

Streptococcus cricetus antigen I/II (*paaA*) 遺伝子周辺配列の解析

田村 晴希, 山田 ありさ, 菊池 敏昭,
斉藤 弘子, 村井 繁夫, 加藤 裕久

岩手医科大学歯学部歯科薬理学講座

(主任: 加藤 裕久 教授)

(受付: 2004年 1月23日)

(受理: 2004年 2月19日)

Abstract : Antigen I/II protein is a cell surface protein antigen of *Streptococcus mutans* and is implicated in the adhesion mechanism to tooth surfaces. We have identified the antigen I/II homologous gene (*paaA*) from *Streptococcus cricetus*, a member of mutans streptococci. To clarify the mechanism of *paaA* expression, we sequenced the flanking regions of the *paaA* gene utilizing the gene-walking method in this study. In the upstream region of *paaA*, three homologous genes found in the corresponding region of *Streptococcus sobrinus* were identified. One of the corresponding genes in *S. sobrinus* was *par*, which has been characterized as a transcription repressor of the antigen I/II (*spaA*) gene. Therefore, the homologous gene in *S. cricetus* could have a role in transcription of *paaA*. In the downstream region of *paaA*, the *paaA* homologous gene was found and designated as *paaB*. The *paaB* gene was interrupted by a novel insertion sequence element (IS*Scr1*), a member of the IS982 family. Southern hybridization analysis of *S. cricetus par* indicated that no gene homologous to *S. cricetus par* was found in the oral streptococci used in this study. Furthermore, the downstream region of antigen I/II (*spaA*) in *S. sobrinus* was sequenced using the gene-walking method. No similar gene to antigen I/II gene was found in the region. It was suggested that the *paaA* might be regulated by the *par* in *S. cricetus*.

Key words : antigen I/II, gene-walking method, *Streptococcus cricetus*, *paaB*, *par*

緒 言

う蝕はバイオフィルム感染症の一つであり、その主要な病原菌はミュータンスレンサ球菌である。ミュータンスレンサ球菌は7つの菌種と8つの血清型からなるグループで、*Streptococcus mutans* (c/e/f型), *S. sobrinus* (d/g型), *S. cricetus* (a型), *S. rattus* (b型),

S. ferus (c型), *S. macacae* (c型), *S. downei* (h型) が知られている。この7菌種のなかで、*S. mutans* と *S. sobrinus* はヒトの歯垢から分離され、う蝕発症と深く関わっている。一方の *S. cricetus* はハムスターを感染宿主とする菌種であるが、*S. rattus* とともにエジプトなど北アフリカ地区のヒトから分離される^{1,2)}。

S. mutans のビルレンス因子には菌体表層タ

Analysis of upstream and downstream regions of antigen I/II (*paaA*) gene in *Streptococcus cricetus*

Haruki TAMURA, Arisa YAMADA, Toshiaki KIKUCHI, Hiroko SAITO, Shigeo MURAI and Hirohisa KATO

Department of Dental Pharmacology, School of Dentistry, Iwate Medical University.

1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

岩手県盛岡市中央通1丁目3-27 (〒020-8505)

Dent. J. Iwate Med. Univ. 29 : 69-78, 2004

ンパク質抗原である antigen I/II, 非水溶性グルカン合成酵素であるグルコシルトランスフェラーゼ, 菌体の菌面への付着に関与すると考えられているグルカン結合タンパク質などが知られている³⁾。

antigen I/II の構造はアミノ末端側にシグナルペプチド領域, 2 箇所ある繰り返し領域, カルボキシル末端にはこのタンパク質を細胞表面にとどめておくための領域がある²⁾。2 箇所ある繰り返し領域は, その主たる構成アミノ酸残基がアラニン (32%) とプロリン (30%) であることから, それぞれアミノ末端側に近いものから順に A リピートと P リピートと呼ばれている。これらの繰り返し領域は唾液タンパク質との疎水性結合に関与しており^{4,5)}, 唾液成分を介して菌面に付着する際に重要であると考えられている⁶⁾。

S. mutans の antigen I/II は PAc⁷⁾, antigen B⁸⁾, P1⁹⁾, SpaP¹⁰⁾, SR¹¹⁾ など血清型や菌株によってさまざまな名称で呼ばれている。遺伝子解析によって, これらのタンパク質の推定アミノ酸配列は同一ではないことが明らかにされている。例えば *S. mutans* MT8148 株の PAc と *S. mutans* NG5 株の SpaP を比較すると分子全体で36個のアミノ酸の置換が認められ, 中央部150個のアミノ酸残基にわたる領域の保存度が低いことから, この領域は高変異領域と呼ばれている¹⁰⁾。さらに antigen I/II は *S. mutans* 固有のタンパク質ではなく, ミュータンスレンサ球菌や口腔レンサ球菌に広く保存されていることが示唆されている^{9,12)}。ある遺伝子に類似した遺伝子は相同遺伝子と定義されるが, *S. cricetus*¹³⁾, *S. sobrinus*^{14,15)}, *S. gordonii*¹⁶⁾ などから antigen I/II 相同遺伝子が報告されている。このうち, *S. sobrinus* 6715 株では *spaA*¹⁴⁾, *S. sobrinus* MT3791 株では *pag*¹⁵⁾ と呼ばれている。現在までに antigen I/II 相同遺伝子を 2 コピー, タンデムにもつ菌種は *S. gordonii* の他に報告されていない¹⁶⁾。

antigen I/II (相同) 遺伝子周辺域の遺伝子解析は *S. mutans*^{3,17)}, *S. sobrinus*¹⁸⁾, *S. gordonii*

