q V Q T N I Q R K S A T N F E L T

GTTTCTAATGTTCCCTAATACTATTAGCAGCATCATGGTACCTGTCTGGTCAGATCAAAAC

V S N V P N T I S G I M V P ~~V N S D Q N~~

GGTCAAGATGATATTAATGGTATAATGCCCGAAAAGGCTGATGATGGCAGTTATAAGCCT

~~G Q D D L K M Y~~ N A R K A D D G S Y K V

TTGATTGATACTAAAAATCACAAGAATGATTTGGGACATTATGAAGCTCATATTTACGGC

L I D T K N H K N D L G H Y E A H I Y G

TACAGCACAGTAACCCAGTCTCAAATTGGCTTAGCTGTTAGTTCTGGTTTTGACCCGAAT

Y S T V T Q S Q I G L A V S S G F D R N

GATACTAGACCCAATGCAAGGATATCTGTTGCTGATTATGACCAAAAATAAAACGACCTTT

D T R P N A R I S V A N Y D Q N K T T F

GATGTTGTTGTTGAGGGTTCATCTGATACAAAGACTGTATCTGCTGTTAATATTGCTGTT

D V V V E G S S D T K T V S A V N I A ~~V~~

TGGTCTGAAGATAAAGGTCAAGATGACCTTAAGTGGTATTACCAAAAATTTGCAACAAT

~~V S E D R G Q D D L K W Y~~ S P K I V D N

AAGGCAACTGTGACGATTAATATCGCTAATCAATCAAAATACTTCAGATAAATAATGTC

K A T V T I N I A N H S N T S D K Y N V

CATGTTTATACAGACTACACTGATGGGACACATTCTGGTACTATTTTAGGGGCTTATCAG

H V Y T D Y T D G T H S G T I L G A Y Q

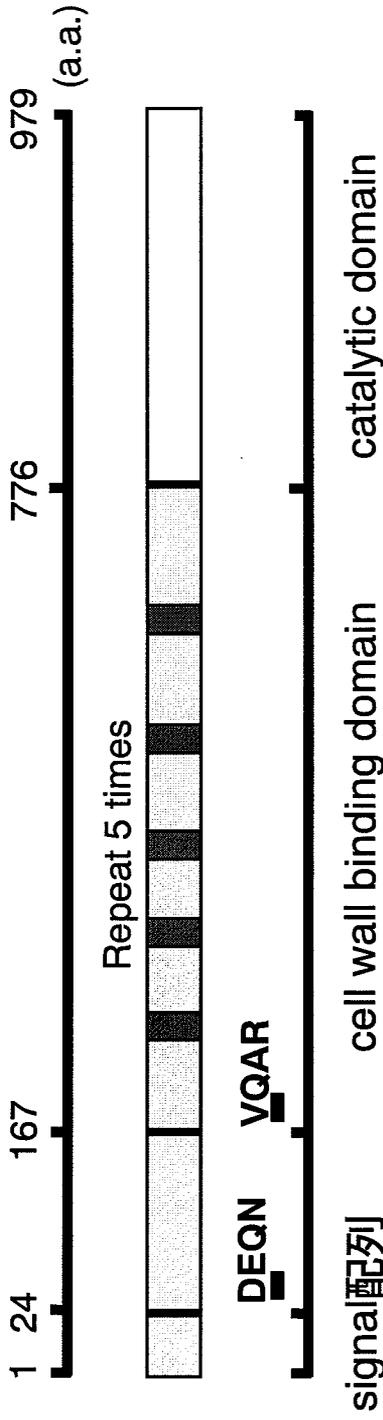
ATCAATAAACCGCTTGAGAAAAATACTGTTTCAGCTGATTTAACTAGTGATGGCATTGCT

I N K P L E K N T V S A D L T S D G I A

CTCAAATTAGATTCAAACACGGTTACAGATTATACCAAAGTACGATTTGCCGTTTGGTGC  
 L K L D S N T V T D Y T K V R F A V W S  
 GATCAAAATGGTCAAGATGATCTCAAGTGGTATAAGTGCAAATAGTGATGGAGCGGCAACT  
D Q N G Q D D L K V Y S A N S D G T A T  
 GCAGCTTACAGTAACACAGTGGTTATGGGCTTTATCATATCCATACTTATATTATTTAAA  
 A A Y S N H S G Y G L Y H I H T Y I I K  
 GATGGGGAAATGGTTGGGCTTAATGGCAGAACGATAACTATTAATCAGCCTAGTGCCAAG  
 D G K M V G L N G K T I T I N Q P S A K  
 GTTGATATTGCTAAAGAATCCGATGCTCTTTATAAAGTGACTGTTTCTAACCTGCCAGCT  
 V D I A K E S D A L Y K V T V S N L P A  
 TACATTAGTTCAGTAGCTATTTCCTGTCTGGACAGATAAAAAACAATCAAGATGATATTCAA  
 Y I S S V V I P Y V T D E N N Q D D I Q  
 TGGATTCTCGCGACAAAACAAGGTGATGGAACCTACGCAGCGCAAATTCAGTTAGCTGAT  
W L P A T K Q G D G T Y A A Q I Q L A D  
 CATAATGGGGAAACAGGCCATTATAATGTTTCATGCTCTATGGACAAAAGTAAATTTGACAAT  
 H N G E T G H Y N V H V Y G Q S K F D N  
 AAAACGGTTGGCTTAGCAGCAACTGATGGCTTTAATGTTGCAGAGACAAGGAATGCTGTT  
 K A V G L A A T D G F N V A E T R N A V  
 ATCGCTGCTTCAAATFATAATGCCAGTGCAGGAACGATAGATATGATTGTTAAACAAGAA  
 I A A S N Y N A S A G T I D M I V K Q E  
 GCGGCTGGTAAAGCGATCAAAGAAGTTCGGATAGCTGCTTGGTCAGAAGCTGATCAATCT  
 A G G K A I K E V R I A A W S E A D Q S  
 AACCTTCATTGGTATGTTTCATCAACTATTATTGATGGTAAGGTAACAGTCACCATTAAT  
 N L H W Y V S S T I I D G K V T V T I N  
 GAAAAAATCATCAATATATTTAAAGGAAATTATAACATTCATGCTCTATGTTGATTATACT  
 E K N H Q Y I K G N Y N I H V Y V D Y T  
 GATGGCACTAGTAGCGGAACCAATATTGGAAACTATAGCTTGAATGCTGATAAACCTGCT  
 D G T S S G T N I G N Y S L N A D K P A  
 GTTGCTCTGCCATCTTACTTTATTGATATTAGTAGCCACAATGGAATCATTTCTGTGTC  
 V A L P S Y F I D I S S H N G I I S V A  
 GAATTC AATAGCTTGAACAACAAGGTATTCAAGGAGTGGTTGTTAAGTTAACAGAAGGT  
 E F N S L K Q Q G I Q G V V V K L T E G  
 ACAAGCTACATCAATCCTTATGCAAGTTCCTCAAATTGCCAATGCCAGAGCTGCCGGTATT  
 T S Y I N P Y A S S Q I A N A R A A G I  
 AAGGTTCTGCTTACCCTATGCTCACTATACTTCTGCGGCTGGGGCACAGAAGAAGCC  
 K V S A Y H Y A H Y T S A A G A Q E E A  
 CGTTATTTTGGCTAATGCAGCCAGATCCTTTGGTTTGGAGGCATCAACTGTCATGGTCAAT  
 R Y F A N A A R S F G L E A S T V M V N  
 GATATGGAAGAGTCCCTCTATGGTGAACAATATTAATAATAATGTTCAAGCTTGGCAAGAT  
 D M E E S S M V N N I N N N V Q A W Q D  
 GAGATGAGGCGTCAAGGTTATAGCAACCTGATTTCATTATACTATGGCTAGTTGGTTGGAT  
 E M R R Q G Y S N L I H Y T M A S W L D  
 ATACGCGGTGGGCAAGTAGACACTGCAAGGTTTGGCATCAATAATTTTTGGGTTGCTCAT  
 I R G G Q V D T A R F G I N N F W V A H  
 TATGCCAAAAGGTTATACCTTATATGACTCAAGAAGAAGCTAAATCCCTTAATTATTATGCT  
 Y A K G Y T Y M T Q E E A K S L N Y Y A  
 AATGCAGCAGCTTGGCAGTATACTAGTGTATCGTCTAAAATTGTCTCATGCTTTGGATGAA  
 N A A A W Q Y T S V S S K L S H A L D E  
 AATATTGATTATACTGGTTCGATTTACTCAACAGTAAAGAAAACGAGGCGTTTGATTATGA  
 N I D Y T G R F T Q Q

図5 *S. mutans*のORF : SMU689遺伝子の塩基配列

-35,-10 推定プロモーター領域 ; SD,推定リボソーム結合サイト、太い下線部 : アミノ酸シーケンスにて得られた配列と一致した部位。   : 5回の繰り返し構造を表す。

**a****b**

<b>repeat 1</b>	212	V	W	S	A	R	N	D	Q	D	D	L	Q	W	Y	225
<b>repeat 2</b>	303	V	W	S	D	Q	N	G	Q	D	D	I	K	W	Y	316
<b>repeat 3</b>	408	V	W	S	E	D	K	G	Q	D	D	L	K	W	Y	421
<b>repeat 4</b>	506	V	W	S	D	Q	N	G	Q	D	D	L	K	W	Y	519
<b>repeat 5</b>	597	V	W	T	D	K	N	Q	D	D	I	Q	W	I	610	

**c**

	Accession No.	source	Identity
putative N-acetyl muramidase	28849823	<i>S. gordonii</i>	49%
hypothetical protein	29376682	<i>E. faecalis</i>	42%
putative 1-4- $\beta$ -acetylmuramidase	15487801	<i>L. sakei</i>	41%
putative muramidase	28378966	<i>L. plantarum</i>	30%
putative lysozyme precursor	6448726	<i>Streptomyces coelicolor</i>	27%

図6 ORF: SMU689にコードされる蛋白の構造と相同性検索

ORF: SMU689は推定一次構造の結果より、C末端側の活性ドメインと、N末端側の菌体結合ドメインと想定されるドメインに分けられた(a)。N末端半側に見られる5回の繰り返し構造は構成するアミノ酸が高く保存されていた (b)。ORF: SMU689 C末端側ドメインは既存の溶菌酵素等と相同性を示した (c)。右の数値はORF: SMU689のcatalytic domainと各々の蛋白との相同性をしめす。



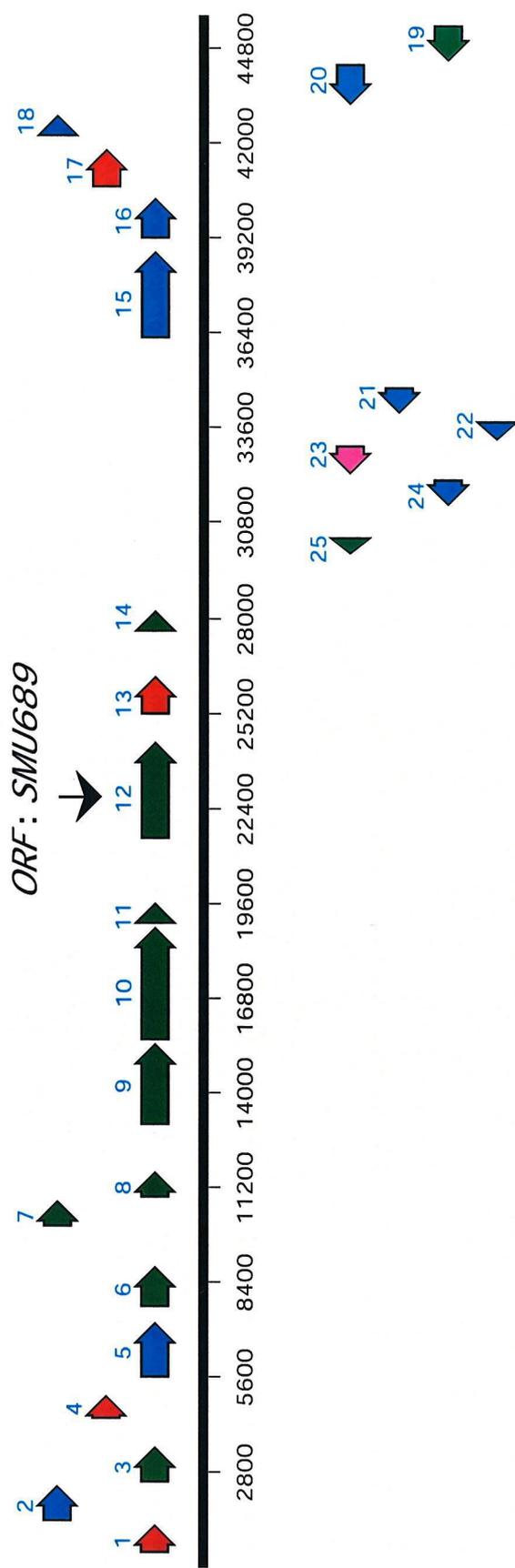


図8 ORF: SMU689 周辺 ORF map

今回、SMU689周辺の200 A.A 以上のORFについて検索した。その結果、周辺ORFは細胞壁合成に関わるなどの、菌の代謝に関わる酵素が多い領域に存在した。(表3参照)

ORF3.25 : *phosphoglycerate mutase* ORF13 : *aminopeptidase* ORF19 : *murM* ORF20 : *murN*

表 3 周边ORF检索结果

orf	start	stop	length	amino acid	Homology	strain
1	3	1367	1365	454	aconitase, Aconitase family	<i>Bacillus anthracis</i>
2	1367	2490	1134	377	citrate synthase	<i>Listeria innocua</i>
3	2492	3673	1182	393	isocitrate/isopropylmalate dehydrogenase	<i>Streptococcus salivarius</i>
4	4341	5138	798	265	Imo2669	<i>Listeria monocytogenes</i>
5	5572	7305	1734	577	phosphoenolpyruvate; sugar phosphotransferase system enzyme	<i>Streptococcus bovis</i>
6	7643	8962	1320	439	Nadp Dependent Aldehyde Dehydrogenase Form	<i>Streptococcus pyogenes</i>
7	10025	10867	843	220	Aldo/keto reductase family K+ ion channel beta chain regulatory domains	<i>Yersinia pestis</i>
8	10877	11743	867	288	Aldo/keto reductase family K+ ion channel beta chain regulatory domains	<i>Yersinia pestis</i>
9	13022	15580	2559	852	hypothetical protein	<i>Escherichia coli</i>
10	15596	19009	3414	1137	hypothetical protein	<i>Archaeoglobus fulgidus</i>
11	19013	19702	690	229	Topo1 homolog	<i>Bacillus subtilis</i>
12	21518	24457	2940	979	putative 1-4- $\beta$ -acetylmuraminidase	<i>Streptococcus gordonii</i>
13	25158	26378	1221	166	aminopeptidase (zinc metallopeptidases)	<i>Streptococcus pneumoniae</i> TIGR4
14	27587	28327	741	246	Cytidylate kinase	<i>Streptococcus pyogenes</i> MGAS315
15	36310	38937	2628	875	PEPcase, Phosphoenolpyruvate carboxylase	<i>Streptococcus agalactiae</i>
16	39232	40509	1278	425	putative cell division protein	<i>Streptococcus pyogenes</i>
17	40728	41924	1197	398	translation elongation factor (Elongation factor )	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
18	42220	42978	759	252	Triosephosphate isomerase	<i>Lactococcus lactis</i>
c	45637	44423	1215	404	MurM(The femAB operon)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
c	44420	43188	1233	410	MurN protein (The femAB operon methicillin resistance factor)	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
c	34925	34077	849	282	putative endolysin	<i>Streptococcus pyogenes</i> MGAS8232
c	33920	33306	615	204	hypothetical protein	<i>Streptococcus agalactiae</i>
c	33216	32233	984	327	autolysin ; amidase	<i>Listeria innocua</i>
c	32189	31347	843	280	hypothetical protein	<i>Streptococcus pyogenes</i>
c	30496	29870	627	208	Phosphoglycerate mutase	<i>Streptococcus pneumoniae</i>

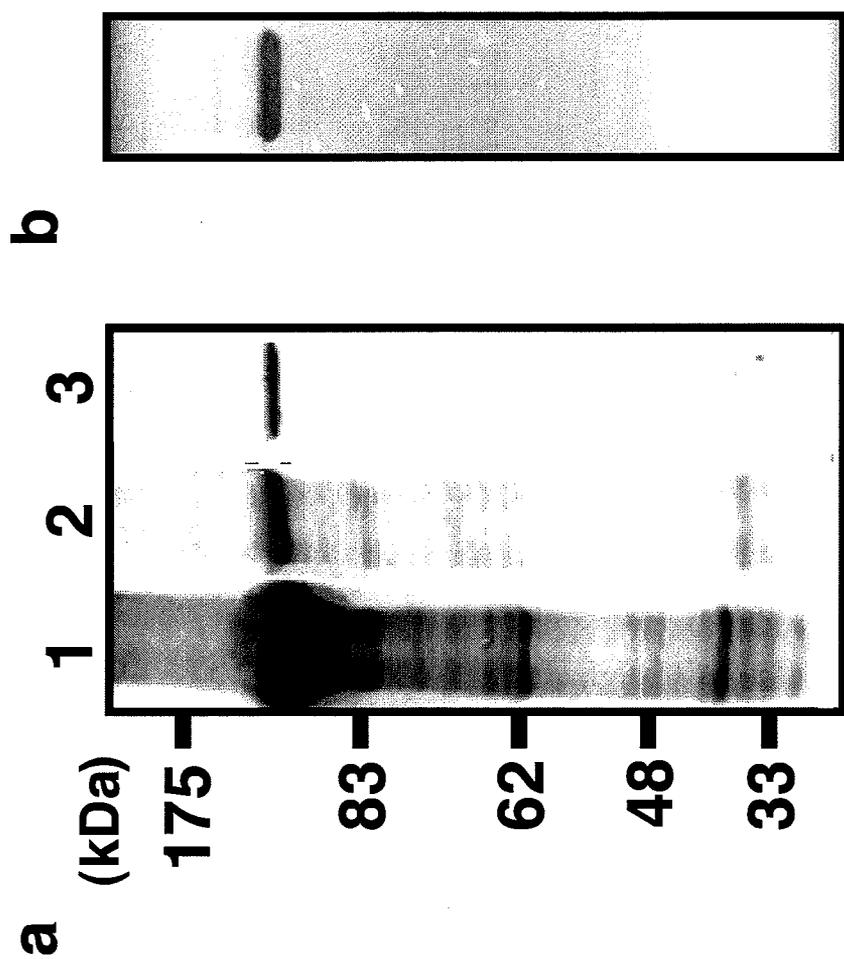


図9 遺伝子組み換え蛋白の精製および Zymography を用いた活性の検討

(a) 遺伝子組み換え蛋白 (full SMU689) の精製過程におけるサンプルについて、12%アクリルアミドゲルを用い SDS-PAGE 後 Coomassie 染色を行った。

