

Title	Streptococcus mutansにおけるピルビン酸・ギ酸リアーゼ遺伝子 ( p f l ) 発現の解析とピルビン酸・ギ酸リアーゼ活性化酵素遺伝子 ( a c t ) の機能解析
Author(s)	山本, 康人
Journal	歯科学報, 101(6): 506-514
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10130/376">http://hdl.handle.net/10130/376</a>
Right	

## *Streptococcus mutans* におけるピルビン酸・ギ酸リアーゼ遺伝子(*pfl*)発現の解析とピルビン酸・ギ酸リアーゼ活性化酵素遺伝子(*act*)の機能解析

山 本 康 人

東京歯科大学学生化学講座

### はじめに

歯科疾患であるう蝕は近年減少傾向にあるものの、依然として歯牙喪失の主要原因の一つである。他の感染疾患と異なり、う蝕の病因は単純ではないが、歯垢中の細菌が主に糖を代謝して産生する酸(主に乳酸、ギ酸、酢酸)が、歯牙表層のエナメル質を脱灰することによってう蝕が発症するという点に関しては研究者の意見は一致している。さらに、高度に石灰化されたエナメル質の主成分がヒドロキシアパタイトであり、その耐酸性を考慮すると、歯垢内のpHが低下して環境が酸性(臨界pH以下)になっても生存でき、かつ酸を産生し続けてなおいっそうpHを低下させることが出来る歯垢細菌こそ、う蝕の発症に最も関与していると考えられる<sup>1)</sup>。ミュータンスレンサ球菌(主に*Streptococcus mutans*)は、前述のような特徴をそなえたう蝕原性をもつ常在の口腔内細菌であり、この菌のう蝕原性の根本を担う糖代謝系の機構も近年明らかにされつつある<sup>1-6)</sup>。*Streptococcus mutans*(*S. mutans*)は他のレンサ球菌と同様にクエン酸回路(TCA サイクル)を持たず、主に糖をエムデン・マイヤー・ホフ経路(解糖系)によって代謝する<sup>1,2)</sup>。特に、歯垢深部の様な高度の嫌気環境下でのこの菌の糖代謝機構と酸産生機構は、う蝕の発症に最も関連がある因子の一つとして、重要な役割を果たしていると考えられる。*S. mutans* にお

いてはエムデン・マイヤー・ホフ経路にて産生されたピルビン酸は乳酸脱水素酵素(LDH)とピルビン酸・ギ酸リアーゼ(PFL)とによって代謝され、それぞれ酸として乳酸とギ酸が生成され、これが菌体外へ放出される(図1)。また、LDH、PFLともエムデン・マイヤー・ホフ経路の糖代謝中間体であるフルクトース 1, 6-ビスリン酸(FBP)やグリセルアルデヒド 3-リン酸(GAL 3P)およびジヒドロキシアセトンリン酸(DHAP)の菌体内濃度によってその酵素活性が調節されている<sup>2,6,7)</sup>。また、エネルギー効率を考えれば、酢酸を産生する過程で酢酸キナーゼによってATPが生成されるPFL系が優位である。さらに従来なされてきた生理・生化学的、酵素学的研究の成果(本菌は複雑な糖輸送系および糖代謝系を有す)として明らかにされた、*S. mutans*の酸産生機構の外的環境(嫌気または好気、代謝される糖の種類や濃度)による動的な変化(発酵転換)の概要を図2に示した<sup>1,2)</sup>。*S. mutans*は、*in vitro*(試験管内)の嫌気環境下における糖の終末代謝産物としてグルコース過剰条件下では主に乳酸を、グルコース制限条件下またはガラクトースや代用糖として用いられる糖アルコール(ソルビトール等)を炭素源として与えた場合には主にギ酸、酢酸、エタノールを産生する。*S. mutans*の糖アルコール代謝は、グルコースやスクロース代謝時に比べ糖アルコールの

Yasuhiro Yamamoto : Analysis of Pyruvate Formate Lyase Gene(*pfl*) Expression and Characterization of Pyruvate Formate Lyase activating Enzyme Gene(*act*) in *Streptococcus mutans* (Department of Biochemistry, Tokyo Dental College)

別刷請求先: 〒261 8502 千葉県美浜区真砂1-2-2  
東京歯科大学学生化学講座 山本康人

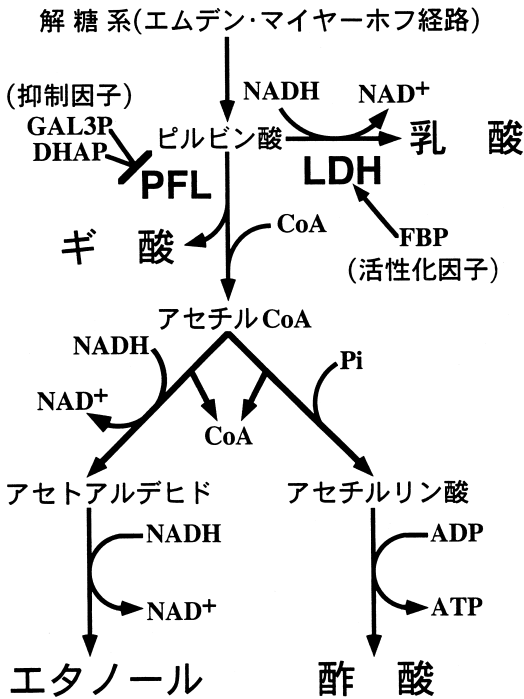
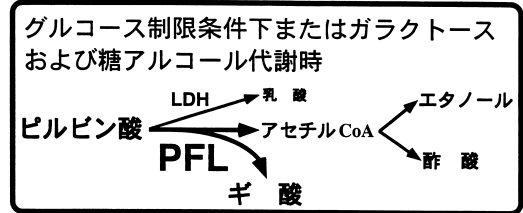
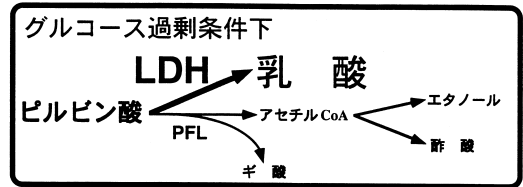


