



Title	う蝕原性レンサ球菌が作る多糖の構造ならびにその多糖を分解する酵素に関する研究 Ⅰ. 不溶性および可溶性のグルカンとフルクタンの構造 Ⅱ. 不溶性グルカン分解酵素の分離・精製およびその作用
Author(s)	恵比須, 繁之
Citation	大阪大学, 1976, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/31541
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

【 3 】

氏名・(本籍)	恵比須 繁之
学位の種類	歯学博士
学位記番号	第 3574 号
学位授与の日付	昭和 51 年 3 月 25 日
学位授与の要件	歯学研究科歯学臨床系 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位論文題目	う蝕原性レンサ球菌が作る多糖の構造ならび にその多糖を分解する酵素に関する研究
論文審査委員	1. 不溶性および可溶性のグルカンとフルクタン の構造 II. 不溶性グルカン分解酵素の分離・精製 およびその作用
	(主査) 教授 横溝 一郎 (副査) 教授 常光 旭 助教授 加藤慶二郎 講師 祖父江鎮雄

論 文 内 容 の 要 旨

齧歯類を使つてのう蝕の誘導実験の結果、*Streptococcus mutans* が歯面に定着、増殖することによつて、う蝕の第一段階が始まることが示されている。また *S. mutans* の歯面への定着には、この菌がスクロースを基質として作る粘着性のある不溶性グルカンが、決定的に重要な役割を演じることが知られている。さらにこのグルカンは、プラーク (*dental plaque*) の重要な構築成分として、歯周病の発生にも関与するとされている。

このような背景の下に、上記のグルカンを酵素的に分解し、う蝕やプラークを抑制する企てが動物やヒトで試みられているが、その成果は満足すべきものではない。これは、う蝕発生やプラーク形成に関与するグルカンの不溶性や粘着性などの物理的特性がどのような化学構造に依拠するか、あるいはこれらの特性が依っている構造がどのような酵素に感受性を示すか、などについての十分な知見が欠けていることに原因するところが大きい。そこで、これらう蝕やプラークの病理機序を知るために重要であるにもかかわらず、不明のままに残されている課題を解明することを目標にこの研究を行なった。

S. mutans を中心に、9 株の口腔レンサ球菌の培養上清を硫酸塩析して得た粗酵素画分をスクロースと反応させ、生成させた多糖を、水に対する溶解性の差により分別した。得られた多糖標品の多くはグルカンであったが、中にはフルクタンもあった。4 種のデキストラナーゼ標品に対するこれらのグルカンの感受性を、還元糖の遊離を指標として調べた。生成菌株の違いによってグルカンの酵素感受性には差が認められたが、不溶性グルカンは可溶性グルカンよりも感受性が低く、不溶性グルカンの中でも *S. mutans* の OMZ 株が作るものは特に酵素作用を受けにくかった。そこでグルカンの化学構

造とデキストラナーゼに対する感受性の関係を調べたところ、 α -1,3結合の含量が高いグルカンほど酵素作用を受けにくいことがわかった。

OMZ 176株が作る不溶性グルカンの化学構造をメチル化、Smith 分解、緩和 Smith 分解などの構造分析法、ならびにエキソデキストラナーゼを利用して調べた。その結果このグルカンは、 α -1,3結合 (51モル%, 以下同じ)、 α -1,6結合(21)、非還元性末端(15)および α -1,3と α -1,6の分岐結合(14)を含み、 α -1,3結合で連なった糖鎖からなる主鎖に、グルコース残基のC-6の位置で α -1,6結合の側枝が高度に分岐した構造をもつことを示す成績が得られた。一方 OMZ 176株がデキストラナーゼ存在下で作るグルカンは不溶性ではあるが、粘着性を欠くことがわかった。そこで、このグルカンの構造を粘着性を有する不溶性グルカンのそれと比較、検討したところ、グルコースが α -1,3結合で連なった長い糖鎖の存在が不溶性に、また高度に分岐した α -1,6結合の側枝が粘着性に関与していることが明らかになった。

