



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

う蝕原性レンリ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
とフルクランの構造

惠比須繁之

(昭和 年 月 日受付)

「脚注」

緒言

口腔レンサ球菌, 特に *Streptococcus mutans* はスロ
 ロースの存在下で菌体表面ないしは菌体外に
 多糖を作る¹⁾²⁾。これらのいわゆる「菌体外多糖
 はグルカンとフルクタンに大別される。この
 うちグルカンは, *S. mutans* を歯面に付着させ³⁾⁴⁾,
 また *S. mutans* を凝集させる性質をもち⁵⁾⁶⁾, さう
 にプラーク (dental plaque, 歯垢, 歯苔) の基質とな
 る⁷⁾⁸⁾ などの蝕や歯周疾患の発生に重要な役割
 を果たすことが考えられる。一方フルクタンは,
 水溶性グルカンと同様⁹⁾¹³⁾, プラーク内の細菌
 によって分解され, 細菌による酸産生の重要
 な基質のひとつとなり得る^{14)~16)}。

口腔レンサ球菌が作るグルカンは, 初期の
 研究ではグルコースが主として α -1,6 結合した
 デキストランであると考えられていた²⁾。し
 かし最近になって Guggenheim¹⁷⁾ は, *S. mutans* OMZ 176 株
 の作る不溶性 (水不溶性) グルカンが α -1,3 結合を
 多量に含むことを Smith 分解を利用した構造研

究によって示し、口腔レンサ球菌が作るグルカンは不溶性および水溶性の両者に区別されるべきであると提言した。また、動物にう蝕を誘発する能力のある *S. mutans* を突然変異剤で処理し、不溶性グルカン生成能を減少ないし喪失させた突然変異株では、う蝕原性の低下が動物実験で確認された^{18)~20)}。この所見は、不溶性グルカンがう蝕の発生にきわめて重要な病理学的意義を持つことを示すものと考えられる。

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た。しかしその成果は満足すべきものではなかつた²¹⁾²²⁾。これは、プラーク形成やう蝕発生に重要な役割を演じるグルカンの不溶性 (water insolubility) や粘着性といった物理的特性がどのような化学構造に依拠するか、またこれらの特性が依って、分子構造がどのような酵素に感受性を示すかなどの知見が乏しいことに原因するところ

が大きい。

これら未解決の問題を解明するために本研究では、疫学的な問題を念頭において、血清型を異にする数株の *S. mutans* および類縁のレンサ球菌がスクロースを基質として作る菌体外多糖を水に対する溶解性の違いにより分別し、それぞれのも糖の化学組成ならびに現在利用し得るデキストラナーゼに対する感受性を調べた。ついで不溶性ケルカン*に焦点を絞って、その化学構造をメタル化分析、Smith 分解、緩知 Smith 分解および酵素分解によって解析し、不溶性および粘着性という物理的特性に対応する化学構造を明らかにすることを試みた。

「脚注」

材料と方法

1. 供試菌株

S. mutans の AHT 株²²⁾、BHT 株²²⁾、FA-1 株²³⁾、Ingbritt 株²⁴⁾、JC-1 株²⁵⁾、OMZ 176 株²⁶⁾ および OMZ 65 株²⁶⁾、*Streptococcus sanguis* ATCC

10556 株²²⁾なすびに *Streptococcus* sp. CHT 株²³⁾を供試した。

これらの菌株はいずれも本学口腔細菌学教室
 浜田茂幸博士より分与されたものである。分
 与を受けた後、アネローフ寒天培地（栄研化
 学，東京）に1ヶ月毎に穿刺継代培養して保
 存した。

2. テキストラナーゼ標品

Flavobacterium sp. の産生する Biken テキストラナー
 ゼ（阪大微生物病研究会から分与された²⁷⁾，
 塩野義製薬から本学口腔治療学教室村山洋二
 博士を経て恵与された *Spicaria* テキストラナー
 ゼ²⁸⁾，Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo., U.S.A.) と Worthington Bio-
 chemical Co. (Freehold, N.J., U.S.A.) から購入した *Penicillium* テ
 キストラナーゼ，以上の4標品を用いた。

3. 不溶性および可溶性(水溶性)多糖の調製

供試菌株の中で *S. mutans* OMZ 176 株および OMZ 65 株
 は Brain heart infusion フロス (Difco Laboratories, Michigan, U.S.A.)，
 その他の菌株は Trypticase soy フロス (Baltimore Biological
 Laboratories, Cockeysville, Md., U.S.A.) に接種し，培
 養した。すなわち，供試菌株を 10 ml の培地に

接種し、 37°C で1夜培養したものを250 mlの培地に加え、さらに 37°C で1夜培養した。このようにして前培養した260 mlの全培養を10 lの培地に接種し、 37°C で18時間静置培養した。培養液を6,500 gで20分間(以下特に断らない場合はこの条件下)遠心し、菌体より分けとった培養上清の50%飽和硫酸による沈澱を精製水に溶解して透析した後、遠心して少量の不溶物を除いたものを酵素標品とした。

この酵素を10%スクロースと0.05 M 磷酸塩緩衝液(pH 6.8)中で、 37°C 、48時間反応させた。反応液を45,000 gで30分間遠心し、沈渣は精製水で洗滌した後、結晶トリプシン(トリプシン、持田製薬、東京)で処理し、ふたたびくり返し水洗してから凍結乾燥した(不溶性多糖画分)。反応液の上清は精製水で透析することによって磷酸塩を除いた後、2倍容のエタノールを加え、 4°C に1夜放置後、遠心し、沈渣を水に溶解した。エタノール沈澱画分の一部は水に溶けなかつたので、この不溶

部を遠心で沈澱させ、不溶性多糖と同様に結晶トリフリンで処理した後、凍結乾燥した。この画分はエタノール沈澱させた後には水不溶となったが、もとは反応液に溶けていたものなので可溶性多糖I画分とした。上述した遠心上清には2.5倍容のエタノールを加えて遠心し、沈渣は水とエタノールの混液(1:2.5, v/v)で洗った後、凍結乾燥した(可溶性多糖II画分)。

4. 化学定量

ヘキソースはアンズロン法²⁹⁾によりグルコースを標準として比色定量した。蛋白質量は結晶ウニ血清アルブミン(Sigma Chemical Co.)を標準としてLowryの記載³⁰⁾にしたがって測定した。グルコースの定量は、Newbrunの記載³¹⁾を参考にして試料を4N硫酸で40~60分間、100℃で水解後、4Nの水酸化ナトリウムで中和し、0.1N磷酸塩緩衝液(pH 7.0)で20倍に希釈した後、Glucostat(Worthington Biochemical Co.)を用い、微量法によって定量した。還元糖量の測定は、グルコースを標

準として, Park と Johnson の方法³²⁾によった。

5. 糖および糖アルコールのペーパークロマトグラフィーによる同定

東洋濾紙 No. 51 A および Whatman No. 1 濾紙を用い、展開溶媒として (A) n-ブタノール : ピリジン : 水 (6 : 4 : 3, $\frac{1}{4}$) , (B) n-ブタノール : 酢酸 : 水 (2 : 1 : 1, $\frac{1}{4}$) , (C) n-プロパノール : エタノール : 水 (6 : 1 : 3, $\frac{1}{4}$) を供用した。展開は (A) では下降法で 20 時間, (B) では上昇法で 20 時間, 一次元, 室温で実施した。なお (C) を用いた場合には上昇法で 20 時間, 一次元展開を 3 回くり返した³³⁾。ペーパークロマトグラム上の糖成分は硝酸銀試薬を用いて発色させた³⁴⁾。この際比較のための標準とした, グルコースが α -1,6 結合したイソマルトースからイソマルトヘptaオースまでの 6 種のオリゴ糖は, 大阪大学微生物病研究所鳥居光雄博士の好意により介与をうけた。

6. 各多糖のデキストラナーゼに対する感受性テスト

供試多糖浮遊液あるいは溶液 10 μ l, 0.1 M 酢酸塩緩衝液 (pH 5.8) 40 μ l および酵素溶液 (単位量は後述) 10 μ l よりなる反応液を作り, 反応前と 37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた後とに 10 μ l の試料を汲みだした。試料は直ちに 100° C で 3 分間加熱して酵素反応を停止させた上, 還元糖量を測定した。なお用いた酵素量は, 5,550 nmoles のグルコース残基を含むデキストラン T-70 (Pharmacia, Uppsala, Sweden) に上記の系で作用させた時, 37 $^{\circ}$ C, 30 分間の反応で 1,000 nmoles の還元糖量を遊離させるのに必要かつ十分な量であった。

7. メチル化分析

1) メチルスルフィニルカルバニオンの調製

メチルスルフィニルカルバニオンは Sandford と Conrad の記載³⁵⁾を参考にして調製した。

2) 多糖のメチル化

Hakomori が記載³⁶⁾した原理を参考にして実施した。すなわち, 細粉化した乾燥多糖試料 20 ~ 50 mg に 3 ml のジメチルスルホキシド (DMSO) を加え, 窒素気流下で 20 KHz/sec, 5 分間, 超音波で処理

して溶解した。ついで1 mlのメチルサルフィニルカルバニオンを加え、室温で3時間攪拌し、多糖のアルコキシドを生成させた。次に反応液を20℃以下に冷却し、2 mlのヨウ化メチルを滴下し、密閉フラスコ中で1時間攪拌した。反応終了後、フラスコ内容に少量の水を加え、1夜流水透析した。透析膜内液は減圧濃縮した後、クロロホルムで抽出し、脱水、濃縮して30℃とした。得られたメチル化多糖は赤外吸収スペクトル測定を行なってメチル化の程度を調べ、水酸基(-OH)による3400~3,600 cm⁻¹の吸収が残っている場合には、この吸収が消失するまで上記のメチル化をくり返した。

3) 緩和 Smith 分解あるいは酵素処理で分解したカルカンのメチル化

分解カルカンではオリゴ糖が存在する可能性があるため、透析を行わないで、DMSOを除くために以下の方法を用いた。まず上述の箱守法でメチル化した試料をクロロホルムで抽出し、抽出液を水で3~4回洗った後、脱水、

濃縮した。濃縮シロップをクロロホルムとメタ
 ールの混液(2:1, v/v)に溶解し, これを
 Sephadex LH-20 (Pharmacia)のカラム(1 × 19 cm)
 にかけ, 上記混液で溶出した。溶出液は2 ml
 ずつ分け取り, 各フラクションをガラス毛细管
 を用いてシリカゲル薄層板(DC-Fertigplatten Kieselgel
 F254, Merk, Darmstat, Germany)にスポットした。スポットし
 た試料が乾燥するのをまち, エタールに溶
 かした4N硫酸をスプレーし, 120℃で5分間
 加熱した。この操作で黒い糖質反応が認めら
 れたフラクションを集め, メチル化糖として,
 次の操作に供した。

4) メチル化グルカンの加水分解とメチル化 単糖の分析

10~20 mgのメチル化グルカンに, 0~5℃に
 冷やした72%硫酸の0.1 mlを加え, 室温で1時
 間放置して溶液としたのを, 水で7倍に薄め
 て100℃で6時間加熱した³⁷⁾。この酸加水分解液
 を炭酸バリウムで中和後, 濾過して炭酸バリ
 ウムおよび硫酸バリウムを除き, 濾液を濃縮

した。得られたメチル化単糖は水に溶かし、この水溶液に過剰の水素化ホウ素ナトリウムを加えて1夜放置することにより還元した。生成した糖アルコールにはピリジンと無水酢酸の混液(1:1, 1/2)を加え、100℃で2時間加熱してアルジトールアセテート誘導体を得、これをガスクロマトグラフーにかけ分析した。

8. 不溶性グルカンの Smith 分解および緩和

Smith 分解

S. mutans OMZ 176 株の不溶性グルカンの 195 mg を供試し、これを 0.08 M のメタ過ヨウ素酸ナトリウム溶液 100 ml に懸濁し、20℃、暗所で酸化を行なった。完全に酸化が終了するのを待た(14日間、過ヨウ素酸の消費量は糖残基1モル当たり 0.75モル、キ酸の生成量は同じく 0.35モルであった)、反応液から不溶性の酸化グルカンを遠心分離して集め、これを水でくり返し洗滌した後、0.1 M の水酸化ナトリウム (8 ml) に溶解し、攪拌しながら水素化ホウ素ナトリウム 150 mg を加え、室温で 16 時間還元した。還

元の完全を期するのために、反応液に水素化ホウ素ナトリウム50 mgを加え、3時間さるに還元した後、pHが6.5になるまで酢酸を加えて過剰の水素化ホウ素ナトリウムを分解した。この反応液を精製水で透析した後、透析膜内液を凍結乾燥した(ケルカンポリアルコール)。

得られたケルカンポリアルコールの一部(20 mg)は2 Nの硫酸(0.2 ml)中で、100℃、150分間加熱して完全酸加水分解し、炭酸バリウムで中和後、酸水解生成物は展開溶媒(A)を用いてペーパークロマトグラフィーで、またアルジトールアセテート誘導体に変えてガスクロマトグラフィーで、分析した。

一方ケルカンポリアルコールの他の一部(100 mg)は、0.1 Nの硫酸(1 ml)中で25℃、16時間、緩やかな条件下で加水分解した(緩和 Smith 分解³⁹⁾)。次にこの反応液を遠心して可溶画分と不溶画分とに分けた。不溶画分(以下解体ケルカン)は十分水洗した後、凍結乾燥した(収量63 mg)。可溶画分は炭酸バリウムで中

和後、展開溶媒(A)を用いてペーパークロマトグラフィーで同定した。不溶性の解体グルカンの一部(10 mg)は完全酸加水分解し、水解物にふくまれるグリセリンとグルコースをガスクロマトグラフィーで定量した。さらに不溶性の解体グルカンの別の一部(20 mg)は、箱守法でメチル化し、生じたメチル化グルカンを水解後、ガスクロマトグラフィーによる分析に供した。

9. メチル化単糖および Smith 分解産物のガスクロマトグラフィーによる分析

ガスクロマトグラフィーは 3% ECNSS-M を被覆した 100 ~ 120 ヶシの Gas Chrom Q のカラム (0.4 × 200 cm) をとりつけた日立 K-53 ガスクロマトグラフを用いて行なった。メチル化単糖は相当するアルジトールアセテート誘導体に変え⁴⁰⁾、カラム温度は 180 °C、注入温度 300 °C、キャリアーガス 60 ml/分で分離した。Smith 分解産物については、相当するアルジトールアセテート誘導体に変えた後、上記のカラムを用い、毎分 7.5 °C の温度上

昇による 60-190℃ の昇温クロマトグラフィー分析を行なった。注入口温度, キャリアーガスの流速などの条件はメチル化単糖の場合と同じとした。

成績

1. 9株のレンサ球菌が無細胞系でスクロースより作る「菌体外」多糖の化学組成

S. mutans の4つの血清学的グループの中から5選んだ7株, 他に類縁の口腔レンサ球菌として *S. sanguis* 1株と *Streptococcus* sp. CHT株の培養液の酵素によってスクロースから作られた不溶性および可溶性の「菌体外」多糖のヘキソース, ガルコースおよび蛋白質の含量と収量とを表1に示した。

表 1

供試多糖が, OMZ 176株およびOMZ 65株からの可溶性多糖IおよびIIを除き, 約80%以上のヘキソース含量を示すことがわかった。OMZの2

株のヘキソース含量が低いのは、両株ともに Trypticase soy ブロスでの発育が悪かったのも、Brain heart infusion ブロスを培地として用いたことに関係するのではないかと考えられる。つまりこの培地を用いた場合には非糖質成分、特に蛋白質がエタノール沈澱画分に混じりこみやすいのではないかと考えられる。

一方グルコース含量については、菌株が異なるにつれて、0から100%に至る大巾な差異がみられた。すなわち、BHT株およびJC-1株の不溶性多糖は構成糖としてグルコースを含まず、またAHT株およびCHT株の不溶性多糖のグルコース含量はヘキソース量の約50%であった。さらに、JC-1株およびCHT株の可溶性多糖Iもヘキソース含量に比して低いグルコース含量を示した。このようにヘキソース量とグルコース量との間に大きな差が認められるのは、これらの多糖が構成糖としてフルクトースを含むためと考えられる。このことを確かめるために、多糖標品を(1)0.5N硫酸で60℃、4時間、(2)2

N 硫酸で 100°C , 3 時間 , 加水分解し , 炭酸バリウムで中和したものを (B) の展開溶媒を用い , ペーパークロマトグラフにより , 構成糖を調べた。その結果 , 不溶性多糖では , BHT 株および JC-1 株からのものはフルクトーゼのみかとなり , AHT 株および CHT 株のものはグルコースとフルクトーゼとの両者を含むこと , 他はすべてグルコースであることがわかった。また可溶性多糖 I では , JC-1 株および CHT 株のものはグルコースとフルクトーゼを含み , 他はグルコースであった。他方可溶性多糖 II は , すべてグルコースであった。

2. 供試口腔レンサ球菌が作る各種のグルコースのデキストラナーゼに対する感受性
表 1 にまとめて示した各グルコースに , 4 種のデキストラナーゼ (α -1,6 glucan 6-glucohydrolase) を材料と方法の項に示した条件下で作用させ , その分解の程度を還元糖の増加を指標として測定した (表 2)。