図1 *S. mutans* におけるピルビン酸の代謝経路。  
 FBP, GAL3PおよびDHAPは、いずれも解糖系における中間代謝産物である。PFL: ピルビン酸・ギ酸リアーゼ, LDH: 乳酸脱水素酵素, FBP: フルクトース-1, 6-ビスリン酸, GAL3P: グリセルアルデヒド3リン酸, DHAP: ジヒドロキシアセトンリン酸。

酸化の為に糖アルコール1分子あたり1分子余分のNAD<sup>+</sup>を必要とする為、嫌気環境下ではその供給にPFL以下の酸産生系が重要な役割をはたしている(好気環境下では、NADHと酸素からNADHオキシダーゼによってNAD<sup>+</sup>が供給される<sup>9)</sup>)。また、好気環境下ではラジカル酵素(活性型酵素分子内にフリーラジカルをもつ)であるPFLは、酸素の作用によって非可逆的に酵素としての機能を失う為(図3、なお*Escherichia coli* (*E. coli*)においてはPFLタンパクの分子構造がグリシンラジカル領域で切断されると報告されている<sup>9-13)</sup>)、LDHによって乳酸のみが産生される<sup>4,14)</sup>。このようにPFLは、*S. mutans*の乳酸生成系からギ酸生成系への発酵転換における鍵酵素(key enzyme)であり、嫌気環境下での糖代謝系

嫌気状態



好気状態



図2 *S. mutans* のピルビン酸からの終末代謝産物の外的環境条件による変化(発酵転換)。PFL: ピルビン酸・ギ酸リアーゼ, LDH: 乳酸脱水素酵素。

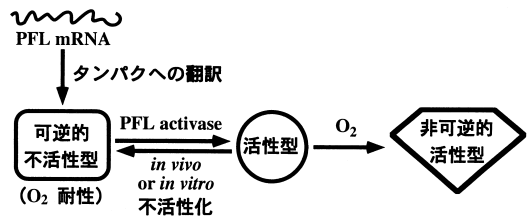


図3 *S. mutans* におけるピルビン酸・ギ酸リアーゼ(PFL)タンパクの発現と型変換(山田<sup>2)</sup>を改変)。可逆的不活性型は酸素に対して耐性があるが、活性型は酸素に接触すると直ちにその酵素としての機能を非可逆的に失う。

におけるNAD<sup>+</sup>/NADHバランスの維持と、ATP供給に関与しているが、PFLの分子生物学的な解析(タンパク発現調節機構の解明)は、行われていなかった。

著者らは既に、*S. mutans*の染色体DNAにランダム変異を導入し、当時*E. coli*以外ではクローニングされていなかったPFL遺伝子(*pfl* :

総塩基数2,325bpでコードするアミノ酸残基数は775, タンパクの推定分子量87,533)をクローニングし, その全塩基配列の決定とこの遺伝子の上流域および下流域の塩基配列の解析を行った<sup>15)</sup>。この結果, *S. mutans* の *pfl* の上流域および下流域で *pfl* をコードしているのは反対の鎖上にそれぞれ構造遺伝子領域を確認し, さらにこれらの PFL 活性への影響を調べる為, それぞれの領域で相同組換えをおこしその構造遺伝子を不活化した変異株を作製し PFL 活性を測定したが, 変異株の PFL 活性は親株でのそれと変化がなかった。 *E. coli* や *Clostridium pasteurianum* (*C. pasteurianum*) の *pfl* がこの酵素の活性化酵素遺伝子 (*act*) とともに近接して存在するのに対し<sup>16,17)</sup>, *S. mutans* では *pfl* が単独で存在することが明らかになり, *E. coli* のそれとは異なった発現調節を受けているものと考えられた。また, 近年 *S. mutans* の PFL には, その活性化および不活性化に関わる酵素の存在が報告されているが(図3)<sup>2,11,14,18-20)</sup>, これらの遺伝子は未だクローニングされていなかった。