^{19,20)}で行われている。*S. sobrinus* では *spaA* の遺伝子発現を転写レベルで抑制する調節遺伝子 *par* が *spaA* 遺伝子の上流域に同定されている¹⁸⁾。*S. gordonii* では 2 つの antigen I/II 相同遺伝子 (*sspA*, *sspB*) それぞれのプロモーター制御による遺伝子発現がみられる¹⁹⁾。さらに, タンパク質 SspA が *sspB* 遺伝子のプロモーター上流域に結合し, *sspB* 遺伝子発現を促進する²¹⁾ことが明らかにされている。

我々は *S. cricetus* の antigen I/II 相同遺伝子 *paaA* (*paa*) を縮重プライマーを用いた PCR 法と gene-walking 法を用いて全塩基配列を決定した¹³⁾。本研究では *S. cricetus paaA* 遺伝子の発現調節機構を明らかにするための基礎的研究として, *paaA* 遺伝子周辺配列の解析を行った。さらに, 口腔レンサ球菌間での *S. cricetus par* 遺伝子の分布と *S. sobrinus* antigen I/II (*spaA*) 遺伝子下流域について検討した。

材料および方法

1. 供試菌株および培養条件

S. cricetus paaA 遺伝子周辺域の塩基配列の決定には *S. cricetus* E49 株を用いた。口腔レンサ球菌間の *par* 遺伝子分布の解析には Table 1 に示す菌株を使用した。*S. sobrinus spaA* 遺伝子下流域の塩基配列の決定には *S. sobrinus* 6715DP 株を使用した。これらの菌株は Brain Heart Infusion 培地 (BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA) に播種し, 37°C16時間培養した。

2. Gene-walking

供試菌株からのゲノム DNA の抽出には PUREGENE[®] DNA Purification kit for Yeast and Gram-positive bacteria (Gentra Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) を使用した。Gene-walking²²⁾ は Universal Genome Walker kit (Clontech, Palo Alto, CA, USA) を用い, メーカーの指示に従って行った。なお *S. cricetus* の gene-walking 用ゲノムライブラ

Table 1. Bacterial strains used in Southern hybridization analysis

Mutans streptococci (serotype)	Oral streptococci
<i>Streptococcus cricetus</i> E49 (a)	<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556
<i>Streptococcus rattus</i> BHT (b)	<i>Streptococcus oralis</i> ATCC 10557
<i>Streptococcus mutans</i> MT8148 (c)	<i>Streptococcus gordonii</i> ATCC 10558
<i>Streptococcus mutans</i> MT703R (e)	<i>Streptococcus anginosus</i> NCTC 10713
<i>Streptococcus mutans</i> MT557 (f)	<i>Streptococcus intermedius</i> GAI-1157
<i>Streptococcus sobrinus</i> SL1 (d)	<i>Streptococcus constellatus</i> ATCC 27823
<i>Streptococcus sobrinus</i> OMZ65 (g)	
<i>Streptococcus downei</i> MFe28 (h)	
<i>Streptococcus ferus</i> 8S1 (c)	

リーは前報¹³⁾の際に調製したものを使用した。

S. *sobrinus* の gene-walking 用ゲノムライブラリーの調製は次のように行った。すなわち、S. *sobrinus* 6715DP 株から抽出したゲノム DNA を、3 種類の制限酵素 (*EcoRV*, *PvuII*, *StuI*) でそれぞれ消化後、消化断片の両端にアダプターを連結したものをを用いた。S. *sobrinus* 6715株 *spaA* 遺伝子の塩基配列 (DDBJ/GenBank / EMBL アクセション番号 X57841) をもとに、開始プライマー (5'-AGC-CTCGTCAGGGCAAGGCTTATCAG-3') とアダプターに対するプライマーを用いて PCR を行った。PCR 産物を GENE CLEAN[®] II kit (Qbiogene, Inc., Carisbad, CA, USA) で精製後、ダイレクトシーケンス法を用いて塩基配列を決定した。また、クローニングベクター pBluescript II SK (+) に必要であればクローニングし、塩基配列を決定した。DNA シーケンス解析には ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer および 377XL DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用した。

3. DNA およびアミノ酸配列のコンピューター解析

Pustell の DNA マトリックス分析²³⁾ およびアミノ酸配列の相同性検索は MacVector[®] 7.2 (Accelrys, Inc., San Diego, CA, USA) を使用した。マルチプルアライメントおよび系統樹の作製に、Clustal X 1.81²⁴⁾ を使用した。

4. サザンブロット解析

Gene-walking の際に PCR 産物をクローニングベクター pBluescript II SK (+) の *EcoRV* サイトにクローニングしたプラスミド pBER 5 の *StuI-StuI* 断片 (553 bp) を精製後、ランダムプライムドラベリング法²⁵⁾ により digoxigenin (DIG) -11-dUTP で標識したものを DNA プローブとして用いた。供試菌株より抽出したゲノム DNA を *EcoRI* で完全消化後、0.7% アガロースゲルで電気泳動を行った。サザンブロットは定法²⁶⁾ により、酸加水分解後、20×SSC (3 M NaCl, 0.3 M クエン酸ナトリウム溶液, pH 7.0) を用いて Hybond-N⁺ (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) にキャピラリートランスファーした。UV 固定後、熱変性したプローブを添加して、37°C で 16 時間インキュベートした。ハイブリダイゼーション後、2×SSC, 0.1% SDS 溶液で 55°C 15 分間洗浄し、DIG Nucleic Acid Detection kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) に従い、NBT/BCIP を用いてハイブリダイズしたバンドを検出した。