表 2

4種のデキストラナーゼの間にはこれらの供試グルカンに対する目だつた分解能の差は認められなかったが、各グルカンの間には、その水に対する溶解性の違いおよび由来菌株が異なるにつれて、用いたデキストラナーゼに対する感受性に明確な差が認められた。すなわち、4種のデキストラナーゼ標品のいずれに対しても、可溶性グルカンIIは感受性が高く、可溶性グルカンIもかなりの感受性を示したが、不溶性グルカン、特にOMZ 176株およびOMZ 65株のものはほとんど感受性を示さなかった。ただし不溶性グルカンの中でも、*S. mutans* 以外の2株、すなわち*S. sanguis* 10556株および*Streptococcus* sp. CHT株が作るものはかなりの程度に、また*S. mutans* AHT株、FA-1株およびIngbritt株のものもある程度、デキストラナーゼの作用を受けた。これらのグルカンのデキストラナーゼに対する感受性の差異は、各グルカンの化学構造に関連していと考えられるので、次に、表1

および2に示したグルカンの中から代表的なものを選んで、化学構造を調べた。

3. 不溶性および可溶性グルカンの化学構造

不溶性グルカンのうちから、デキストラナーゼに対して感受性の最も低かったOMZ 176株からのもの、ある程度感受性を示したFA-1株からのもの、およびよく分解を受けると10556株からのものを選び、これにデキストラナーゼに対して非常に感受性の高いOMZ 176株の可溶性グルカンII(蛋白質成分を除去する目的で不溶性トリフィン処理を行なった)を加え、計4種のグルカンについて、箱守法でメチル化、水解後、メチル化単糖をカスクロマトグラフィーで分析した。4標品ともメチル化単糖として、非還元性末端に由来する2,3,4,6-テトラ-メチルグルコース、1,3結合に由来する2,4,6-トリ-メチルグルコース、1,6結合から生じた2,3,4-トリ-メチルグルコース、および1,3結合と1,6結合の分岐構造

に由来する 2,4-ジメチルグルコースが、表 3 に示すようなそれぞれの比で得られた。

表 3

表 3 に示す分析結果は、デキストラナーゼに対する感受性の高いものほど 1,6 結合の含量が多く、1,3 結合の含量の多いものほどデキストラナーゼに対する感受性が低いことを示している。同じ OMZ 176 株が作る不溶性グルカンと可溶性グルカン II とのグルコシド結合を比べると、 α -1,3 結合の含量にそれぞれ 51 および 2% というような大差があり、Guggenheim⁽⁴⁾ も指摘しているように、 α -1,3 結合の含量が α -グルカンの不溶性に大いに関連していることを示す分析結果が得られた。なお不溶性に関連して、本実験では供試レンサ球菌由来の多糖のうち、45,000 g、30 分の遠心で沈澱するものを不溶性多糖としたが、用いた 9 株の中で OMZ 176 株および OMZ 65 株からのものは 4,000 g、20 分の遠心によっても沈澱するのに対して、他の 7 株からのものはこの遠心条件では沈澱しなかった。

4. *S. mutans* OMZ 176 株の作る不溶性グルカンの化学構造決定の試み

不溶性グルカンの不溶性を担うことが示唆された α -1,3 結合が当該グルカンの化学構造の中でどのように位置づけられるかを調べるため、*S. mutans* OMZ 176 株が作った不溶性グルカンの化学構造を Smith 分解、緩知 Smith 分解、メタル化および酵素による分解を利用して詳細に解析した。

まず不溶性グルカンを過ヨウ素酸で酸化した後、水素化ホウ素ナトリウムで還元してグルカンポリアルコールを得たが、これはもとのグルカンが示した粘着性をほとんど失っていた。グルカンポリアルコールの一部は完全水解を行ない、水解物を分析したところ、グルコースとグリセリンが 13:7 の割合で得られた。グルカンを Smith 分解すると、 α -1,3 結合鎖および分岐点はグルコースとして、また α -1,6 結合鎖および非還元性末端はグリセリン

として検出されるので、この成績は前項で述べたメチル化分析の成績と非常によく一致している。

つぎにグルカン-ポリアルコールを緩和 Smith 分解することによつて得られた不溶性の解体グルカン(収量 63%)は超音波処理を施してもすぐ沈澱する強い不溶性を示したが、粘着性はまったく失つていた。すなわち、もとの不溶性グルカンは超音波処理により容易に懸濁し、放置してもかなりの時間が経たないと沈澱しなかった。この不溶性の解体グルカンはメチル化すると 98%以上の 2,4,6-トリ-メチルグルコースを与え、他にごく少量の 2,3,4,6-テトラ-および 2,4-ジ-メチルグルコースを生成した(表 4)。

表 4 (可溶性の解体画分には)

一方緩和 Smith 分解により生じたグリセリンのみが含まれ、 $\rightarrow G1 \rightarrow 3G1 \rightarrow 6G \rightarrow$ のような糖の配列を示すフルコシル-グリセリンなどのグリコシドがみあたらないことから、もとの供試グルカ

ンの α -1,3 結合部は、緩和 Smith 分解をうけた後
 も、不溶部にのみ存在することわかった。
 この結果、 α -1,3 結合部が分岐点あるい側鎖
 にのみ短い糖鎖として存在することわかつ
 ている“デキストラン”とは異なり、*S. mutans* OMZ 176 株
 からの不溶性グルカン中の α -1,3 結合部は非常
 に長い、連続した糖鎖として存在し、そして
 この長い α -1,3 結合鎖がグルカンの不溶性に関
 与していることがわかった。

次に α -1,6 結合鎖が不溶性グルカンの主鎖に
 存在するか、それとも側鎖に存在するのかを
 調べるため、*Achromobacter* sp. 由来のエキソ型のデ
 キストラナーゼ（愛知教育大学の沢井輝男博
 士より分与された⁴⁾）を以上述べた分析に用い
 た OMZ 176 株からの不溶性グルカンに作用させた。
 このデキストラナーゼは α -1,6 結合鎖を非還元
 性末端よりイソマルトース単位に切断してい
 く酵素であるが、この酵素を作用させたとき
 3, イソマルトースの遊離が認められた。こ
 のことから、 α -1,6 結合鎖は非還元性末端側に、

言い換えれば、側鎖に位置していることがわかった。なお緩和 Smith 分解後の不溶性の解体グルカンを4N硫酸で水解したものをガスクロマトグラフで分析したところ、グルコースとグリセリンが25:1の割合で得られた。この所見は、主鎖にもごく少量の α -1,6結合鎖があり、これが長い α -1,3結合鎖の間に組み込まれている可能性を示している。

以上の結果から推定される、OMZ 176株が作る不溶性グルカンおよびその緩和 Smith 分解グルカンの化学構造を図1に提示した。

図 1

5. 不溶性グルカンの粘着性と化学構造の関係

詳細は別に報告したが、大量のデキストラナーゼ存在下でOMZ 176株の培養液の酵素をスクロースに作用させると、少量の、不溶性ではあるが粘着性のないグルカンが生成されることをみつけた⁴²⁾ので、このグルカンの化学構造

を、通常のデキストラナーゼを加えない条件で生成した同じ OMZ 176 株の粘着性をもつ不溶性グルカンのそれと、メチル化分析によって比較検討した。

表 5

表 5 に示したように、デキストラナーゼ存在下で生成された非粘着性の不溶性グルカンは、緩和 Smith 分解で得られた不溶性の解体グルカンと同様、きわめて高い割合 (95%) で α -1,3 結合を含んでいた。すなわちこの非粘着性の不溶性グルカンは、 α -1,3 結合をした長いグルコース主鎖から、約 45~47 個のグルコース残基当りおすかに 1 個のイソマルトース (グルコースが α -1,6 結合した二糖) 残基が分岐した構造であることがわかった。

この実験結果から、不溶性グルカンの粘着性には分子量の他に、 α -1,6 結合の側鎖の存在が大きく関与していることが示唆された。

6. デキストラナーゼによる不溶性グルカ

シの分解限度およびその分解生成物

不溶性グルカンのデキストラナーゼに対する感受性が低いことは結果3で示したが、その分解限度を明らかにするために、4種のデキストラナーゼの中から *Spicaria* デキストラナーゼを選んで、OMZ 176 株の作る不溶性グルカンに対する作用を調べた。すなわち、50 mg の不溶性グルカンおよび 200 単位²⁸⁾ の *Spicaria* デキストラナーゼを含む総量 10 ml の 0.05 M 酢酸塩緩衝液 (pH 5.8) を 37 °C で 24 時間 反応させた。反応前後の還元基量の増加は 47.3 μmoles (1 mg のグルカン当り 826 nmoles) で、これは供試グルカンの総グルコース残基の 15% に相当した。反応液を 8000 g で 20 分間遠心して不溶部と可溶部とに分離し、不溶部は水洗後、凍結乾燥した。凍結乾燥した不溶画分の重さは 30.1 mg であった。

可溶部は Amberlite[®] (Rohm and Hass Co., Philadelphia, U.S.A.) の IR-120 (H⁺型) および IR-45 (OH⁻型) を充填したカラムを通すことにより脱塩した後、展開溶媒(c)を用いてペーパークロマトグラフィ

一により生成糖を同定した。分解生成物としてはグルコースおよびイソマルトースが大部分で、他に少量のオリゴ糖（未同定）が認められた。一方約60%の収量で得られた不溶性の解体グルカンの化学構造をメチル化分析によって調べ、その値をもとのグルカンと対比させて表6に示した。

表 6

Spicaria テキストラナーゼの作用により生成した解体グルカンは、もとの不溶性グルカンに比較して、 α -1,3結合由来の2,4,6-トリメチルグルコースの相対比が高いが、 α -1,6結合からの2,3,4-トリメチルグルコースが減少しているほか、非還元性末端に相当する2,3,4,6-テトラメチルグルコースおよび分岐点に由来する2,4-ジメチルグルコースも減少している。このことから *Spicaria* テキストラナーゼは、従来報告されていたように α -1,6結合鎖を切断する他に、1,6結合と1,3結合の分岐点の1,6結合側の多くをも切断すること、しかし α -1,3結合鎖にはほと

んど作用しないことがあつた。

7. *S. mutans* が作るフルクトーシンの化学構造

細菌が作るフルクトーシンは、報告されたものはすべて水溶性で β -2,6 結合のレバン型である⁴³⁾。ところが *S. mutans* AHT 株, BHT 株および JC-1 株の作るフルクトーシンは不溶性で 45,000 g, 30 分間の遠心で沈澱した。また BHT 株および JC-1 株の不溶性フルクトーシンは室温では水に溶けず, 60 °C に熱してはじめて溶解した。そこで *S. mutans* から得られたこれらのフルクトーシスが β -2,6 結合のレバンとは異なる構造を有している可能性が大きいと考え, その化学構造を検討した。

はじめに BHT 株および JC-1 株の不溶性フルクトーシンのメチル化による構造研究を行なった。まず常法どおりメチル化単糖を水素化ホウ素ナトリウム (NaBH_4) で還元し, ガスクロマトグラフで分析したが, レバン型に由来する 1,3,4-トリメチルフルクトースと, β -2,1 結合のイヌリン型に由来する 3,4,6-トリメチルフルクトー

スとか、用いたクロマトの条件では保持時間が同じであり、いずれであるかは同定できなかった。そこで Lindberg 3 の記載⁴⁴⁾を参考にして、メチル化単糖を重水素化ホウ素ナトリウム (NaBD_4) で還元した後、相当するアルジトールアセテート誘導体に変え、ガスクロマトグラフに連結した質量スペクトル分析器で分析した (図 2)。

図 2

その結果、BHT 株および JC-1 株からのメチル化フルクタンは加水分解により、1,3,4,6-テトラ-, 3,4,6-トリ-および 3,4-ジメチルフルクトースを 1 : 6 : 0.9 (BHT 株), 1 : 25 : 0.85 (JC-1 株) の比で生成した。すなわち BHT 株および JC-1 株のフルクタンは β -2,1 結合のイヌリン型であることがわかった。

次に供試標品がグルカンとフルクタンの両者を含む、AHT 株の不溶性画分および JC-1 株の可溶性画分 I のフルクタンの結合様式を調べる目的で、この 2 標品と、メチル化分析の結果

イヌリン型であることが明らかになった BHT 株および JC-1 株の不溶性フルクトシンの計 4 標品に、それぞれ *Arthrobacter ureafaciens* 由来のイヌリナーゼ II (大阪教育大学内山喬夫博士に恵与された) を作用させた。このイヌリナーゼ II は、高等植物由来の β -2,1 結合のイヌリンに特異的に作用してジフルクトースアンヒドライド III を生成することから、Uchiyama⁴⁵⁾ により報告されている。この酵素の作用によつて、4 種の供試標品のいずれからとも β -2,1 結合に特有のジフルクトースアンヒドライド III の生成が認められた。

すなわちメチル化分析および酵素分解による結果から、*S. mutans* の作るフルクトシンは、レバンであるという従来の報告^{41) 46)} とは異なり、冷水難溶性の β -2,1 結合のイヌリン型であることが明らかになった。またイヌリン型フルクトシンの分岐の程度は菌株により異つていた。なお *S. mutans* 由来のイヌリン型フルクトシンのなすびに *Streptococcus salivarius* HHT 株の作るレバン型フルク

タンの化学構造の詳細は別に報告した⁴⁾。

考 察

フロークの主な構成成分が細菌細胞と多糖であることはよく知られた事実である。多糖、すなわちグルカンとフルクタンは、主としてフローク中に存在するレンサ球菌のグルコシル-およびフルクトシルトランスフェラーゼによってスクロースから「菌体外」に生成され、フローク中の細菌細胞をつなぎあわせていると考えられている²⁾²¹⁾。そしてこれらの多糖のうちでも、特に *S. mutans* の作る不溶性グルカンがフローク形成やう蝕、とりわけ平滑面う蝕の発生に必須の要素であるという実験結果が、近年集積している¹⁸⁾²⁰⁾⁴⁹⁾。

ところで水不溶のグルカンを、スクロースを含んだ培地で発育させたレンサ球菌から、その化学構造を損うことなく抽出することは容易でない。またグルカン以外の種々の菌体

成分がまじりこむ可能性も大きい。そこで Guggenheim¹⁷⁾ は、*S. mutans* OMZ 176 株および *S. sanguis* 804 株の培養上清にスクロースを加えて反応させ、反応液を遠心することによって不溶性のグルカンを調製する方法を案出した。彼はこの不溶性グルカンの Smith 分解産物を分析した結果に基づいて、このグルカンが多量の α -1,3 結合を含むことを示すとともに、グルカンが水に溶けない性質は α -1,3 結合の含量が高いことに関係するのであると述べた。しかしこの研究では、グルカンの構造研究が Smith 分解によるのみ行なわれ、化学構造の詳細については多くの不明な点が残された。

本研究では、上記の Guggenheim の方法を参考にして供試多糖を調製した。すなわち、供試菌株の培養上清から硫酸 50% 飽和で塩析することによって得たグルコシル-およびフルクトシルトランスラーゼを含む画分をスクロースと pH 6.8 の磷酸塩緩衝液中で反応させ、生成した多糖を水に対する溶解性に基づいて遠心分

画した。得られた不溶性グルカンの収量およびデキストラナーゼに対する感受性には、その由来菌株によりかなりの差異が認められた。興味があるのは、非う蝕原性の *Streptococcus* sp. CHT 株および *S. mutans* よりう蝕原性が低い *S. sanguis* 10556 株の作った不溶性グルカンが、*S. mutans* の作った不溶性グルカンよりもデキストラナーゼに対する感受性が高かったことである。これは Bowen⁴⁾ が 6 株のう蝕原性を異にするレンサ球菌由来の水溶性グルカンにデキストラナーゼを作用させて得た結果とよく似ている。

著者は本研究において、*S. mutans* OMZ 176 株が作った不溶性グルカン、および過剰のデキストラナーゼ存在下で同株が生成した不溶性ではあるが粘着性のないグルカンの化学構造をメチル化、Smith 分解、緩和 Smith 分解および酵素分解により詳細に調べ、OMZ 176 株からの不溶性グルカンは、 α -1,3 結合の主鎖をもち、 α -1,6 結合の比較的短い側枝がグルコース残基 7 に対して 1 つの割合で C-6 で分岐した構造であり、

連続した α -1,3 結合の長い糖鎖の存在がグルカンの不溶性に、また主鎖に分岐した α -1,6 結合の側鎖が不溶性グルカンの粘着性に関与していることを初めて明らかにした。

不溶性という性質が発現するためには連続した α -1,3 結合の長い糖鎖が必要であるとの考えは、三崎⁵⁰⁾の次のような実験結果にも根拠している。すなわち、*Leuconostoc mesenteroides* NRRL 1355 株が作る水溶性グルカンは、メチル化により 2,3,4,6-テトラ- (12.9%), 2,4,6-トリ- (32.8%), 2,3,4-トリ- (44.7%) および 2,4-ジメチルグルコース (10.6%) を生成する。したがってこのグルカンには、 α -1,3 結合および α -1,3 結合と α -1,6 結合の分岐結合部が 43% 存在することになる。しかしこのグルカンは水溶性である。1355 グルカン中での α -1,3 結合の存在様式を緩和 Smith 分解を行って調べたところ、*S. mutans* OMZ 176 株からの不溶性グルカンで得られたような不溶性の解体グルカン (α -1,3 グルカン) は得られず、グリセリンおよび D-グルコシルグリセリンのみが生じた。さらに