レーン 1 . 遺伝子組み換え蛋白を発現した大腸菌の inclusion body 破碎画分

レーン 2 . Ni-NTA アガロースゲルを用いた抽出画分

レーン 3 . TSK gel phenyl-5PW から溶出した精製酵素

(b) 抽出した精製酵素の溶菌活性について、*S. mutans* 死菌体を封入した 12% アクリルアミドゲルを用いた Zymography を行った結果、溶菌活性が確認された。

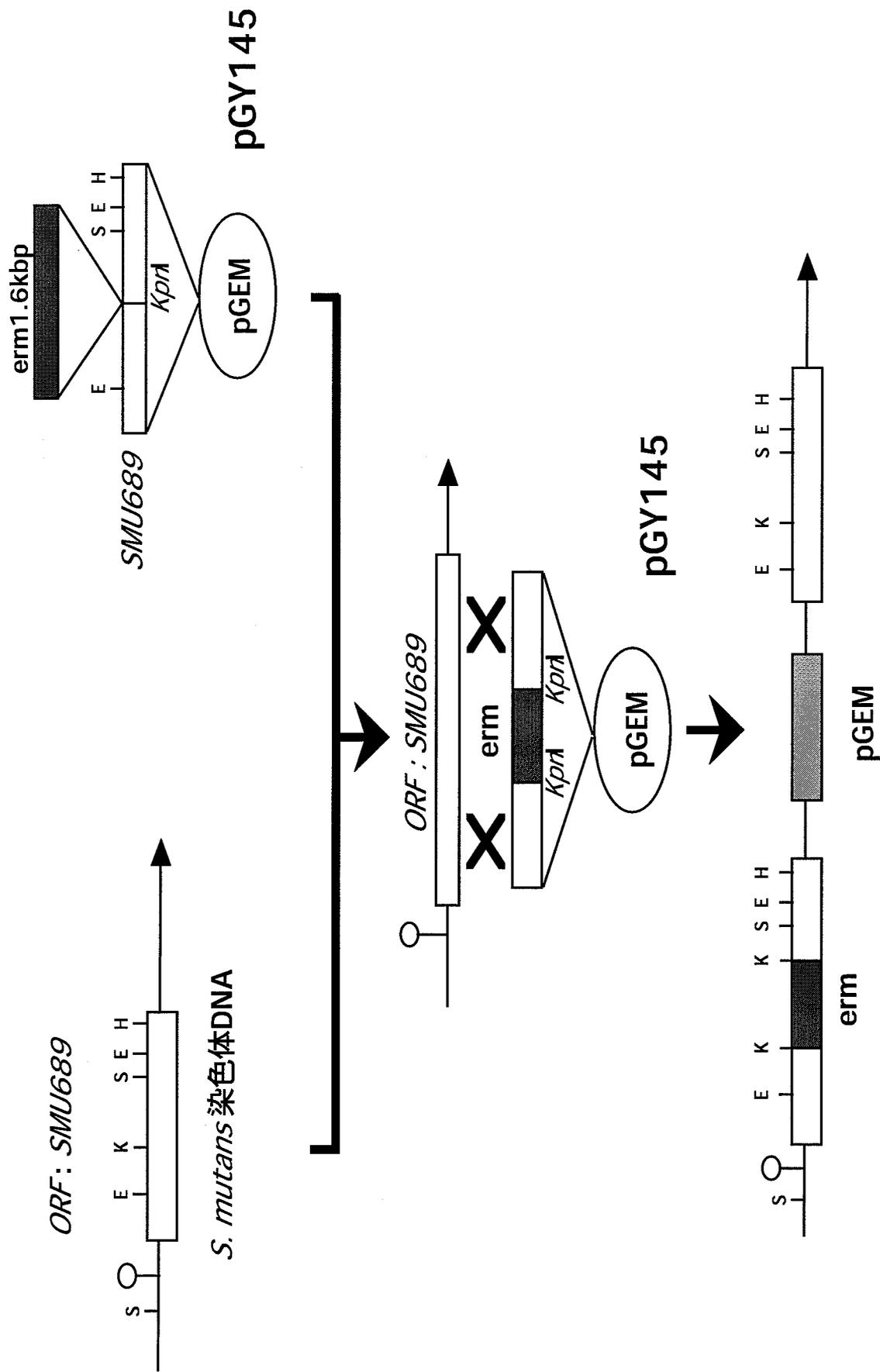


図10 ORF: SMU689の遺伝子不活化株作製方法

ORF: SMU689 遺伝子不活化株を作製した。まず形質転換に用いるプラスミドを作製し、*S. mutans* 染色体DNA (C67-1) 株に対し、トランスフォーメーションによる相同性組み換えを行った。(E, *EcoR* ; S, *StyI* ; K, *KprI* ; H, *HindIII* の各制限酵素)

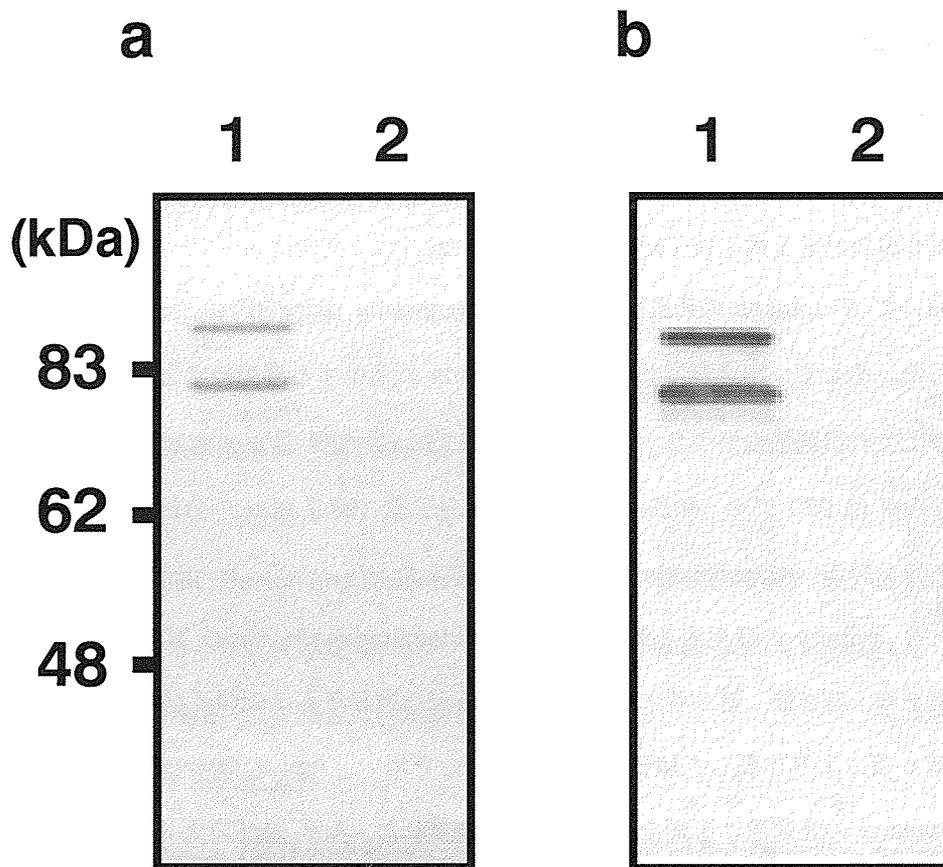


図11 野生株およびSMU689 遺伝子不活化株を用いたSMU689蛋白の発現の検討

野生株およびSMU689 遺伝子不活化株の4%SDS抽出画分を用いて、SMU689 遺伝子の不活化を、*S. mutans* 死菌体を封入した12%アクリルアミドゲルを用いたZymography (a) および抗SMU689血清を用いたWestern Blotting (b) により、SMU689蛋白が発現していないことを確認した。

レーン1. *S. mutans* C67-1 (野生株)

レーン2. *S. mutans* GY154 (SMU689 遺伝子不活化株)

### 第3章 *S. mutans* の産生する新規溶菌酵素 automutanolysin の機能解析

#### 第1節 概要

第1章において *S. mutans* の死菌体を用いた Zymography より、*S. mutans* の産生する溶菌酵素を見出した。そして、第2章において、*S. mutans* の産生する溶菌酵素をコードする *orf* を同定し、Web 上での相同性検索より、新規の溶菌酵素である事を見出し、automutanolysin (Aml) と名付けた。Aml は 979 アミノ酸残基よりなる推定分子量 107.2 kDa の分泌型の蛋白で、その一部が既存の溶菌酵素 (muraminidase) と相同性を示した。

本章では、*S. mutans* の産生する新規溶菌酵素 automutanolysin (Aml) について、機能解析を行った。第2章、第2節、第9項により作製した *aml* の遺伝子不活化株及び第2章、第2節、第5項及び第6項により作製した遺伝子組み換え蛋白を用い、Aml の機能解析を行った結果、Aml は *S. mutans* の連鎖数に影響を与える事が示唆された。Aml のペプチドグリカン切断部位の検討を行った結果、muraminidase 活性を持つことが明らかとなった。口腔レンサ球菌5菌種を用いて酵素活性を検討した結果、*S. mutans* 及び *S. sobrinus* を選択的に溶解する菌種特異性が示された。各種の遺伝子組み換え蛋白を作製し、Aml の各領域がどのような役割を果たしているか検討を行った。その結果、Aml は2つのドメイン構造を有しており、N 末端半側は菌体との結合に働いている結合ドメインであり、C 末端側は溶菌活性を担う活性ドメインと考えられた。しかし、活性ドメインと考えられる C 末端側ドメインのみではペプチドグリカン分解活性が弱く、十分なペプチドグリカン分解活性を示すには結合ドメインと活性ドメインの両構造が必要である事が示唆された。

#### 第2節 材料及び方法

##### 第1項 使用菌株及び培養方法、使用蛋白

実験に用いた菌株及びプラスミドを表 4 に示した。*S. mutans* を含む口腔レンサ球菌 5 菌種は Brain Heart Infusion (BHI ; Becton and Dickinson) 培地を用い、*E. coli* は, Luria-Bertani (LB) 培地を用いて培養した。菌株は、必要に応じて erythromycin (10  $\mu\text{g/ml}$ ) 及び Ampicillin (100  $\mu\text{g/ml}$ ) を添加し、37°Cにて培養を行った。また、Aml 遺伝子組み換え蛋白は第 2 章、第 2 節、第 5 項及び第 6 項に準じて精製し、実験に使用した。

## 第 2 項 光学顕微鏡及び電子顕微鏡を用いた *aml* 遺伝子不活化株の観察

菌を 10 ml の BHI (Becton and Dickinson) 培地を用いて静置培養後、遠心 (3,000 $\times$ g, 20 min, 4°C) を行った。得られた菌体を 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) にて 3 回洗浄し、1 ml の 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) にて懸濁し、顕微鏡にて観察した。

### (a) 光学顕微鏡を用いた観察

スライドガラス上にて塗沫標本を作製し、Löffler の methylene blue 液にて単染色後、光学顕微鏡 vanox-S (OLYMPUS., 東京, 日本) を用いて 1,000 倍にて観察、撮影した。

### (b) 走査型電子顕微鏡を用いた観察

菌体をカバーガラス上で乾燥させ、2.5 %グルタルアルデヒドにて固定後、1% OsO<sub>4</sub> にて再度固定した。エタノール、*t*-ブチルアルコール、カーボン蒸着させ、S-4500FE scanning electron microscope (Hitachi, 東京, 日本)にて観察、撮影した。

### (c) Aml 遺伝子組み換え蛋白の添加による影響

洗浄まで行った Wild type 及び *aml* 遺伝子不活化株の菌体を 1 ml の 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) に懸濁し、Aml 遺伝子組み換え蛋白を終濃度が 10  $\mu\text{g/ml}$  になるように添加して 30 分処理後、光学顕微鏡を用いた観察と同様にスライドガラス上にて塗沫標本を作製し、Löffler の methylene blue 液にて単染色し、3 視野において菌の連鎖数を 10 菌ずつ光学顕微鏡を用いて計測し、菌の平均連鎖数を求めた。

### 第3項 菌の濁度の変化を用いた酵素活性の測定

酵素活性の検討は Sugai らの方法 [43, 44] に準じ、酵素添加後の菌の濁度の変化を測定して行った。基質には生菌、死菌、ペプチドグリカンを用い、0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) 中に  $OD_{660nm}$  が 0.3 になるように懸濁し、酵素 (Aml 遺伝子組み換え蛋白) を最終濃度が 10  $\mu\text{g/ml}$  になるように添加し、経時的に濁度の減少を  $OD_{660nm}$  にて計測した。そして最初の OD に対する割合を求めることにより、酵素による基質の分解活性の指標とした。

本章において、溶菌酵素活性を検討する場合、*S. mutans* においては C67-1 株 (表 4 参照) を用い、その他に口腔レンサ球菌 4 菌種 (*S. sobrinus* OMZ176a, *S. sanguinis* ATCC10556, *S. mitis* ATCC9811, *S. salivarius* ATCC9222 : 表 4 参照) を用いた。

基質は実験に応じ処理を行った。生菌は菌を 10 ml の BHI (Becton and Dickinson) 培地を用いて振盪培養後、遠心 (8,000 $\times$ g, 10 min, 4 $^{\circ}$ C) を行い、得られた菌体を 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) にて3回洗浄し、実験に使用した。加熱処理死菌体は第1章、第2節、第3項に準じ作製した。ペプチドグリカンの作製法は次項において述べる。

### 第4項 ペプチドグリカン作製法

*S. mutans* を含む *Streptococcus* 5 菌種 (*S. mutans* C67-1, *S. sobrinus* OMZ176a, *S. sanguinis* ATCC10556, *S. mitis* ATCC9811, *S. salivarius* ATCC9222 : 表 4 参照) のペプチドグリカン作製は Fuqua らの方法 [45] に従った。被検菌株を BHI (Becton and Dickinson) 培地 1liter を用いて対数増殖期後期 ( $OD_{660nm}=0.8$ ) になるまで培養し、遠心 (8,000 $\times$ g, 15 min, 4 $^{\circ}$ C) し、集菌した。得られた菌体を、0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) にて洗浄し、1M NaCl 10 ml にて懸濁し、ガラスビーズ (B.Braun Biothech. Int., Melsungen, Germany) 10 g を加え、cell homogenizer (B.Braun Biothech. Int.) を用いて菌体を破碎した。ビーズとともに破碎した菌体破碎画分を遠心 (3,000 $\times$ g, 15 min, 4 $^{\circ}$ C) し、破碎した懸濁液のみ回収した。この懸濁液を遠

心 (9,000×g, 20 min, 4°C) し、得られた沈殿を 0.5% SDS に懸濁後加熱 (30 min, 60°C) した。遠心 (9,000×g, 15 min, 4°C) 後、沈渣を精製水にて 6 回洗浄し、可及的に SDS を取り除いた。洗浄した沈渣を、1M Tris-HCl (pH7.0) 10 ml に懸濁し、トリプシンを終濃度 200 µg/ml で、CaCl<sub>2</sub> を終濃度 10 mM になるように添加し、37°C、12 時間インキュベートした。遠心 (9,000×g, 20 min, 4°C) 後、1M Tris-HCl (pH7.0)、1M NaCl 含有 1M Tris-HCl (pH7.0)、1M Tris-HCl (pH7.0)、にて順次洗浄し、最終的に精製水にて 3 回洗浄した。得られた沈渣を蒸留水 2 ml に懸濁し、500 µl ずつ分注し、その後遠心 (9,000×g, 15 min, 4°C) して上清を取り除き、ペプチドグリカン少量に分けた。その後沈渣に 40 %フッ化水素酸 1 ml を加え、4°Cにて 12 時間作用させタイコ酸を除去した。その後精製水にて 5 回洗浄し、得られたペプチドグリカンを凍結乾燥し、精製ペプチドグリカンとした。

#### 第 5 項 Aml の酵素活性に影響を与える因子の検討

Aml の酵素活性について、第 3 章、第 2 節、第 3 項の方法を用いて pH 及びケミカルファクターが活性に及ぼす影響を検討した。pH の検討には緩衝液に 0.1M クエン酸緩衝液 (pH3-7)、0.1M リン酸緩衝液 (pH5-9)、0.1M トリス緩衝液 (pH7-11) を使用した。各々の pH に調製後、緩衝液中にペプチドグリカンを懸濁し、酵素 (Aml 遺伝子組み換え蛋白) を終濃度が 10 µg/ml になるように添加し、添加後 4 時間経過時の濁度の減少率により比較した。最も酵素活性が強かった 0.1M リン酸緩衝液 pH6.0 における濁度の減少率を 100%とする事により、各 pH における活性を比較した。

ケミカルファクターが酵素活性に与える影響は、pH の影響の検討と同様の方法を用いた。ケミカルファクターを添加した緩衝液中にペプチドグリカンを懸濁し、酵素 (Aml 遺伝子組み換え蛋白) 終濃度が 10 µg/ml になるように添加し、添加後 4 時間経過時の濁度の減少率により比較した。緩衝液には 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) を使用し、以下に示す因子を添加した。添加した因子の最終濃度は 0.1M NaCl、0.1mM ZnCl<sub>2</sub>、0.1mM MnCl<sub>2</sub>、0.1mM MgCl<sub>2</sub>、0.1mM BaCl<sub>2</sub>、0.1mM、0.01mM、0.001mM CaCl<sub>2</sub>、0.1mM NiSO<sub>4</sub>、0.01mM CuSO<sub>4</sub> 及びキレート剤である 1mM

EDTA、1mM EGTA である。また、非添加時の 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) における濁度の減少率を 100%として、それに対するケミカルファクター添加時の増減率を比較した。

検討の結果、酵素活性が最も強く示された 0.1M リン酸緩衝液中に 0.1mM CaCl<sub>2</sub>、0.1M NaCl を加えた buffer (pH6.8) を Turbidity buffer と名付け、その後の実験に使用した。

#### 第6項 Aml によるペプチドグリカン切断部位の検討

精製した Aml 遺伝子組み換え蛋白を用いて、ペプチドグリカンの切断部位の決定を行った。*S. mutans* より精製したペプチドグリカン 6.5 mg を Turbidity buffer (pH6.8) (第3章、第2節、第5項参照) 1.5 ml に懸濁し、酵素 (Aml 遺伝子組み換え蛋白) を最終濃度が 25 µg/ml になるように加え、37°C で 12 時間インキュベートした。経時的に濁度の低下を測定しながら懸濁液を採取し、得られたペプチドグリカン消化物について還元糖及び遊離アミノ酸の測定を行った。またコントロールとして酵素を作用させていないペプチドグリカン懸濁液について経時的に濁度の変化を測定しながらサンプリングした。