5. 塩基配列のデータベース登録

S. *cricetus paaA* 遺伝子周辺域および S. *sobrinus spaA* 遺伝子下流域の塩基配列はそれぞれ DDBJ/GenBank/EMBL アクセション番号 AB042239 および AB069963 に登録した。

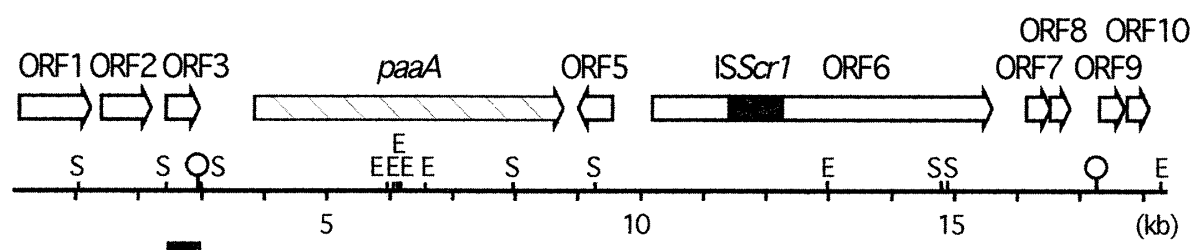


Fig. 1. Restriction map of *S. cricetus paaA* flanking region. Arrows indicate open reading frames (ORFs). Closed box represents *ISScr1*. The bar represents the probe used in the hybridization experiment. Symbols: E, *EcoRI*; S, *StuI*; Q; putative stem-loop structure.

結 果

1. *S. cricetus paaA* 遺伝子周辺域の DNA 解析

paaA 遺伝子周辺域 (18442 bp) の DNA 配列を決定した結果を Fig. 1 に示す。遺伝子の読み取り枠は open reading frame (ORF) と定義されるが, ORF 1 (391 アミノ酸), ORF 3 (183 アミノ酸), ORF 5 (190 アミノ酸) は *S. sobrinus spaA* 遺伝子の上流域に同定されている 3 個の遺伝子¹⁸⁾ と相同性を示した。すなわち, ORF 1 は *S. sobrinus* ORF 1 (アミノトランスフェラーゼ) とアミノ酸一致率が 76%, ORF 3 は転写抑制遺伝子 *par* のコードするタンパク質 Par と 61%, ORF 5 は *S. sobrinus* ORF 3 と 85% であった。このように, *paaA* 遺伝子の周辺は *S. sobrinus* の antigen I/II (*spaA*) 遺伝子の上流域に類似していることが明らかとなった。一方, このような類似性は, *S. mutans* antigen I/II (*spaP*) 遺伝子周辺域とは認められなかった。

ORF 6 は全長が 962 塩基で, 両端に 9 塩基の直接反復配列 (TAGCTAAAT) と 25 塩基の逆方向反復配列をもつ新規の挿入配列が認められた。そこで *ISScr1* と名付けた。*ISScr1* には 287 アミノ酸残基からなるタンパク質をコードする ORF が 1 個あり, その推定アミノ酸配列には IS982 ファミリーのトランスポゼースに保存されている酵素ドメイン DDE モチーフ²⁷⁾ が認められた。このことから, *ISScr1* の ORF はトランスポゼースと推定された。また *ISScr1* は, *S. agalactiae ISSa4*²⁸⁾ と DNA レベルで 87% の一

致率を示した。これにより, *ISScr1* は IS982 ファミリーに属する挿入配列であると考えられた。

S. mutans のゲノムデータベース上のタンパク質³⁾ と *S. cricetus* ORF 2, ORF 7-10 のアミノ酸配列を比較したところ, ORF 2 (273 アミノ酸) はグルコシルトランスフェラーゼと推定される SMU.1039c と 56% の相同性を示した。また, ORF 7 (135 アミノ酸) および ORF 9 (142 アミノ酸) はともに転写調節因子と推定される SMU.1969c および SMU.1025 と相同性を示し, アミノ酸一致率はそれぞれ 46% と 49% であった。ORF 8 (119 アミノ酸) および ORF 10 (127 アミノ酸) は機能の同定されていない SMU.1968c および SMU.1026 と相同性を示し, それぞれアミノ酸一致率は 66% と 38% であった。さらに, *S. cricetus paaA* 遺伝子周辺にある遺伝子は *S. mutans* の antigen I/II (*spaP*) 遺伝子の近隣には認められなかった。また, stem-loop 構造が ORF 3 と ORF 8 の下流域に同定された。

ORF 6 に挿入されている *ISScr1* の DNA 配列をコンピューター解析ソフト上で取り除いて, アミノ酸配列の解析を行った。すなわち, 2 箇所ある *ISScr1* の直接反復配列部分 (ORF 6 のアミノ酸配列で LAK) を連結した結果, ORF 6 は PAaA と相同性を示す 1497 アミノ酸残基のタンパク質をコードするものと推定された。そこで同遺伝子を *paaB* とした。PAaB の構造解析の結果, A リピート相当部に *ISScr1* が単純挿入されていた。したがって, *paaB* 遺伝子は挿入配列のために機能的には失