このグルカニンに結果4の項で述べた *Achromobacter* sp. 由来のエキソデキストラナーゼを作用させると、 $G1 \rightarrow 6G1$ が主要分解産物として得られた。



これらの結果から三崎らは、このグルカニンを構成しているグルコシド結合は、 α -1,6結合と α -1,3結合が交互に連なっており、 α -1,3結合が連続した長い糖鎖は存在しないと推定した。

一方 α -1,6結合が不溶性グルカニンの粘着性に関与するという考えは、守山⁵¹⁾がグルコシルトランスフェラーゼを用いて行なった^{次のような}グルカニン合成実験の結果ともよく一致する。すなわち、*S. mutans* HS-6株の培養上清から α -1,6結合グルカニンを合成するデキストランスクララーゼおよび α -1,3結合グルカニンを合成するムタンスクラーゼを精製した。この両酵素の共同作用によりスクロースより合成された不溶性のグルカニンは試験管壁に付着したが、部分精製ムタンスクラーゼ単独の作用で合成された不溶性のグルカニンは粘着性をほとんど欠いていた。

本研究の他に *S. mutans* の作る不溶性グルカンの化学構造を検討したものとしては、以下に記すような報告がある。すなわち Ceska⁵²⁾ は、*S. mutans* OMZ 176 株および *S. sanguis* の数株のグルコシルトランスフェラーゼがスクロースから生成する5種のα-グルカン中の結合をメチル化により比較している。いずれも分岐結合をとるが、α-1,3結合の割合は異っており、*S. sanguis* の3種のグルカンでは2.4, 10.8 および17.7%, *S. mutans* が作る2種のグルカンでは49.5 および94.2% であり、このα-1,3結合の含量の増加とともに用いたデキストラナーゼによる分解程度が減少したと報告している。また Baird⁵³⁾ は、*S. mutans* Ingbritt A 株が作る不溶性および可溶性グルカンの化学構造を調べた。すなわち、メチル化により、不溶性グルカンからは2,3,4,6-テトラ-(10%), 2,4,6-トリ-(51%), 2,3,4-トリ-(27%) および2,4-ジメチルグルコース(12%), また可溶性グルカンからは2,3,4,6-テトラ-(15%), 2,4,6-トリ-(3%), 2,3,4-トリ-(66%) および2,4-ジメチルグルコース(16%) が生成した。

このメチル化分析の成績は、本研究における OMZ 176 株からの不溶性および可溶性グルカンのそれとよく一致している。しかし Ceska らおよび Baird らの実験は、もっぱらメチル化分析が中心であって構造研究はきわめて不十分であるといわざるを得ない。

う蝕発生あるいはフローラク形成に際し不溶性グルカンが重要な役割を果たすということから、不溶性グルカンの生成を阻害し、あるいは分解することを通じて口腔疾患、特にう蝕を予防する可能性が考えられる。こういった観点から多糖類分解酵素を利用する場合には、本研究における不溶性グルカンの構造の成績から明らかとなったように、グルカンの不溶性を担う α -1,3 結合鎖を切断する酵素ならびにグルカンの粘着性に関与している α -1,6 結合鎖に作用する酵素を併用すれば最も効果的であろう。こういった多糖類分解酵素、特に α -1,3 グルコシド結合を開裂する酵素については続報⁵⁴⁾で詳しく述べる。

一方本研究では, *S. mutans* 由来のフルクトーザンが従来信じられてきた β -2,6 結合のレバン型でなく, β -2,1 結合のイヌリン型であることを示した。これまで数多くの細菌, 例えば, *Acetobacter*, *Aerobacter*, *Bacillus*, *Leuconostoc*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Streptococcus* および *Xanthomonas* に属する菌株がスクロースを基質として, 高分子量の β -2,6 レバン型フルクトーザンを生成することが知られている⁴³⁾。これに対してイヌリン型フルクトーザンは, *Dahlia variabilis* や *Helianthus tuberosus* のような高等植物にのみ存在すると信じられてきた。

Wood と Critchley⁴⁶⁾ および Critchley⁴⁷⁾ は, *S. mutans* FA-1 株がスクロースより生成する多糖, またフラワーから抽出した水溶性の多糖を調べたところ, その構成糖はグルコースとフルクトースであり, さらに Smith 分解で得られる分解産物がグリセリンのみであることから, これらの多糖は α -1,6 結合をしたデキストランおよび β -2,6 結合のレバンであると報告した。この報告の中で彼らが誤ったのは, β -2,6 結合のレバン型フル

クタンも β -2,1 結合のイヌリン型フルクタンも、Smith 分解を行なうといずれの場合にもグリセリンのみを生じることを考慮しなかったことによる。彼らは供試フルクタンの Smith 分解産物がグリセリンであったという結果、および細菌が作るフルクタンはレバン型であるという先入感から、*S. mutans* を含めて、フローク内の細菌によって作られるフルクタンは β -2,6 結合のレバン型であると決論してしまった。

最近になって Kawai⁵⁵⁾ は、*Aspergillus sydowi* の分生(胞子)に分子量 2,000 万のイヌリン型フルクタンが含まれていることを示した。さらに本研究とは独立に Rosell と Birhed⁵⁶⁾ は、*S. mutans* JC-2 株からエタール沈澱により調製したフルクタンが β -2,1 結合のイヌリン型であることを示した。

フローク中では、フルクタンはフローク内の細菌により分解され、結果的にフロークでの持続的な酸産生に寄与するとされている^{(14)~(16)}。

ちなみに DaCosta と Gibbons¹⁵⁾ は、フロークから分離した数株のレンサ球菌が *S. salivarius* の作るレバン

および高等植物からのイヌリンの両者を分解することを報告している。フロークには、*S. salivarius*⁵⁷⁾⁵⁸⁾ や *Actinomyces*⁵⁷⁾⁶⁰⁾ の作るレバン型フルクタンと、本研究で明らかとなった *S. mutans* の作るイヌリン型フルクタンの両者が存在することを考え合わせると、この2種類のフルクタンを分解する活性がフローク内に存在するという報告は興味深い。

総括

1. *S. mutans* の血清型を異にする7株 (AHT株, BHT株, FA-1株, Ingbritt株, JC-1株, OMZ 176株およびOMZ 65株), *S. sanguis* 10556株ならびに *Streptococcus* sp. CHT株の培養上清を硫酸塩析して得た酵素画分をスクロースと反応させ、生成し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。

2. これらのグルカンの4種のデキストラ

ナーゼ標品に対する感受性を、還元基の遊離を指標として調べた。供試グルカンのデキストラナーゼに対する感受性にそれぞれのグルカンが由来する菌株による差が認められたが、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OMZ株が作るものが特に酵素作用を受けにくかった。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。

3. 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分解法および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、主鎖に α -1,3結合、またグルコース残基のC-6の位置で高度に分岐した側鎖に α -1,6結合が局在した構造をもつことを示す結果が得られた。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示された。この非粘着性グルカンの化学構造を粘着性グルカンのそれと比較した。この比較研究の結果、グルコースが α -1,3結合で連なった長い糖鎖の存在が α -グルカンの不溶性に、また主鎖に高度に分岐した α -1,6結合の側鎖の存在が α -グルカンの粘着性に関与していることを初めて明らかにした。

4. *S. mutans* が作るフルクトサンの化学構造をメチル化分析およびイヌリナーゼIIを利用して検討した。従来 β -2,6結合のレバン型と信じられていた*S. mutans*の作るフルクトンが、 β -2,1結合のイヌリン型であることを初めて明らかにした。

STUDIES ON THE STRUCTURE OF POLYSACCHARIDES (GLUCANS AND FRUCTANS) PRODUCED BY CARIOGENIC STREPTOCOCCI AND ON AN ENZYME HYDROLYZING THE INSOLUBLE GLUCAN. I. STRUCTURAL STUDIES OF INSOLUBLE GLUCAN, SOLUBLE GLUCAN, AND FRUCTANS.

Shigeyuki EBISU

Department of Oral Medicine, Osaka University Dental School, 32-Joancho, Kitaku, Osaka, Japan.

Studies were made on the physical and chemical properties of polysaccharides synthesized by cell-free extracts of *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguis*, and *Streptococcus* sp. and their susceptibilities to dextranases. Judged by liberation of reducing sugars, the soluble polysaccharide II's were highly susceptible, the soluble polysaccharide I's were moderately susceptible, and the insoluble polysaccharides, especially those produced by *S. mutans* strain OMZ 176 and OMZ 65, were scarcely susceptible.

The correlation between the chemical structure of various glucans and the extent to which they were hydrolyzed by dextranases of various origin was studied. It was found that the limited extent of hydrolysis of the insoluble glucans by dextranases is dependent on the amount of α -1,3 glucosidic linkages present.

The insoluble glucan from *S. mutans* OMZ 176 has been shown by methylation, Smith degradation, controlled Smith degradation, and enzymatic examination to be a α -1,3 glucan having short 1,6-linked branches. Hydrolysis of the methylated glucan yielded 2,3,4,6-tetra-

(14.6 %), 2,4,6-tri- (50.5 %), 2,3,4-tri- (20.9 %), and 2,4-di-0-methyl-D-glucose (14.0 %), which indicated a highly branched structure with an average repeating unit of seven sugar residues. Periodate oxidation of the glucan followed by reduction and mild hydrolysis with acid eliminated all of the α -1,6 linked side chains to give glycerol and an water-insoluble, degraded glucan, which gave on methylation and hydrolysis 2,4,6-tri-0-methyl-D-glucose, predominantly.

The glucan formed in the presence of dextranase, which is insoluble but devoid of the original adhesive characteristics, was shown to be an essentially α -1,3 glucan.

In the view of the physical properties of streptococcal glucans, it can be deduced that the water-insolubility is attributable mainly to the long, consecutive α -1,3 linked backbone chain, whereas the α -1,6 linked side chains having a certain length are related to the adhesion of the insoluble glucan to the surface of teeth. It is anticipated that if an enzyme preparation is to have a therapeutic effect, it must contain hydrolyses specific for α -1,3 as well as for α -1,6 linkages.

The structure of fructans formed by *S. mutans* were also studied by methylation and enzymatic examination. The cold-water-insoluble fructans from *S. mutans* strain BHT and JC-1 have inulin-type structures containing β -2,1-D-fructofranosidic linkages, with average repeating units of 8 and 27 sugar residues, respectively.

文 献

- 1) Fitzgerald, R. J., and Jordan, H. V. (1968): Polysaccharide-Producing bacteria and caries, p. 79-86. *In* Harris, H. R. (ed.), Art and science of dental caries research. Academic Press Inc., New York.
- 2) Guggenheim, B. (1970): Extracellular polysaccharide and microbial plaque. *Int. Dent. J.* 20, 657-678.
- 3) Gibbons, R. J., and Banghart, S. S. S. (1967): Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque. *Arch. Oral Biol.* 12, 11-24.
- 4) Mukasa, H., and Slade, H. D. (1973): Mechanism of adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces. I. Roles of insoluble dextran-levan synthetase enzymes and cell wall polysaccharide antigen in plaque formation. *Infect. Immun.* 8, 555-562.
- 5) Gibbons, R. J., and Fitzgerald, R. J. (1969): Dextran-induced agglutination of *Streptococcus mutans*, and its potential role in the formation of microbial dental plaques. *J. Bacteriol.* 98, 341-346.
- 6) Kelstrup, J., and Funder-Nielsen, T. D. (1974): Adhesion of

- dextran to *Streptococcus mutans*. J. Gen. Microbiol. 81, 485-489.
- 7) Critchley, P., Wood, J. M., Saxton, C. A., and Leach, S. A. (1967): The polymerisation of dietary sugars by dental plaque. Caries Res. 1, 112-129.
 - 8) Guggenheim, B., and Schroeder, H. E. (1967): Biochemical and morphological aspects of extracellular polysaccharides produced by cariogenic streptococci. Helv. Odontol. Acta 11, 131-152.
 - 9) Walker, G. J. (1972): Some properties of a dextransucrosidase isolated from streptococci and its use in studies on dextran synthesis. J. Dent. Res. 51, 409-414.
 - 10) Walker, G. J., and Pulkownik, A. (1973): Degradation of dextrans by an α -1,6-glucan glucohydrolase from *Streptococcus mitis*. Carbohydr. Res. 29, 1-14.
 - 11) Staat, R. H., Gawronski, T. H., and Schachtele, C. F. (1973): Detection and preliminary studies on dextransucrose-producing microorganisms from human dental plaque. Infect. Immun. 8, 1009-1016.
 - 12) Staat, R. H., and Schachtele. (1974): Evaluation of dextransucrose production by the cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. 9, 467-469.

- 13) Guggenheim, B., and Burckhardt. (1974): Isolation and properties of a dextranase from *Streptococcus mutans* OMZ 176. *Helv. Odontol. Acta* 13, 84-97.
- 14) Wood, J. M. (1964): Polysaccharide synthesis and utilization by dental plaque. *J. Dent. Res.* 43, 955.
- 15) DaCosta, T., and Gibbons, R. J. (1968): Hydrolysis of levan by human plaque streptococci. *Arch. Oral Biol.* 13, 609-617.
- 16) Manly, R. S., and Richardsson, D. T. (1968): Metabolism of levan by oral samples. *J. Dent. Res.* 47, 1080-1086.
- 17) Guggenheim, B. (1970): Enzymatic hydrolysis and structure of water-insoluble glucan produced by glucosyltransferases from a strain of *Streptococcus mutans*. *Helv. Odontol. Acta* 14, 89-108.
- 18) de Stoppelaar, J. D., König, K. G., Plasschart, A. J. M., and van der Hoeven, J. S. (1971): Decreased cariogenicity of a mutant of *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.* 16, 971-975.
- 19) Freedman, M. L., and Tanzer, J. M. (1974): Dissociation of plaque formation from glucan-induced agglutination in mutants of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 10, 189-196.
- 20) Tanzer, J. M., Freedman, M. L., Fitzgerald, R. J., and Larson, R. L. (1974): Diminished virulence of glucan synthesis-defective

mutants of *Streptococcus mutans*. Infect. Immun. 10, 197-203.

- 21) 浜田茂幸, 小谷尚三 (1973): 齲蝕と細菌(下). 歯界展望 41, 227-234, 昭和48.
- 22) Jabron, J. M., and Zinner, D. D. (1966): Differentiation of cariogenic streptococci by fluorescent antibody. J. Bacteriol. 92, 1590-1596.
- 23) Fitzgerald, R. J., and Keys, P. H. (1960): Demonstration of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. J. Am. Dent. Assoc. 61, 9-19.
- 24) Krasse, B. (1966): Human streptococci and experimental caries in hamsters. Arch. Oral Biol. 11, 429-436.
- 25) Krasse, B., and Carlsson, J. (1970): Various types of streptococci and experimental caries in hamsters. Arch. Oral Biol. 15, 25-32.
- 26) Guggenheim, B. (1968): Streptococci of dental plaques. Caries Res. 2, 147-163.
- 27) 嶋田一夫, 石川信義, 北條史子, 網島勇, 山下浩三, 鶴川清, 久保隆, 井上公蔵 (1973): *Flavobacterium* の一菌株の産生する Dextranase について. 日細菌誌 28, 270, 昭和48.

- 28) Murayama, Y., Wada, H., Hayashi, H., Uchida, T., Yokomizo, I., and Hamada, S. (1973): Effect of dextranase from *Spicaria violaceae* (IFO 6120) on the polysaccharides produced by oral streptococci and on human dental plaque. *J. Dent. Res.* 52, 658-667.
- 29) Ashwell, G. (1957): Colorimetric analysis of sugars, p. 73-105. *In* Colowick, S. P., and Kaplan, N. O. (ed.), *Methods in enzymology*, vol. 3. Academic Press Inc., New York.
- 30) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 31) Newbrun, E. (1972): Extracellular polysaccharides synthesized by glucosyltransferases of oral streptococci. *Caries Res.* 6, 132-147.
- 32) Park, J. T., and Johnson, M. J. (1949): A submicrodetermination on glucose. *J. Biol. Chem.* 181, 149-151.
- 33) Sakakibara, K., Torii, M., Misaki, A., and Miyaji, H. (1972): Acetolysis of dextran NRRL B1397. Preparation of trisaccharides containing (1→2)- and (1→6)- α -D-glucose linkages. *Carbohydr. Res.* 25, 443-451.
- 34) Trevelyan, W. E., Procter, D. P., and Harrison, J. S. (1950):

- Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature* 166, 444-445.
- 35) Standford, P. A., and Conrad, H. E. (1966): The structure of the *Aerobacter aerogenes* A3 (S1) polysaccharide. I. A reexamination using improved procedures for methylation analysis. *Biochemistry* 5, 1508-1517.
- 36) Hakomori, S. (1964): A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J. Biochem.* 55, 205-208.
- 37) Garegg, P. J., and Lindberg, B. (1960): The constitution of an araboxylan from scots pine. *Acta Chem. Scand.* 14, 871-876.
- 38) Abdel-Akher, M., Hamilton, J. K., Montgomery, R., and Smith, F. (1952): A new procedure for determination of the fine structure of polysaccharides. *J. Amer. Chem. Soc.* 74, 4970-4971.
- 39) Goldstein, I. J., Hay, G. W., Lewis, B. A., and Smith, F. (1965): Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction, and hydrolysis, p. 361-370. *In* Whistler, R. L. (ed.), *Methods in carbohydrate chemistry*, vol. 5. Academic Press Inc., New York.
- 40) Björndal, H., Lindberg, B., and Svensson, S. (1967): Gas-liquid chromatography of partially methylated alditols as their acetates.