以上の所見は、う蝕発生あるいはプラーク形成の抑制にグルカナーゼを用いる場合、 α -1,6 グルコシド結合のみを分解するデキストラナーゼだけでは不十分で、 α -1,3結合を切断する酵素が必要なことを示唆している。しかし α -1,3 グルカナーゼは、1969年に *Trichoderma viride* から初めて精製されて以来、数種の真菌由来のものが報告されているが、それらのうちで *S. mutans* が作る不溶性グルカンを効率よく分解するのは、Guggenheim と Haller が *Trichoderma harzianum* の培養濾液から得たムタナーゼのみである。

そこで α -1,3 グルカナーゼを土壌菌の産物に求め、OMZ 176株の不溶性グルカンを唯一の炭素源とする増強培養を行ない、*Flavobacterium* に属する一土壌菌 (EK-14菌) を分離した。この菌は、Trypticase soy ブロスに接種し、通気振盪培養すると、培養液中に α -1,3グルカナーゼを産生する。この酵素を硫酸塩析、限外濾過により濃縮し、DE32およびCM32を用いるイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。最終の標品 (EK-14酵素) の蛋白質量を基準とした比活性は、培養上清の 162倍、回収率は38%であった。EK-14酵素は、pH 8.5に等電点をもち、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動で測定した分子量は約65,000であった。作用の至適 pH は6.3、20分間の反応では40℃付近で最大活性を示した。EK-14酵素は、不溶性グルカン主鎖内部の α -1,3結合を切断し、 α -1,4、 α -1,6、 β -1,3、 β -1,4、および β -1,6グルコシド結合には作用しない。この酵素を作用させると、*S. mutans* OMZ 176株由来の不溶性グルカンは、重量を基準として、その約半分が水溶性となった。

S. mutans の歯面への定着、および *S. mutans* が *in vitro* で形成したプラークに対する EK-14酵素の作用を、本酵素単独作用、ならびに主に α -1,6グルカナーゼとして作用する *Spicaria* デキストラナーゼとの併用の両条件下で、走査型電子顕微鏡を用い、形態学的に調べた。EK-14酵素は、*S. mutans* がスクロースの存在下で歯面に定着するのを抑制すること、またスクロースの存在下で *S. mutans* により形成されたプラークは、EK-14酵素あるいは *Spicaria* デキストラナーゼの単独の作用では完全には除去されないが、両酵素を併用することにより、ほぼ完全に除去できることが明らかにされた。

以上述べたように本研究では、う蝕発生およびプラーク形成に重要な役割を演じる粘着性かつ不溶性グルカンの化学構造を調べ、これらの物理学的特性と化学構造との関係を初めて明らかにした。さ

らに、このグルカンの不溶性を担い、また既知のデキストラナーゼでは切断されない α -1,3結合の主鎖を開裂する *Flavobacterium* sp. が作る新しい酵素を分離、精製することに成功した。

論文の審査結果の要旨

恵比須繁之君の論文は、次の諸点にその独創性が認められる。(1) *Streptococcus mutans* が作る粘着性かつ不溶性グルカンの化学構造、特に歯苔形成やう蝕原性の発現に密接に関係するこのグルカンの特性を担う化学構造を明らかにしたこと、(2) *S. mutans* が作るフルクタンがイヌリン型であることを異論の余地なく示したこと、(3)前記グルカンを分解する α -1,3グルカナーゼをインデューサーを必要とすることなく作る土壌菌を分離し、この酵素が真菌由来のものとは異なることを確認したこと、さらに、(4)この酵素が α -1,6グルカナーゼと併用することにより、効果的に *S. mutans* による *in vitro* での歯苔形成の阻止および形成された歯苔の除去に役立つことを見出したこと。

以上のように同君の論文は、基礎歯学の分野で重要であるばかりでなく、臨床および予防歯学の領域にも応用可能な多くの新知見をもたらしたものとして、歯学博士の学位に値する優れた研究内容を持ったものであると認める。