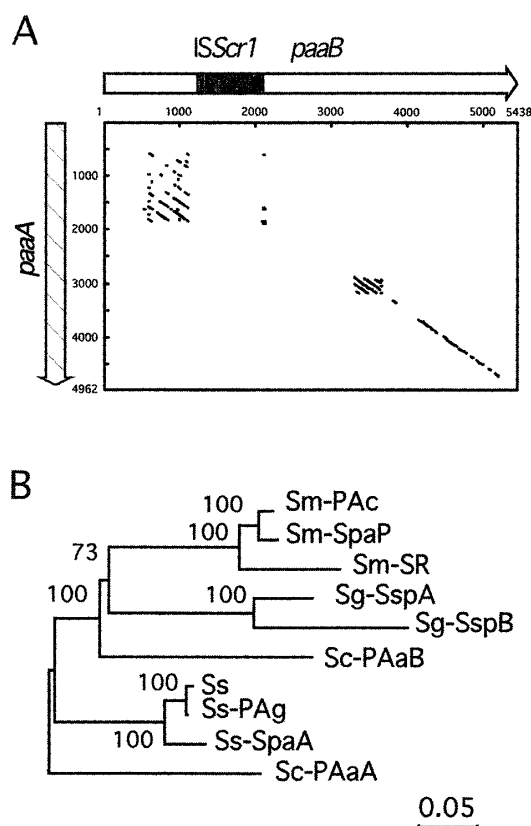


Fig. 2. (A) Dot matrix comparisons of the nucleotide sequences of *paaA* with those of *paaB* inserted by *ISScr1*. Closed box represents *ISScr1*. Dots are placed at locations where more than 18 of 30 nucleotides are identical. (B) Phylogenetic analysis of antigen I/II proteins based on the whole molecules. Numbers indicate percent support for specific nodes after 1000 replications of bootstrap analysis. Bar represents 5% estimated sequence difference. Abbreviations : Sm-PAc, PAc of *S. mutans* MT8148 ; Sm-SpaP, SpaP of *S. mutans* NG5 ; Sm-SR, SR of *S. mutans* OMZ175 ; Ss, antigen I/II homolog of *S. sobrinus* MUCOB263 ; Ss-PAg, PAg of *S. sobrinus* MT3791 ; Ss-SpaA, SpaA of *S. sobrinus* 6715 ; Sc-PAAa, PAAa of *S. cricetus* E49 ; Sc-PAAb, PAAb of *S. cricetus* E49 ; Sg-SspA, SspA of *S. gordonii* DL1 ; Sg-SspB, SspB of *S. gordonii* DL1.

活していると考えられた。また、*paaB* 遺伝子から挿入配列が取り除かれるならば、antigen I/II として機能する可能性が示唆された。

そこで *paaA* と *paaB* 遺伝子の DNA 配列の相同性を明らかにするために、Pustell の DNA マトリックス分析を行った (Fig. 2 A)。DNA

レベルでの相同性は A リピート相当部よりもアミノ末端側、P リピートからカルボキシル末端側が高く、中央部では相同性が低かった。

antigen I/II タンパク質が同定されているものには、*S. mutans* では PAc⁷⁾, SpaP¹⁰⁾, SR¹¹⁾ などが、*S. sobrinus* では SpaA¹⁴⁾, PAg¹⁵⁾ などが、*S. gordonii* では SspA と SspB¹⁶⁾ が知られている。そこで、これら antigen I/II ファミリータンパク質のアミノ酸配列と *S. cricetus* PAAb のアミノ酸配列を比較するために系統樹を作製した (Fig. 2 B)。その結果、*S. gordonii* の SspA と SspB はグループ (クラスター) にまとめられたのに対し、*S. cricetus* の PAAa と PAAb はクラスターを形成しなかった。PAAa は *S. sobrinus* のグループに類似しており、PAAb は *S. gordonii* の SspA や SspB とともに *S. mutans* の PAc のグループと類似性を示した。

2. 口腔レンサ球菌における *par* 遺伝子の検索

S. cricetus par 相同遺伝子が口腔レンサ球菌に分布しているか調べるために、サザンブロット解析を行った (Fig. 3)。37°C の条件下においてハイブリダイゼーションを行ったところ、*S. cricetus* ではおよそ 14 kbp の *EcoRI* 断片がハイブリダイズしたが、他の供試菌株では検出されなかった。

3. *S. sobrinus spaA* 遺伝子下流域の DNA 解析

S. sobrinus spaA 遺伝子上流域に同定されている遺伝子が *S. cricetus paaA* 遺伝子周辺域に保存されており、類似性があることが示唆された。そこで、*S. sobrinus* においても *spaA* 遺伝子の他に antigen I/II 相同遺伝子があるか調べるために、*spaA* 遺伝子下流域 (2957 bp) の DNA 配列を決定した (Fig. 4 A)。その結果、DNA 配列を決定した領域に 2 個の ORF (SSO1, SSO2) が予想されたが、antigen I/II に相同性を示す DNA 配列は認められなかった。*spaA* 遺伝子の終止コドンの 13 塩基下流に