- Acta Chem. Scand. 21, 1801-1804.
- 41) Sawai, T., Toriyama, K., and Yano, K. (1974): A bacterial dextranase releasing only isomaltose from dextrans. J. Biochem. 75, 105-112.
- 42) Ebisu, S., Misaki, A., Kato, K., and Kotani, S. (1974): The structure of water-insoluble glucans of cariogenic *Streptococcus mutans*, formed in the absence and presence of dextranase. Carbohydr. Res. 38, 374-381.
- 43) Avigad, G. (1968): Levans, in Encyclopedia of Polymer Science and Technology, vol. 8, 711-718.
- 44) Lindberg, B., Lönngren, J., and Thompson, J. L. (1973): Methylation studies on levans. Acta Chem. Scand. 27, 1819-1821.
- 45) Uchiyama, T., Niwa, S., and Tanaka, K. (1973): Purification and properties of *Arthrobacter ureafaciens* inulase II. Biochim. Biophys. Acta 315, 412-420.
- 46) Wood, J. M., and Critchley, P. (1966): The extracellular polysaccharide produced from sucrose by a cariogenic streptococcus. Arch. Oral Biol. 11, 1039-1042.
- 47) Ebisu, S., Kato, K., Kotani, S., and Misaki, A. (1975): Structural differences in fructans elaborated by *Streptococcus mutans* and *Strep. salivarius*. J. Biochem. 78, 879-887.

- 48) Gibbons, R. J., and Nygaard, M. (1968): Synthesis of insoluble dextran and its significance in the formation of gelatinous deposits by plaque-forming streptococci. Arch. Oral. Biol. 13, 1249-1262.
- 49) Bowen, W.H.(1968): Effects of dextranase on cariogenic and non-cariogenic dextrans. Brit. Dent. J. 124, 347-349.
- 50) 三崎旭, Goldstein, I. J., 鳥居光雄, 沢井輝男 (1975): *Leuconostoc mesenteroides* NRRL 1355 の デキストランの構造 : α -1,3 結合の配列. 生化学 47, 743, 昭和 50.
- 51) 守山隆章 (1974): *Streptococcus mutans* による glucan の合成. 日細菌誌 29, 36, 昭和 49.
- 52) Ceska, M., Granath, K., Norrman, B., and Guggenheim, B. (1972): Structural and enzymatic studies on glucans synthesized with glucosyltransferases of some strains of oral streptococci. Acta Chem. Scand. 26, 2223-2230.
- 53) Baird, J. K., Longyear, V. M. C., and Ellwood, D. C. (1973): Water insoluble and soluble glucans produced by extracellular glycosyltransferases from *Streptococcus mutans*. Microbios 8, 143-150.
- 54) 恵比須繁之. (1976): α 蝕原性レンガ球菌

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. II. 不溶性グルカン分解酵素の分離, 精製およびその作用. 阪大歯学誌 21, 昭和51.

- 55) Kawai, G., Taniguchi, H., and Nakamura, M. (1973): Polyfructan and oligofructans synthesized from sucrose by conidia of *Aspergillus sydowi* IAM 2544. *Agr. Biol. Chem.* 37, 2111-2119.
- 56) Rosell, K. J., and Birkhed, D. (1974): An inulin-like fructan produced by *Streptococcus mutans*, strain JC 2. *Acta Chem. Scand.* B28, 589.
- 57) Niven, C., Smiley, K. L., Sherman, J. M. (1941): The polysaccharides synthesized by *Streptococcus mutans* and *Streptococcus bovis*. *J. Biol. Chem.* 140, 105-109.
- 58) Newbrun, E., and Baker, S. (1968): Physico-chemical characteristics of the levan produced by *Streptococcus salivarius*. *Carbohydr. Res.* 6, 165-170.
- 59) Howell, Jr., A., and Jordan, H. V. (1967): Production and extracellular levan by *Odontomyces viscosus*. *Arch. Oral Biol.* 12, 571-573.

- 60) Krichevsky, M. I., Howell, Jr., A., and Lim, S. (1969): Levan formation by *Odontomyces viscosus*. J. Dent. Res. 48, 938-942.

表題脚注

大阪大学歯学部口腔治療学講座 (主任
横溝一郎教授)

本論文の要旨は昭和48年4月の第46回日本細菌学会総会, 昭和48年5月の第2回日本歯周病学会例会, 昭和49年9月の第16回歯科基礎医学会総会ならびに昭和49年10月の第47回日本生化学会大会において発表した。

第4頁脚注.

*. この研究で主な対象として取り扱った不溶性多糖はいずれもがうす壁に付着する性質を示した。この「粘着性」は、これら不溶性多糖をフロー形成、う蝕や歯周疾患の病理機序との関連で論ずる場合にはきわめて重要な性質である。しかしいちいち不溶性かつ粘着性カルカンと記述するのはおそろおしいので、特に非粘着性と断るない限り、この論文および次の論文で云う不溶性多糖あるいは不溶性カルカンは不溶性かつ粘着性多糖あるいはカルカンを意味するものとしたい。

表1. 各種の口腔レンサ球菌の菌体外酵素によってスクロースより作られた不溶性および可溶性多糖の化学組成および収量

多	糖	血清群 ¹⁾	ヘキソース		グルコース		フルクトース	蛋白質 %	収量 ²⁾ mg
			μmole/mg	%	μmole/mg	%			
不溶性多糖									
<i>S. mutans</i>	AHT	a	4.56	82	2.08	38	+ ³⁾	tr	353
	BHT	b	5.53	100	0	0	+	tr	194
	FA-1	b	5.56	100	5.12	92	-	tr	314
	Ingbritt	c	5.29	95	5.18	93	-	tr	384
	JC-1	c	5.57	100	0	0	+	tr	451
	OMZ 176	d	5.91	107	5.52	99	-	tr	1996
	OMZ 65	d	5.52	99	5.41	97	-	tr	1720
	Streptococcus sp. CHT		4.62	83	2.58	47	+	tr	222
<i>S. sanguis</i> ATCC 10556		5.76	104	5.29	95	-	tr	623	
可溶性多糖 I									
<i>S. mutans</i>	AHT	a	5.48	99	5.46	98	-	tr	114
	BHT	b	5.51	99	5.34	96	-	tr	436
	FA-1	b	5.48	99	5.29	95	-	tr	298
	Ingbritt	c	4.97	90	3.93	71	-	tr	726
	JC-1	c	5.25	95	2.48	45	+	tr	1023
	OMZ 176	d	3.86	69	4.05	73	-	1.7	15
	OMZ 65	d	ND ⁴⁾		ND		ND	ND	tr
<i>S. sanguis</i> ATCC 10556		4.63	83	4.61	83	-	1.5	348	
Streptococcus sp. CHT		5.34	96	3.28	59	+	tr	460	
可溶性多糖 II									
<i>S. mutans</i>	AHT	a	5.29	95	5.53	99	-	1.5	1363
	BHT	b	5.10	92	5.36	96	-	1.5	1472
	FA-1	b	5.64	102	5.61	101	-	tr	1985
	Ingbritt	c	5.54	100	5.36	97	-	tr	3083
	JC-1	c	4.34	78	4.27	77	-	1.0	24
	OMZ 176	d	2.18	39	1.40	25	-	17.15	895
	OMZ 65	d	2.34	42	2.32	42	-	18.33	285
<i>S. sanguis</i> ATCC 10556		ND		ND		ND	ND	tr	
Streptococcus sp. CHT		5.34	96	5.24	94	-	tr	2179	

(1) Bratthall の分類による *S. mutans* の型。

2) 10 L の培地から得られた多糖の収量。

3) フルクトースを含むもの(+), および含まないもの(-)。

4) 収量が非常に低かったため, 構成成分の分析を行なわなかった。

表2. 口腔レンサ球菌の作る不溶性および可溶性多糖の4種のデキストラナーゼ標品に対する感受性

供試多糖	血清群	デキストラナーゼ ⁰				
		Biken	Spicaria	Penicillium (Sigma)	Penicillium (Worthington)	
不溶性多糖						
<i>S. mutans</i> AHT ³⁾	BHT ²⁾	a	176	261	235	224
	FA-1	b	0	0	0	0
	Ingbritt	b	164	192	176	184
	JC-1 ³⁾	c	167	191	177	201
	OMZ 176	c	0	0	0	0
	OMZ 65	d	39	64	47	76
		d	49	66	59	83
<i>S. sanguis</i> ATCC 10556			320	313	290	292
<i>Streptococcus</i> sp. CHT ³⁾			343	375	339	362
可溶性多糖 I						
<i>S. mutans</i> AHT	BHT	a	251	322	292	301
	FA-1	b	316	289	271	284
	Ingbritt	b	353	350	349	335
	JC-1 ³⁾	c	327	339	329	323
	OMZ 176	c	336	312	317	332
	OMZ 65	d	ND	ND	ND	ND
		d	ND	ND	ND	ND
<i>S. sanguis</i> ATCC 10556			490	446	416	434
<i>Streptococcus</i> sp. CHT ³⁾			431	487	420	451
可溶性多糖 II						
<i>S. mutans</i> AHT	BHT	a	671	602	583	534
	FA-1	b	629	584	577	527
	Ingbritt	b	683	572	625	569
	JC-i	c	759	629	621	579
	OMZ 176	c	ND	ND	ND	ND
	OMZ 65	d	768	662	777	636
		d	632	603	606	592
<i>S. sanguis</i> ATCC 10556			ND	ND	ND	ND
<i>Streptococcus</i> sp. CHT			691	619	630	559

1) デキストラナーゼの使用量は、酵素活性測定のための標準系でデキストランT-70から1,000 nmolesの還元糖量を遊離させる酵素量とした。

2) 数値は、5,550 nmolesのグルコース量を含む供試多糖を酵素と37℃で30分間反応させた時に遊離した還元糖量(nmole)である。

3) フルクトン。

4) グルカンとフルクトンの両方を含む。

表3 デキストラナーゼに対する感受性を異にする4種のグルカン中のグルコシド結合のメチル化分析による比較

O-メチル-D-グルコース 結合様式	モル百分率			
	S. mutans		S. sanguis	S. mutans
	OMZ-176	IP*	10556	IP* OMZ-176 WSP**
2,3,4,6-テトラ- Glc _p -(1→	14.6	16.0	18.5	12.6
2,4,6-トリ- →3)-Glc _p -(1→	50.5	25.4	19.3	1.9
2,3,4-トリ- →6)-Glc _p -(1→	20.9	43.2	47.1	73.2
2,4-ジ- →3)-Glc _p -(1→ 6 ↑	14.0	15.4	15.1	12.3

* IP: 不溶性多糖

** WSP: 可溶性多糖II

表4 *S. mutans* OMZ 176株由来の不溶性グルカンおよび緩和Smith分解により生じた解体グルカンのメチル化分析による比較

O-メチル-D-グルコース 結合様式	モル百分率	
	不溶性グルカン	解体グルカン (緩和Smith分解)
2,3,4,6-テトラ- Glc _p -(1→	14.6	trace
2,4,6-トリ- →3)-Glc _p -(1→	50.5	predominant
2,3,4-トリ- →6)-Glc _p -(1→	20.9	0
2,4-ジ- →3)-Glc _p -(1→	14.0	trace

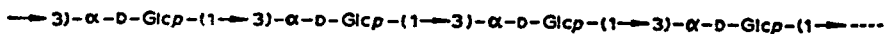
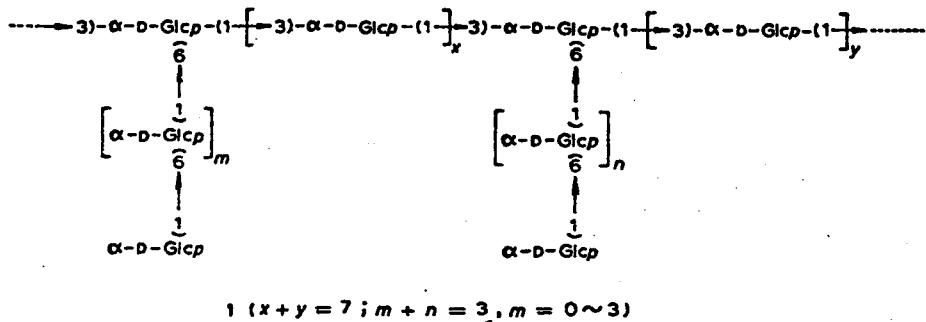
$\begin{matrix} \text{6} \\ \uparrow \end{matrix}$

表5 *S. mutans* OMZ 176株由来の粘着性かつ不溶性
 グルカンと *Spicaria* テキストラナーゼの
 存在下で生成した非粘着性ではあるが
 不溶性のグルカンのメチル化分析によ
 る比較

O-メチル-D-グルコース	結合様式	モル百分率	
		粘着性, 不溶性 グルカン	非粘着性, 不溶性 グルカン
2,3,4,6-テトラ-	Glc _p -(1→	14.6	1.9
2,4,6-トリ-	→3)-Glc _p -(1→	50.5	94.5
2,3,4-トリ-	→6)-Glc _p -(1→	20.9	1.9
2,4-ジ-	→3)-Glc _p -(1→ 6 ↑	14.0	1.7

表 6 *S. mutans* OMZ 176 株由来の不溶性グルカンおよび *Spicaria* デキストラナーゼ処理により生じた解体グルカンのメチル化分析による比較

O-メチル-D-グルコース	結合様式	モル百分率	
		不溶性グルカン	解体グルカン (<i>Spicaria</i> デキストラナーゼ処理)
2,3,4,6-テトラ-	Glc _p -(1→	14.6	5.7
2,4,6-トリ-	→3)-Glc _p -(1→	50.5	81.7
2,3,4-トリ-	→6)-Glc _p -(1→	20.9	7.6
2,4-ジ-	→3)-Glc _p -(1→ 6 ↑	14.0	5.0



2

1 *S. mutans* OMZ 176 株から不溶性グル
 カン(1)とその緩和 Smith 分解によ
 り生じた解体グルカン(2)の推定
 構造

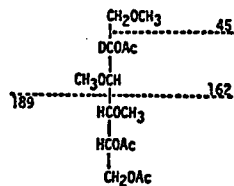
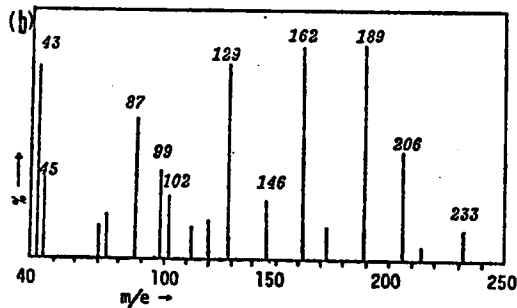
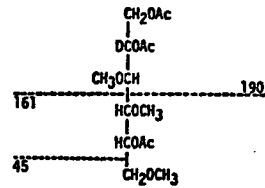
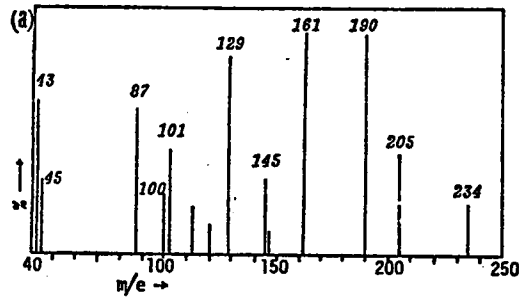


図2 *S. mutans* BHT 株および JC-1 株からの不溶性
 フルクトサン (a), ならびに *S. salivarius* HHT
 株からの水溶性フルクトサン (b) 由来の
 トリ-メチルフルクトースのガス質量
 スペクトル分析結果

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

II. 不溶性グルカン分解酵素の分離,
精製およびその作用

惠比須繁之

(昭和 年 月 日受付)

緒言

少なくとも齧歯類を用いた実験的う蝕の成績によると、*Streptococcus mutans* が歯面に定着、増殖することによりう蝕の第1段階が始まる¹⁾。

この定着現象においては、*S. mutans* がスクロースを基質として作る水に不溶で、かつ粘着性のグルカンとグルカン産生菌の細胞表層に存在するグルカンのレセプター²⁾⁵⁾の両者が必須であると報告されている²⁾⁵⁾。またこの不溶性グルカンは、プラーク (dental plaque, 歯苔, 歯垢) の構築成分としてプラーク形成において重要な役割を果たしている¹⁾⁶⁾。したがって不溶性グルカンの生成を阻害するか、あるいは生成した不溶性グルカンを分解することが出来れば、う蝕発生およびプラーク形成を抑制することが可能であると考えられる。

さて初期の研究において、上述の *S. mutans* の歯面への定着に関与するグルカンは α -1,6 結合を主体とするデキストランであると誤って報

告^{7)~10)}されたため、フローク形成の阻害、また形成されたフロークの除去、さらにはう蝕発生の抑制を目的として、由来を異にする多くのデキストラナーゼ(α -1,6 glucan 6-glucanohydrolase)を用いた *in vitro*^{11)~15)}、*in vivo*^{16)~20)} および臨床実験^{21)~23)}が行なわれた。