還元糖の定量は Park and Jonson の方法 [46] に準じて行った。ペプチドグリカン消化物 100 µl に対し、フェリシアン化カリウム (WAKO) (0.5 g/ liter) 100 µl、炭酸ソーダシアン化カリウム (炭酸ソーダ 5.3g, KCN 0.65g/ liter) 100 µl を添加し、100°C にて 30 分加熱した。加熱後、反応液に鉄ミョウバン液 (鉄ミョウバン (WAKO) 1.5g, SDS1g/ liter 0.05N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 750 µl を添加し、室温にて 15 分間反応させ、OD<sub>690nm</sub> にて比色、定量を行った。コントロールには酵素を作用させていないペプチドグリカン懸濁液を用いて同様の処理を行い、比色、定量を行った。

遊離アミノ酸量は Ghuysen の方法 [1] に準じて行った。ペプチドグリカン消化物 120 µl に対し、2%ホウ酸ナトリウム 80 µl 及び 2,4-ジニトロフルオロベンゼン (DNFB; Sigma chemical Co.) 20 µl を添加し、60°C にて 30 分加熱した。加熱後、反応液に 6N HCl 440 µl を添加し、さらに 100°C にて 30 分加熱した。加熱後、反応液に精製水 360 µl を添加し、OD<sub>420nm</sub> にて比色、定量を行った。コントロールには酵素を作用させていないペプチドグリカン懸濁液を用いて同様の処理を行い、比色、定量を行った。

## 第7項 Amlによる糖鎖切断部位の検討

酵素 (Aml 遺伝子組み換え蛋白) によるペプチドグリカン消化物の作製法は第3章、第2節、第6項に準じて行った。ペプチドグリカン消化物の処理法は Pi-Wan らの方法 [47] に準じた。ペプチドグリカン消化物 10  $\mu$ l について吸引乾燥を行い、0.1N ホウ酸ナトリウム 20  $\mu$ l を用いて再溶解を行い、室温にて 2 時間反応させた。反応液の再度吸引乾燥を行い、3N HCl 30  $\mu$ l を添加し再溶解を行い、100°Cにて 3 時間加熱し、反応後再度吸引乾燥を行った。次にトリエチルアミン溶液 (メタノール : 精製水 : トリエチルアミン (Wako, 大阪, 日本) = 2 : 2 : 1 (vol/vol/vol)) に溶解し、反応後再度吸引乾燥を行った。更にイソチオシアン酸溶液 (メタノール : 精製水 : トリエチルアミン : イソチオシアン酸 (PITC; Wako, 大阪, 日本) = 7 : 1 : 1 : 1 (v/v/v/v)) に溶解し、室温にて 30 分間反応させ、その後再度吸引乾燥を行った。最終的に RP-HPLC に用いた A buffer (200 mM ホウ酸ナトリウム、0.7 ml/liter トリエチルアミン含有 140 mM 酢酸ナトリウム) 100  $\mu$ l に溶解し、その 5  $\mu$ l を RP-HPLC の最終サンプルとして用いた。

RP-HPLC は Pi-Wan の方法 [47] 及び Robert らの方法 [48] に準じた。RP-HPLC には逆相カラム (ODS-II, 4.6×150 mm, shimazu, 東京, 日本) を使用し、A buffer に 200 mM ホウ酸ナトリウム、0.7 ml/liter トリエチルアミン含有 140 mM 酢酸ナトリウムを、B buffer に 60 % (v/v) アセトニトリルを使用し、A buffer から 50 %B buffer になるように 20 分間のリニアグラジエントを流速 1 ml/min で行い、UV<sub>254nm</sub> にてモニタリングした。また、標準物質として 1 nmol の *N*-acetylmuramic acid 及び *N*-acetylglucosamine を用いた。

## 第8項 RP-HPLC を用いたムロペプチド解析

RP-HPLC に用いるサンプルの作製は Glauner らの方法 [49, 50] に準じた。精製したペプチドグリカン (1.3 mg) を 4 mM MgCl<sub>2</sub> 含有 0.1M リン酸緩衝液 (pH6.8) 300  $\mu$ l に懸濁し、mutanolysin (Sigma) の最終濃度が 50  $\mu$ g/ml になるように添加し、37°C、12 時間インキュ

ベートし、mutanolysin によるペプチドグリカン消化物を作製した。得られたペプチドグリカン消化物について、20 %リン酸を用いて pH4.0 に調製し、その後 95℃にて5分間加熱して、酵素を完全に失活させた。得られた反応液について 1.5M ホウ酸ナトリウム (pH9.0) をもちいて pH7.5 に調製し、ついで水酸化ホウ化ナトリウム 10 mg を添加し、室温にて 15 分間反応させ、完全に還元させた。更に過剰の還元剤を中和するために、反応液に 20 %リン酸を添加し、pH4.0 に調製し、ついで 4M NaOH を添加し pH12.0 に調製し、37℃にて 1.5 時間作用させた。その後、反応液について 20 %リン酸を添加し、pH2.5 に調製し、遠心 (15,000×g, 10 min, 4℃) を行った。その上清についてフィルター (0.22 μm) でろ過しサンプルとした。調製したサンプルを逆相カラム (Hypersil ODS, 4.6×250 mm, Suplco.Inc., Sigma, USA) を用いて RP-HPLC にて分析を行った。RP-HPLC を用いた分析は Glauner らの方法 [49-51] に準じた。A buffer には 5% (V/V) メタノール含有 50 mM リン酸緩衝液 (pH2.5) を、B buffer に 30% (V/V) メタノール含有 50 mM リン酸緩衝液 (pH2.8) を用いて、A buffer から 100% B buffer になるように流速 0.5 ml/min にて 210 分間のリニアグラジエントを行い、UV<sub>206nm</sub> にてモニタリングし、解析を行った。

#### 第9項 MALDI-TOF/MS を用いた質量分析

第3章、第2節、第8項の方法に準じペプチドグリカンを mutanolysin で消化し、RP-HPLC を用いてピーク分集を行った。ピーク分取後凍結乾燥を行った分集サンプルを B buffer (0.1% (V/V) トリフルオロ酢酸 (TFA; Nacalai tesque Inc. Ltd.)) 10 μl に溶解した。Zip Tip C18 (Tipsize : P10, millipore Corporation, Bedford, MA, USA) を用い、サンプル吸着前に A buffer (50% (V/V) アセトニトリル) 10 μl で3回、B buffer 10 μl で5回洗浄し、レジンを B buffer と平衡化させた後、サンプルをピペッティングを行いレジんに吸着させた。ついで、B buffer 10 μl で5回洗浄し、不純物を取り除き、C buffer (50% (V/V) アセトニトリル、0.1% (V/V) TFA、イオン交換水) 10 μl にて溶出し一連の操作で脱塩を行った。得られたサンプル 2 μl と飽和マトリックス溶液 (2, 5-Dihydroxybenzoic acid を C buffer に溶解した飽和溶液) 2 μl と混和させ

ターゲットプレート上に滴下して乾燥後、MALDI-TOF/MS reflexIII (Nihon Bruker Daltonics K.K., 東京, 日本) にて **negative mode** で質量を解析した。質量測定による構造解析は Sarka Beragonova-Giogianni らの方法 [51] に準じて行った。

#### 第10項 各種の遺伝子組み換え蛋白の作製

推定される Aml のドメイン構造を基に、シグナル配列を除くすべての領域を含んだ Aml (full Aml)、N 末端 166 アミノ酸配列を除いた Aml ( $\Delta$ N-term Aml)、N 末端 166 アミノ酸、C 末端 213 アミノ酸を除き、繰り返し配列のみで作製した Aml ( $\Delta$ N,C-term Aml)、C 末端 213 アミノ酸のみ (213aa) (図 25) について、それぞれの遺伝子組み換え蛋白を作製するために、表 4 に示したプライマーを用い、それぞれの大きさの *aml* 遺伝子を第2章、第2項、第4項 (1) に準じ PCR 反応で増幅した。

増幅した PCR 産物は第2章、第2項、第5項に準じ、pGEM-T easy vector にクローン化後、pQE30 vector に組み込み、*E. coli* XL-II に形質転換した。 $\Delta$ N,C-term Aml は遺伝子組み換え蛋白の親水性を増すため、大腸菌の蛋白発現ベクターを変え、maltose binding protein tag (MBP-tag) が付与される pMAL vector (BioLabs) に第2章、第2項、第5項に準じて組み込んだ。

PCR-mutagenesis は、Ito らの方法を用いて行った [52]。活性中心と考えられる N 末端から 869 番目のアスパラギン酸 (D) をコードする DNA 配列を alanine の配列に置換したプライマーを設計し、PCR 法を用いて図 23 に示す方法で変異を導入した。まず、それぞれの変異 DNA 断片を作製するために、*S. mutans* の染色体 DNA を鋳型に 2 組の PCR 反応を行った。即ち一方のプライマーセットは鋳型 DNA の *aml* 遺伝子の N 末端部分の相補鎖にアニールする primer1 (Sm-3) と変異部分の reverse primer (primer2 (mutR 869D→A)) を、他方のプライマーセットは *aml* 遺伝子の C 末端部分にアニールする primer4 (Sm-2) と変異部分の reverse プライマーと相補的な universe primer (primer3 (mutF 869D→A)) をそれぞれ用いた。これらの PCR は第2章、第2項、第4項 (1) に準じて KOD-plus-PCR system (TOYOBO, 大阪, 日本) を用いて行い、PCR 条件は共に、94°C 2 min、(denature 94°C 15 sec, annealing 45.5°C 30

sec、extension 68°C 3min ) を 25 cycle、68°C 2sec、4°Cで行った。その後、得られた2つの PCR 産物をアガロースゲルから切り出し Gene-clean III Kit (BIO 101) を用いて精製した。得られた PCR 産物を混和後 denature 94°C 15 min、annealing 37°C 30 min 処理し、ついで High Fidelity System の酵素 (tag polymerase) 及び dNTP mix (2.5 mM) (共に Roche) を加え extension 72°C 6min 行い、その後2回目の PCR に用いた。2 回目の PCR 反応は High Fidelity System (Roche) によって行い、プライマーセットは primer1 (Sm-2) と primer4 (Sm-3) を用いた。PCR 条件は、94°C 2 min、(denature 94°C 30 sec、annealing 45°C 30 sec、extension 72°C 4 min ) を 25 cycle、72°C 7 min、4°Cで行った。得られた変異 *aml* 遺伝子断片は第2章、第2節、第5項に準じ野生型の *aml* 遺伝子断片と同様に pQE30 及び pMAL vector に組み込んだ。

得られたプラスミドは *E. coli* XL-II に形質転換し、大腸菌にて発現させ精製を行った。His-tag 遺伝子組み換え蛋白については第2章、第2節、第6項に準じて精製し、MBP-tag 遺伝子組み換え蛋白は、次項で述べる方法を用いて精製した。

#### 第11項 遺伝子組み換え蛋白 (MBP タグ組み換え蛋白) の作製

前項にて作製した大腸菌株 (GY178 株) を LB 培地 500 ml を用いて  $OD_{660nm} = 0.5$  になるまで振盪培養し、MBP-tag 組み換えタンパクを発現させるため IPTG を最終濃度 0.3 mM になるよう添加し、2 時間培養した。その後遠心 (8,000×g, 20 min, 4°C) し、得られた菌体を Column buffer (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 7.4) 15 ml に懸濁し、超音波破砕器 (TOMY SEIKO) にて菌体を破砕 (30 min, 0.5 sec puls, レベル4) した。遠心 (9,000×g, 20 min, 4°C) 後、上清に Column buffer 35 ml を加えて希釈し、希釈液に amylose resin (BioLabs) を bed volume 1.0 ml となるよう加え、4°Cにて1時間振盪して結合させた後、amylose resin を8倍量の Column buffer で洗浄した。MBP-tag 組み換え蛋白の溶出は Elution buffer (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM maltose, pH 7.4) 1.0 ml x 15 を加えて行った。

#### 第12項 遺伝子組み換え蛋白の結合能の測定

基質として *S. mutans* C67-1 株 SDS 加熱処理死菌体を用いた。加熱処理死菌体は第 1 章、第 2 節、第 3 項に準じ作製した。作製した死菌体を 2 mg (湿重量) 用い、菌体を 10% (V/V) エチレングリコール含有 0.1 M リン酸緩衝液 (pH6.8) にて懸濁し、作製した組み換え蛋白を各々 2000 pmol 加え、37°C で 30 分間インキュベートした。その後遠心 (8,000×g, 20 min, 4°C) し、上清を取り除いた。次に 4% SDS 100  $\mu$ l により菌体に結合した組み換えタンパク質を溶出した。得られたサンプルの 20  $\mu$ l を 12% アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE にて泳動し、Coomassie 染色を行った。結合した組み換え蛋白の定量はイメージスキャナーを用いてコンピューターにゲルの像を取り込み、NIH image 1.52 で数値化した。また、定量化するためコントロールとしてウシ BSA (SIGMA) を濃度を振って作製し、あわせて Coomassie 染色を行った。

### 第 3 節 結果

#### 第 1 項 *aml* 遺伝子不活化株の性状解析

第 2 章において作製した *S. mutans* の *aml* 遺伝子不活化株について、野生株 (*S. mutans* C67-1 株) との比較を光学顕微鏡及び電子顕微鏡を用いて行った。その結果、*aml* 遺伝子の不活化により、位相差顕微鏡及び電子顕微鏡像ともに、菌の連鎖数の増大が確認された (図 12)。また、*aml* 遺伝子不活化株について増殖への影響を検討した結果、濁度の上昇の遅延が認められた (図 13)。

さらに、*S. mutans* C67-1 株及びその *aml* 遺伝子不活化株について精製 Aml 蛋白を添加し、光学顕微鏡下において平均連鎖数の計測を行ったところ、野生株については連鎖数の減少は認められるものの有意の差は認められなかったが、*aml* 遺伝子不活化株については平均連鎖数の減少が観察された ( $0.05 > P$ ) (図 14)。

#### 第 2 項 Aml の酵素活性の検討

Aml の酵素活性について、精製 Aml 蛋白添加による濁度の変化を測定し検討を行った [15, 43]。 *S. mutans* C67-1 株菌体より生菌、死菌、ペプチドグリカンを調製し酵素活性を検討したところ、ペプチドグリカン、死菌、生菌の順で濁度の減少幅が増加し、菌体に含まれる蛋白やタイコ酸などの細胞壁成分が取り除かれ、ペプチドグリカンに精製されるに従って、Aml の感受性が向上した (図 15)。また、ペプチドグリカンに対する Aml の酵素活性は濃度依存的に示された (図 15)。

*S. mutans* C67-1 株のペプチドグリカン及び精製 Aml 蛋白を用いて、Aml の酵素活性に影響を与える因子について同様に精製 Aml 蛋白添加による濁度の変化を測定し検討を行った。 pH3 から pH11 までクエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリス緩衝液を調製し pH に対する Aml の酵素活性を検討したところ、中性付近のリン酸緩衝液中で Aml の活性が最も強いことが明らかとなった (図 16)。また、同様の方法で酵素活性に影響を与えるケミカルファクターの検討を行ったところ、2 価の陽イオンの影響を受ける傾向にあり、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ により比活性が上昇し、特に  $\text{Ca}^{2+}$ により比活性が上昇した (表 5)。また、 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ により活性が阻害され、その他にはイオンのキレート剤である EDTA 及び EGTA により活性が阻害された。

口腔レンサ球菌 5 菌種に対する Aml の酵素活性について、生菌、死菌、ペプチドグリカンを用いて検討したところ、第 1 章において Zymography の場合に観察された傾向と同じく、*S. mutans* 及び *S. sobrinus* に対する菌種特異的な酵素活性が示され、その傾向はペプチドグリカンで特に顕著であった (図 17)。

### 第 3 項 Aml のペプチドグリカン切断部位の検討

溶菌酵素はその切断部位により、ペプチドグリカンの糖鎖を切断する Hexosaminidase とペプチド鎖を切断する peptidase に大別される。Aml についてまずペプチドグリカンの切断部位が糖鎖なのかペプチド鎖なのか決定を行った。*S. mutans* C67-1 株のペプチドグリカン懸濁液に精製 Aml 蛋白を反応させ、経時的に濁度を計測しながらサンプリングし、得られたペプチド

グリカンの Aml 消化物について還元糖量及び遊離アミノ酸量を計測した。ペプチドグリカン懸濁液の濁度が減少すると共に消化物に含まれる還元糖量が増加したが、アミノ酸量については変化が見られなかった (図 18)。このことにより、Aml は糖鎖を切断することが明らかとなった。

次に、Aml の糖鎖切断部位について検討を行った。経時的にサンプリングしたペプチドグリカンの Aml 消化物について、還元処理により糖鎖の末端部位のみ糖アルコール化を行い、RP-HPLC を用いて分画、定量を行った (図 19)。その結果、濁度の減少と共にムラミン酸量の減少及び、その糖アルコールであるムラミニシトール量の増加が観察されたが、グルコサミン量については、グルコサミン量及びその糖アルコールであるグルコサミニシトール量の増減は認められなかった (図 20)。以上の結果より、Aml は糖鎖の *N*-acetylmuramic acid (MurNAc) と *N*-acetylglucosamine (GlcNAc) の間を切断する muraminidase 活性を示すことが明らかになった。

#### 第4項 *S. mutans* 及び *S. sobrinus* のペプチドグリカン構造解析

Aml に対する菌種特異性を示した *S. mutans* 及び *S. sobrinus* について、HPLC を用いたマイクロペプチド解析及び MALDI-TOF/MS による質量解析によりペプチドグリカンの構造を解析した。mutanolysin を用いたマイクロペプチド解析の結果、*S. mutans* のペプチドグリカンは最小構造物であるモノマーと想定されるピークから順にダイマー、トリマーと想定されるピークへと分子量ごとに分画された。そして、*S. mutans* のクロマトグラムと *S. sobrinus* のクロマトグラムはピークパターンが類似していた (図 21)。しかし、マイクロペプチド解析にて得られたピークについて分取を行い、MALDI-TOF/MS を用いて、モノマー、ダイマーの質量解析を行った結果、両菌種で質量が異なり、*S. mutans* と *S. sobrinus* ペプチドグリカンの構造は異なっていた。*S. mutans* のモノマーのピークは  $m/z=990$  で GlcNAc-MurNAc-(L-Ala-D-Glu-L-Lys)-(Ala-Ala) の質量と一致し、ダイマーのピークは  $m/z=2012$  で GlcNAc-MurNAc-(L-Ala-D-Glu-L-Lys)-(Ala-Ala) のモノマーに GlcNAc-MurNAc-(L-Ala-D-Glu-L-Lys-L-Ala)-(Ala-Ala) が

付加したものであった (図 22、表 6)。これは過去の報告と一致した [8]。一方 *S. sobrinus* のモノマーのピークは  $m/z=1020$  で GlcNAc-MurNAc- (L-Ala-D-Glu-L-Lys) - (Thr-Ala) の質量と一致し、ダイマーのピークは  $m/z=2042$  で GlcNAc-MurNAc- (L-Ala-D-Glu-L-Lys) - (Thr-Ala) のモノマーに GlcNAc-MurNAc- (L-Ala-D-Glu-L-Lys-L-Ala) - (Thr-Ala) が付加したものであった。従って、*S. mutans* と *S. sobrinus* では架橋部分の構造が異なる事が明らかとなった (表 6)。