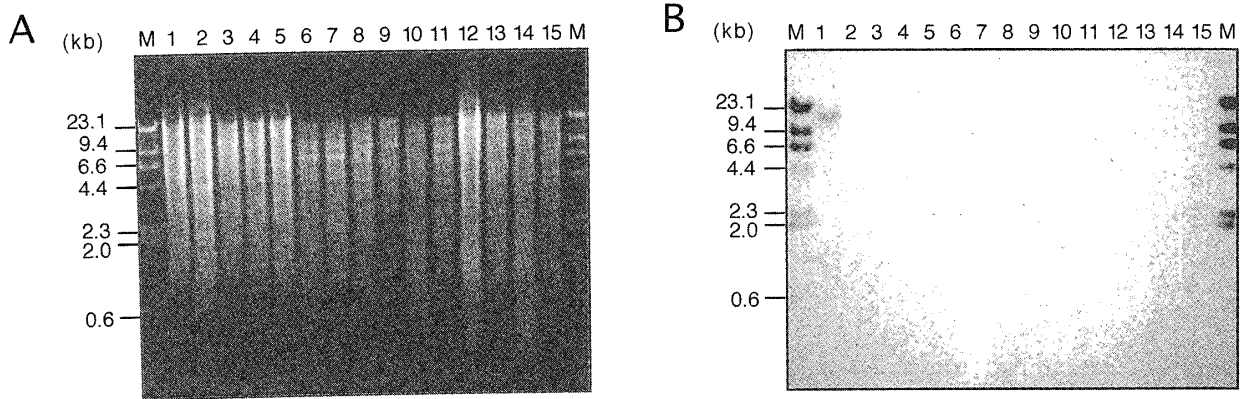


Fig. 3. (A) Ethidium bromide-stained 0.7% agarose gel. Chromosomal DNA from oral streptococci was cleaved with *EcoRI* and separated on a gel. (B) Hybridization with a 0.5-kb *StuI* fragment of *S. cricetus par* at 37°C. Lanes : 1, *S. cricetus* E49 ; 2, *S. rattus* BHT ; 3, *S. mutans* MT8148 ; 4, *S. mutans* MT703R ; 5, *S. mutans* MT557 ; 6, *S. sobrinus* SL 1 ; 7, *S. sobrinus* OMZ65 ; 8, *S. downei* MFe28 ; 9, *S. ferus* 8 S 1 ; 10, *S. sanguinis* ATCC 10556 ; 11, *S. oralis* ATCC 10557 ; 12, *S. gordonii* ATCC 10558 ; 13, *S. anginosus* NCTC 10713 ; 14, *S. intermedius* GAI-1157 ; 15, *S. constellatus* ATCC 27823 ; M, digoxigenin-labeled DNA molecular weight marker II. Positions of molecular mass markers are indicated (kb) on the left.

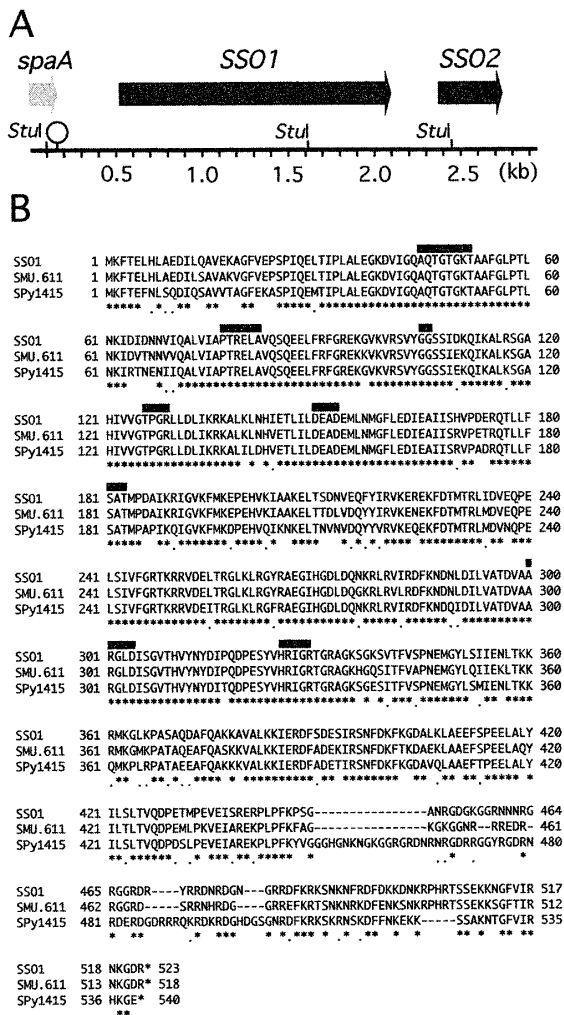


Fig. 4. (A) Downstream region of *S. sobrinus spaA* gene. Shaded and closed arrows represent incomplete and complete ORFs, respectively. Positions of *StuI* are indicated. Putative stem-loop structure is depicted by a symbol (O). (B) Deduced amino acid sequence alignment of DEAD-box proteins of *S. sobrinus* SSO1, *S. mutans* SMU.611, and *S. pyogenes* SPy1415. The diagnostic DEAD box amino acid motifs are shown above the sequences by thick bars. Identical and similar residues in three proteins are indicated by asterisks and dots, respectively.

stem-loop 構造がみられた。SSO1 および SSO2 遺伝子はそれぞれ522アミノ酸残基および121アミノ酸残基のタンパク質をコードする遺伝子と推定された。開始コドン(TTG)で始まる SSO1 遺伝子の推定アミノ酸配列には DEAD-box タンパク質で保存されているアミノ酸配列 (モチーフ)²⁹⁾ がみられた。BLAST による相同性検索の結果, SSO1 は DEAD-box タンパク質に属する ATP 依存性 RNA ヘリカーゼに高い相同性を示し, *S. mutans* SMU.611および *S. pyogenes* SPy1415とそれぞれ86%および78%のアミノ酸一致率を示した (Fig. 4 B)。一方, SSO2は相同性を示すものが検索されなかった。
S. sobrinus SSO1 遺伝子と *S. mutans* の