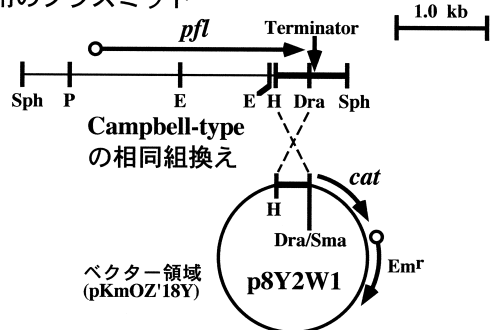
本稿では, *S. mutans* において *pfl* の3'端にレポーター遺伝子としてクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子 (*cat*) を導入し, *pfl* と *cat* がオペロン(1つの調節遺伝子または転写調節領域とそれに続くいくつかの構造遺伝子からなる転写単位)を形成する変異株を作製し(図4), PFLの機能に影響を与えることなく種々の発酵条件下(好気, 微嫌気および高度嫌気環境下各種糖類の種々濃度)での *pfl* の発現をレポーター遺伝子産物であるクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)の酵素活性として検出した研究と, PFLの活性化酵素であるピルビン酸・ギ酸リアーゼ活性化酵素(PFL activase, 図3)の遺伝子(*act*)のクローニングと, その機能をPFL活性化系の *in vitro* での再構築(*act* 変異株および *pfl* 変異株それぞれからの菌体抽出液を混合することによる, 図5)によって確認した研究について報告する。

### *pfl cat* オペロンフュージョン変異株の

#### 作製と CAT 活性としての *pfl* 発現の検出

前述したように, *S. mutans* の PFL は酸素に対する強い感受性を示し, 好気環境下では速やかに失活することから(図3)<sup>14)</sup>, その発現調節機構を直接的に PFL 活性を指標にして解析するのは非常に困難である。そこで著者らは, *pfl* の発現が好気環境下で容易にモニターできるように, 予め *E. coli* においてプラスミッドベクター上に *pfl* と *cat* のオペロンフュージョンを構築し, これを *S. mutans* 染色体 DNA 上の *pfl* 領域に Campbell type の相同組換えで導入し, *pfl cat* オペロンフュージョン変異株 (YASC 8 Y 2 W 1) を分離した(図4)。この YASC 8 Y 2 W 1 染色体 DNA 上には, *pfl* の終止コドンと転写(mRNAの合成)の

#### 親株(GS-5IS3)の染色体DNAと相同組換え用のプラスミッド



#### 変異株(YASC8Y2W1)の染色体DNA

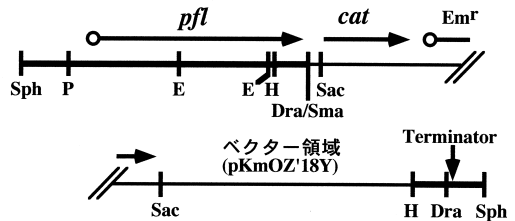


図4 *pfl cat* オペロンフュージョン変異株 (YASC 8 Y 2 W 1) の作製法とその染色体 DNA の制限酵素地図。 *pfl*: ピルビン酸・ギ酸リアーゼ遺伝子, *cat*: クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子, *Emr*: エリスロマイシン耐性遺伝子, *Dra*: *Dra*, *E*: *EcoR*, *H*: *Hind*, *P*: *Pst*, *Sac*: *Sac*, *Sma*: *Sma*, *Sph*: *Sph*, : promoter。

表1 親株(GS 5IS3)およびオペロンフュージョン(*pfl cat* 変異株 YASC8Y2W1)のクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)と乳酸脱水酵素(LDH)の活性

菌 株 (培養環境)	培地のグ ルコース 濃度	酵素活性* ( $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg protein}$ )	
		CAT	LDH
GS 5IS3(嫌気)	56mM	not detected	21.5 $\pm$ 2.0
YASC8Y2W1 (嫌気)	2.8mM	0.34 $\pm$ 0.05	20.0 $\pm$ 2.0
	56mM	0.16 $\pm$ 0.05	19.2 $\pm$ 0.4
YASC8Y2W1 (好気)	2.8mM	0.46 $\pm$ 0.05	not determined
	56mM	0.33 $\pm$ 0.03	26.4 $\pm$ 0.8

酵素活性は25℃で測定した。\*: 平均 $\pm$ S.D.(n=3)

終結部分であるターミネーターとの間にプロモーター(DNA上の転写促進構造)を持たない*cat*が配置され、*pfl*の転写と同時に*cat*もひと続きで転写される*pfl cat*オペロンが存在する。(図4)またYASC8Y2W1が上述のような染色体構造をとっていることは、サザンハイブリダイゼーション分析によって確認した。そしてこの分離したYASC8Y2W1を用い、*pfl*の発現をCAT活性として検出した(表1)。酵素活性測定の試料である菌体抽出液は種々の発酵条件下(好気、微嫌気および高度嫌気環境下各種糖類の種々濃度)で培養したこの株を対数増殖期に集菌し、超音波処理することによって調製した。嫌気環境グルコース過剰条件下(56mM)でのCAT活性は0.16 $\pm$ 0.05 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg of protein}$ であり、嫌気環境低濃度グルコース条件下(2.8mM)における活性0.34 $\pm$ 0.05 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg of protein}$ のほぼ半分であった。これは*pfl*の発現量が外部環境のグルコース濃度(または菌体内のグルコース代謝中間体の濃度か)に対応して変化していることを示している。しかし、*pfl*のmRNAへの転写が何らかの調節因子によって調節されており誘導的に転写が促進されたか、または抑制されたか考えるにはあまりにも値の変化が小さかった(1例として、*E. coli*のラクトースオペロンの場合では、誘導がかかる以前のこの発現はほぼ0であ