#### 第 5 項 各種の遺伝子組み換え蛋白による Aml のドメイン機能解析

遺伝子情報より予想される Aml のドメイン構造をもとに、組み換え蛋白を作製した (図 24、図 25)。第 1 章、第 2 節、第 3 項に準じて Zymography を行った結果、Aml の 869 番目のアスパラギン酸 (D) をアラニン (A) に変異させる事により full Aml 869D→A、 $\Delta$ N-term Aml 869D→A、213aa869D→A らの遺伝子組み換え蛋白の活性が失われることが明らかになった。213aa は Zymogram では活性が検出されなかった (図 24)。しかし、*S. mutans* の死菌体を用いた Zymography において、蛋白量を多く泳動し、長時間緩衝液中にて観察する事により、溶菌バンドとして検出できることを確認した (データ示さず)。

作製した各々の遺伝子組み換え蛋白 (full Aml、 $\Delta$ N-term Aml、 $\Delta$ N,C-term Aml、213aa 及びそれらの不活性型) を用い、各領域の役割について検討を行った。

*S. mutans* の SDS 加熱死菌体を用いて、組み換え蛋白 (full Aml 869D→A、 $\Delta$ N-term Aml 869D→A、MBP-tag  $\Delta$ N,C-term Aml、213aa869D→A) の結合能を比較した。菌体との結合ドメイン (結合ドメイン) と想定された部位が保存されている組み換え蛋白は菌体に対して結合したが、結合ドメインを欠損させた 213aa ではほとんど結合しなかった (図 26)。以上の結果、菌体との結合には結合ドメインが必要なことが明らかとなった。また、full Aml 869D→A 及び  $\Delta$ N-term Aml 869D→A の結合能の差はなく、N 末端部分の欠損による結合能への影響は認められなかった。

次に活性型のそれぞれの組み換え蛋白 (full Aml、 $\Delta$ N-term Aml、 $\Delta$ N,C-term Aml、213aa)

について、蛋白添加後の濁度の減少を測定し、*S. mutans* のペプチドグリカン分解活性について検討を行った。その結果 full Aml 及び $\Delta$ N-term Aml はペプチドグリカン分解能を有していたが、 $\Delta$ N,C-term Aml (結合ドメインのみ)、213aa (活性ドメインのみ) では活性がほとんど認められなかった (図 27)。従って、Aml が十分な活性を示すには結合ドメインと活性ドメインの両方の構造が必要である事が明らかとなった。また、full Aml 及び $\Delta$ N-term Aml のペプチドグリカン分解活性においても N 末端欠損による影響は認められなかった。

#### 第4節 考察ならびに小括

本章において、*S. mutans* の新規の溶菌酵素 Aml について、機能解析及び作用機序の検討を行った。

Aml の遺伝子不活化株についてその形態を観察したところ、親株と比較して連鎖数の増加が観察された。Blanca de Las Rivas らは *S. pneumoniae* の産生する溶菌酵素 LytB 蛋白において、その不活化によりほぼ双球菌であった形態が、長い連鎖を形成することを明らかにしている [36, 41]。また、Sugai らは *S. aureus* においては ATL が菌の次期隔壁形成面にそってリング状に分泌され、黄色ブドウ球菌細胞の細胞分離に働いている事を報告している [43, 53]。atl 遺伝子の欠損株においては、巨大なクラスターが観察された [53]。これらの結果はグラム陽性細菌においてある種の溶菌酵素は細胞分離に関与している事を示している。

*S. pneumoniae* の LytB 蛋白は N 末端側に細胞壁成分のタイコ酸の主成分ある choline との結合ドメイン (13 回の繰り返し構造) が存在し、C 末端側に活性部位を保有しており、細菌の分離に関わる事が明らかになっている [41]。LytB のペプチドグリカン分解の活性様式は endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase で、Aml とは活性様式が異なり、遺伝子レベルにおいても Aml との相同性は観察されなかったが、遺伝子不活化により観察された現象は類似している。Streptococcus 属に代表される連鎖球菌の場合、次期隔壁形成面が平行に作られ、連鎖が連なる。LytB 蛋白は連鎖を切り離す最終局面において活性を発揮すると考えられている。増殖段階において *S. mutans* においても細胞の分離は必要であり、LytB 蛋白と Aml はペプチドグリカン

に対する切断様式は異なるものの、LytB 蛋白と同様に連鎖を切り離す最終局面において活性を發揮する役割を担う溶菌酵素として Aml が存在すると考えられる。

ペプチドグリカンを用いて Aml の酵素活性に影響を与える因子を検討したところ、2 価の陽イオンの影響を受ける傾向にあり、 $\text{Ca}^{2+}$  で最も活性が上昇し、またイオンのキレート剤である EDTA で活性が落ち、特にカルシウムのキレート剤である EGTA での活性の減少は著しかった。酵素活性に  $\text{Ca}^{2+}$  が関与することは、唾液の豊富な口腔内で機能する蛋白として非常に興味を持たれる。

また、口腔レンサ球菌 5 菌種のペプチドグリカンを用いて、Aml の酵素活性を検討したところ、*S. mutans* と *S. sobrinus* に対して選択的に溶解する菌種特異性を示した。また、その傾向は生菌より、ペプチドグリカンにおいてより明らかであり、溶菌活性が見られる *S. mutans* と *S. sobrinus* の細胞壁の構造とそれ以外の菌種 (*S. sanguinis*、*S. mitis*、*S. salivarius*) では明らかな構造上の相違点が存在すると考えられた。

ムロペプチド解析の結果、*S. mutans* と *S. sobrinus* のピークパターンは比較的類似していたが、MALDI-TOF/MS の結果、架橋部分の構造が異なる事が明らかとなった。従って、架橋部分の構成アミノ酸が異なることは Aml の活性において影響がないと考えられた。

Sarka Beranova-Giorgianni らは *S. sanguinis* のペプチドグリカンの構造についてムロペプチド解析及び MALDI-TOF/MS を用いた質量解析を行っている [51]。その結果、*S. sanguinis* は *S. mutans* の構造と類似していた。*S. sanguinis* の構造はモノマーにおいて GlcNAc-MurNAc- (L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala) - (Ala-Ala) と GlcNAc-MurNAc- (L-Ala-D-Glu-L-Lys) - (Ala-Ala) の 2 パターンをとっていた。*S. sanguinis* のペプチドグリカンの構造について、今回用いた HPLC による方法により検討を行った。ムロペプチド解析の結果、*S. sanguinis* のピークパターンは *S. mutans* のそれと異なっており、また *S. mutans* に比べ架橋度が高い事が示されている。また、モノマーの構造は GlcNAc-MurNAc- (L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala) - (Ala-Ala) が優位に観察され、*S. mutans* の構造と比較して、ペプチド鎖に Alanine が 2 つ付加されていた。従って *S. mutans* と *S. sanguinis* の構造の大きな相違点はモノマーのペプチド鎖の Alanine と架橋度にあると考えられた。従って *S. mutans* と *S. sanguinis* の細胞

壁の Aml に対する感受性の違いが *S. sanguinis* のモノマーのペプチド鎖に存在する 2 つの Alanine に由来する可能性と、また架橋度が異なる事に起因している可能性が考えられる。ペプチドグリカンの構造及び構成成分について *S. mutans* 及び *S. sobrinus* での共通性、またそれらの *S. sanguinis* との相違点についてさらに検討が必要であると考えられた。

その他にも、溶菌酵素による細胞壁の溶解は構成成分によって左右される事が知られている。グラム陰性菌を溶解する溶菌酵素として知られる lysozyme は、グラム陽性菌のペプチドグリカンほとんど溶解できない。その理由として、グラム陽性菌ではペプチドグリカンのアミノ糖が  $\alpha$ -アセチル化や脱アセチル化されている事があげられる [54-60]。また、*S. pneumoniae* の LytA 及び LytB は細胞壁の構成成分の一つであるタイコ酸の成分であるコリンに活性をコントロールされていると報告されており [37, 41]、タイコ酸やリポタイコ酸 [10, 17, 61-64] はペプチドグリカンを加水分解酵素から保護する阻害作用を果たしているとの報告がある。*S. mutans* においてもフッ化水素処理する事によりタイコ酸を除去した結果、酵素に対する感受性が向上する事を確かめており (データ示さず)、タイコ酸が Aml の活性に影響している事が考えられる。

また、Aml の各領域が果たす役割について検討するため、様々な遺伝子組み換え蛋白を作製し *S. mutans* 菌体に対する結合能とペプチドグリカン分解能の検討を行った。その結果、N 末端半側は菌体との結合に働く結合ドメインである事が明らかとなり、Aml が溶菌活性を十分示すには結合ドメインと活性ドメインの両構造が必要であることが明らかとなった。

N 末端側の 167 アミノ酸の機能は菌体に対する結合能にもペプチドグリカンに対する分解能にも関与していなかった。この部位がどういう機能を担っているか今回の結果では不明であり、なぜ、*S. mutans* の表層では 100 KDa と 80 KDa の蛋白が存在するのかは不明である。

活性ドメインと相同性を示す *Streptomyces coelicolor* より分離された mutanolysin [29] は Aml の結合ドメインに相当する領域を持たない。また、mutanolysin は *Streptococcus* 属を一律に溶解する事が知られており、*S. mutans*、*S. sobrinus*、*S. sanguinis* の 3 菌種に対しては同程度のペプチドグリカン分解活性を有しており、基質特異性を示さなかった (データ示さず)。これらの相違点より、結合ドメインが菌種の認識に重要な役割を果たしている可能性が考えられ

る。また、*S. pneumoniae* の LytB において Blanca de Las Rivas らは結合ドメインが細菌表面の極の部分、つまり連鎖が連なっている分離面の認識に関わっている可能性があるとして指摘している [37, 39, 41]。Aml において存在する結合ドメインの機能が基質特異性や局在などの Aml 蛋白の性格を特徴づけている可能性が考えられ、結合ドメインの機能に関しては今後さらなる検討が必要であると考えられた。

#### 小括

1. *aml* 遺伝子不活化株の形態について検討したところ、連鎖数の増大が観察され、細胞分離への影響が示唆された。
2. Aml は *S. mutans* と *S. sobrinus* に対して選択的に溶解する菌種特異性を示した。
3. Aml のペプチドグリカンへの酵素作用部位を検討した結果、糖鎖を構成する *N*-acetylmuramic acid と *N*-acetylglucosamine の間を切断する muraminidase 活性を示した。
4. Aml の種々の遺伝子組み換え蛋白を作製し、機能解析した結果、*N* 末端半側は菌体への結合ドメインであった。しかし、活性ドメインと考えられる *C* 末端側のみではペプチドグリカン分解活性が弱く、十分な活性を示すには両構造が必要であった。

表 4-1 使用した菌株

Strain	Relevant characteristics	Source or reference
<i>S. mutans</i>		
C67-1	clinical strain	Bratthall [67]
GY154	<i>aml</i> ::EM <sup>f</sup>	This study
<i>S. sobrinus</i>		
OMZ176a	clinical strain	Bratthall [67]
<i>S. sanguinis</i>		
ATCC10556	American Type Culture Collections	
<i>S. mitis</i>		
ATCC9811	American Type Culture Collections	
<i>S. salivarius</i>		
ATCC9222	American Type Culture Collections	
<i>E. coli</i>		
XLII-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lac f'ZΔM15 Tn10</i> (Tet) Amy Cam]	Bullock et al. [30]
GY122	pGY122 / XLII-Blue	This study
GY136	pGY142 / XLII-Blue	This study
GY142	pGY142 / XLII-Blue	This study
GY144	pGY142 / XLII-Blue	This study
GY178	pGY145 / XLII-Blue	This study
GY216	pGY142 / XLII-Blue	This study
GY221	pGY142 / XLII-Blue	This study
GY224	pGY142 / XLII-Blue	This study

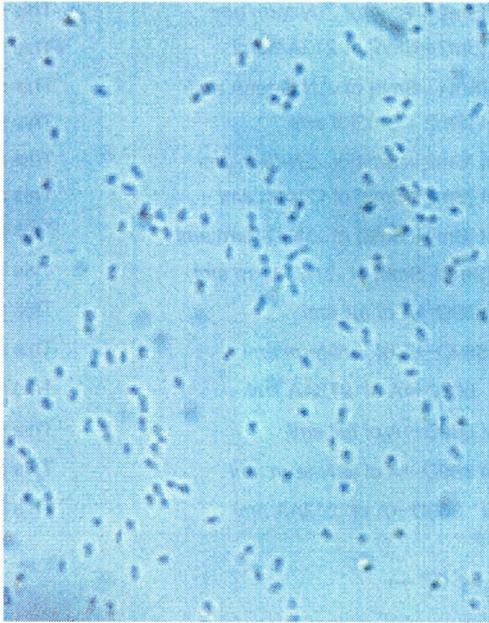
表 4-2 使用したプラスミド

Plasmids	Vector	Cloning site	Relevant properties	Reference or source
pGEM-T Easy			<i>E. coli</i> cloning vector for PCR products	Promega
pQE30			<i>E. coli</i> expression vector (His-tag)	QIAGEN
pMAL			<i>E. coli</i> expression vector (MBP-tag)	BioLabs
pGY112	pGEM	<i>Bam</i> HI/ <i>Sa</i> II	pGEM containing PCR fragment [Sm2 + Sm3]of <i>full aml</i>	This study
pGY112	pGEM	<i>Bam</i> HI/ <i>Sa</i> II	pGEM containing PCR fragment [Sm2 + Sm4]of $\Delta$ N-term <i>aml</i>	This study
pGY113	pGEM	<i>Bam</i> HI/ <i>Sa</i> II	pGEM containing PCR fragment [Sm2+ Sm5] of 213AA <i>aml</i>	This study
pGY140	pGEM	<i>Bam</i> HI/ <i>Sa</i> II	pGEM containing PCR fragment [Sm4+ Sm6] of $\Delta$ N,C-term <i>aml</i>	This study
pGY122	pQE30	<i>Bam</i> HI/ <i>Sa</i> II	pQE-30 containing PCR fragment [Sm2 + Sm3]of <i>aml</i>	This study
pGY136	pQE30	<i>Bam</i> HI/ <i>Sa</i> II	pQE-30 containing PCR fragment [Sm2 + Sm4]of $\Delta$ N-term <i>aml</i>	This study
pGY142	pQE30	<i>Bam</i> HI/ <i>Sa</i> II	pQE-30 containing PCR fragment [Sm2+ Sm5] of C-term <i>aml</i>	This study
pGY144	pQE30	<i>Bam</i> HI/ <i>Sa</i> II	pQE-30 containing PCR fragment [Sm4+ Sm6] of $\Delta$ N,C-term <i>aml</i>	This study
pGY178	pMAL	<i>Bam</i> HI/ <i>Sa</i> II	pMAL containing PCR fragment [Sm4+ Sm6] of $\Delta$ N,C-term <i>aml</i>	This study
pGY212	pGEM	<i>Bam</i> HI/ <i>Sa</i> II	pGEM containing PCR fragment 869D→A of <i>full aml</i>	This study
pGY218	pGEM	<i>Bam</i> HI/ <i>Sa</i> II	pGEM containing PCR fragment 869D→A of $\Delta$ N-term <i>aml</i>	This study
pGY214	pGEM	<i>Bam</i> HI/ <i>Sa</i> II	pGEM containing PCR fragment 869D→A of 213AA <i>aml</i>	This study
pGY216	pQE30	<i>Bam</i> HI/ <i>Sa</i> II	pQE-30 containing PCR fragment 869D→A of <i>full aml</i>	This study
pGY221	pQE30	<i>Bam</i> HI/ <i>Sa</i> II	pQE-30 containing PCR fragment 869D→A of $\Delta$ N-term <i>aml</i>	This study
pGY224	pQE30	<i>Bam</i> HI/ <i>Sa</i> II	pQE-30 containing PCR fragment 869D→A of 213AA <i>aml</i>	This study

表 4-3 使用したプライマー

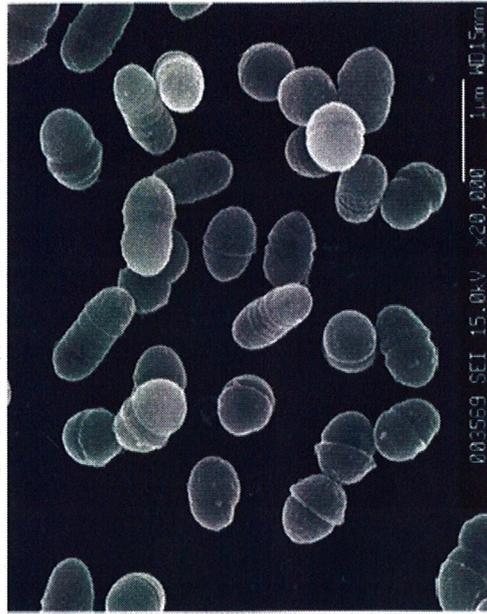
Gene	number	name	Sequence (5' to 3')	size of amplified products (kbp)
<i>aml</i>	GY15	Sm2	AGT TCC TGC CAT ACT ACT GT	
	GY19	Sm3	TAG GAT CCG ATG AGC AAA ATC AAT CCT	Sm2+Sm3 2.9kbp
	GY20	Sm4	CAG GAT CCG TAC AAG CTC GTT CTT CTC T	Sm2+Sm4 2.4kbp
	GY23	Sm5	ACG GAT CCG CGG TTG GTT TAG	Sm5+Sm2 0.9kbp
	GY24	Sm6	AAG TCG ACT TAT TTA TTG TCA AAT	Sm6+Sm4 1.4kbp
	GY98	mutF 869D→A	ATG GTC AAT GCT ATG GAA GAG TCC	Sm3+mutF 2.4kbp
	GY99	mutR 869D→A	CTC TTC CAT AGC ATT GAC CAT GAC AGT TGA	Sm2+mutR 0.5kbp

光学顕微鏡像

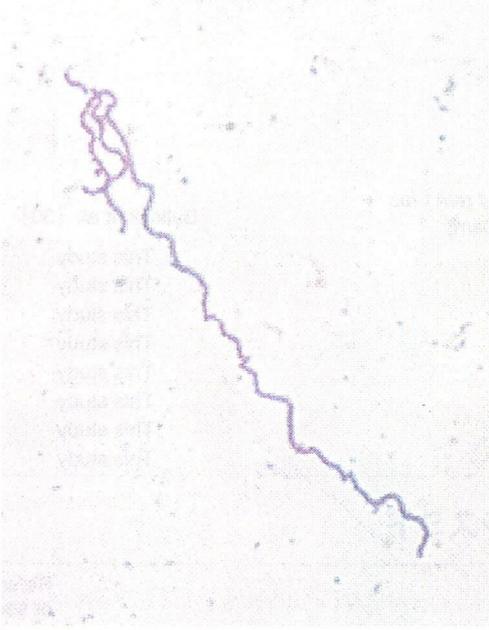


wild type(×1,000)