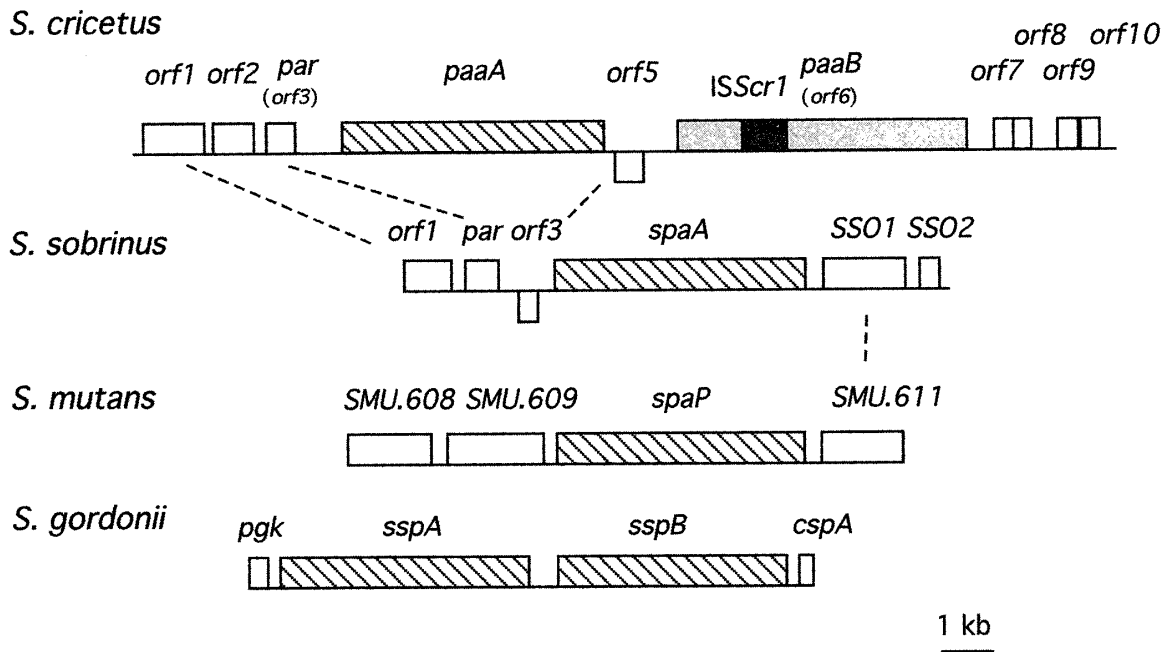


Fig. 5. Schematic representation of the flanking regions of antigen I/II genes in *S. cricetus*, *S. sobrinus*, *S. mutans*, and *S. gordonii*. Sequence data were obtained from *S. cricetus* E49 (this study), *S. mutans* UA159, and *S. gordonii* DL1. The upstream region and downstream region of *S. sobrinus spaA* gene were depicted from sequence data of *S. sobrinus* strains MT3791 and 6715DP (this study), respectively. Boxes indicate coding regions for genes. Upper and lower boxes indicate the coding direction in the same and opposite orientations to antigen I/II genes, respectively. Hatched, shaded, and closed boxes represent antigen I/II genes, *paaB*, and *ISScr1*, respectively.

SMU.611 遺伝子はそれぞれの antigen I/II 遺伝子の下流域にみられる (Fig. 5)。このように、antigen I/II 遺伝子の下流域の類似性が *S. sobrinus* と *S. mutans* の間に認められた。しかしながら、*S. cricetus paaA* 下流域にはそのような相同遺伝子はみられなかった。

考 察

S. mutans の antigen I/II は菌体表層で微繊維状構造をとっており、唾液中のタンパク質と疎水性結合を形成し、菌体が歯面に付着する際に重要であると考えられている^{2,4-6}。

antigen I/II の発現調節機構に関する研究は *S. sobrinus*¹⁸⁾ や *S. gordonii*¹⁹⁻²¹⁾ で行われているものの、未だ解明されていない。我々はミュータンスレンサ球菌に属する *S. cricetus* の antigen I/II 相同遺伝子 (*paaA*) を同定し¹³⁾、*paaA* 遺伝子の発現調節機構に注目している。

本研究では *S. cricetus* E49 株の *paaA* 遺伝子

周辺配列の解析を行ったところ、*paaA* 遺伝子下流域に *ISScr1* で挿入失活された *paaB* 遺伝子があり、*paaA* 遺伝子上流域には *S. sobrinus par* 相同遺伝子が認められた。この2つの所見が *S. cricetus* HS-1 株、HS-6 株 (*S. cricetus* 標準株) においてみられるか PCR 法を用いて検討したところ、*paaB* 遺伝子の同一部位に *ISScr1* が挿入されていること、*S. cricetus par* 遺伝子が保存されていることを我々は確認している (データ未掲載)。このように我々の研究室で保有する *S. cricetus* 保存菌株すべてについて検討したが、本研究では臨床分離菌株について検討することができなかった。今後の課題として、*S. cricetus* 分離菌株に *ISScr1* が挿入されていない機能的な *paaB* 遺伝子があるかどうか検討する必要がある。

paaB 遺伝子に挿入している *ISScr1* は直接反復配列および逆方向反復配列を両端にもつ典型的な挿入配列で、*S. cricetus* から最初に同定された挿入配列である。*ISScr1* はトランスポ

ゼースと高い相同性を示し、酵素ドメインの DDE モチーフ²⁷⁾を保有することから IS982ファミリーに属すると考えられた。これまでに、IS982ファミリーには *S. agalactiae* ISSa4, *Lactococcus lactis* IS982など5つの挿入配列が同定されているが、いずれもグラム陽性菌からの報告である²⁷⁾。ISScr1はDNAレベルで87%と非常に高い相同性を示した ISSa4 と共通の祖先をもつことが考えられた。

paaA と *paaB* 遺伝子の相同性をDNAレベルで比較すると、タンパク質のアミノ末端側およびカルボキシル末端側に相当する部分で相同性が高く、中央部で相同性が低かった。この傾向は antigen I/II 遺伝子が2コピー (*sspA* と *sspB*) タンデムに並んでいる *S. gordonii* と同様¹⁶⁾であった。しかしながら、antigen I/II ファミリータンパク質の系統樹による分析では *S. gordonii* の SspA と SspB は同一のクラスターを形成したのに対し、PAaA と PAaB は異なるクラスターに分類された。また、PAaB はむしろ *S. mutans* の SpaP などのグループと類似性を示した。このことは PAaA と PAaB の中央部の相同性が低いのみならず、PAaA が1653アミノ酸残基であるのに対し、PAaB が1497アミノ酸残基と全長が短いためであると考えられた。また、*S. gordonii* の場合と比較して、*S. cricetus* の *paaA* 遺伝子と *paaB* 遺伝子は分岐してからかなり時間が経過したことが推察された。