る)。好気環境下でのCAT活性はグルコース濃度に関わらず、嫌気環境グルコース過剰条件下に比べて高値であった。これは好気環境下でPFLが酵素としては代謝系に寄与できないにもかかわらず(図2)、ピルビン酸代謝系においてPFLが重責を担っている嫌気環境低濃度グルコース条件下と同レベルかそれ以上発現していることを示し、極めて興味深い知見であった。グルコース過剰条件下でのCAT活性による*pfl*の発現量の低濃度グルコース条件下に対する比(約0.5)は、先に報告されているグルコース過剰条件下および制限条件下でのPFL活性値の比(約0.3)<sup>2,4)</sup>に対して開きがあるが、必ずしもPFL活性値がタンパクの発現量を表すものではなく、この結果には、エムデン・マイヤーホフ経路における糖の代謝中間体でありPFL活性の抑制因子であるGAL3PとDHAPによる抑制効果が大きく関与しているのではないかと考えられた。GAL3PやDHAPによる酵素活性の抑制は、それらが直接PFL酵素タンパクに強固に結合することによっておこり、たとえ実験系からGAL3PやDHAPを取り除いても、その酵素活性抑制効果は長期にわたって持続すると報告されている<sup>2,7)</sup>。表1には含まれていないが糖アルコールであるソルビトールを炭素源としてグルコース高濃度時と同じ56mMの濃度で培地に加え、嫌気環境下で培養した実験からは、0.44 $\pm$ 0.02 $\mu\text{mol} / \text{min} / \text{mg of protein}$ という嫌気環境下の実験では一番高いCAT活性値をえた。この結果は、糖アルコールを嫌気環境下で代謝するには菌体内のNAD<sup>+</sup>/NADHバランスの維持の為PFL以下の酸産生系が重要な役割をはたしていることと、またすでに報告されている嫌気環境下での糖アルコール代謝時のグルコース代謝時に比べてのPFL活性の上昇という酵素的なデータの値とをよく反映している<sup>4,8)</sup>と考えられる。LDH活性は、親株および変異株においてほぼ同じであった。

また、種々の発酵条件下で培養した*S. mutans* GS 5IS3(親株)から全RNAを分離し、*pfl*内の適当な配列のいくつかをプライマーとしてRT

PCR を行い、pfl の mRNA レベルの検出も試みた。この結果については、正確な発現量比への換算は難しいが、前述した CAT 活性の結果と同様、嫌気好気または培地中のグルコース濃度の高低によらず pfl の一定レベル転写が確認された。

上記の2つの結果から、S. mutans では PFL が嫌気環境のみならず自身の活性型が酵素タンパクとしての機能を非可逆的に失ってしまう好気環境においても発現していることが明らかとなった。また、S. mutans を積極的に好気環境下(振とう培養器を使い培養期間を通じて積極的に空気が培地に溶け込むようにする)で培養し、その後嫌気グローブボックス内に移し、嫌気環境下で菌体を壊し菌体抽出液を調整し PFL 活性を測定すると、非常に弱いながらも PFL 活性が検出されるという実験結果も報告されている<sup>21)</sup>。よって、S. mutans の pfl は、好気環境下においても、いつ起こるか判らない環境の変化へ備えて発現しており、好気環境下で生育した菌体内には、すくなくとも少量の PFL が酸素に対して耐性である可逆的不活性型として存在するであろうと考えられた。また、PFL の活性化酵素である PFL activase 自身の発現調節による、PFL の酵素としての機能調節機構の存在も考えられ、次のステップとして S. mutans における PFL activase 遺伝子( act )のクローニングへと研究を進展させた。

#### act のクローニングと、in vitro PFL

##### 再活性化系を利用したその機能解析

前述したように著者らは S. mutans の pfl をクローニングし、また、その上流域および下流域の塩基配列についても報告した<sup>15)</sup>。E. coli や C. pasteurianum は、pfl のすぐ下流に続いて act が存在するにもかかわらず<sup>16,17)</sup>、S. mutans では pfl のすぐ下流には act は見い出されなかった。またその後の Lactococcus lactis と Streptococcus bovis の pfl に関する報告でも、S. mutans と同様に pfl のすぐ下流に act は存在しなかった<sup>22,23)</sup>。そこで著者らは、PCR 法による S. mutans の act 領域の増幅を目的とし、E. coli と C. pasteurianum の PFL acti-

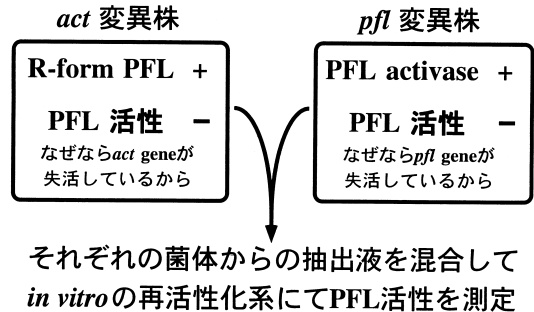


図5 act 変異株および pfl 変異株からの菌体抽出液による、in vitro でのピルビン酸・ギ酸リアーゼ (PFL) 活性化系の相補的な構築。R form PFL : 可逆的不活性型 PFL。