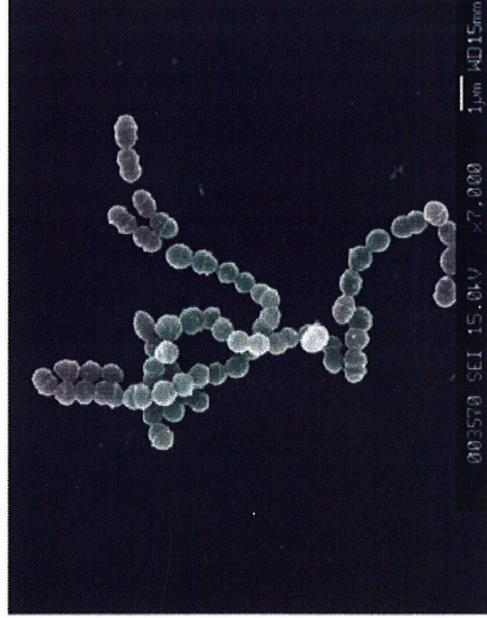
走査型電子顕微鏡像



wild type(×20,000)



aml 遺伝子不活化株(×1,000)



aml 遺伝子不活化株(×7,000)

図 12 野生株と *aml* 遺伝子不活化株の比較

どちらの顕微鏡像でも、*aml* 遺伝子不活化株において菌の連鎖数の増加が確認された。

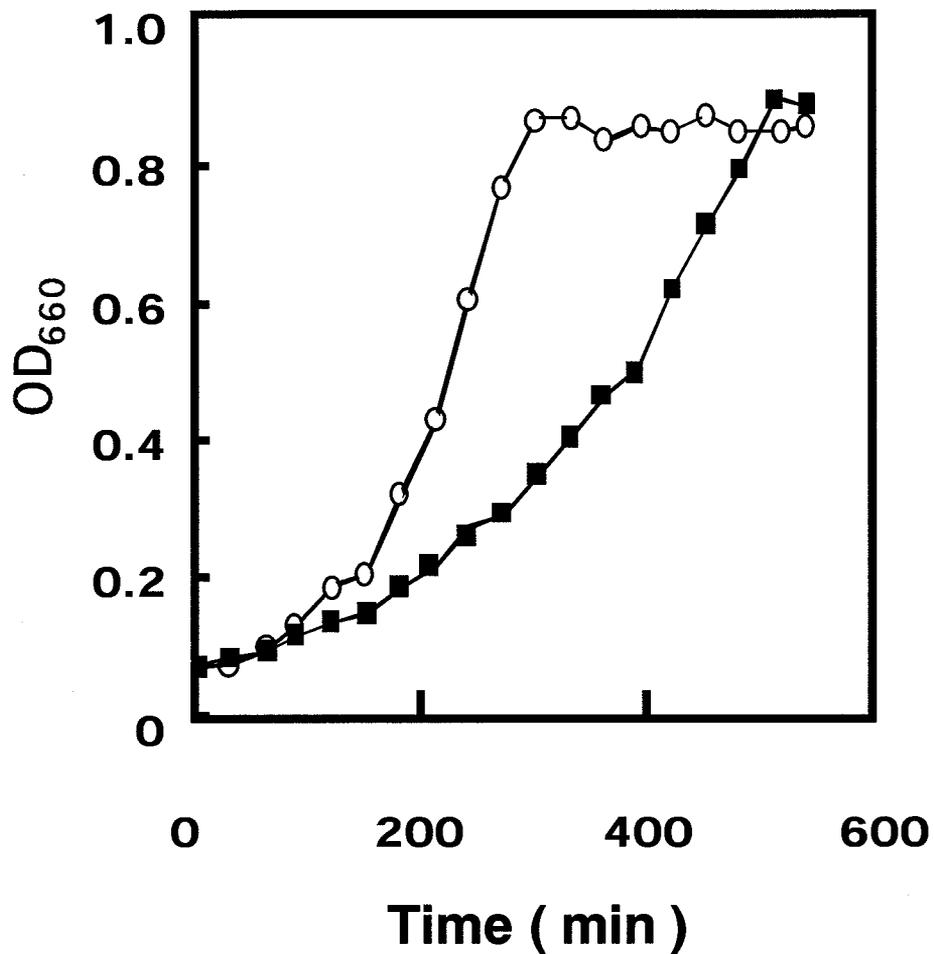


図13 野生株および*aml* 遺伝子不活化株の液体培地 (BHI) 中での増殖

野生株および*aml* 遺伝子不活化株についてBHI培地中での濁度の上昇について検討を行った。

(○) *S. mutans* C67-1 (野生株)

(■) *S. mutans* GY154 (*aml* 遺伝子不活化株)

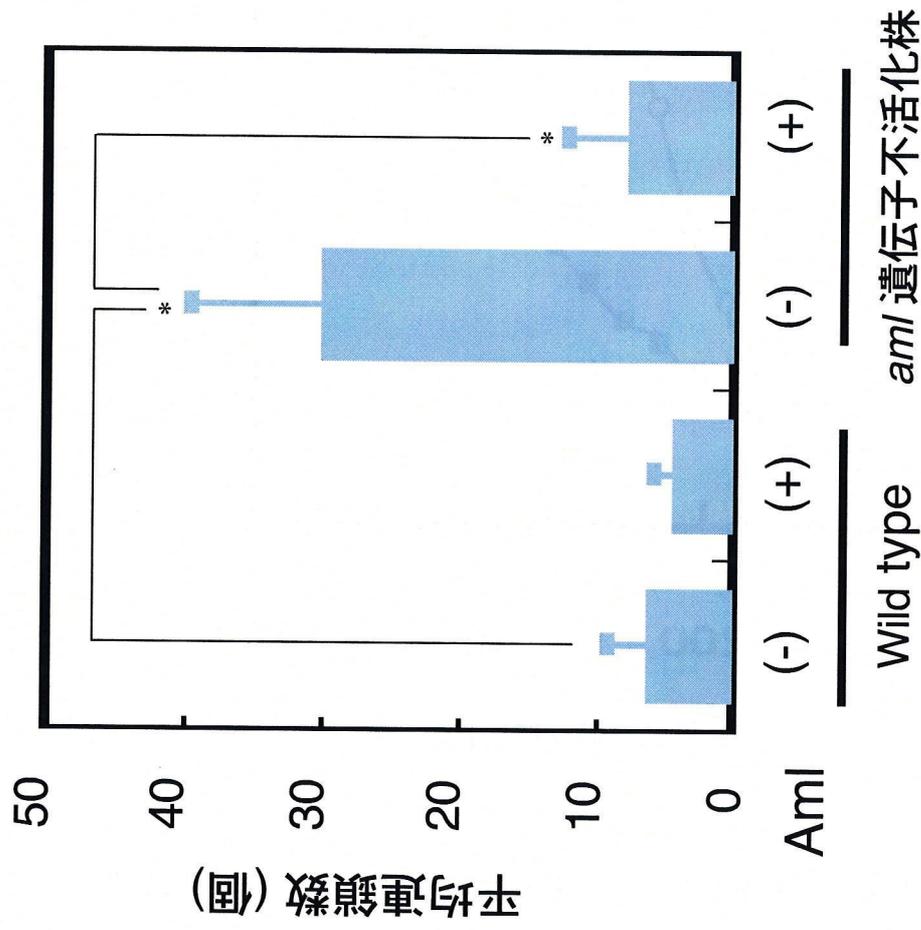


図 14 野生株と *aml* 遺伝子不活化株の比較

野生株および *aml* 遺伝子不活化株について連鎖数の比較を行った。*aml* 遺伝子の不活化によって連鎖数が有為増加し、Aml 精製蛋白を添加することにより有為に減少した。  
 \*, 0.05 > P

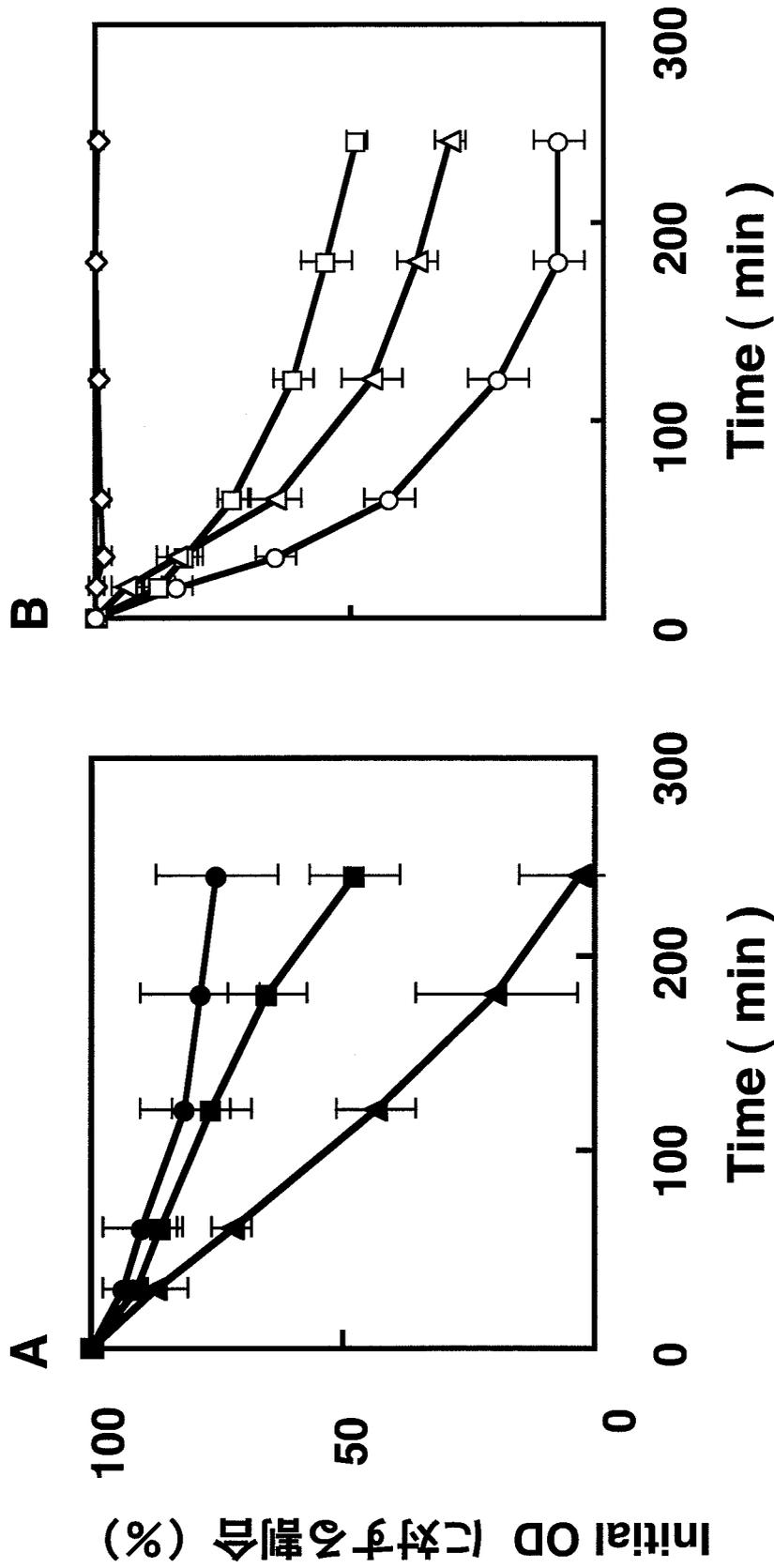


図 15 Amlの酵素活性の比較

*S. mutans* C67-1株より作製した基質を用い、精製Aml添加後の濁度の変化を測定し、精製Amlの酵素活性を検討した。

(A) 基質の精製にしたがって、基質のAmlに対する感受性が向上した。

●, *S. mutans* C67-1生菌; ■, 死菌体; ▲, ペプチドグリカン

(B) Amlは基質 (ペプチドグリカン) に対し、濃度依存的に活性を示した。

◇, Aml非添加; □, 1  $\mu\text{g/ml}$ ; △, 3  $\mu\text{g/ml}$ ; ○, 10  $\mu\text{g/ml}$

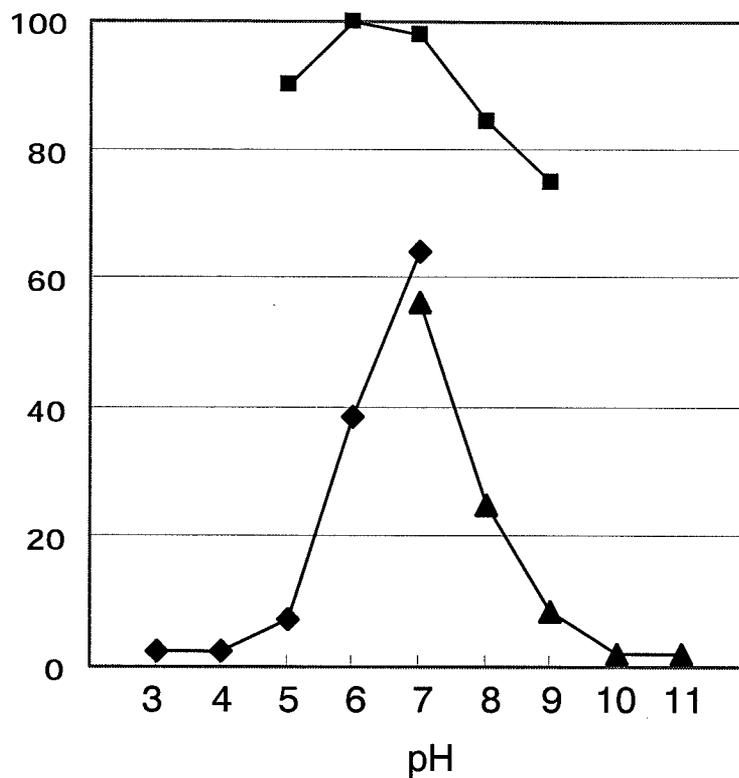


図16 Amlの酵素活性に対するpHの影響

ペプチドグリカンを用い、pHがAmlの酵素活性に対して与える影響を検討した結果、中性付近で最も酵素活性が強かった。

◆：クエン酸緩衝液pH3-7, ■：リン酸緩衝液pH5-9, ▲：トリス緩衝液pH7-11

表5 各chemical factorの影響

factor	Concn	lytic activity(%)
none		100.0 (%)
Na <sup>+</sup>	(0.1M)	132.6
EDTA	(1mM)	50.0
EGTA	(1mM)	21.7
Ni <sup>2+</sup>	(0.1mM)	26.0
Mn <sup>2+</sup>	(0.1mM)	121.7
Mg <sup>2+</sup>	(1mM)	121.7
Cu <sup>2+</sup>	(0.01mM)	28.4
Ba <sup>2+</sup>	(0.1mM)	121.7
Zn <sup>2+</sup>	(0.1mM)	56.5
Ca <sup>2+</sup>	(0.1mM)	276.0
NaCl+Ca	(NaCl 0.1M+Ca <sup>2+</sup> 0.1mM)	304.3

ケミカルファクターがAmlの酵素活性に対して与える影響を検討した結果、Amlは2価の陽イオンの影響を受ける傾向にあり、特にカルシウムに強く影響された。

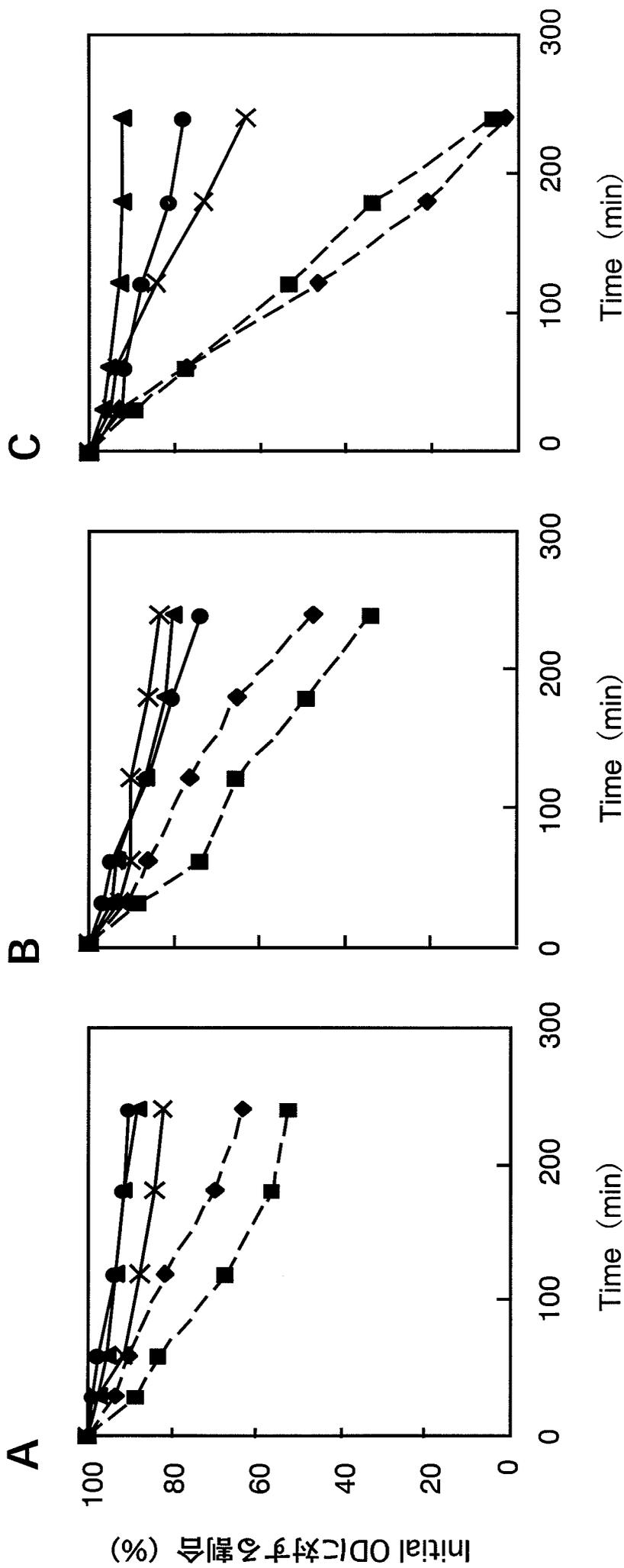


図 17 口腔レンサ球菌 5 菌種に対する酵素活性

口腔レンサ球菌 5 菌種の生菌 (A)、死菌(B)、ペプチドグリカン(C)を用いて、精製Aml添加後の濁度の変化を測定し、口腔レンサ球菌 5 菌種に対する酵素活性を検討した。その結果、Amlは*S. mutans*および*S. sobrinus*を選択的に溶解する菌種特異性を示した。また、その傾向は基質が精製されるに従って顕著であった。

■ : *S. mutans* C67-1, ◆ : *S. sobrinus* OMZ176a, ▲ : *S. sanguinis* ATCC10556,  
 ○ : *S. mitis* ATCC9811, × : *S. salivarius* ATCC9222