これまでに報告のある antigen I/II 周辺域と本研究で明らかにした *S. cricetus* の *paaA* 遺伝子周辺域および *S. sobrinus spaA* 遺伝子下流域をまとめた (Fig. 5)。*S. gordonii* では、菌体の増殖過程や周囲環境によって antigen I/II 遺伝子発現が異なる¹⁹⁾ことが報告されている。しかも *sspA*, *sspB* 遺伝子それぞれのプロモーターによる転写調節¹⁹⁾に加えて、タンパク質の SspA が *sspB* 遺伝子の転写を促進する報告²¹⁾がある。また、*S. sobrinus* では *par* 遺伝子を挿入失活した変異株で *spaA* 遺伝子の発現が促進されることから、*par* 遺伝子が antigen I/II 転

写抑制遺伝子である¹⁸⁾と同定されている。したがって、菌種によって独特の antigen I/II 転写調節機構がある可能性が考えられた。*S. mutans* ゲノムプロジェクトの結果³⁾から、antigen I/II (*spaP*) 遺伝子は1コピーであり、*par* 相同遺伝子は保存されていない。*S. cricetus* で、*par* 遺伝子が *paaA* 遺伝子の上流域に認められたことは、*S. sobrinus* の *par* 遺伝子のような antigen I/II 遺伝子転写抑制機構がある可能性を示唆している。

S. mutans spaP 遺伝子下流域には DEAD-box タンパク質をコードする SMU.611 遺伝子がみられる³⁾。*S. sobrinus spaA* 遺伝子下流域の配列の解析の結果、*S. mutans* SMU.611 遺伝子と相同性を示す SSO1 遺伝子が認められた。したがって、*S. sobrinus* antigen I/II 遺伝子下流域は *S. mutans* antigen I/II 下流域と類似していることが示唆された。

サザンブロット解析から *S. cricetus par* 遺伝子に相同性を示す遺伝子は検討した口腔レンサ球菌にみられないことが示唆された。やや低いストレンジな条件 (37°C) にもかかわらず、*S. sobrinus par* 遺伝子を *S. cricetus* のプローブで検出できなかった。この理由として、*S. cricetus par* 遺伝子が *S. sobrinus* の *par* 遺伝子とDNAレベルで67.6%と相同性が低いことが考えられる。*S. sobrinus par* 遺伝子をプローブとしたサザンブロット解析¹⁸⁾では *S. mutans* から *par* 相同遺伝子は検出されていない。また、ゲノム解析³⁾の結果からも *S. mutans* には *par* 相同遺伝子は同定されていない。口腔レンサ球菌には、antigen I/II 相同遺伝子が分布していることが示唆されている¹²⁾ことから、antigen I/II 相同遺伝子の転写調節遺伝子が分布する可能性も考えられる。この点を含めて、今後、*S. cricetus paaA* 遺伝子発現調節機構について研究を行う予定である。

結 論

S. cricetus paaA 遺伝子周辺域 (18-kb) の遺伝子解析を gene-walking 法を用いて行った。また, S. sobrinus の spaA 遺伝子下流域 (2.9-kb) についても antigen I/II 遺伝子の検索を行ったところ, 以下の結論を得た。

1. paaA 遺伝子周辺域に S. sobrinus antigen I/II (spaA) 遺伝子上流域にある3つの遺伝子が保存されていた。このうち, antigen I/II 転写抑制遺伝子と推定される par 遺伝子が paaA 遺伝子の上流に認められた。

2. paaA 遺伝子下流域に paaA 遺伝子と相同性を示す遺伝子 paaB がみられた。paaB 遺伝子には挿入配列 ISScr1 が挿入されており, 機能的に失活していると考えられた。