vase タンパクのアミノ酸配列と、Streptococcus pyogenes (S. pyogenes) においては推定上(機能が確認されて報告された訳ではなく、S. pyogenes のゲノムデータベース<sup>24)</sup>から相同検索によって見つけ出した領域の為)の PFL activase タンパクのアミノ酸配列から、相同性の高い領域をいくつか見い出だし、それらの領域をもとに4種( act 5 ' 1, act 5 ' 2, act 3 ' 3 and act 3 ' 4 )の PCR 用のオリゴヌクレオチドプライマーを合成した。そして、S. mutans GS 5 IS3 (親株)の染色体 DNA をテンプレートとしてそれらの合成オリゴヌクレオチドプライマーを用い、PCR 法による S. mutans の act 領域の増幅を試み、act 5 ' 2 と act 3 ' 3 のプライマーの組み合わせにおいてのみ、0.43kb のバンドが増幅された。増幅されてきた0.43kb のバンドは TA クローニング法でベクター(プラスミッド、pCRTM2.1)上にサブクローニングし、塩基配列を解析した。その結果この領域にコードされているアミノ酸配列が、既に報告されている PFL activase タンパクの一次構造(アミノ酸残基の配列順)との間で非常に高い相同性を示した為、増幅された0.43kb 領域は S. mutans の act 領域と考えられた。この増幅断片の情報をもとに染色体ウォーキング法により全 act 領域と、act 上流域および下流域をクローニングし、塩基配列を決定した。S. mutans act (塩基数789)は、263アミノ酸残基をコードしており、このタンパクの推定

分子量は30,148であった。また、*E. coli* の *act* および *S. pyogenes* 推定上の *act* がコードするアミノ酸残基間における相同性は、同一アミノ酸残基のみで42.1%、類似のアミノ酸残基も含めると79.3%であり、全領域を通してよく保存されていた(図6)。*E. coli* においてPFL activaseの活性中心と報告された3つのシステイン残基からなるクラスター(three cysteine cluster)の領域Cys 29, Cys 33, Cys 36は、*S. mutans* ではCys 37, Cys 41, Cys 44に対応すると考えられた(図6)。また、*S. mutans* GS 5 IS 3(親株)の染色体DNAを制限酵素 *Not* で消化後パルスフィールド電気泳動しサザン分析した結果、*pfl* と *act* が染色体DNA上で物理的にかなり離れた領域 *Not* 消化では、*pfl* はAフラグメント:433kb、*act* はEフラグメント:223kb)に存在することが判った<sup>25)</sup>。

次いで、*act* にコードされているタンパクの機能を解析する目的で、*act* 変異株(YASC 9YK2/PFL activaseが欠失している)を作製した。YASC 9YK2では、*act* 構造遺伝子領域にCampbell type 相同組換えによってプラスミッドベクター領域と *S. mutans* で発現する抗生物質耐性遺伝子

(*tet*<sup>r</sup>:テトラサイクリン耐性遺伝子)が挿入され、*act* が発現しなくなっている。また、PFL activaseの酵素活性を直接的に測定する方法は報告されていない為、その活性は、*in vitro* のPFL再活性化系における経時的なPFL活性の変化として検出することにした<sup>2,7,14)</sup>。なお、供試菌の培養および全ての実験操作は、酸素によって活性型PFLが非可逆的に失活してしまうのを防ぐ為、高度嫌気条件下で行った。YASC 9YK2を液体培養して得た培養上清中からはギ酸は検出されず(表2)、この株を対数増殖期に集菌し、超音波処理によって調製した菌体抽出液中のPFL活性も消失していた(表3)。これは、*S. mutans* ではPFLを活性化するPFL activaseの機能を有するタンパクが、今回クローニングした*act*領域にのみコードされていることを示唆している。次に、*in vitro* のPFL再活性化系を用い、PFL activaseタンパクが正常に発現していると考えられる*pfl*変異株(SAKC 5Y 2C1/PFLが欠失している、表2および3)と、PFLタンパクが正常に発現していると考えられる*act*変異株(YASC 9YK2)とにより、それぞれの菌体抽出液を混合して変異株同士によるPFL活性化系の相補的な再構成を