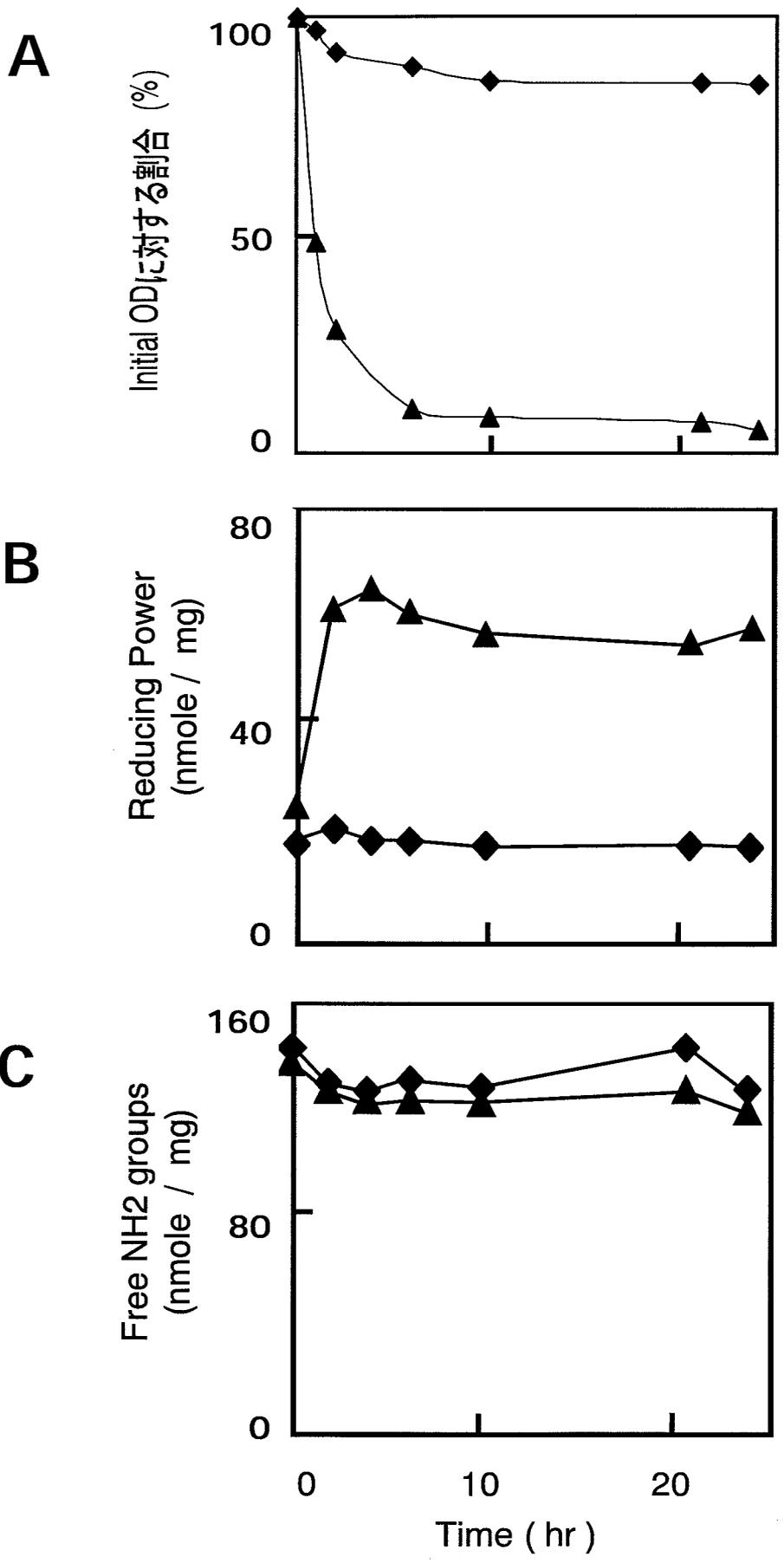


図 18 ペプチドグリカン切断部位の決定

精製したペプチドグリカンにAmを添加し、経時的に濁度 (A)、還元糖量 (B)、遊離アミノ酸量 (C) の測定を行った結果、糖鎖を切断する事が明らかとなった。

◆ : control, ▲ : Am消化サンプル

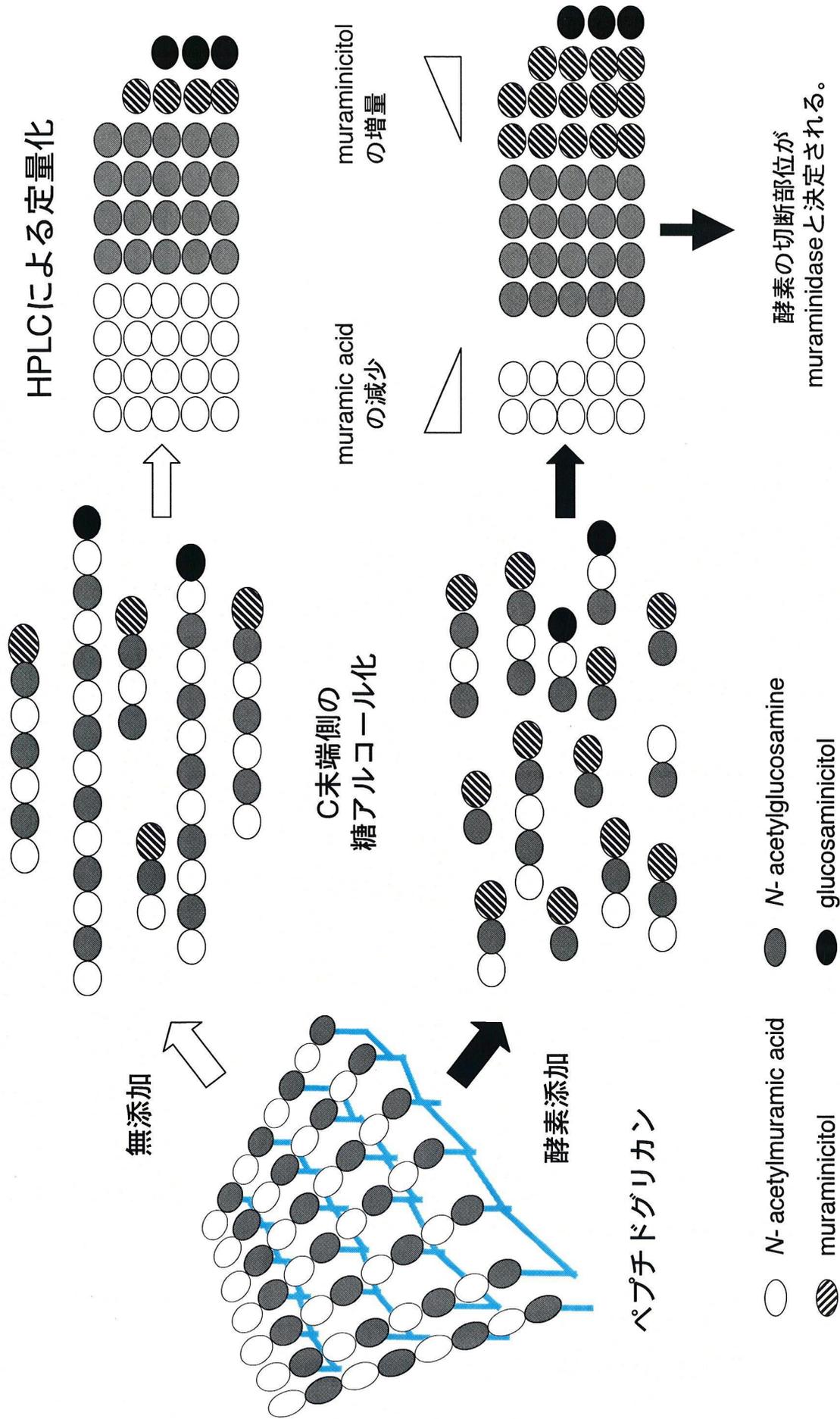


図 19 糖鎖切断部位の決定 (モデル)

ペプチドグリカンに酵素にて消化して分解後、その切断面のみアルコール化を行い、RP-HPLCを用いて、分画、定量を行った。減少する糖、及び増加する糖アルコールにより、酵素切断部位が決定される。

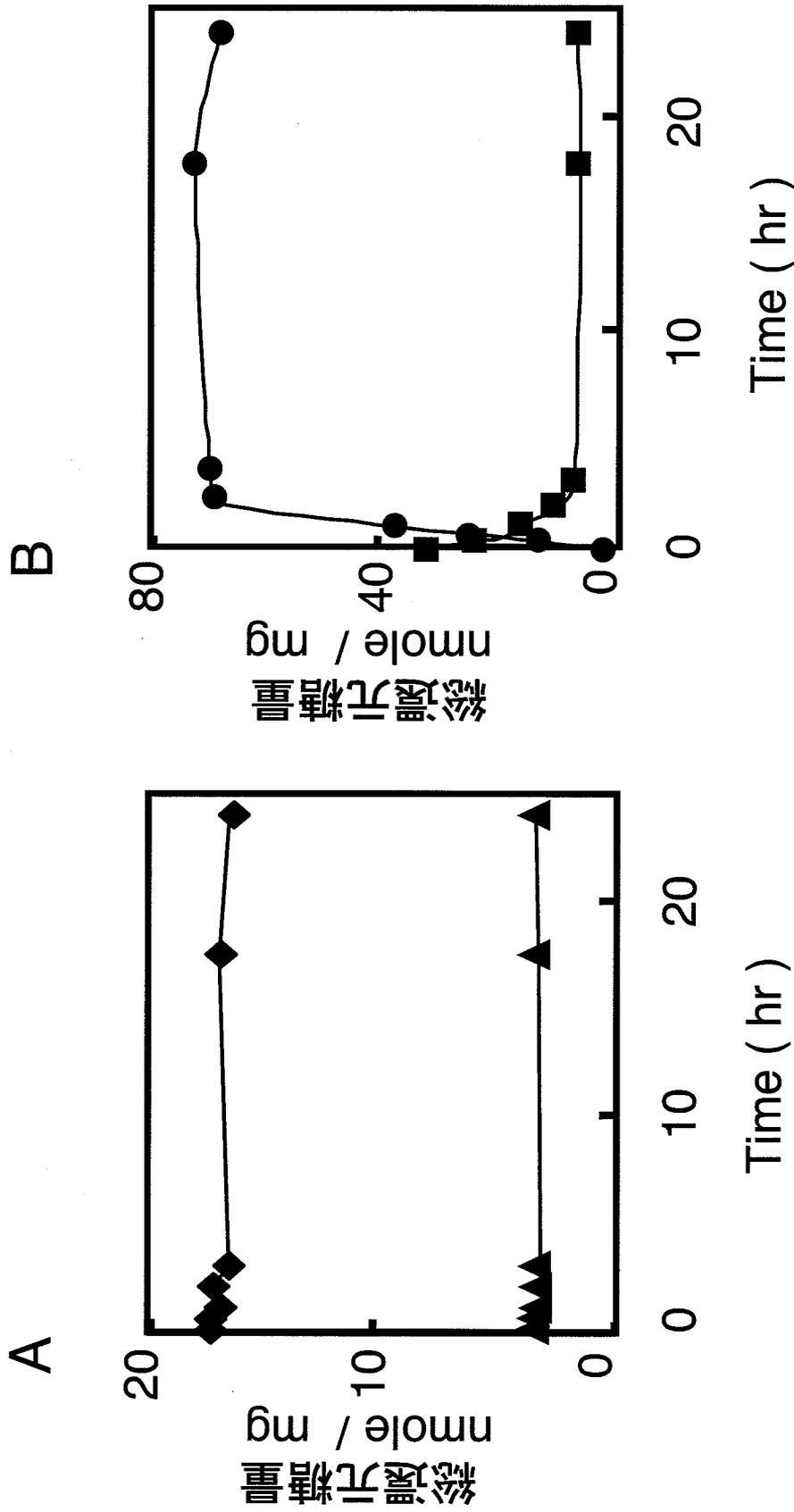


図 20 糖鎖切断部位の決定

経時的にサンプリングしたAmlのペプチドグリカン消化物 (図18-A参照) を用い、糖鎖末端部位を糖アルコール化し、RP-HPLCをもちいて糖鎖切断部位の同定を行った。その結果、グルコサミンおよびその糖アルコール量 (A) に経時的な変化がなく、ムラミン酸およびその糖アルコール量 (B) ではムラミン酸の減少および糖アルコール (muraminicitol) の増加がみられ、Amlが muraminidase活性を示すことが明らかになった。

◆, glucosamine ; ▲, glucosaminicitol ; ■, muramic acid ; ●, muraminicitol

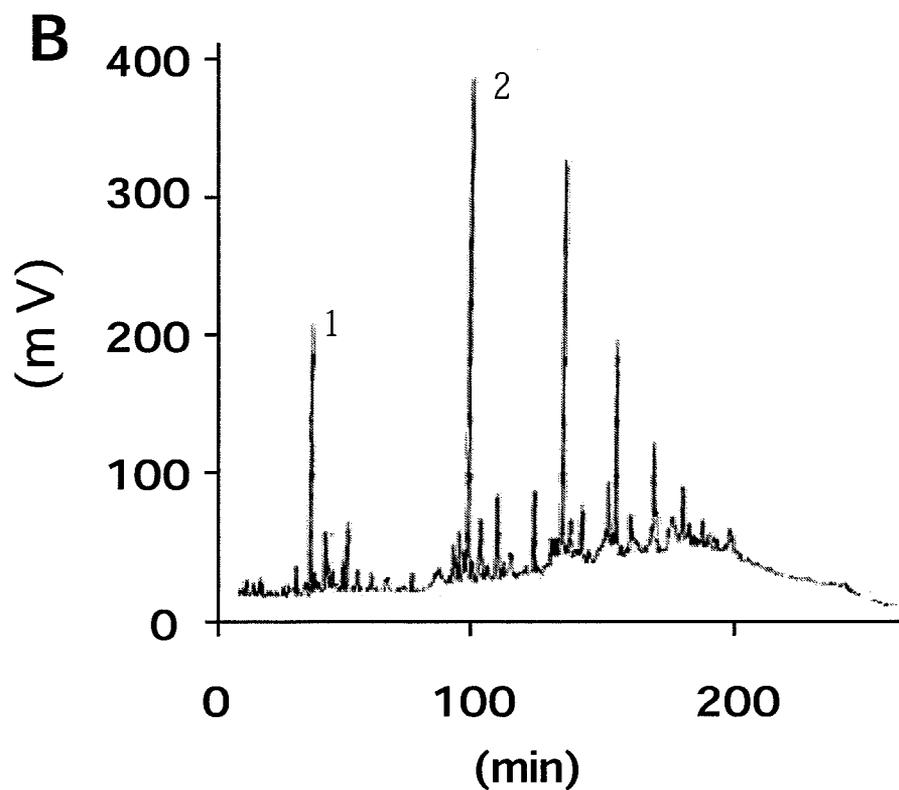
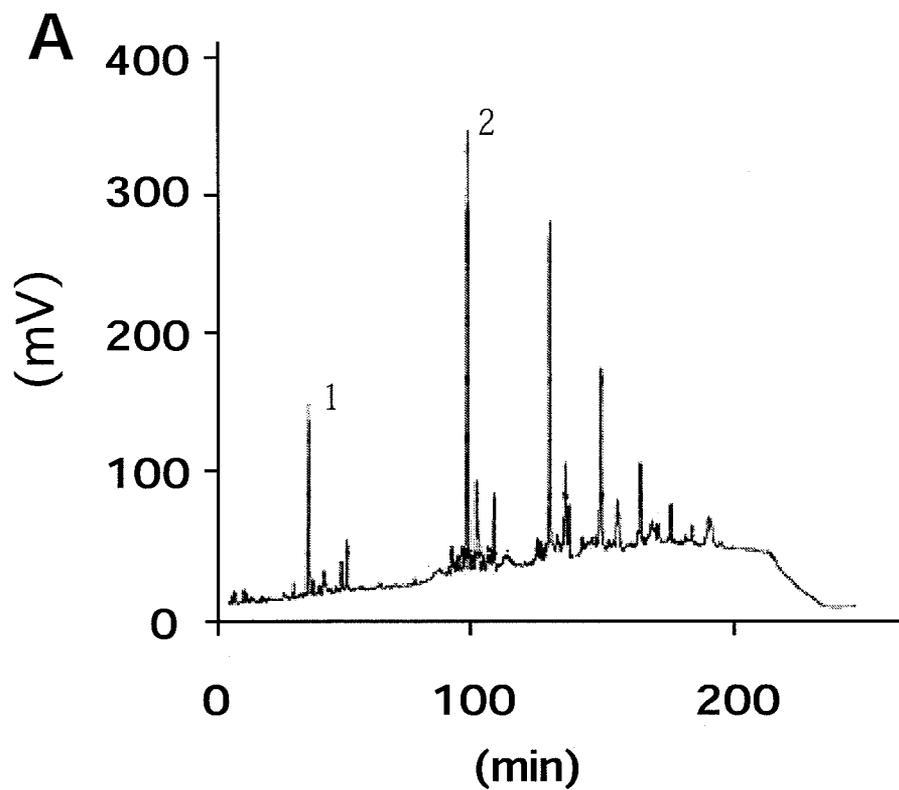


図21 RP-HPLCを用いたムロペプチド解析

*S. mutans* C67-1株 (A) 及び *S. sobrinus* OMZ176a 株 (B) より精製したペプチドグリカンについて、mutanolysinにより消化し調製を行い、ムロペプチド解析を行った。さらにピーク分取（ピーク1、2）を行い、MALDI-TOF/MSによる質量解析に用いた。



表6 TOF/MS解析より推測されるペプチドグリカンの構造

Strain	peak	calculated (m/z)	measured (m/z)	Proposed structure
<i>S. mutans</i> C67-1	1	967.5	990	GlcNAc-MurNAc-Ala-iGln-Lys(Ala) <sub>2</sub> *
	2	1988	2012	GlcNAc-MurNAc-Ala-iGln-Lys(Ala) <sub>2</sub> *   GlcNAc-MurNAc-Ala-iGln-Lys(Ala) <sub>2</sub> *-Ala
<i>S. sobrinus</i> OMZ176a	1	997.5	1020	GlcNAc-MurNAc-Ala-iGln-Lys(Thr-Ala)*
	2	2012	2042	GlcNAc-MurNAc-Ala-iGln-Lys(Thr-Ala)*   GlcNAc-MurNAc-Ala-iGln-Lys(Thr-Ala)*-Ala

mutanolysinにて消化したサンプルについてムロペプチド解析の結果得られたのピークを分取し、MALDI-TOF/MSにより質量を決定し、*S. mutans*および*S. sobrinus* についてペプチドグリカンの構造を推測した。糖及びアミノ酸の正式名称は図21欄外の説明に準ずる。