*In vitro*の研究から、デキストラナーゼは水溶性グルカンを容易に分解するが、不溶性グルカンは不完全にしか分解できないことが明らかとなった。また *S. mutans* の接種によるう蝕誘発を指標とした動物実験において、デキストラナーゼを実験開始時から飼料および飲料水に添加しておいた場合にはフローク形成やう蝕発生が抑制されるが、いったんフロークが形成された後にデキストラナーゼを投与してもフロークの除去が出来ず、う蝕抑制の目的は十分に果し得ないことがわかった。さらにデキストラナーゼ投与によるヒトのフローク除去効果の試験においても、有望な結果を得るに至らなかった。

最近になって Guggenheim²⁴⁾, Ceska²⁵⁾ および Baird²⁶⁾ は、不溶性グルカンには α -1,3 結合が多量に含まれていることを示した。また著者は前報²⁷⁾において、グルカンが水に溶けない性質を示すのは主鎖のグルコース残基が α -1,3 結合で長く連なっているからであること、また不溶性グルカンが粘着性を示すのは主鎖に α -1,6 結合の側枝が高度に分岐しているためであることを明らかにした。

したがって不溶性グルカンを解体するには、 α -1,6 グルコシド結合に特異性をもつデキストラナーゼのみでは不十分であり、 α -1,3 グルコシド結合を切断する酵素の利用が必要である。しかしながら α -1,3 グルカナーゼは、1969年に Hasegawa²⁸⁾ により *Trichoderma viride* から精製されて以来数種の真菌由来のものが報告^{29)~31)} されているが、それらのうちで *S. mutans* の不溶性グルカンを効率よく分解するのはわずかに Guggenheim と Haller²⁹⁾ が *Trichoderma harzianum* から分離したムタナーゼのみである。

前報²⁷⁾において述べたごとく著者は、9株の口腔レンサ球菌由来の不溶性グルカンの中で *S. mutans* OMZ 176 株からのものが α -1,3 結合を多量に含み、デキストラナーゼの作用を最も受けにくい点に着目し、この OMZ 176 株由来の不溶性グルカンを基質とし得る α -1,3 グルカナーゼの分離を企てた。本論文では、上記グルカンを唯一の炭素源とする増強培養法を利用して α -1,3 グルカナーゼ産生菌を土壌より分離するに至る過程について記し、さらにこの菌が産生する α -1,3 グルカナーゼの精製、酵素学的性状および作用様式について述べるとともに、*S. mutans* の *in vitro* でのフラーク形成に対する作用についても記述する。

材 料 と 方 法

1. グルカン

S. mutans OMZ 176 株および OMZ 65 株がスクロースより作る不溶性および可溶性グルカンの調製法

については前報²⁷⁾で述べた。また OMZ 176 株からの
 グルカンポリアルコールの調製は既報²⁷⁾に従っ
 た。一方 *Aspergillus niger* NRRL 326 株の細胞壁からの α -
 1,3 グルカンの抽出分離は別に報告³²⁾した。

他にデキストラン T-2000 および T-70 (Pharmacia,
 Uppsala, Sweden), パキマン, ラミナランおよび
Leuconostoc mesenteroides NRRL 1355 株が作る水溶性グルカ
 ン³³⁾(この3標品は大阪大学産業科学研究所三
 崎旭博士から恵与された), *Paracoccidioides brasiliensis*
 7193 株の細胞壁からの α -1,3 グルカン³⁴⁾(国立療
 養所刀根山病院, 大阪, 金網文史博士の好意
 により分与を受けた), カードランおよびルテ
 オース(それぞれ大阪大学産業科学研究所原
 田篤也博士および雨村明倫博士より恵与され
 た), 可溶性デンプン(和光純薬, 大阪), お
 よびセルロース(アビセル[®]SF, フナコシ薬品,
 東京)を基質として使用した。

2. 不溶性グルカン分解菌を分離するため

の増強培地

1) 液体培地

Baker と Whiteside の記載³⁵⁾を参考にして *S. mutans* OMZ 176 株からの不溶性グルカン (0.03%) を唯一の炭素源とし、他に $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.1%), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.0005%) および $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.0005%) を含む培地を作り、1%の KH_2PO_4 および K_2HPO_4 溶液を加えて pH を 7.0 に調節して増強用培地とした。

2) 固形平板培地

上記の液体培地に OMZ 176 株由来の不溶性グルカンおよび寒天をそれぞれ 0.2% および 1.2% の割合に加え、固形培地を作製した。

なおりでは不溶性グルカンおよび無機塩類溶液を、2) では不溶性グルカン、無機塩類溶液および寒天液を、別々に高圧滅菌した後、無菌的に混和した。不溶性グルカンは高圧滅菌しても、遊離の還元糖量の増加が認められないことから、グルカンの構造には変化がないものと判断した。

3. デキストラナーゼ

Spicaria violaceae (IFO 6120) が生産する *Spicaria* デキストラナーゼ¹⁵⁾ は塩野義製薬から本学口腔治療学

教室村山洋二博士を経て分与を受けた。

4. エナメル質フロック

ヒトの新鮮抜去永久歯からのエナメル質フロックの調製は竹村の記載³⁶⁾に従った。エナメル質フロックは120℃で20分間高压滅菌して用いた。

5. 不溶性グルカン分解酵素活性の測定

標準測定反応系は次のようである。すなわち、*S. mutans* OMZ 176 株からの不溶性グルカンを0.2%の割合に精製水に懸濁したものの100 μ l, 0.2 Mの酢酸塩緩衝液(pH 6.3) 50 μ l, および適当に稀釈した酵素溶液50 μ lからなる反応液を作り、反応前と37℃で20分間反応させた後に、いずれも10 μ lずつの検体を採取し、還元糖量を測定した。なおこの研究で用いた α -1,3 グルカナゼ(EK-14 酵素)の1単位は、上記の標準測定反応系で1分間に1 nmoleの還元糖量を遊離させる酵素量と定めた。

6. 化学分析

還元糖量および蛋白質の定量法は前報²⁷⁾に記

載した。なお蛋白質量の測定には、他に波長 280 nm での吸光度 (OD 280) をも指標とした。

ペーパークロマトグラフィーは、前報²⁷⁾で述べた(c)の展開溶媒を用いて実施した。

7. SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動は Weber と Osborn の記載³⁷⁾を参考にし行なった。すなわち、6 mm × 8 cm のガラス管を用い、約 40 μg の蛋白質を含んだ 80 μl の供試溶液に、3% SDS, 30% グリセリンおよび 0.006% ブロムフェノールブルーを加えた 0.1 M 磷酸塩緩衝液 (pH 7.2) 40 μl を加えて、よく混ぜたものを前もって固めておいた 7.5% ポリアクリルアミドゲルの上に添加した。電気泳動は、ゲル 1 本当り 8 mA の定電流を通じながら 5 時間行なった。またゲル内の蛋白質はコマジーブリリアントブルーで染色した。

分子量測定のための標準検体として、ウシ血清アルブミン (分子量 67,000; Combithec, C.F. Boehringer

& Soehne GmbH, Mannheim, Germany), 卵白アルブミン(分子量 45,000; Combithec), ウシ脾臓からのキモトリ
フォシ) - ケン A (分子量 25,000; Combithec) および
ウシ心臓からのチトクローム C (分子量 12,500;
Combithec) を用いた。

8. 電気泳動的等電点分画

等電点分画は Vesterverg と Svensson の報告³⁸⁾を参考
にして行なった。すなわち, pH 3-10 のキャリアー
アンフォライン (Ampholine[®], LKB, Rockville, Md., U.S.A.) を使
用し (終末濃度 1%, v/v), グリセリンを用
いて 0 ~ 50% (v/v) の濃度勾配を作った。総量
110 ml のカラム (LKB) に酵素標品を添加し, 始め
は電圧 500 V, 電流 3.0-1.1 A で 14 時間通電し, つ
いで電圧 700 V, 電流 1.5-1.1 A でさらに 24 時間通
電した。カラム温度は 1°C に保ち, 等電点分
画終了後, 1 ml ずつのフラクションを採取した。
各フラクションは pH および OD 280 を測定した後,
精製水に対して透析し, 透析内液について不
溶性カルカン分解酵素活性を測定した。

9. メチル化分析

S. mutans OMZ 176 株由来の不溶性グルカンを酵素で処理した後にも不溶性の画分にとどまる解体グルカンは、前報²⁷⁾に記載した方法によってメチル化分析を行なった。

10. 走査型電子顕微鏡観察のための試料作製と鏡検

In vitro での *S. mutans* の歯面への定着あるいは *S. mutans* により形成されたプラーク (bacterial plaque 以下プラークとする) に対する酵素の作用を調べるために結果7の項で後述するような処理を施したエナメル質ブロックは、終末濃度 0.1 M の塩化ナトリウムを溶かした 0.2 M 磷酸塩緩衝液 (pH 7.0) の存在下で、2.5% カルタルアルデヒドにより4時間固定した³⁹⁾ 後、精製水で十分に洗滌し、乾燥した。このエナメル質ブロックに 200 Å の厚さで金蒸着を施し、走査型電子顕微鏡 P-15 型、日本電子、東京) で観察した。

成績

1. *S. mutans* 由来の不溶性グルカンを分解する微生物の分離

α -1,3 結合を多量に含んだ *S. mutans* OMZ 176 株由来の不溶性グルカンを唯一の炭素源として、 α -1,3 結合を切断する酵素を産生する菌の分離を試みた。すなわち、前述の増強培養用の液体培地それぞれ 3 ml に、各地より集めた 16 種の土壌標品の 0.5 g を接種し、28℃で 10 日間培養した。培養の 0.1 ml を新しい液体培地に接種し、前と同様に培養した。この継代操作を 4 ヶ月間、12 回くり返した後、それぞれの培養を 0.2% の割合に不溶性グルカンを加えて白濁させた固形平板培地に塗抹し、28℃で数日培養した。その結果、図 1 に示すように、不溶性グルカンを分解し、周囲に明瞭な溶解帯を示す集落の出現が認められた。

図 1

溶解帯が明瞭な孤立集落を釣菌して Trypticase

soy 寒天斜面培地 (Baltimore Biological Laboratories, Cockeysville, Md., U.S.A.) に接種し、純培養を得、EK-14 菌と名づけた。この菌は上記斜面培地に継代する一方、凍結乾燥して保存した。

2. EK-14 菌の細菌学的基本性状

EK-14 菌は無芽胞、非運動性のグラム陰性小桿菌である。巾 $0.5-0.7 \mu\text{m}$ 、長さ $1.5-4.0 \mu\text{m}$ で、やや多形性を示す。普通寒天平板培養では正円形、半球状または露滴状で、表面が滑らかで光沢があり、不透明で粘稠性を示す集落を作る。また黄色非拡散性色素を生成する。

EK-14 菌の分離、同定にあたって参考される生理学的性質は次のようである。通性嫌気性で、リトマスミルクを微酸性に変える。インドールを生成せず、硝酸銀を還元せず、尿素を分解せず、硫化水素も生成しない。カタラーゼおよびオキシダーゼテストはいずれも陽性、メチルレッドテスト陰性、Voges-Proskauer テスト陽性。クエン酸を炭素源として利用せず、

アルギニン非分解, グルコン酸を酸化しない。
 次に示した糖を分解し, 酸を産生する (いかなる場合にもガスは作らない) : アラビノース, キシロース, グルコース, マンノース, ガラクトース, フルクトース, マルトース, スクロース, およびラクトース。次の糖および糖アルコールは分解しない : ラムノース, トレハロース, アドニット, マンニット, ソルビット, スルシット, イノシット, およびサリシン。

以上の性状やテストの結果を Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (第8版) の記載に照合したところ, EK-14 菌は *Flavobacterium* に属することが明らかになった。

3. α -1,3 グルカナターゼの生産

予備実験の結果, EK-14 菌はインデューサーとして不溶性グルカンを追加しなくても, このグルカンを分解する酵素を生産することがわかった。そこで EK-14 菌を Trypticase soy ブロス 10 ml

に接種し、28℃で24時間培養した後、この培養の全体を100 mlの同培地に接種し、25℃で16時間振盪培養して増菌した。このようにして得た前培養の110 mlを7 lの Trypticase soy ブロス を容れた10 l容のシェーカーメンターに接種し、毎分350回の回転数で攪拌するとともに、1分間に2000 mlの滅菌空気を送りつつ、25℃で培養した。この時のEK-14菌の発育曲線と不溶性グルカン分解酵素活性（測定の結果 α -1,3 グルカナーゼ活性）を図2に示した。

図 2

24時間の培養で酵素活性が最大に達することがわかったので、以後上記の条件でEK-14菌培養を反復し、その10,000 gの遠心上清の形で30 lの粗酵素画分を得、凍結保存した。

4. α -1,3 グルカナーゼの精製

α -1,3 グルカナーゼの精製操作はすべて4℃以下で行なった。上記の粗酵素液を硫酸70%飽和で塩析し、6,500 gで20分間の遠心沈渣を精

製水に溶解し、精製水に対して透析した。ついで透析内液 (500 ml) を分画分子量 10,000 dalton のダイアフィルター G-10 T (バイオエンジニアリング, 東京) を用い、 2 Kg/cm^2 の窒素圧の下で限外濾過することにより濃縮 (109 ml) した後、0.05 M の磷酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) に対して再び透析した。得られた透析内液は、0.05 M 磷酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) と平衡化した DE 32 (Whatman Biochemicals, Kent, England) のカラム ($3.5 \times 40 \text{ cm}$) に添加し、同緩衝液で溶出した (流速は毎分 1 ml)。10 ml ずつ分画したフラクションについて OMZ 176 株由来の不溶性グルカン分解酵素活性および蛋白質量を測定した。濃縮酵素画分中の暗褐色の着色物質はすべてカラムに吸着され、表 1 に示すように、酵素活性は約 80% の収率で無色の溶出液中に認められた。この DE 32 カラムによる negative adsorption によって、蛋白質当りの比活性の上昇はクロマト前の濃縮液に対して約 15 倍であった (表 1)。

DE 32 フラクション中の活性部分を集め (156

ml), 0.05 M の 磷酸ニ水素カリウム (pH 4.3) に対して透析したものをダイアフルタ-G-10 T を通して濃縮した (50 ml)。次にこの DE 画分を 0.05 M 磷酸ニ水素カリウム (pH 4.3) と平衡化した CM 32 (Whatman Biochemicals) のカラム (3 × 15 cm) に添加し, カラムをまず 200 ml の 0.05 M 磷酸ニ水素カリウム (pH 4.3) で洗った後, この溶液と 0.5 M 磷酸カリウム緩衝液 (pH 8.0) との間の pH およびイオン濃度勾配による溶出を行なった。流出速度は 1 ml/分とし, 10 ml ずつのフラクションを集め, OD 280, pH および不溶性グルカン分解酵素活性を測定した。

図 3

図 3 に示したように, 酵素活性は主として pH 6.0, 0.08 M の緩衝液によって溶出されるピーク画分に認められた。この画分の蛋白質当りの酵素活性 (比活性) は培養上清のそれの約 160 倍で, 収率は 38% であった。以上の酵素 (以下 EK-14 酵素) の濃縮と精製のフローセスを表 1 にまとめて示した。

表 1

5. EK-14 酵素の性状

1) 酵素蛋白質としての性状

最終精製酵素標品 (EK-14 酵素) の純度を検定する目的で、約 40 μ g の酵素標品を用いて SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行ない、コマジューブリリアントブルーで染色した。図 4 に示すように 1 本のバンドのみが検出された。

図 4

EK-14 酵素の分子量を、Weber と Osborn の記載³⁾に従い、標準として分子量既知の 4 標品を用い SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行なうことにより測定した。図 5 に示すように、供試酵素蛋白質の分子量は、この方法では約 65,000 dalton と算出された。

DE32 酵素画分を供試して行なった 図 5

電気泳動的等電点分画法による測定の結果、EK-14 酵素は pH 8.5 に等電点を有する塩基性蛋白質

質であることがわかった。もっともアンフラインを用いた等電点分画実験では、酵素活性の収量が非常に低く、この方法で酵素をより一層精製することはできなかつた。

2) 基本的性状

図6のaのように、EK-14酵素の作用の至適pHは6.3付近であるが、pH8でもかなりの活性が認められた。

イオン強度が0.004-0.254となるように、所要量の食塩を添加した酵素活性の標準測定系を作り、イオン強度が酵素活性におよぼす影響を検討した(図6のb)。上記範囲内では、イオン強度の酵素活性に対する影響はほとんど認められなかつた。

反応系の温度がEK-14酵素の作用におよぼす影響を調べた(図6のc)。20分間の反応では、40℃付近でもっとも活性が強かつた。

EK-14酵素はpH6.3、イオン強度0.05の系での60℃、30分間の加熱により、ほぼ完全に失活した(図6のd)。

図 6

種々の金属イオン、エチレンジアミン四酢酸ナトリウム (EDTA) およびヨウドアセトアミドがEK-14酵素活性におよぼす影響を標準測定系において調べた。表2に示すように、酵素活性を高めるものは調べたかぎりでは無く、 Ag^+ 、 Hg^{++} および Pb^{++} は酵素活性を強く阻害した。