<i>S. mutans</i>	1	MIEKVDYEVK TGLVNSTESF GSVI	GGPGIRF VVFMQGCQMR CQYCHNPDTW
<i>S. pyogenes</i>	1	MTEK-DYGVV TGMVHSTESF GSVI	GGPGIRF IIFLQGCCKLR CQYCHNPDTW
<i>E. coli</i>	1	M-----SV IGRHSPFESC GTVI	GGPGIRF ITFFPQGLMR CLYCHNRDTW
		* * * * * *	* * * * * *
<i>S. mutans</i>	51	AMKNDRATER TAGDVFKEAL RPKDFWGD TG	G-ITVSGGEA TLQMDFLIAL
<i>S. pyogenes</i>	50	EMETNNKIR TVNDVLKEAL QYKHFVWGGK G	-ITVSGGEA MLQIDFITAL
<i>E. coli</i>	44	D--THGGKEV TVEDLMKEVY TYRHFVNASG	GGVTASGGEA ILQAEFVRDW
		: : : : : *	: * * * * * :
<i>S. mutans</i>	100	FSLAKEKGIH TTLDTCALTF RNTPKYLEKY	EKLMAVTDLV LLDIKEINPD
<i>S. pyogenes</i>	99	FIEAKKLGIIH TTLDTCGFTY RPTPEYHQVL	DNLLAVTDLI LLDLKEIDEK
<i>E. coli</i>	92	FRACKKEGIIH TCLDTNGFVR R----YDFVI	DELLEVTDLV MLDLQKMNDE
		* * * * * *	: * * * * * :
<i>S. mutans</i>	150	QHKIVTGHNS KTIILACARYL SDIGKPVWIR	HVLVPLGLTDR DEDLIKLGLEY
<i>S. pyogenes</i>	149	QHKIVTRQPN KNILQFARYL SDKQIPWVIR	HVLVPLGLTDI DDHLTRLGFEF
<i>E. coli</i>	138	IHQNLVGVSN HRTLEFAKYL ANKNVVKWVIR	YVVVPGWSDD DDSAHLRGEF
		* : : * * * * :	: * * * * * :
<i>S. mutans</i>	200	VKTLKNVQRF EILPYHTMGE FKWRELGIPI	PLEGVKPPPT DRVRNAKMLM
<i>S. pyogenes</i>	199	VKTLKNVDKF EIVLYHTMGE FKWRELGIPI	QLEGVKPPPT ERVQNAKMLM
<i>E. coli</i>	288	TRDMGNVEKI ELLPYHELK HKWVAMGEEY	KLDGVKPPPK ETMERVKGIL
		: : : * * * * :	: * * * * * :
<i>S. mutans</i>	250	HTETYEEYKK RINH-	263
<i>S. pyogenes</i>	249	QTESYTEYMN RIHQF	263
<i>E. coli</i>	238	E-----QYGH KV-MF	246
		: * * * * :	: : * * * :

図6 *S. mutans* および *E. coli* のピルビン酸・ギ酸リアーゼ活性化酵素遺伝子(*act*)と *S. pyogenes* の推定上の *act* とがコードするアミノ酸残基配列3者間におけるマルチプルアライメント。ボックスで囲まれたところは、*E. coli* においてPFL activaseの活性中心だと報告された3つのシステイン残基からなるクラスター(three cysteine cluster)を含む領域。ハイフン( ):アミノ酸残基の“ずれ”を示す、アスタリスク(\*):同一のアミノ酸残基、コロン(:):類似のアミノ酸残基。

表2 親株(GS 5 IS 3)および変異株を液体培養してえた培養上清中のギ酸濃度

菌 株	ギ酸濃度*(mM)
GS 5 IS 3	1.13 ± 0.26
SAKC 5 Y 2 C 1( <i>pfl</i> mutant)	not detected
YASC 9 YK 2( <i>act</i> mutant)	not detected

\*: 平均 + S. D.(n = 3)

表3 親株(GS 5 IS 3)および変異株のピルビン酸ギ酸リアーゼ(PFL)と乳酸脱水素酵素(LDH)の活性

菌 株	酵素活性*	
	PFL	LDH
GS 5 IS 3	2.11 ± 0.44	21.5 ± 2.0
SAKC5Y2C1( <i>pfl</i> mutant)	not detected	17.3 ± 0.45
YASC9YK2( <i>act</i> mutant)	not detected	16.4 ± 4.1

酵素活性はPFLは30, LDHは25で測定した。

\*: 平均 ± S. D.(n = 3)

行った(図5および図7)。変異株からの菌体抽出液を混合しての相補的再構成系では、インキュベーション時間に伴ったPFL活性の上昇がみられ最大値は120分間インキュベーションした試料の1.01 μmol/min/mg of proteinであり、これは親株での再活性化値の最大値1.07 μmol/min/mg of protein)の約94%に相当する値であった(図7)。さらに、検出した酵素活性がPFLに由来するものであるかどうかは、インキュベーションした試料を5分間空気に暴露することによってその酵素活性が完全に消失することで確認した(図7)。PFLの活性型は酸素に曝されると速やかに非可逆的活性型に変換され、その酵素活性を消失する<sup>4,14)</sup>。この結果は *act* 変異株である YASC 9 YK 2 の菌体内に、親株とほぼ同量の可逆的不活性型 PFL が存在していることを示し(*pfl* 変異株である SAKC 5 Y 2 C 1 では PFL が欠失しているから)、YASC 9 YK 2 での培養上清中からのギ酸および菌体抽出液中からの PFL 活性の消失は PFL タンパク自身の不具合によるものではな

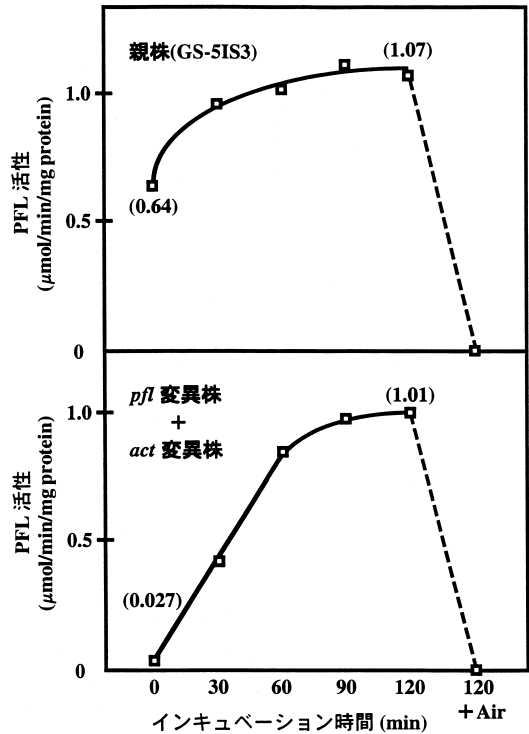


図7 *in vitro* のピルビン酸・ギ酸リアーゼ(PFL)再活性化系による、PFLの再活性化過程(親株からの菌体抽出液において)と活性化過程(*pfl* 変異株および *act* 変異株それぞれからの菌体抽出液を混合することによって)の検出。酵素活性は30で測定した(値は平均値, n = 2)。120 + Air: 再活性化系で120分間インキュベーション後、5分間空気に暴露した試料。