\*括弧内はLysineの副鎖である架橋部分の構造を表す。

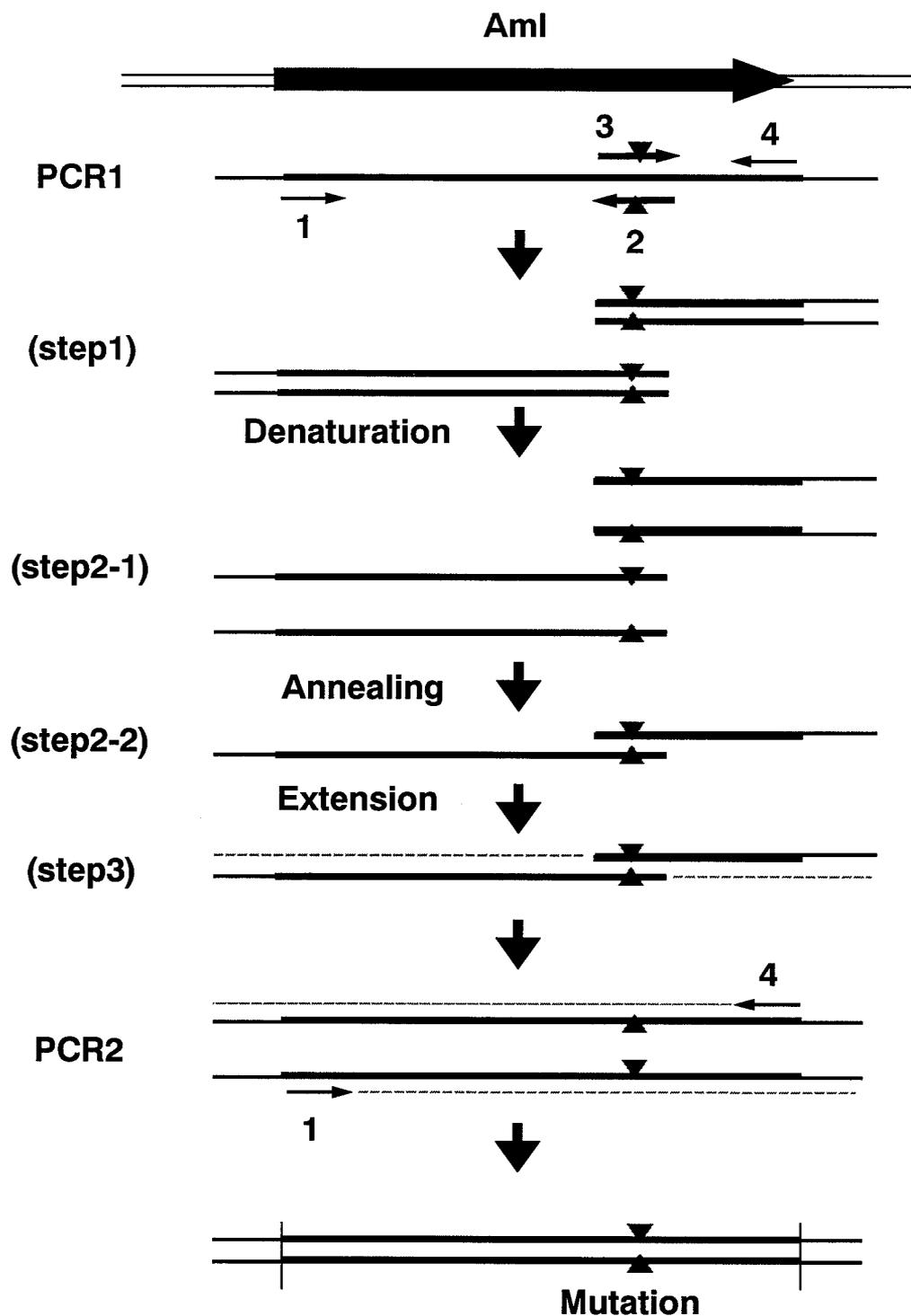


図 23 PCR- mutagenesis

▼▲, 変異部位 (869D→A) を示す。使用したprimerの詳細は表 4 に示す。  
 primer1 : sm3 (GY19)                      primer2 : mutR 869D→A (GY98)  
 primer3 : mutF 869D→A (GY99)        primer4 : sm2 (GY15)

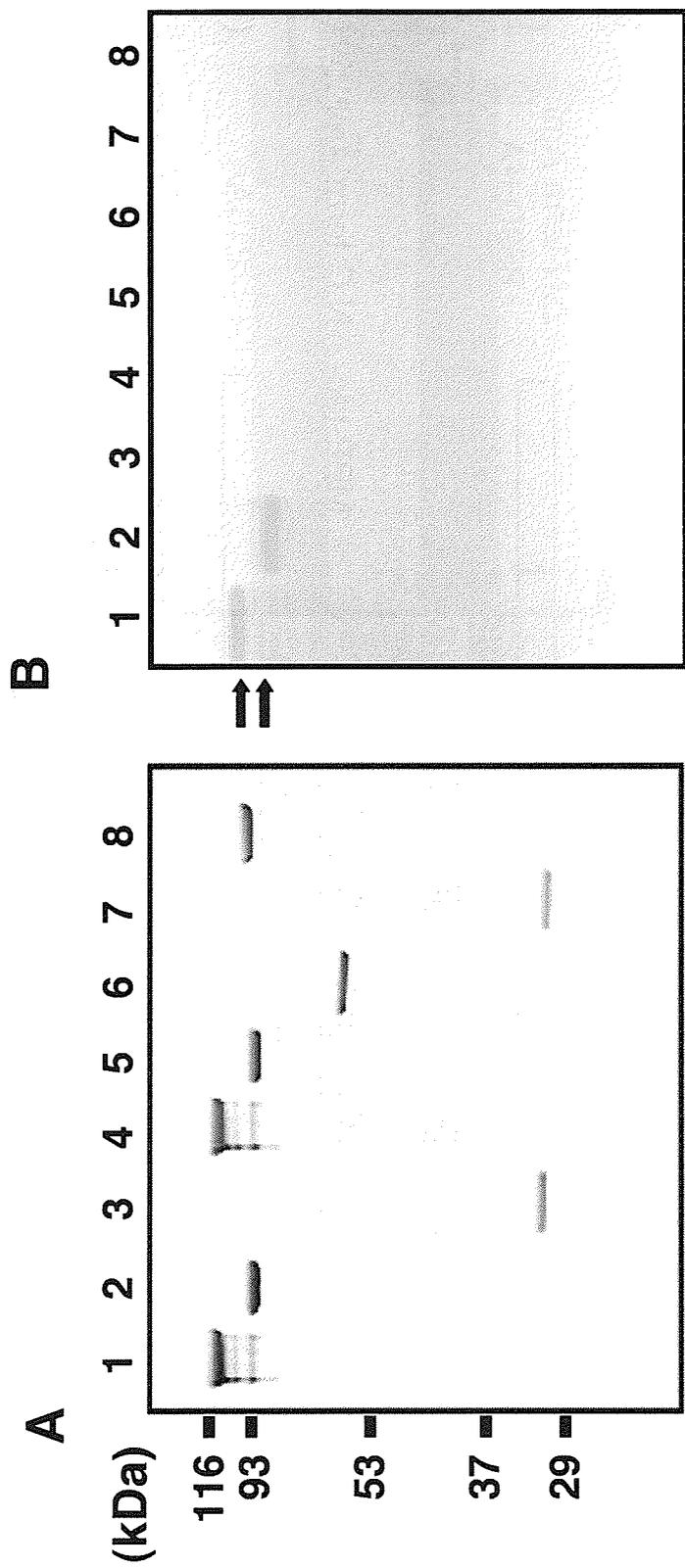


図 24 各種の遺伝子組み換え蛋白の精製結果及びその溶菌活性

各種のトランケート型蛋白及びそれらのpoint mutation mutant について、大腸菌にて発現させ精製を行い、得られた精製蛋白を12%アクリルアミドゲルを用いて泳動しCoomassie染色 (A)、および*S. mutans* 死菌体を用いたZymographyを行った。その結果、full Aml および $\Delta$ N-term Aml のみ溶菌活性が観察された。  
 レーン1. full Aml ; レーン2,  $\Delta$ N-term Aml ; レーン3. 213AA ; レーン4. full Aml 869D $\rightarrow$ A  
 レーン5.  $\Delta$ N-term Aml 869D $\rightarrow$ A ; レーン6  $\Delta$ N,C-term Aml ; レーン7. 213AA 869D $\rightarrow$ A  
 レーン1-7. すべてHis-tag遺伝子組み換え  
 レーン8. MBP-tag- $\Delta$ N,C-term Aml  $\Rightarrow$  : 溶菌バンド

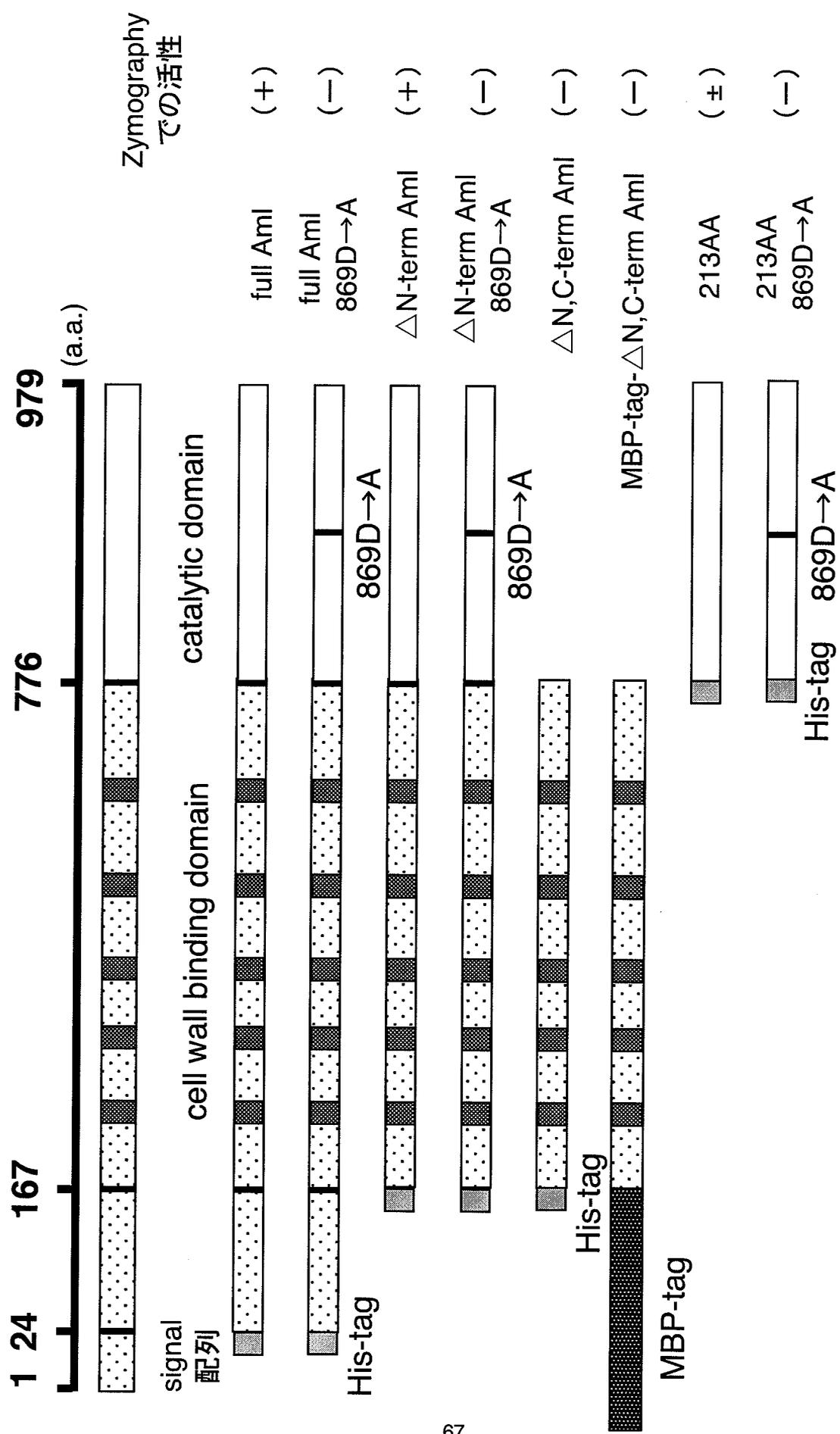


図25 各種の遺伝子組み換え蛋白の作製

PCRおよびPCR-mutagenesisを用い、各種の遺伝子組み換え蛋白を作製した。

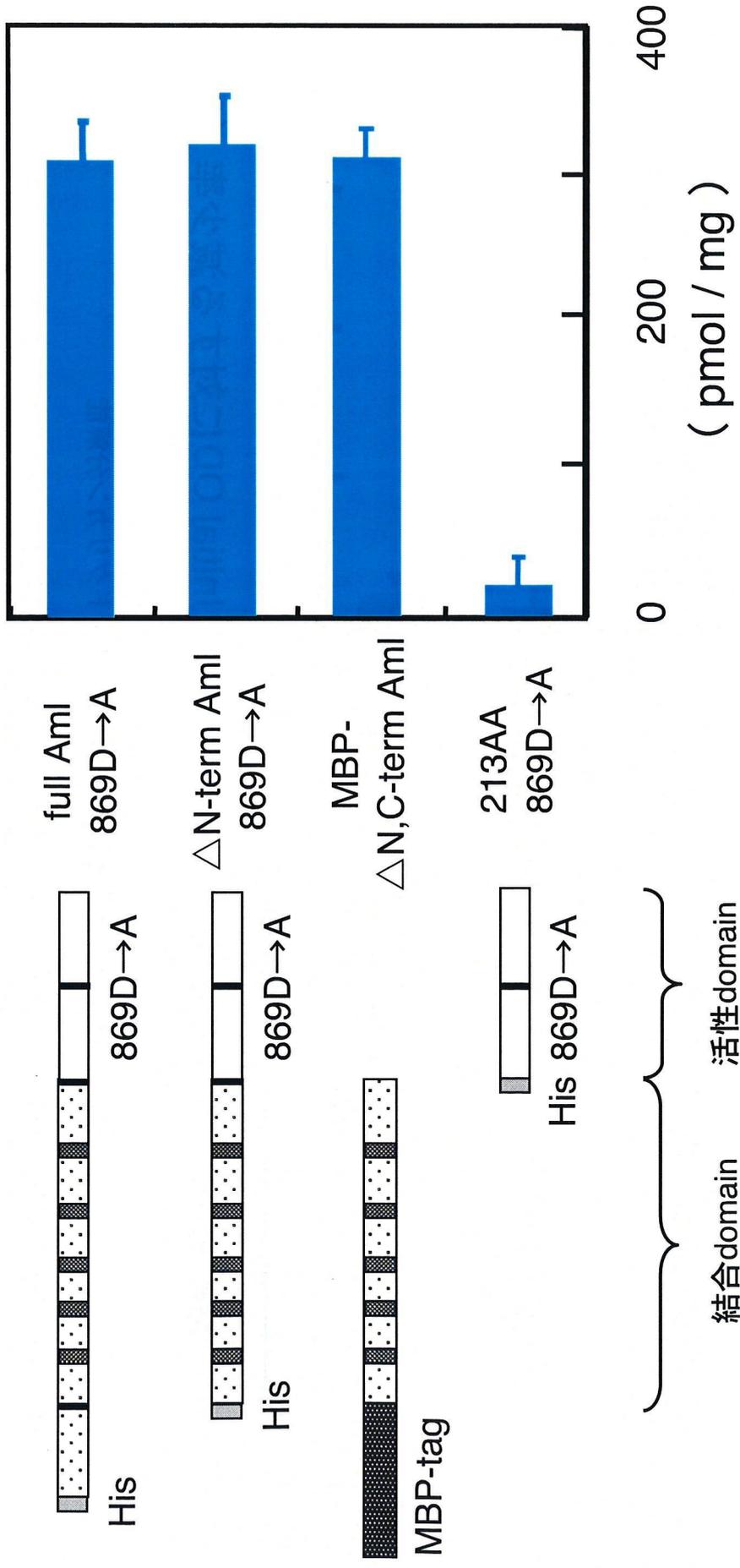


図26 各種の遺伝子組み換え蛋白の菌体に対する結合量

それぞれの遺伝子組み換え蛋白について、*S. mutans* C67-1株 加熱死菌体を用いて菌体との結合量を測定した。その結果、結合 domainと想定される領域が保存されないと、菌体に対する結合能が低いことが明らかとなった。

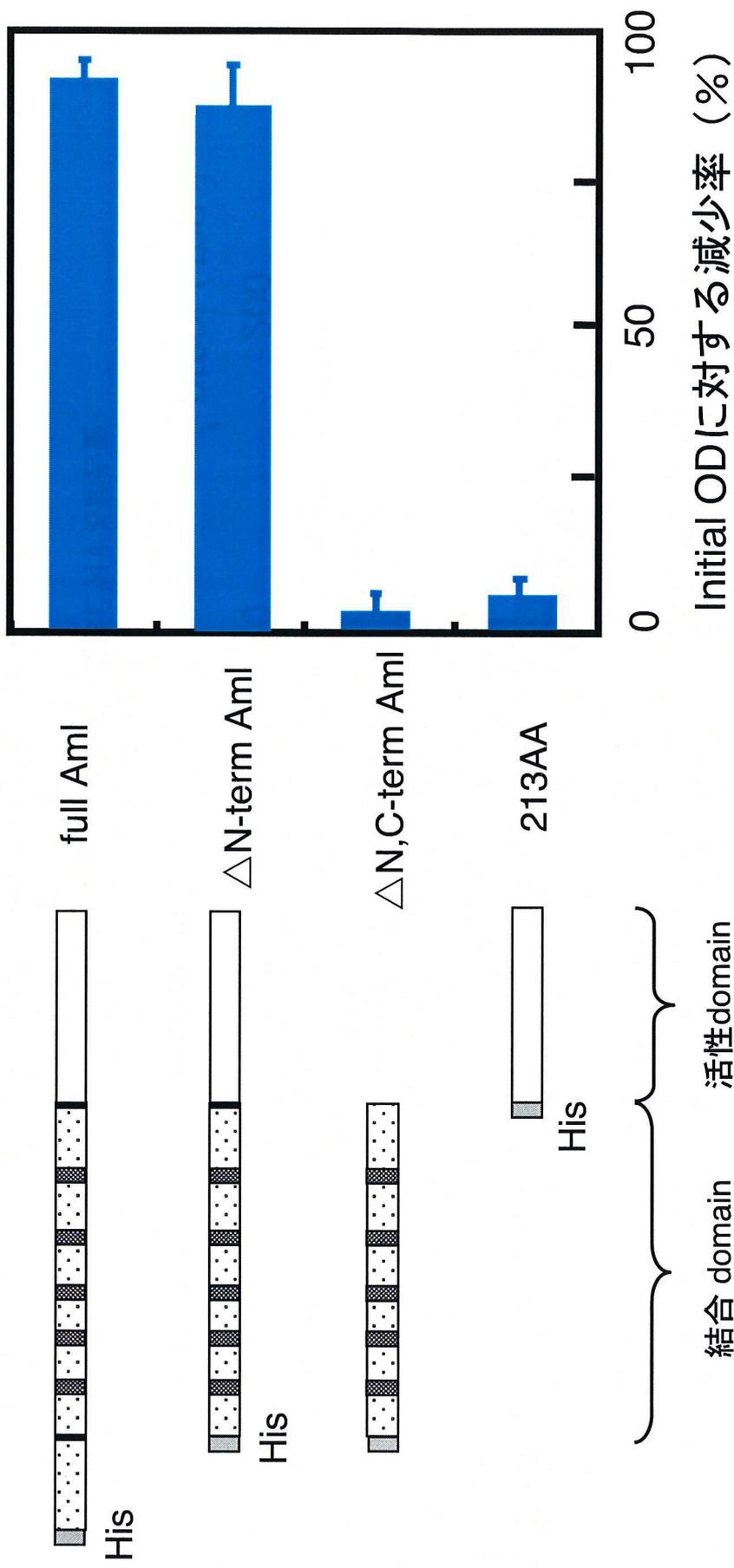


図27 各種の遺伝子組み換え蛋白のペプチドグリカン分解能

それぞれの遺伝子組み換え蛋白について、*S. mutans* C67-1株より精製したペプチドグリカンを用いてペプチドグリカン分解能を測定した。その結果、十分な酵素活性を示すには結合 domain と活性 domain の両方が必要である事が明らかとなった。