表 2

6. EK-14 酵素の基質特異性および作用様式

EK-14 酵素の基質特異性を調べるために、表3に示すような種々のカルカンにEK-14酵素を標準測定系で作用させ、遊離する還元糖量を測定した。その各種カルカンに対する分解作用は、供試カルカンに作用して遊離する還元糖量とEK-14酵素の本来の基質であるOMZ 176株由来の不溶性カルカンから遊離する還元糖量に対する相対%で表わした。

表 3

EK-14 酵素は、主な結合が α -1,3 結合であるク

ルカン, すなわち *S. mutans* OMZ 176 株および OMZ 65 株
が作る不溶性グルカン, また *P. brasiliensis* およ
び *A. niger* の細胞壁由来の α -1,3 グルカンを分解
するが, α -1,3 結合を含んでいない他のグルカ
ンには作用しなかった。なお α -1,3 結合および
 α -1,3 分岐結合を43%含んでいる *L. mesenteroides* の
1355 グルカンは, ほとんど EK-14 酵素による分解
作用を受けなかった。

EK-14 酵素がエンド型あるいはエキリ型のい
ずれの型式で α -1,3 グルコシド結合を開裂する
かを調べるため, OMZ 176 株からの不溶性グルカ
ンおよびこのグルカン由来のグルカンポリア
ルコールに EK-14 酵素を作用させた。ちなみに
前報²¹⁾で報告したように, このグルカンポリア
ルコールは α -1,6 結合鎖および非還元性末端に
位置するグルコース残基が開環しており, α -
1,3 結合鎖および α -1,3 と α -1,6 の分岐点に位置す
るグルコース残基はもとの不溶性グルカンと
比べて変化していない。つまり供試酵素がエ
キリ型であれば, 不溶性グルカンに対してと

は異なり、グルカンポリアルコールからは還元基を遊離しないし、エンド型であれば両者ともに分解作用を示すはずである。

EK-14 酵素を両者に 1 時間におたつて作用させ、10 分間隔にその還元基の遊離を測定した結果、不溶性グルカンとグルカンポリアルコールはまったく同じ反応率で分解されることがわかった。この所見から、EK-14 酵素はエンド型に α -1,3 結合を開裂することが明らかになった。

EK-14 酵素の OMZ 176 株由来の不溶性グルカンに対する作用様式を調べる目的で、50 mg の不溶性グルカンと 462 単位の EK-14 酵素を 10.5 ml の 0.05 M 酢酸塩緩衝液 (pH 6.3) 中で、37℃ で 24 時間反応させた。31.3 μ moles (1 mg のグルカン当り 626 nmoles) の還元基が遊離したが、これは基質として用いた不溶性グルカンが全部グルコースになったと計算した時の 11.3% にあたる。

反応液を 20,000 g で 25 分間遠心し、可溶画分と不溶画分を分離した。不溶画分は精製水で

洗滌し、凍結乾燥した後、重さを測定した。
 不溶画分の重量は25.5mgであり、もとのガルカ
 ンの約半分が可溶化された。可溶画分はAmberlite
 (Rohm and Hass, Phila., U.S.A.) の IR-120 (H⁺型) および IR-
 45 (OH⁻型) を充填した小カラム (1×6 cm)
 を通して脱塩した後、ペーパークロマトグラ
 フーにより分解生成糖を同定した。その結果、
 3つの主要生成糖の Rf 値は、標準としたイソ
 マルトース、ニゲロースおよびニゲロトリオ
 ースにそれぞれ一致した。その他に、現在ま
 でのところ未同定の数種のオリゴ糖が少量な
 がら検出された。

一方酵素分解により生じた不溶性の解体ガ
 ルカンは、箱守法でメチル化し、水解後、ガ
 スクロマトグラフーで分析した。表4に示し
 たように解体ガルカンはもとのガルカんに比
 べて α -1,3 結合部が減少していた。

表 4

解体ガルカンは α -1,3 結合と α -1,6 結合の分岐結
 合を中心として構成されていることから、精

製した Ek-14 酵素は，前報²⁷⁾で述べた部分精製の *Spicaria* デキストラナーゼとは異なり，1,3 結合と 1,6 結合の分岐点を切断する活性を含まないことがわかった。また上述の基質特異性を調べた実験成績とあわせて考えると，Ek-14 酵素は α -1,3 結合鎖のみを特異的に切断していると考えられる。なお不溶性の解体グルカンは，もとの不溶性グルカンと同様 20,000 g で 25 分間の遠心により沈澱したが，水中での超音波処理によつてもとの不溶性グルカンよりも容易に透明化できる点で異なっていた。

7. *S. mutans* の歯面への定着および *S. mutans* が形成したプラークに対する Ek-14 酵素の作用

S. mutans が歯面に定着することによりう蝕の第 1 段階が始まることが，少なくとも齧歯類での実験で明らかにされている。そこで *in vitro* での，*S. mutans* の歯面への定着，および定着した *S. mutans* により抜去歯牙上に形成されたプラ

一 (bacterial plaque) に対する EK-14 酵素の作用を、本酵素単独あるいは主に 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て検討した。供試菌には、菌が定着するのに最も重要な役割を果す不溶性グルカンの生成量が多く、また本学口腔細菌学教室の浜田らにより行なわれた動物実験で、Sprague Dawley ラットにう蝕を誘発することが再確認されている *S. mutans* OMZ 176 株を用いた。ちなみに結果の試験では、両酵素を径 $0.45 \mu\text{m}$ のミリポアフィルター (Millipore Co., Bedford, Massachusetts, U.S.A.) で濾過滅菌した。

1) *S. mutans* の歯面への定着に対する EK-14 酵素の作用

6.6% Trypticase soy ブロス 2.5 ml, 30% スクロース溶液 1.0 ml および 616 単位の EK-14 酵素溶液 2.0 ml を加えて作製した総量 5.5 ml の培養液に、Trypticase soy ブロスに 1 夜培養した *S. mutans* OMZ 176 株の培養液 0.5 ml を接種し、これにエナメル質ブロックを無菌的に浸漬して、 37°C で培養した。対照

としては、EK-14 酵素溶液のかわりに同容の滅菌水を加えたものを供した。この両者を8時間培養した後、精製水で洗滌し、固定処理を行なって走査型電顕観察試料とした。

図 7

酵素を加えなかった対照では、エナメル質表面が不溶性グルカンの厚い層に覆われ、菌体はその中に埋没した像が観られる(図7のa)。これに対してEK-14 酵素の存在下では、菌による不溶性グルカンの生成は認められず、エナメル質表面にはOMZ 176 株がいわば「裸」の状態でレンサ状に認められるのみである(図7のb)。

2) *In vitro* で *S. mutans* がエナメル質表面に形成したプラークに対するEK-14 酵素の作用

EK-14 酵素がその単独作用、あるいは *Spicaria* デキストラナーゼとの併用により、エナメル質プラーク上に形成されたプラークを除去し、あるいは除去されやすい状態にするかどうかを検討した。すなわち5.5 ml の5%スクロース

加 Trypticase soy フロースに, Trypticase soy フロースに 1 夜培養した *S. mutans* OMZ 176 株の培養液 0.5 ml を接種し, 37 °C で 14 時間培養した。このようにしてエナメル質表面にあらかじめフロークを形成させたブロック 4 個を, (1) 0.1 M の滅菌酢酸塩緩衝液 (pH 6.3), (2) 231 単位/ml の割合に EK-14 酵素を含む 0.1 M の滅菌酢酸塩緩衝液, (3) 116 単位の EK-14 酵素および 66 単位^{*}の *Spicaria* テキストラーゼをそれぞれ 1 ml 当りに含む 0.1 M の滅菌酢酸塩緩衝液 (pH 6.3), (4) 132 単位/ml の *Spicaria* テキストラーゼを含む 0.1 M の滅菌酢酸塩緩衝液 (pH 6.3) にそれぞれ懸垂し, 1 時間に 1 度, 静かに振盪しながら 37 °C で 6 時間インキュベートした。

このように操作したエナメル質表面を走査型電子顕微鏡によって観察した結果, 対照として緩衝液中でインキュベートしたエナメル質表面は, フロークの一部が物理的にはがれただけで, 大部のフロークが層状に残留している (図 8 の 2) のに対し, EK-14 酵素を単独で

作用させたものでは、フロークの一部が残っているが、かなりの部分で不溶性グルカンの脱落が観られ、レニサ状に連なった供試菌が「裸」の状態に認められた(図8のb)。さらに α -1,3 グルカナーゼであるEK-14酵素と α -1,6 グルカナーゼが主体である *Spicaria* デキストラナーゼの両酵素を併用して作用させた場合には、不溶性グルカンの残存がまったく認められず、脱落をまぬがれた菌体がところどころに認められるだけであつた(ちなみに図8のcはエナメル質ブロック上で菌の残存が多く認められた個所を特に選んで写したものである)。なお *Spicaria* デキストラナーゼのみを作用させた場合には、フローク表面の不溶性グルカンははがれ、菌体の輪郭がある程度明らかになつたが、厚みをもつたフロークの深部には酵素が作用しないようで、歯面にはかなりのフロークが残存してゐた(図8のd)。

図 8

考 察

S. mutans がスクロースを基質として作る不溶性グルカンはフローリ形成および腐敗生において重要な役割を果たしている¹⁾。この不溶性グルカンは α -1,3結合を主体としており、この結合はデキストラナーゼによって切断されない。

本研究では α -1,3グルコシド結合を開裂する酵素を土壌菌の産物に求め、*S. mutans* OMZ 176株から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った。ついでこの菌の培養上清から硫酸塩析、限外濾過、DE 32およびCM 32カラムクロマトグラフにより、比活性が培養上清のその約160倍に上昇した精製酵素(EK-14酵素)を得た。

EK-14酵素は基質特異性からみて α -1,3グルカナーゼであることが証明されたが、精製の中間段階において α -1,3グルカナーゼ活性に加え

て、 β -1,3 グルカンであるパキマン、ラビナランおよびカードランに対する活性が混在していた。この β -1,3 グルカンに対する活性は DE 32 カラムクロマトグラフ—後に認められたが、CM 32 カラムクロマトグラフ—によって β -1,3 グルカナーゼ活性を除くことができた。

Guggenheim と Haller²⁹⁾ が *T. harzianum* の培養上清から硫酸塩析、ゲル濾過および等電点分画により精製した α -1,3 グルカナーゼ(ムタナーゼ)の最終標品には β -1,3 結合のラビナランを分解する活性がみられた。彼らは「基質の立体配位が酵素活性を限定する因子に在るないのは予想外のことである」と述べ、さらに「酵素が不溶性の基質に作用する能力は、基質の結合のタイプよりも三次元構造に依るのである」と説明している。しかしこの点については本研究において、 α -1,3 グルコシド結合と β -1,3 グルコシド結合を切断する活性は、それぞれ別個の酵素蛋白質に担われていることが明確にされた。

EK-14 酵素は連続した α -1,3 結合鎖を有してい

るグルカン, すなわち *S. mutans* OMZ 176 株および OMZ 65 株からの不溶性グルカン, *A. niger* および *P. brasiliensis* の細胞壁からの α -1,3 グルカンに作用した。しかし, α -1,3 グルコシド結合が4つ以上連続した個所が無く³³⁾, α -1,6 結合と α -1,3 結合が交互に連なっている⁴⁰⁾ ことが証明されている。*L. mesenteroides* の 1355 グルカンは, α -1,3 結合の含量が多いにも関わらずほとんど分解されなかった。この事実は, EK-14 酵素が酵素基質複合体を形成するには, グルコース残基が少なくとも4つ以上 α -1,3 結合で連続した構造が基質として必要であることを示唆している。

α -1,3 グルカナターゼの研究は, Hasegawa²⁸⁾ が *T. viride* の培養上清から硫酸塩析, Sephadex G-150 によるゲル濾過, DEAE-および SE-Sephadex カラムクロマトグラフにより初めて α -1,3 グルカナターゼを精製して以来, *T. harzianum*²⁴⁾, *Cladosporium resinae*³⁰⁾ および *Aspergillus nidulans*³¹⁾ からのものが報告されている。これらの真菌由来の α -1,3 グルカナターゼに対し, EK-14 酵素は細菌由来であり, その等電点, 分

子量, 至適pH, 作用pH域, 至適温度, 安定性, グルカンの分解様式, あるいは不溶性グルカン分解能などの酵素学的性状においてかなり異なっている。

T. viride からの酵素²⁸⁾はエンド型であり, α -1,3 グルカナーゼの産生にはインデューサーとして α -1,3 グルカン を培養基に加えることが必要である。分子量が約 47,000 dalton であるこの酵素の至適作用 pH は 4.5 で, pH 7 では活性が pH 4.5 の約 1/4 に低下した。しかし Guggenheim²⁹⁾ および Reese³⁰⁾ の報告では, この菌は α -1,3 グルカナーゼを産生しないとされた。

T. harzianum からの α -1,3 グルカナーゼ (ムタナーゼ)²⁹⁾ はエンド型であるが, 酵素の産生にインデューサーとして α -1,3 グルカンが必要である。この酵素の等電点は pH 7.1, 至適作用 pH は 6.0 で, pH 7 ではその活性が pH 6 の 1/2 に低下した。

Guggenheim²⁹⁾ は, このムタナーゼおよび *Penicillium funiculosum* からの テキストラナーゼが Osborn Mender ラットを用いた実験う蝕におよぼす影響を調べ

た。その結果によれば、ムタナーゼは普通飼育ラットでも gnotobioticラットでも明確なう蝕抑制効果を示したが、デキストラナーゼはほとんど抑制作用を示さなかった。ちなみにこの実験では、*S. mutans* を連続して3日間接種して歯面に定着させた後、酵素を実験終了時まで連続投与した。

Reese³⁰⁾により *C. resinae* の培養上清からアセトン沈澱および DEAE-Sephadex カラムクロマトグラフィーにより精製されたエンド型の α -1,3 グルカナーゼは、構成酵素で、その至適作用 pH は 4.5、pH 7 では酵素活性が認められなかった。またこの酵素は *S. mutans* の不溶性グルカンに対する分解能力が低く、*A. niger* の α -1,3 グルカン基質とした場合の 1/100 の活性しか示さなかった。

Zonneveld³¹⁾ により *A. nidulans* の菌体抽出液からアセトン沈澱および Sephadex G-100 によるゲル濾過により精製された α -1,3 グルカナーゼは構成酵素で、 α -1,3 グルカンをエキソ型に切断する。この酵素の分子量は約 36,000 dalton、至適作用 pH は 5.5 で、

pH 7 でも pH 5.5 の約 5% の活性を保っていた。この酵素画分は他に β -1,3 結合のラビナランおよび α -1,4 結合の可溶性デンプンに対する分解酵素活性を少量含んでいた。Kelstrup⁴²⁾ は、この *A. nidulans* からのエキソ α -1,3 ガルカナラーゼの作用によって、口腔レンサ球菌の定着阻止あるいはプラークが除去されるか否かを *in vivo* で検討した。その結果、口腔レンサ球菌、中でも *S. mutans* の定着が抑制されることを認めた。しかし、すでに形成されたプラークはほとんど除去されなかった。この結果に関して彼らは、プラークには多くの微生物が存在し、それぞれが様々な様式でプラークを形成しているので、不溶性ガルカンのみを分解してもプラーク除去という目的が果せないのであろうと考察している。

前報²⁹⁾ で述べた著者の研究で明らかとなったように、不溶性ガルカンでは α -1,3 結合は主鎖に存在し、非還元性末端を含む側鎖には α -1,6 結合が位置している。したがってエキソ型の

α -1,3 グルカナーゼの作用によつては、不溶性グルカンの生合成は抑制し得るかもしれないが、形成された不溶性グルカンを分解することはできない。つまり上記の研究はエンド型の α -1,3 グルカナーゼを用いて再検討されるべきであろう。

上記の4酵素の他に、*Streptomyces* sp.⁴³⁾, *Penicillium*
³⁰⁾ *funiculosum*, *P. wortmanni*, ³⁰⁾ *P. vermiculatum*, ³⁰⁾ *Spicaria violacea*,
³⁰⁾ *Chloridium viride*, ⁴⁴⁾ *Streptomyces werraensis* および ⁴⁴⁾ *chartreusis*

の培養上清に α -1,3 グルカンを切断する活性が存在することが報告されている。しかしこれらの活性因子は精製されておらず、したがって性状についても未知である。

以上述べたように、現在までに精製された α -1,3 グルカナーゼはその酵素蛋白質としての性質および作用様式がいずれも互に異なるので、グルカンの構造研究、あるいは α -1,3 グルカンを構築単位として有する真菌細胞壁の研究にとって有用な武器になるものと考えられる。しかし口腔レンサ球菌、特に *S. mutans* の作る不

溶性グルカンに明確な分解作用を示すのは、Guggenheim と Haller²⁹⁾ が *T. harzianum* から分離したムタナーゼと著者が *Flavobacterium*, sp. から分離した EK-14 酵素のみである。両酵素はその産生菌を異にするだけでなく、前に述べたように等電点、最適 pH、作用 pH 域などを異にする別個の酵素蛋白質であるが、EK-14 酵素の産生にはインデューガーを必要としない点でこの酵素はムタナーゼより優れていると云えよう。