く、それを活性化する酵素 PFL activase の欠失による為であり、よってクローニングした *act* 領域には PFL activase がコードされていることが確認された。

#### おわりに

多くの偉大な先達によってなされたう蝕原性細菌である *S. mutans* の糖代謝機構、ならびに酸産生機構の生理・生化学的、酵素学的研究の成果は図2に示すような、この菌がおこす発酵転換(外的環境条件の変化に対応して産生される終末代謝産物に変化する)の仔細を明らかにしたが、その転換調節機構の解明はまだ十分にはなされてい



い。著者は、*S. mutans* の酸産生機構、特にう蝕発症との関連が深い歯垢深部の様な高度の嫌気環境下でのこの菌の酸産生機構に焦点をあて、その遺伝子レベルでの調節機構(どのような環境下で代謝酵素の遺伝子が発現するか?)の解明に取り組んできたが、まだ道半ばである。著者らがクローニングし機能解析を行った PFL は、まさに *S. mutans* の発酵転換における鍵酵素(key enzyme)であり、その活性化酵素である PFL activase もまた同様に重責を担っているものと考えられるが、現時点ではそれらの発酵転換への関与のありか(それらの発現がどのように、どんな因子によって調節されているのか)の全貌を明らかにするにはいたっていない。また、*S. mutans* では活性型 PFL を可逆的不活性型 PFL へと変換する機構(酵素の関与が示唆されている)の活性が、同じ口腔内の歯垢中から分離される細菌である *Streptococcus sanguis* のそれに比べて、非常に弱いことが報告されている<sup>14)</sup>。このことは、う蝕原性細菌である *S. mutans* の特徴の1つであると考えられ、ヒト口腔内の歯垢中(歯面に接しているような歯垢深部の環境は高度嫌気で低糖濃度)という限定された環境で優位に生息してきたこの細菌の進化の履歴に由来するものではないかと思われる。今後は、*pfl*、*act* の2つの遺伝子を軸に、研究の過程で生じてきたいくつかの疑問点、なぜ PFL は好気環境下では炭素源であるグルコース濃度に依存せず高く発現しているのか、PFL は構成酵素の仲間なのか、それとも転写が何らかの因子により調節されている誘導酵素なのか、などの解明に向かって、さらには発酵転換調節機構への *pfl*、*act* の関与の在り方に向かって邁進していくつもりである。

本稿は、平成8年度東京歯科大学学長奨励研究報告として、第262回東京歯科大学学会総会(1997年11月1日、千葉)において発表したものに、その後の研究の進展(Yamamoto, Y., Sato, Y., Takahashi Abbe, S., Takahashi, N. and Kizaki, H.(2000): Characterization of the *Streptococcus mutans* pyruvate formate lyase(PFL) activating enzyme gene by complementary

reconstitution of the in vitro PFL reactivating system, *Infect. Immun.*, 68(8): 4773~4777.)を加えて新たにまとめたものである。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究課題を平成8年度東京歯科大学学長奨励研究として採択して頂き、さらに東京歯科大学学会において発表の機会を与えて下さった石川達也学長をはじめ関係各位の方々へ深謝いたします。また、本研究を終始ご指導下さいました生化学講座主任木崎治俊教授ならびに同佐藤 裕助教授、研究の進展にあたっては共同研究者としてご協力下さいました東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座口腔生化学分野高橋信博教授ならびに同阿部昌子助手、数々のご助言を頂きました東北大学名誉教授山田 正先生、ニューヨーク州立大学バッファロー校 Howard K. Kuramitsu 教授ならびに日本大学歯学部衛生学教室山下喜久教授、日々実験室において研究の進行を助けて下さいました生化学講座の皆様へ感謝いたします。

## 参 考 文 献

- 1) 阿部一彦, 山田 正(1997): ミュータンスレンサ球菌の糖代謝, う蝕細菌の分子生物学・研究の成果と展望, 監修 武笠英彦, クインテッセンス出版: 156~171.
- 2) Yamada, T.(1987): Regulation of glycolysis in streptococci, Sugar transport and metabolism in Gram positive bacteria, J. Reizer and A. Peterkofsky(ed.) Ellis Horwood Limited, Chichester: 69~93.
- 3) Abbe, K., J. Carlsson, S. Takahashi Abbe, and T. Yamada(1991): Oxygen and the sugar metabolism in oral streptococci, *Proc. Finn. Dent. Soc.*, 87: 477~487.
- 4) Abbe, K., S. Takahashi, and T. Yamada(1982) Involvement of oxygen sensitive pyruvate formate lyase in mixed acid fermentation by *Streptococcus mutans* under strictly anaerobic conditions, *J. Bacteriol.*, 152: 175~182.
- 5) Carlsson, J., and C. J. Griffith(1974): Fermentation products and bacterial yields in glucose limited and nitrogen limited cultures of streptococci, *Arch. Oral Biol.*, 19: 1105~1109.
- 6) Yamada, T., and J. Carlsson(1975): Regulation of lactate dehydrogenase and change of fermentation products in streptococci, *J. Bacteriol.*, 124: 55~61.
- 7) Takahashi, S., K. Abbe, and T. Yamada(1982): Purification of pyruvate formate lyase from *Streptococcus mutans* and its regulatory properties, *J. Bacteriol.*, 149: 1034~1040.