3. S. cricetus par 遺伝子と相同性を示す遺伝子は口腔レンサ球菌からは検出されなかった。

4. S. sobrinus spaA 遺伝子下流域には DEAD-box タンパク質をコードする遺伝子がみられ, S. mutans の spaP 遺伝子下流域と類似性を示した。

本論文の要旨は, 岩手医科大学歯学会第55回例会 (2003年2月22日, 盛岡市) において発表した。

本研究は, 科学研究費補助金 (若手研究 B 課題番号14771026) および文部科学省私立大学ハイテク・リサーチ・センター事業補助金による研究助成を受けた。

文 献

- 1) Loesche, W. J.: Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.* 50 : 353-380, 1986.
- 2) 加藤裕久: S. mutans の生物学—特に齲蝕ワクチンについて—, 岩医大歯誌, 25 : 145-154, 2000.
- 3) Ajdić, D., McShan, W. M., McLaughlin, R. E., Savić, G., Chang, J., Carson, M. B., Primeaux, C., Tian, R., Kenton, S., Jia, H., Lin, S., Qian, Y., Li, S., Zhu, H., Najjar, F., Lai, H., White, J., Roe, B. A., and Ferretti, J. J.: Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 : 14434-14439, 2002.
- 4) Nakai, M., Okahashi, N., Ohta, H., and Koga, T.: Saliva-binding region of *Streptococcus mutans* surface protein antigen. *Infect. Immun.* 61 : 4344-4349, 1993.
- 5) Munro, G. H., Evans, P., Todryk, S., Buckett, P., Kelly, C. G., and Lehner, T.: A protein fragment of streptococcal cell surface antigen I/II which prevents adhesion of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 61 : 4590-4598, 1993.
- 6) Lee, S. F., Progulsk-Fox, A., Erdos, G. W., Piacentini, D. A., Ayakawa, G. Y., Crowley, P. J., and Bleiweis, A. S.: Construction and characterization of isogenic mutants of *Streptococcus mutans* deficient in major surface protein antigen P 1 (I/II). *Infect. Immun.* 57 : 3306-3313, 1989.
- 7) Okahashi, N., Sasakawa, C., Yoshikawa, M., Hamada, S., and Koga, T.: Molecular characterization of a surface protein antigen gene from serotype c *Streptococcus mutans*, implicated in dental caries. *Mol. Microbiol.* 3 : 673-678, 1989.
- 8) Russell, R. R.: Wall-associated protein antigens of *Streptococcus mutans*. *J. Gen. Microbiol.* 114 : 109-115, 1979.
- 9) Lee, S. F., Progulsk-Fox, A., and Bleiweis, A. S.: Molecular cloning and expression of a *Streptococcus mutans* major surface protein antigen, P 1 (I/II), in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 56 : 2114-2119, 1988.
- 10) Kelly, C., Evans, P., Bergmeier, L., Lee, S. F., Progulsk-Fox, A., Harris, A. C., Aitken, A., Bleiweis, A. S., and Lehner, T.: Sequence analysis of the cloned streptococcal cell surface antigen I/II. *FEBS Lett.* 258 : 127-132, 1989.
- 11) Ogier, J. A., Scholler, M., Leproivre, Y., Pini, A., Sommer, P., and Klein, J. P.: Complete nucleotide sequence of the sr gene from *Streptococcus mutans* OMZ 175. *FEMS Microbiol. Lett.* 56 : 223-227, 1990.
- 12) Ma, J. K.-C., Kelly, C. G., Munro, G., Whiley, R. A., and Lehner, T.: Conservation of the gene encoding streptococcal antigen I/II in oral streptococci. *Infect. Immun.* 59 : 2686-2694, 1991.
- 13) Tamura, H., Kikuchi, T., Shirato, R., and Kato, H.: Cloning and DNA sequencing of the surface protein antigen I/II (PAA) of *Streptococcus cricetus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 196 : 251-256, 2001.
- 14) LaPolla, R. J., Haron, J. A., Kelly, C. G., Taylor, W. R., Bohart, C., Hendricks, M., Pyati, J., Graff, R. T., Ma, J. K.-C., and Lehner, T.: Sequence and structural analysis of surface protein antigen I/II (SpaA) of *Streptococcus sobrinus*. *Infect. Immun.* 59 : 2677-2685, 1991.
- 15) Tokuda, M., Okahashi, N., Takahashi, I., Nakai, M., Nagaoka, S., Kawagoe, M., and Koga, T.:

- Complete nucleotide sequence of the gene for a surface protein antigen of *Streptococcus sobrinus*. *Infect. Immun.* 59 : 3309-3312, 1991.
- 16) Demuth, D. R., Duan, Y., Brooks, W., Holmes, A. R., McNab, R., and Jenkinson, H. F. : Tandem genes encode cell-surface polypeptides SspA and SspB which mediate adhesion of the oral bacterium *Streptococcus gordonii* to human and bacterial receptors. *Mol. Microbiol.* 20 : 403-413, 1996.
- 17) Ogier, J. A., Schöller, M., Lepoivre, Y., Gangloff, S., M'Zoughi, R., and Klein, J. P. : A 40-kilodalton cell wall protein-coding sequence upstream of the *sr* gene of *Streptococcus mutans* OMZ175 (serotype f). *Infect. Immun.* 59 : 1620-1626, 1991.
- 18) Takahashi, I., Okahashi, N., and Hamada, S. : Molecular characterization of a negative regulator of *Streptococcus sobrinus* surface protein antigen gene. *J. Bacteriol.* 175, 4345-4353, 1993.
- 19) El-Sabaeny, A., Demuth, D. R., Park, Y., and Lamont, R. J. : Environmental conditions modulate the expression of the *sspA* and *sspB* genes in *Streptococcus gordonii*. *Microb. Pathog.* 29 : 101-113, 2000.
- 20) Demuth, D. R., Duan, Y., Jenkinson, H. F., McNab, R., Gil, S., and Lamont, R. J. : Interruption of the *Streptococcus gordonii* M 5 *sspA/sspB* intergenic region by an insertion sequence related to IS1167 of *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* 143, 2047-2055, 1997.
- 21) El-Sabaeny, A., Demuth, D. R., and Lamont, R. J. : Regulation of *Streptococcus gordonii sspB* by the *sspA* gene product. *Infect. Immun.* 69 : 6520-6522, 2001.
- 22) Siebert, P. D., Chenchik, A., Kellogg, D. E., Lukyanov, K. A., and Lukyanov, S. A. : An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Res.* 23 : 1087-1088, 1995.
- 23) Pustell, J., and Kafatos, F. C. : A high speed, high capacity homology matrix : zooming through SV40 and polyoma. *Nucleic Acids Res.* 10 : 4765-4782, 1982.
- 24) Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, D. G. : The CLUSTAL_X windows interface : flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25 : 4876-4882, 1997.
- 25) Hölteke, H. J., Ankenbauer, W., Mühlegger, K., Rein, R., Sagner, G., Seibl, R., and Walter, T. : The digoxigenin (DIG) system for non-radioactive labeling and detection of nucleic acids - an overview. *Cell. Mol. Biol.* 41 : 883-905, 1995.
- 26) Sambrook, J., and Russell, D. W. : Molecular cloning : a laboratory manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp6.39-6.46, 2001.
- 27) Mahillon, J., and Chandler, M. : Insertion sequences. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 : 725-774, 1998.
- 28) Spellerberg, B., Martin, S., Franken, C., Berner R., and Lütticken, R. : Identification of a novel insertion sequence element in *Streptococcus agalactiae*. *Gene* 241 : 51-56, 2000.
- 29) Schmid, S. R., and Linder, P. : D-E-A-D protein family of putative RNA helicases. *Mol. Microbiol.* 6 : 283-291, 1992.