EK-14 酵素の歯科領域への応用のひとつとして、*S. mutans* の歯面への定着ならびに形成されたプラークに対する作用を走査型電子顕微鏡によって観察した。EK-14 酵素の存在下では *S. mutans* の歯面への定着が抑制されたが、これは α -1,3 グルコシド結合がある一定の長さになると EK-14 酵素によって切断されるので、 α -1,3 グルコシド結合を主鎖とする不溶性グルカンの生成が完了できないためと考えられる。

S. mutans により形成されたプラークに対する作用を調べた実験において、EK-14 酵素を作用

させたエナムル質ブロックは一部に不溶性グルカンを残っていたが、視野のかなりの部分では不溶性グルカンを脱落し、わずかな菌体がいわば「裸」に認められた(図8のb)。結果6の項で示したように、EK-14酵素の作用によりOMZ 176株の不溶性グルカンは、重量を基準にすれば約半分しか可溶化されないにも拘らず、走査電顕で観察した結果7の実験では不溶性グルカンを脱落して多くの個所が観じられた。これは、Ceska⁵²⁴⁾も述べているように α -1,3結合が α -グルカンの骨格をなすものであり、この結合がエンド型に切断されると、不溶性グルカンは歯面から脱落し易くなるのである。

一方デキストラナーゼ単独の作用ではフローラを除去することができなかつた。しかし図8のdの写真のように、*Spicaria* デキストラナーゼの作用によりフローラ表層部分の不溶性グルカンははずれて、菌体の輪郭がある程度明らかになるのが観察された。これは、不

溶性グルカンの粘着性に関与している α -1,6 結合鎖が切断されたためと考えられる。

最後に図8のcに示したように、EK-14 酵素と *Spicaria* デキストラナーゼとを併用して作用させれば、フローは完全に歯面から脱落し、ごくわずかの菌体を認めるのみであった。この結果は不溶性グルカンの化学構造から考えて予期される通りであり、フローの除去および歯蝕発生の抑制という目的のためにグルカナーゼを用いる場合には、 α -1,3 結合と α -1,6 結合を切断する両酵素を併用するのが最も効果的であることを示す所見といえることができる。

総 括

1. *S. mutans* がスクロースより作る不溶性グルカンを分解する酵素を産生する菌を、増強培養法により土壌から分離した。この菌、EK-14 菌はその細菌学的性状から *Flavobacterium* に属す

ることがわかった。

2. EK-14 菌を Trypticase soy ブロスに接種し、25℃で通気振盪培養した際、インデューサーとして不溶性グルカンを経験基に加えなくても、不溶性グルカン分解酵素活性が培養液中に現われた。

3. この培養上清から、不溶性グルカン分解酵素 (α -1,3 グルカンナーゼ) を硫酸塩析および限外濾過による濃縮、DE 32 カラムクロマトグラフィーによる negative adsorption、^{なごび} _{勾配} に CM 32 カラムを用いた pH およびイオン濃度による溶出により精製した。最終酵素標品 (EK-14 酵素) の比活性は、培養上清のそれの約 160 倍、回収率は 38% であった。

4. EK-14 酵素は、pH 8.5 に等電点をもち塩基性蛋白質で、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 dalton であった。至適作用 pH は 6.3、20 分間の反応では 40℃付近で最大活性を示した。酵素活性はイオン強度による影響をほとんど受けず、60℃、30 分間

の加熱によりほぼ失活した。また調べた限りでは、酵素活性を増加させる金属イオンは存在せず、 Ag^+ 、 Hg^{++} 、および Pb^{++} は酵素活性を強く阻害した。

5. EK-14 酵素はエンド型に α -1,3 グルコシド結合を切断し、 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かった。

S. mutans OMZ 176 株由来の不溶性グルカンはEK-14 酵素の作用により、その重量の半分が水溶性となり、主な分解産物はニゲロース、イソマルトースおよびニゲロトリオースであった。また酵素分解により生じた不溶性の解体グルカンの構造研究より、EK-14 酵素は不溶性グルカン主鎖内部の α -1,3 結合のみを特異的に切断し、1,3 結合と 1,6 結合の分岐点には作用しないことがわかった。

6. EK-14 酵素は、*S. mutans* がスクロースの存在下で歯牙表面に定着するのを抑制した。またスクロースの存在下で *S. mutans* により形成されたフローラは、EK-14 酵素あるいは主に α -1,6

グルカナーゼとして作用する *Spicaria* デキスト
ラナーゼ単独では完全には除去し得なかった
が、両酵素を併用することにより、ほぼ完全
に除去することができた。

稿を終えるにあたり、ご指導、ご鞭撻を賜
はった口腔治療学講座横溝一郎教授、ならび
に、本研究課題をよえられ、ご指導、ご校閲
を賜はった口腔細菌学講座小谷尚三教授に深
く感謝いたします。

なお研究計画の立案と実験の実施にあたっ
て、終始ひとかたならぬご指導とご助言をい
ただいた口腔細菌学講座加藤慶二郎助教授、
多糖の構造研究に際し、細部にあたってご教
示とご協力を下さった大阪市立大学三崎旭教
授（当時大阪大学産業科学研究所）に厚くお
礼を申し上げます。

また本研究に際して種々のご援助を頂いた
口腔治療学講座村山洋二講師、口腔細菌学講

座杉中秀寿講師をはじめ、口腔治療学教室、
口腔細菌学教室および大阪大学産業科学研究
所生合成部門（主任 原田篤也教授）の諸氏
に感謝いたします。

STUDIES ON THE STRUCTURE OF POLYSACCHARIDES (GLUCANS AND FRUCTANS)
PRODUCED BY CARIOGENIC STREPTOCOCCI AND ON AN ENZYME HYDROLYZING
THE INSOLUBLE GLUCAN. II. ISOLATION, PURIFICATION, AND PROPERTIES
OF THE ENZYME HYDROLYZING THE INSOLUBLE GLUCAN.

Shigeyuki EBISU

*Department of Oral Medicine, Osaka University Dental
School, 32-Joancho, Kitaku, Osaka, Japan.*

An attempt was made to isolate bacteria capable of degrading the dextranase-resistant glucans by enrichment culture method, using OMZ 176 glucan as the sole carbon source. An organism was isolated that produced colonies surrounded by a clear zone on opaque agar plates containing OMZ 176 glucan. The organism was identified as a strain of *Flavobacterium* and named the EK-14 bacterium.

When the EK-14 bacterium was grown in Trypticase soy broth, an enzyme capable of hydrolyzing the OMZ 176 glucan was produced in the culture supernatant without α -1,3 glucan as an inducer.

The enzyme was concentrated by saturation with ammonium sulfate and ultrafiltration, and purified by negative adsorption on a diethylaminoethyl cellulose (DE 32) column and gradient elution chromatography with a carboxymethyl cellulose (CM 32) column. About a 160-fold increase in the specific activity of purified enzyme (EK-14 enzyme) was achieved with a yield of 38%.

The EK-14 enzyme was a basic protein with an isoelectric point of pH 8.5 and molecular weight of 65,000. Its optimum pH was 6.3 and

its optimal temperature was about 40 C. The enzyme activity was scarcely affected by a change in the ionic strength between 0.004 to 0.254. None of the metal ions tested potentiated the enzyme activity, and Ag^+ , Hg^{2+} , and Pb^{2+} were strongly inhibitory.

The EK-14 enzyme split the α -1,3 glucan endolytically and was inactive towards glucans containing α -1,4, α -1,6, β -1,3, β -1,4, and/or β -1,6 bonds as the main linkages. The enzyme released 11% of the total glucose residues of the OMZ 176 glucan as reducing sugars and solubilized about half of the substrate glucan. The soluble products were found to be nigerose, isomaltose, and nigerotriose, with some oligosaccharides. The methylation studies on the insoluble product showed that the EK-14 enzyme attacked only α -1,3 glucosidic linkages in the main chain of the OMZ 176 glucan, but was inactive at these (α -1,3 glucosidic) linkages which directly adjoin branching points.

The *in vitro* effects of the EK-14 enzyme on the adherence of *Streptococcus mutans* to tooth surface and on plaque formed by *S. mutans* in the presence of sucrose were evaluated by scanning electron microscopy. In the presence of the EK-14 enzyme, *S. mutans* was not able to adhere to the teeth and produce insoluble polysaccharides. The plaque once formed by *S. mutans* in the presence of sucrose was not completely removed by either EK-14 enzyme nor *Spicaria* dextranase when applied separately, but when applied together they affected complete removal of the plaque.

文 献

- 1) 来田茂幸, 小谷尚三 (1973) : 齧蝕と細菌(上)(下). 歯界展望41, 56-62, 227-234, 昭和48.
- 2) Mukasa, H., and Slade, H. D. (1973): Mechanism of adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces. I. Roles of insoluble dextran-levan synthetase enzymes and cell wall polysaccharide antigen in plaque formation. *Infect. Immun.* 8, 555-562.
- 3) Freedman, M. L., and Tanzer, J. M. (1974): Dissociation of plaque formation from glucan-induced agglutination in mutants of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 10, 189-196.
- 4) Tanzer, J. M., Freedman, M. L., Fitzgerald, R. J., and Larson, R. L. (1974): Diminished virulence of glucan synthesis-defective mutants of *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 10, 197-203.
- 5) Mukasa, H., and Slade, H. D. (1974): Mechanism of adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces. II. Nature of the binding site and adsorption of dextran-levan synthetase enzymes on the cell-wall surface of streptococcus. *Infect. Immun.* 9, 419-429.
- 6) Guggenheim, B. (1970): Extracellular polysaccharides and microbial plaque. *Int. Dent. J.* 20, 657-678.

- 7) Gibbons, R. J., and Banghart, S. S. S. (1967): Synthesis of extracellular dextran by cariogenic bacteria and its presence in human dental plaque. Arch. Oral Biol. 12, 11-24.
- 8) Critchley, P., Wood, J. M., Saxton, C. A., and Leach, S. A. (1967): The polymerisation of sugars by dental plaque. Caries Res. 1, 112-129.
- 9) Guggenheim, B., and Schroeder, H. E. (1967): Biochemical and morphological aspects of extracellular polysaccharides produced by cariogenic streptococci. Helv. Odontol. Acta 11, 131-152.
- 10) Dahlqvist, A., Krasse, B., Olsson, I., and Gardell, S. (1967): Extracellular polysaccharides formed by caries-inducing streptococci. Helv. Odontol. Acta 11, 15-21.
- 11) Fitzgerald, R. J., Spinell, D. M., and Stoudt, T. H. (1968): Enzymatic removal of artificial plaques. Arch. Oral Biol. 13, 125-128.
- 12) Bowen, W. H. (1968): Effects of dextranases on cariogenic and non-cariogenic dextrans. Brit. Dent. J. 124, 347-349.
- 13) Extracellular polysaccharides synthesized by glucosyltransferases of oral streptococci. Caries Res. 6, 132-147.
- 14) Minah, G. E., Loesche, W. J., and Dziewiatkowski, D. D. (1972):

- The *in-vitro* effect of fungal dextranase on human dental plaque. Arch. Oral Biol. 17, 35-42.
- 15) Murayama, Y., Wada, H., Hayashi, H., Uchida, T., Yokomizo, I., and Hamada, S. (1973): Effect of dextranase from *Spicaria violaceae* (IFO 6120) on the polysaccharides produced by oral streptococci and on human dental plaque. J. Dent. Res. 52, 658-667.
- 16) Fitzgerald, R. J., Keyes, P. H., Stoudt, T. H., and Spinell, D. M. (1968): The effects of a dextranase preparation on plaque and caries in hamsters, a preliminary report. J. Amer. Dent. Ass. 76, 301-304.
- 17) König, K. G., and Guggenheim, B. (1968): *In-vivo* effects of dextranase on plaque and caries. Helv. Odontol. Acta 12, 48-55.
- 18) Guggenheim, B., König, K. G., Mühlemann, H. R., and Regolati, B. (1969): Effect of dextranase on caries in rats harbouring an indigenous cariogenic bacterial flora. Arch. Oral Biol. 14, 555-558.
- 19) Block, P. L., Dooley, C. L., and Howe, E. E. (1969): The retardation of spontaneous periodontal disease and the prevention of caries in hamsters with dextranase. J. Periodontol. 40, 105-110.
- 20) Bowen, W. H. (1971): The effect of dextranase on caries activity

- in monkeys (*Macaca irus*). Brit. Dent. J. 131, 445-449.
- 21) Caldwell, R. C., Sandham, H. J., Mann, W. V. Jr., Finn, S. B., and Formicola, A. J. (1971): The effect of a dextranase mouthwash on dental plaque in young adults and children. J. Amer. Dent. Ass. 82, 124-131.
- 22) A clinical study of the effect of dextranase on human dental plaque. J. Amer. Dent. Ass. 82, 132-135.
- 23) Keyes, P. H., Hicks, M. A., Goldman, B. M., McCabe, R. M., and Fitzgerald, R. J. (1971): Dispersion of dextranous bacterial plaques on human teeth with dextranase. J. Amer. Dent. Ass. 82, 136-141.
- 24) Guggenheim, B. (1970): Enzymatic hydrolysis and structure of water-insoluble glucan produced by glucosyltransferases from a strain of *Streptococcus mutans*. Helv. Odontol. Acta 14, 89-108.
- 25) Ceska, M., Granath, K., Norrman, B., and Guggenheim, B. (1972): Structural and enzymatic studies on glucans synthesized with glucosyltransferases of some strains of oral streptococci. Acta Chem. Scand. 26, 2223-2230.
- 26) Baird, J. K., Longyear, V. M. C., and Ellwood, D. C. (1973): Water insoluble and soluble glucans produced by extracellular

glucosyltransferases from *Streptococcus mitans*. Microbios 8,
143-150.

- 27) 恵比須繁之 (1976): 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. 阪大歯学誌 21, , 昭和51.
- 28) Hasegawa, S., Nordin, J. H., and Kirkwood, S. (1969): Enzymes
that hydrolyze fungal cell wall polysaccharides. I. Purification
and properties of an endo- α -D-(1 \rightarrow 3)-glucanase from *Trichoderma*
viride. J. Biol. Chem. 244, 5460-5470.
- 29) Guggenheim, B., and Haller, R. (1972): Purification and properties
of an α -(1 \rightarrow 3) glucanohydrolase from *Trichoderma harzianum*. J.
Dent. Res. 51, 394-402.
- 30) Reese, E. T., Maguire, A., and Parrish, F. W. (1972): α -1,3-Glu-
canase of fungi and their relationship to mycodextranase. Proc.
IV IFS, Ferment. Technol. Today, 735-742.
- 31) Zonneveld, B. J. M. (1972): A new type of enzyme, an exo-splitting
 α -1,3 glucanase from non-induced cultures of *Aspergillus nidulans*.
Biochim. Biophys. Acta 258, 541-547.

- 32) Ebisu, S., Kato, K., Kotani, S., and Misaki, A. (1975): Isolation and purification of *Flavobacterium* α -1,3 glucanase hydrolyzing insoluble, sticky glucan of *Streptococcus mutans*. J. Bacteriol. 124, 1489-1502.
- 33) Goldstein, I. J., and Whelan, W. J. (1962): Structural studies of dextrans. Part I. A dextran containing α -1,3-glycosidic linkages. J. Chem. Soc. 1962, 170-175.
- 34) Kanetsuna, F., Carbonell, L. M., Azuma, I., and Yamamura, Y. (1972): Biochemical studies on the thermal dimorphism of *Paracoccidioides brasiliensis*. J. Bacteriol. 110, 208-218.
- 35) Baker, E. E., and Whiteside, R. E. (1965): Preparation and properties of a Vi antigen-degrading enzyme. J. Bacteriol. 89, 1217-1224.
- 36) 竹村金造 (1975): フロールヘキシジンの歯苔抑制機序の *in vitro* における解析. 歯病誌 18, 35-56. 昭和 50.
- 37) Weber, K., and Osborn, M. (1969): The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 244, 4406-4412.
- 38) Vesterverg, O., and Svensson. (1966): Isoelectric fractionation,

- analysis, and characterization of ampholytes in natural gradients.
Acta Chem. Scand. 20, 820-834.
- 39) Good, C. M., and Tipper, P. J. (1972): Conditional mutants of *Streptococcus aureus* defective in cell wall precursor synthesis. J. Bacteriol. 111, 231-241.
- 40) 三崎旭, Goldstein, I. J., 鳥居光雄, 沢井輝男
(1975): *Leuconostoc mesenteroides* NRRL 1355 のデキスト
ランの構造: α -1,3 結合の配列, 生化学
47, 743, 昭和 50.
- 41) Guggenheim, B., Regolati, B., and Mühlmann, H. R. (1972): Caries and plaque inhibition by mutanase in rats. Caries Res. 6, 289-297.
- 42) Kelstrup, J., Funder-Nielsen, T. D., and Moller, E. N. (1973): Enzymatic reduction of the colonization of *Streptococcus mutans* in human dental plaque. Acta Odontol. Scand. 31, 249-253.
- 43) Bacon, J. S. D., Lones, D., Farmer, V. C., and Webley, D. M. (1968): The occurrence of α (1-3)glucan in *Cryptococcus*, *Schizosaccharomyces* and *Polyporus* species, and its hydrolysis by a *Streptomyces* culture filtrate lysing cell walls of *Cryptococcus*. Biochim. Biophys. Acta 158, 313-315.