## 総括

う蝕は、歯という人体中もっとも硬い硬組織が、不可逆的に破壊、溶解される細菌感染症である。口腔内の各部位において最も多く検出されるのがレンサ球菌であるが [65]、う蝕を誘発する一群のレンサ球菌は、“*mutans* グループ” と総称され [7, 66]、細胞壁の多糖抗原に基づく血清学的分類により (a-h) の血清型に分類されている [67-69]。これらのうち *Streptococcus mutans* (c/e/f 型) と *Streptococcus sobrinus* (d/g 型) の 2 菌種がう蝕発症に深く関わっている事が明らかにされている [7, 70, 71]。しかし、菌の産生する溶菌酵素については説明が進んでいなかった。

本研究では口腔レンサ球菌 5 菌種より溶菌酵素を検出し、そのうち、う蝕の原因菌である *S. mutans* の産生する溶菌酵素について同定を行い、新規の溶菌酵素 Aml を見出し、その性状、機能について解析を行った。

口腔レンサ球菌 5 菌種 (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. salivarius*) について、4%SDS 粗酵素画分を用いて Zymography による溶菌酵素の検出を行った。その結果、粗酵素は菌種間で異なる溶菌バンドパターンを示し、基質に用いる菌種の違いにより感受性が異なった。そのうち *S. mutans* の粗酵素画分からは同種菌体及び *S. sobrinus* 菌体を溶解する分子量 100 kDa と 80 kDa の活性の強い溶菌バンドを検出した。

*S. mutans* の溶菌酵素を protein sequencer を用いて同定した N 末端アミノ酸残基及び Web 上に公開されているデータベースを用いて検索した結果、これらは共に染色体 DNA 上に存在する一つの ORF : SMU689 にコードされる事が明らかとなった。検索の結果、予想される蛋白は、推定分子量 107 kDa の分泌型の蛋白で、ゲノム上での ORF の機能は判明していなかったが、ORF の一部 (C 末端側) は相同性検索の結果、既存の溶菌酵素 (muraminidase) と相同性を示し、ORF : SMU689 より作製した遺伝子組み換え蛋白は *S. mutans* に対して溶菌活性を示した。従って、ORF : SMU689 にコードされる蛋白が新規の溶菌酵素であることが明らかとなり、automutanolysin (Aml) と名付けた。

automutanolysin (Aml) について、機能解析を行うため作製した *aml* 遺伝子不活化株では分

分子量 100 kDa と 80 kDa の蛋白バンドが消失し、これらの蛋白バンドが *aml* 遺伝子にコードされる事が実験的に明らかとなった。また、その形態を観察した結果菌の連鎖数の増大が確認され、*Aml* が *S. mutans* の連鎖数に影響を与える事が示唆された。

口腔レンサ球菌 5 菌種に対する *Aml* の酵素活性について、*Aml* 遺伝子組み換え蛋白を用いて検討したところ、粗酵素画分を用いた Zymography の場合に観察された傾向と同じく、*S. mutans* 及び *S. sobrinus* に対する菌種特異的な酵素活性が示された。

また、*Aml* のペプチドグリカン切断部位の検討を行った結果、*Aml* は糖鎖を構成する *N*-acetylmuramic acid と *N*-acetylglucosamine の間を切断する muraminidase 活性を示すことが明らかになった。

遺伝子情報より予想される *Aml* のドメイン構造をもとに、組み換え蛋白を作製した。*Aml* は 2つのドメイン構造を有している。*N* 末端半側は、13 アミノ酸残基からなる 5回の繰り返し構造が保存され、菌体との結合ドメインと考えられ、*C* 末端側は既存の溶菌酵素と相同性を示し、活性ドメインと考えられた。ドメイン構造を基に作製した遺伝子組み換え蛋白を用い、各領域がどのような役割を果たしているか検討を行った。

その結果、*N* 末端半側は想定のように菌体との結合に働いている事が明らかとなった。しかし、活性ドメインと考えられる *C* 末端側のみでは分解活性が弱く、十分な活性を示すには結合ドメインと活性ドメインの両構造が必要である事が示唆された。

## 参考文献

1. Ghuysen J-M, Tipper DJ, and Strominger JL. (1966). "Enzymes that degrade bacterial cell walls." *Methods in Enzymology*. 8:685-699.
2. Perkins HR. (1980). "The bacterial autolysins." In: Rogers HJ, Perkins HR, Ward JB, eds *Microbial cell walls and membranes*. Chapman and Hall, :437-460.
3. Schockman GDA. (1983). "Structure, function, and assembly of cell walls of gram-positive bacteria." *Annu. Rev. Microbiol.* 37:501-527.
4. Ward JB, and Williamson R. (1984). "Bacterial autolysis: specificity and function." *Elsevier Science publishers B.V.* 3:113-127.
5. Sugai M. (1997). "Peptidoglycan hydrolase of the *Staphylococci*." *J. Infect. Chemother.* 3:113-127.
6. Sugai M, Yamada S, Nakashima S, et al. (1997). "Localized perforation of the cell wall by a major autolysin: *atl* gene products and onset of penicillin-induced lysis of *Staphylococcus aureus*." *J. Bacteriol.* 179:2958-2962.
7. Hamada S, and Slade HD. (1980). "Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*." *Microbiol. Rev.* 44:331-384.
8. Inoue M, Hamada S, Kotani S, et al. (1979). "Enzymic lysis and structure of the cell wall of the oral *Streptococcus mutans* BHT." *Arch Oral Biol.* 24:529-537.
9. Actor P, Daneo-Moore L, Higgins ML, et al. (1988). "Antibiotic inhibition of bacterial surface assembly and function." *American Society for Microbiology*.
10. Bierbaum G, and Sahl H-G. (1987). "Autolytic system of *Staphylococcus simulans* 22: influence of cationic peptides on activity of *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase." *J. Bacteriol.* 169:5452-5458.
11. Valisena S, Varaldo PE, and Satta G. (1982). "Purification and characterization of three separate bacteriolytic enzymes excreted by *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus*

- simulans*, *Staphylococcus saprophyticus*." J. Bacteriol. 151:636-647.
12. Ramadurai L, and Jayaswal RK. (1997). "Molecular cloning, sequencing, and expression of LytM, a unique autolytic gene of *Staphylococcus aureus*." J. Bacteriol. 179:3625-3631.
  13. Bateman A, D, and Rawlings N. (2003). "The CHAP domain: a large family of amidases including GSP amidase and peptidoglycan hydrolases." Trends Biochem. Sci. 28:234-237.
  14. Sugai M, Koike H, Hong Y-M, et al. (1989). "Purification of a 51 kDa endo- $\beta$ -N-acetylglucosaminidase from *Staphylococcus aureus*." FEMS. Microbiol. Lett. 61:267-272.
  15. Smith TJ, and Foster SJ. (1995). "Characterization of the involvement of two compensatory autolysins in mother cell lysis during sporulation of *Bacillus subtilis* 168." J. Bacteriol. 177:3855-3862.
  16. Yamoto H, and Kurosawa Y. (2003). "Localization of the vegetative cell wall hydrolases LytC, LytE, and LytF on the *Bacillus subtilis* cell surface and stability of these enzymes to cell wall bound or extracellular proteases." J. Bacteriol. 185:6666-6677.
  17. Guidicelli S, and Tomasz A. (1984). "Attachment of pneumococcal autolysin to wall teichoic acids, an essential step in enzymatic wall degradation." J. Bacteriol. 158:1188-1190.
  18. Garcia P, Gonzalez MP, Garcia E, et al. (1999). "LytB, a novel pneumococcal murein hydrolases essential for cell separation." Mol. Microbiol. 31:1275-1281.
  19. Herve T, Vega M, Michael JC, et al. (2002). "Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99:12391-12396.
  20. Laemmli U. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227:680-685.
  21. Sugai M, Akiyama T, Komatsuzawa H, et al. (1990). "Characterization of sodium dodecyl sulfate-stable *Staphylococcus aureus* bacteriolytic enzymes by polyacrylamide gel electrophoresis." J. Bacteriol. 172:6494-6498.
  22. Ferretti JJ, Mcshan WM, Ajdic D, et al. (2001). "Complete genome sequence of an M1 strain of *Streptococcus pyogenes*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98:4658-4663.

23. Tettelin H, Massignani V, Cieslewicz MJ, et al. (2002). "Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99:12391-12396.
24. Ajdic D, Mcshan WM, McLaughlin RE, et al. (2002). "Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 99:14434-14439.
25. Hoshino T, Kawaguchi M, Shimizu N, et al. (2004). "PCR detection and identification of oral streptococci in saliva samples using *gtf* genes." Diag. Microbiol. Infect. Dis. 48:195-199.
26. DQ X, J T, and JO C. (2003). "Genetic loci for coaggregation receptor polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus gordonii* 38." J. Bacteriol. 185:5419-5430.
27. Paulsen I, Banerjee L, Myers GS, et al. (2003). "Role of mobile DNA in evolution of vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*." Science 299:1999-2002.
28. Kleerebenzem M, Boekhorst J, Van Kranenburg R, et al. (2003). "Complete genome sequence of *Lactobacillus planturum* WCFS1." Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 100:1990-1995.
29. Astrid R, Tanis H, Ruiger M, et al. (2001). "Crystal structure of the muramidase from *Streptomyces coelicolor* At 1.65 Å." J. Biol. Chem. 276:31994-31999.
30. Bullock WO, Fernandez JM, and Short JM. (1987). "XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection." BioTechniques 5:376-379.
31. Sambrook J, Maniatis T, and Fritsch EF. (1989). "Molecular cloning: A laboratory manual." Plainview, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press.
32. Komatsuzawa H, Ohta K, Labischinski H, et al. (1999). "Characterization of *fmtA*, a gene that modulates the expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*." Antimicrob. Agents Chemother. 43:2121-2125.
33. Sugai M, Fujiwara T, Ohta K, et al. (1997). "*epr* which encodes glycyglycine endopeptidase resistance gene, is homologous to *femAB* and affects serine content of peptidoglycan cross bridges in *Staphylococcus capitis* and *Staphylococcus aureus*." J. Bacteriol. 179:4311-4318.
34. Wu S, de Lencastre H, and Tomasz A. (1999). "The *Staphylococcus aureus* transposon

- Tn551*: complete nucleotide sequence and transcriptional analysis of the expression of the erythromycin resistance gene." *Microb. Drug Resist.* 1:1-7.
35. Dudez A, Chaillus S, Hissler L, et al. (2002). "Physical and genetic map of the *Lactobacillus sakei* 23k chromosome." *Microbiology* 148:421-431.
  36. Lopez R, E G, and P G. (1997). "The pneumococcal cell wall degrading enzymes: a modular design to create new lysins?" *Microb. Drug. Resist.* 3:199-211.
  37. Fernandez-Tornero C, Lopez R, Gimenez-Gallego G, et al. (2001). "A novel solenoid fold in the cell wall anchoring domain of the pneumococcal virulence factor LytA." *Nat.Struct.Biol.* 8:1020-1024.
  38. Kuroda A, and Sekiguchi J. (1991). "Molecular cloning and sequencing of the major *Bacillus subtilis* autolysin gene." *J. Bacteriol.* 173:7304-7312.
  39. Baba T, and Schneewind O. (1998). "Targeting of muralytic enzymes to the cell division site of gram-positive bacteria: repeat domains direct autolysin to the equatorial surface ring of *Staphylococcus aureus*." *EMBO J.* 17:4639-4646.
  40. Bentley S, Chater K, Cerdeno-Tarraga A, et al. (2002). "Complete genome sequence of the model *Actinomyces coelicolor* A3(2)." *Nature* 417:141-147.
  41. Blanca De Las R, Jose L G, Lopez R, et al. (2002). "Purification and polar localization of pneumococcal LytB, a putative Endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase: the chain-dispersing murein hydrolase." *J. Bacteriol.* 184:4988-5000.
  42. Neumann VC, Heath HE, LeBlanc PA, et al. (1993). "Extracellular proteolytic activation of bacteriolytic peptidoglycan hydrolases of *Staphylococcus simulans biovar staphylolyticus*." *FEMS Microbiol. Lett.* 110:205-11.
  43. Sugai M, Komatsuzawa H, Akiyama T, et al. (1995). "Identification of endo- $\beta$ -*N*-acetylglucosaminidase and *N*-acetylmuramyl-L-alanine amidase as cluster-dispersing enzymes in *Staphylococcus aureus*." *J. Bacteriol.* 177:1491 - 1496.
  44. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, et al. (1985). "Measurement of protein bicinchoninic acid." *Anal. Biochem.* 150:76-85.

45. Fuqua W, and SC. W. (1994). "A *LuxR-LuxI* type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite." *J. Bacteriol.* 176:2796-2806.
46. Thompson JS, and Shockman GD. (1969). "A modification of the Park and Johnson reducing sugar determination suitable for the assay of insoluble materials: its application to bacterial cell wall." *Anal. Biochem.* 22:260-268.
47. Pi-Wan C. (1987). "High-performance liquid chromatography analysis of galactosamine, glucosamine, Glucosaminitol, and galactosaminitol." *Anal. Biochem.* 167:265-269.
48. Robert LH, and Stephen CM. (1984). "Amino acid analysis by reverse-phase high-performance liquid chromatography: Precolumn derivatization with phenylisothiocyanate." *Anal. Biochem.* 136:65-74.
49. Glauner B. (1988). "Separation and quantification of mucopeptides with high-performance liquid chromatography." *Anal. Biochem.* 172:451-464.
50. De Jonge BL, Chang YS, Gage D, et al. (1992). "Peptidoglycan composition of a highly methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain. The role of penicillin binding protein 2A." *J. Biol. Chem.* 267:11248-11254.
51. Sarka B-G, Dominic MD, and Pabst MJ. (1998). "Structures of biologically active muramyl peptides from peptidoglycan of *Streptococcus sanguis*." *J. Mass. Spectrom.* 33:1182-1191.
52. Ito W, Ishiguro H, and Kurosawa Y. (1991). "A general method for introducing a series of mutations into cloned DNA using the polymerase chain reaction." *Gene* 102:67-70.
53. Sugai M, Komatsuzawa H, Ooku-Inomata K, et al. (1994). "Isolation and characterization of *Staphylococcus aureus* mutants which form altered cell clusters." *Microbiol. Immunol.* 38:995-999.
54. Araki Y, Nakatani T, Wakayama K, et al. (1972). "Occurrence of *N*-nonsubstituted glucosamine residues in peptidoglycan of lysozyme-resistant cell walls of *Bacillus cereus*." *J. Biol. Chem.* 247:6312-6322.
55. Clarke AJ. (1993). "Extent of peptidoglycan *o*-acetylation in the tribe *Proteeae*." *J. Bacteriol.*

175:4550-4553.

56. Dupont C, and Clarke AJ. (1991). "Dependence of lysozyme-catalyzed solubilization of *Proteus mirabilis* peptidoglycan on the extent of *o*-acetylation." *Eur. J. Biochem.* 195:763-769.
57. Hayashi H, Araki Y, and Ito E. (1973). "Occurrence of glucosamine residues with free amino groups in cell wall peptidoglycan from bacilli as a factor responsible for resistance to lysozyme." *J. Bacteriol.* 113:592-598.
58. Losardt IM, and Neujahr HY. (1975). "Lysis of modified walls from *Lactobacillus fermentum*." *J. Bacteriol.* 124:73-77.
59. Rosenthal RS, Blundell JK, and Perkins HR. (1982). "Strain-related differences in lysozyme sensitivity and extent of *o*-acetylation of gonococcal peptidoglycan." *Infect. Immun.* 37:826-829.
60. Swim SC, Gfell MA, Wilde CEI, et al. (1983). "Strain distribution in extents of lysozyme resistance and *o*-acetylation of gonococcal peptidoglycan determined by high-performance liquid chromatography." *Infect. Immun.* 42:446-452.
61. Tomasz A, Westphal M, Briles EB, et al. (1975). "On the physiological functions of teichoic acids." *J. Supramol. Struct.* 3:1-16.
62. Cleveland RF, Holtje JV, Wicken AJ, et al. (1975). "Inhibition of bacterial wall lysins by lipoteichoic acids and related compounds." *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 67:1128-35.
63. Fischer W, Rosel P, and Koch HU. (1981). "Effect of alanine ester substitution and other structural features of lipoteichoic acids on their inhibitory activity against autolysins of *Staphylococcus aureus*." *J. Bacteriol.* 146:467-75.
64. Holtje JV, and Tomasz A. (1975). "Lipoteichoic acid: a specific inhibitor of autolysin activity in *Pneumococcus*." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72:1690-1694.
65. Schonfeld SE. (1992). "Oral microbiol ecology." In: J. Slots, MA Taubman, eds. *Contemporary Oral Microbiology and Immunology.* Mosby Year Book. 267-274.
66. Loesche WJ. (1986). "Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay." *Microbial. Rev.*

50:353-380.

67. Bratthall D. (1970). "Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus mutans*." *Odont. Revy.* 21:143-152.
68. Schleifer KH. (1986). "Gram-positive cocci." In: Sneath PHA, Mair NS and Holt JG, eds. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2. :1022-1023.
69. Coykendall AL, and Gustafson KB. (1986). "Taxsonomy of *Streptococcus mutans*. Molecular microbiology and immunology of *Streptococcus mutans*." In: Hamada S, Michalek S.M., Kiyono, H et al eds. *Elservier Science Publishers*:121-132.
70. Kuramitsu HK. (1993). "Virulence factors of *mutans streptococci*: role of molecular genetics." *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 4:159-176.
71. Van Houte J. (1994). "Role of micro-organisms in caries etiology." *J. Dent. Res.* 73:672-681