- 8) Yamada, T., S. Takahashi Abbe, and K. Abbe (1985): Effects of oxygen on pyruvate formate lyase in situ and sugar metabolism of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*, *Infect. Immun.*, 47 : 129 ~ 134 .
- 9) Frey, M., M. Rothe, A. F. Wagner, and J. Knappe (1994): Adenosylmethionine dependent synthesis of the glycyl radical in pyruvate formate lyase by abstraction of the glycine C 2 pro S hydrogen atom. Studies of [2 H]glycine substituted enzyme and peptides homologous to the glycine 734 site, *J. Biol. Chem.*, 269 : 12432 ~ 12437 .
- 10) Knappe, J., S. Elbert, M. Frey, and A. F. Wagner (1993): Pyruvate formate lyase mechanism involving the protein based glycyl radical, *Biochem. Soc. Trans.*, 21 : 731 ~ 734 .
- 11) Sawers, G., and G. Watson (1998) : A glycyl radical solution : oxygen dependent interconversion of pyruvate formate lyase, *Mol. Microbiol.*, 29 : 945 ~ 954 .
- 12) Unkrig, V., F. A. Neugebauer, and J. Knappe (1989): The free radical of pyruvate formate lyase. Characterization by EPR spectroscopy and involvement in catalysis as studied with the substrate analogue hypophosphite, *Eur. J. Biochem.* 184 : 723 ~ 728 .
- 13) Wagner, A. F., M. Frey, F. A. Neugebauer, W. Schafer, and J. Knappe (1992): The free radical in pyruvate formate lyase is located on glycine 734, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 89 : 996 ~ 1000 .
- 14) Takahashi, N., K. Abbe, S. Takahashi Abbe, and T. Yamada (1987): Oxygen sensitivity of sugar metabolism and interconversion of pyruvate formate lyase in intact cells of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguis*, *Infect. Immun.*, 55 : 652 ~ 656 .
- 15) Yamamoto, Y., Y. Sato, S. Takahashi Abbe, K. Abbe, T. Yamada, and H. Kizaki (1996): Cloning and sequence analysis of the *pfl* gene encoding pyruvate formate lyase from *Streptococcus mutans*, *Infect. Immun.*, 64 : 385 ~ 391 .
- 16) Rodel, W., W. Plaga, R. Frank, and J. Knappe (1988): Primary structures of *Escherichia coli* pyruvate formate lyase and pyruvate formate lyase activating enzyme deduced from the DNA nucleotide sequences, *Eur. J. Biochem.*, 177 : 153 ~ 158 .
- 17) Weidner, G., and G. Sawers (1996) Molecular characterization of the genes encoding pyruvate formate lyase and its activating enzyme of *Clostridium pasteurianum*, *J. Bacteriol.*, 178 : 2440 ~ 2444 .
- 18) Knappe, J., F. A. Neugebauer, H. P. Blaschkowski, and M. Ganzler (1984) : Post translational activation introduces a free radical into pyruvate formate lyase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 81 : 1332 ~ 1335 .
- 19) Knappe, J., and A. F. Wagner (1995): Glycyl free radical in pyruvate formate lyase : synthesis, structure characteristics, and involvement in catalysis, *Methods. Enzymol.*, 258 : 343 ~ 362 .
- 20) Wagner, A. F., J. Demand, G. Schilling, T. Pils, and J. Knappe (1999) : A dehydroalanyl residue can capture the 5' deoxyadenosyl radical generated from S adenosylmethionine by pyruvate formate lyase activating enzyme, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 254 : 306 ~ 310 .
- 21) S. Takahashi Abbe, Personal communication.
- 22) Arnau, J., F. Jorgensen, S. M. Madsen, A. Vrang, and H. Israelser (1997) Cloning, expression, and characterization of the *Lactococcus lactis pfl* gene, encoding pyruvate formate lyase, *J. Bacteriol.*, 179 : 5884 ~ 5891 .
- 23) Asanuma, N., M. Iwamoto, and T. Hino (1999) : Structure and transcriptional regulation of the gene encoding pyruvate formate lyase of a ruminal bacterium, *Streptococcus bovis*, *Microbiology.*, 145 : 151 ~ 157 .
- 24) The University of Oklahoma's Advanced Center for Genome Technology, <http://www.genome.ou.edu/strep.html>.
- 25) Cappiello, M. G., M. J. Hantman, F. M. Zuccon, F. Peruzzi, M. Amjad, P. J. Piggot, and L. Daneo Moore (1999) : Physical and genetic map of *Streptococcus mutans* GS 5 and localization of five rRNA operons, *Oral. Microbiol. Immunol.*, 14 : 225 ~ 232 .