44) 井上昌一, 江上立子, 竹原直道, 森岡俊夫 (1957): *Streptomyces* 属の産生する非水溶性グルカン水解酵素の性状. 齒基礎誌 17, 27-36, 昭和 50.

表題脚注

大阪大学歯学部口腔治療学講座 (主任
横溝一郎教授)

本論文の要旨は昭和48年9月の第15回歯科
基礎医学会総会, 昭和49年4月の第47回日本
細菌学会総会ならびに昭和49年10月の第17回
日本歯周病学会総会において発表した。

第2頁脚注

* 前報²⁷⁾の脚注参照。

第27頁脚注

* *Spicaria* テキストラナーゼの単位はMurayama
らの記載⁵⁾による。

表1 EK-14 酵素の濃縮と精製

分画	容量 (ml)	酵素活性 (単位/ml)	総単位	蛋白質 (mg/ml)	比活性 (単位/mg)	回収率 (%)	精製度 (倍)
培養上清	30,000	3	90,000	0.53	5	100	1
硫酸沈殿画分	500	158	79,000	8.01	20	88	4
濃縮画分	109	513	56,019	31.11	17	62	3
DE 32 フラクション	156	272	43,432	1.15	237	48	47
濃縮画分	50	799	39,950	3.26	245	44	49
CM 32 フラクション	110	308	33,880	0.38	813	38	162

表2 各種金属イオン, EDTA およびヨウ
ドアセトアミドがEK-14酵素活性に
及ぼす影響*

テスト物質	濃度 ($M \times 10^{-2}$)	相対酵素活性 (%)
None	0	100
Ba ⁺⁺	1.0	88
Ni ⁺⁺	1.0	63
Co ⁺⁺	1.0	62
Fe ⁺⁺	0.5	72
Fe ⁺⁺⁺	0.5	41
Ag ⁺	1.0	19
Hg ⁺⁺	1.0	13
Pb ⁺⁺	1.0	11
EDTA	1.0	98
ヨウドアセトアミド	1.0	62

* 酵素活性の測定は標準酵素活性測定系で
おこなったが, 0.2 M 酢酸塩緩衝液 (pH 6.3) に
テスト物質を溶解し, 40 単位/ml の EK-14 酵素
を用いて反応させた。

表3 EK-14酵素の基質特異性*

供試 グルカン	主結合	相対 水解度 (%)
<u>S. mutans</u> OMZ 176 不溶性多糖	$\alpha(1-3), \alpha(1-6)$	100
" OMZ 65 "	$\alpha(1-3), \alpha(1-6)$	93
" OMZ 176 可溶性多糖 II	$\alpha(1-6)$	0
" OMZ 65 "	$\alpha(1-6)$	0
<u>L. mesenteroides</u> デキストラン T-70	$\alpha(1-6)$	0
" " T-2000	$\alpha(1-6)$	0
" NRRL 1355 グルカン	$\alpha(1-6), \alpha(1-3)$	4
<u>P. brasiliensis</u> 細胞壁 グルカン	$\alpha(1-3)$	90
<u>A. niger</u> "	$\alpha(1-3)$	88
可溶性デンプン	$\alpha(1-4), \alpha(1-6)$	0
セルロース	$\beta(1-4)$	0
パキマン	$\beta(1-3)$	0
ラミナラン	$\beta(1-3), \beta(1-6)$	0
カードラン	$\beta(1-3)$	0
ルテオース	$\beta(1-6)$	0

* 供試グルカンの水浮遊液あるいは溶液(0.2%)100 μ l, 0.2 M の酢酸塩緩衝液(pH6.3) 50 μ l, および EK-14 酵素(60 単位/ml)50 μ lよりなる系を, 37 $^{\circ}$ C で 20 分間反応させた。反応の開始時と終了時に 10 μ l ずつの反応液を汲みだし, 3 分間加熱して酵素反応を停止させた後, 還元糖量を測定した。相対水解%として示した数字は, 上記反応系で OMZ176 株由来の不溶性グルカンから遊離する還元糖量を 100%とした場合の, 他のグルカンから遊離する還元糖量の相対値である。

表4 *S. mutans* OMZ 176株由来の不溶性グルカンおよびEK-14酵素処理により生じた解体グルカンのメチル化分析による比較

O-メチル-D-グルコース 結合様式	モル百分率	
	不溶性グルカン	解体グルカン (EK-14酵素分解)
2,3,4,6-テトラ- Glc _p -(1→	14.6	18.0
2,4,6-トリ- →3)-Glc _p -(1→	50.5	37.6
2,3,4-トリ- →6)-Glc _p -(1→	20.9	26.9
2,4-ジ- →3)-Glc _p -(1→ 6 ↑	14.0	17.5

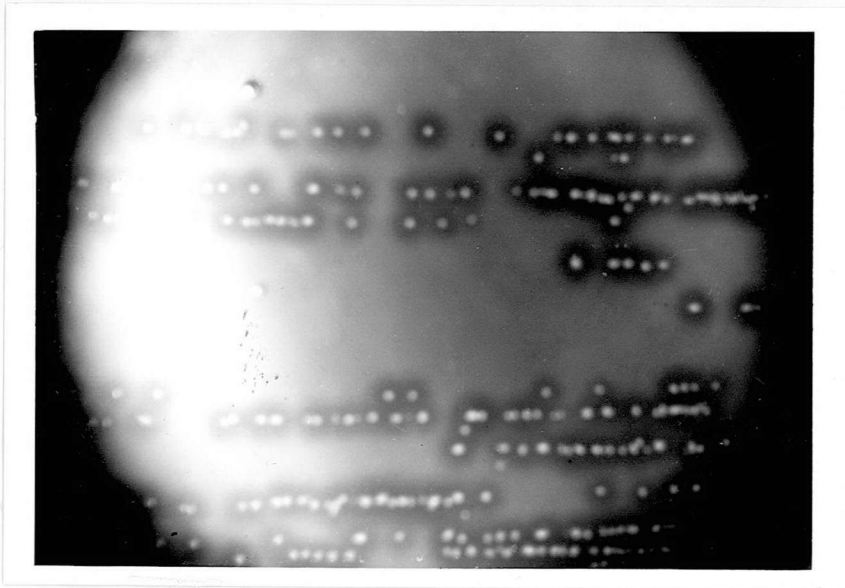


図1 *S. mutans* OMZ 176 株からの不溶性グル
カンを含む0.2%の割合に含んだ寒天
平板培地上での不溶性グルカン
分解菌(EK-14菌)の集落と集落周
囲の分解帯

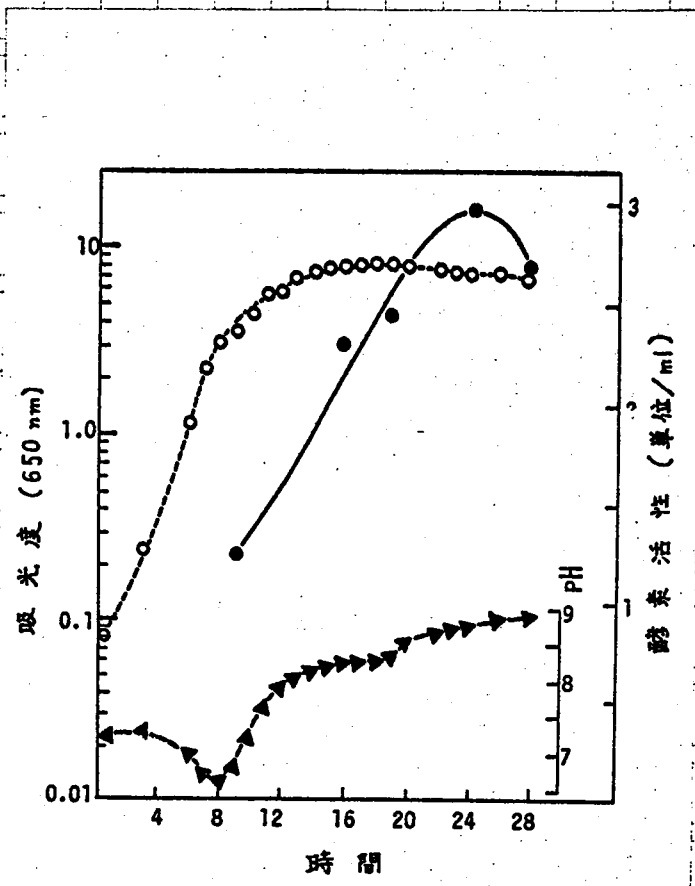


図 2

Trypticase soy ブロス中でEK-14 酵素

を 通気 振盪 培養 した 時の 発

育 曲 線, 培 地 pH, お よ び 不

溶 性 グ ル カ ン 分 解 酵 素 活 性

○ : EK-14 菌 の 発 育 曲 線 (650 nm の 吸 光 度)

● : 不 溶 性 グ ル カ ン 分 解 酵 素 活 性

▲ : 培 地 の pH

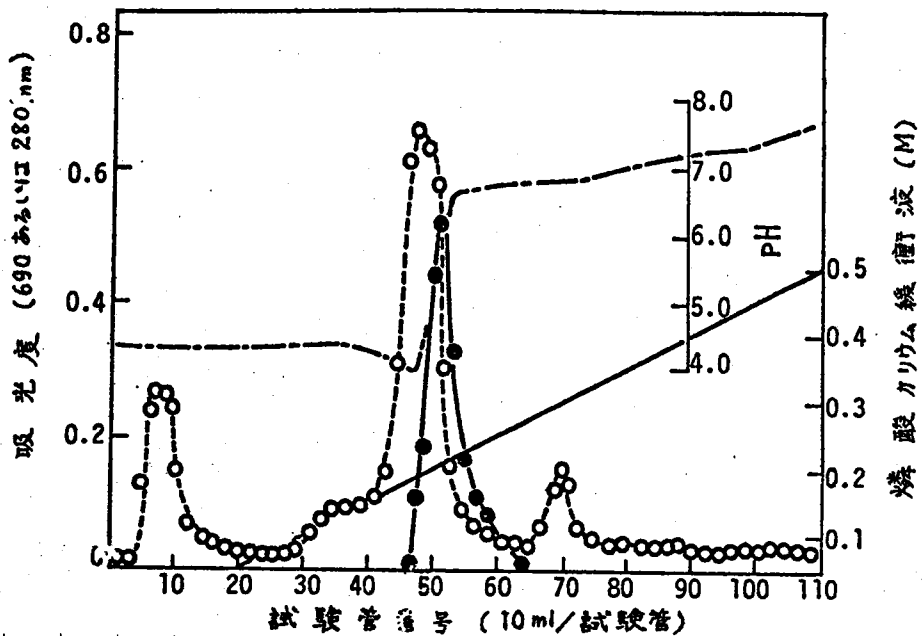


図3 DE 32 カラム クロマト で 部分 精製 し た
 酵素 の CM 32 カラム に よる 再 クロマト
 グラフ

○ : 280 nm の 吸光度

● : 酵素 活性 (690 nm の 吸光度)

--- : pH

— : イオン 濃度

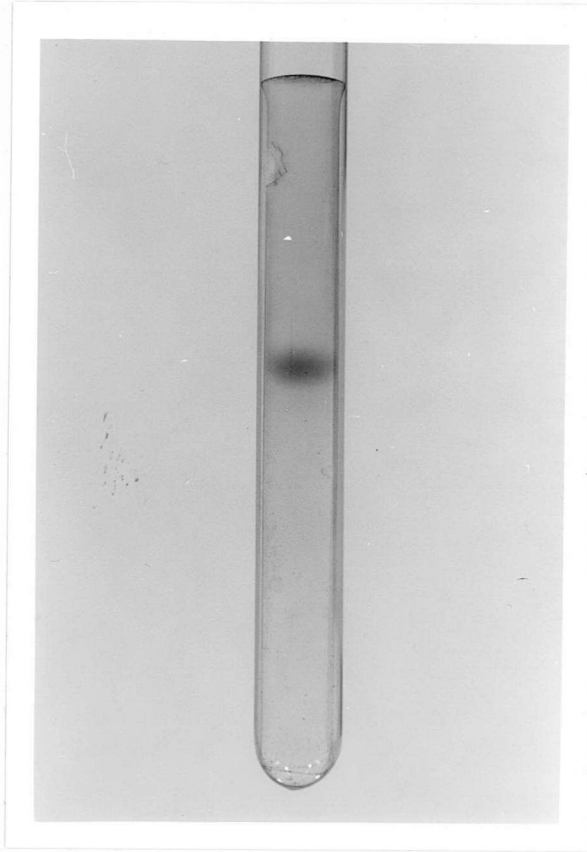
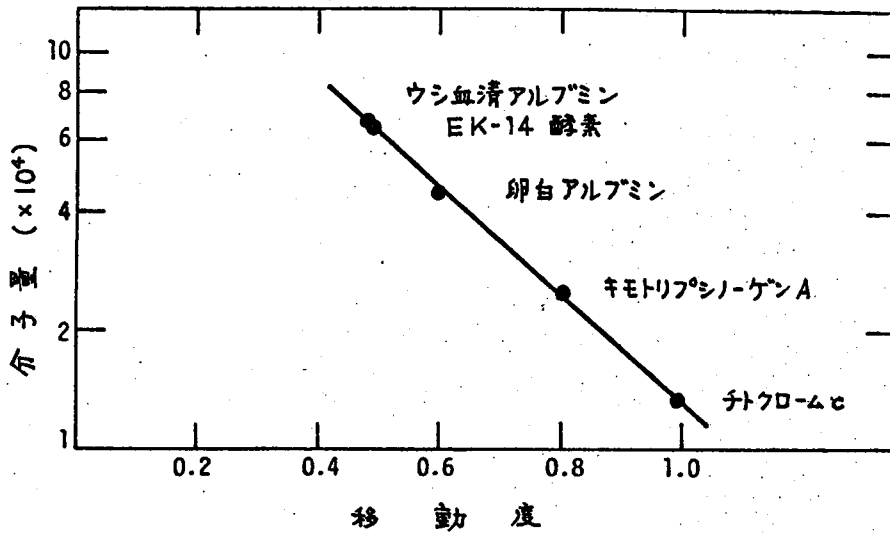


図4 EK-14 酵素の SDS ポリアクリル
アミドゲル電気泳動パターン



5 SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動による EK-14 酵素の分子量の測定

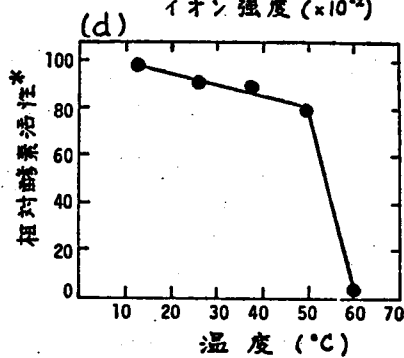
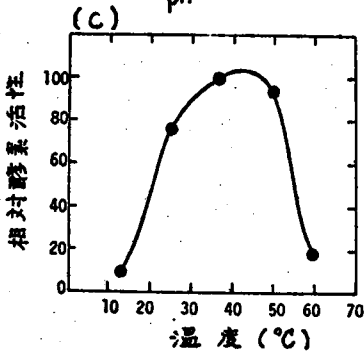
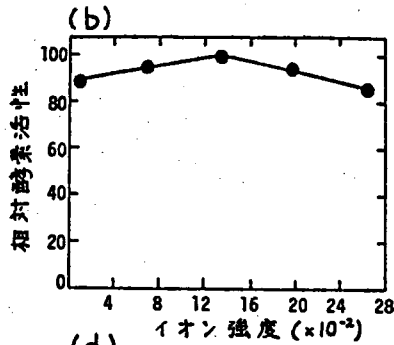
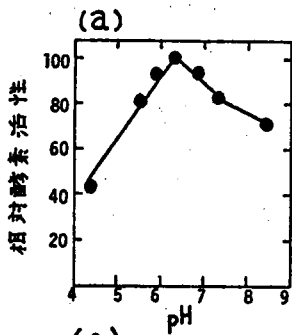
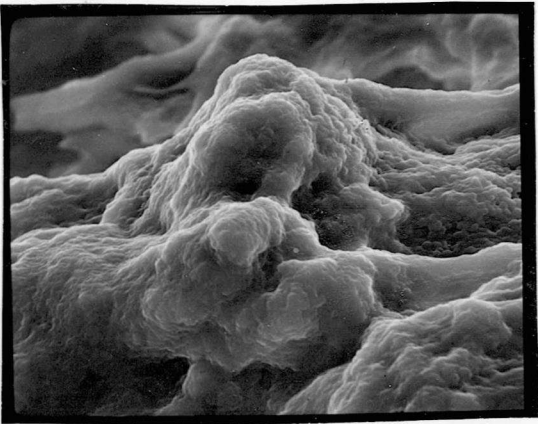


図6 反応系の pH (a), イオン強度 (b) および温度 (c) が EK-14 酵素活性に及ぼす影響、ならびに EK-14 酵素の耐熱性 (d)

* EK-14 酵素を横軸に示した温度に 30 分間放置した後、標準測定反応系で酵素活性を測定した。

(a)



(b)

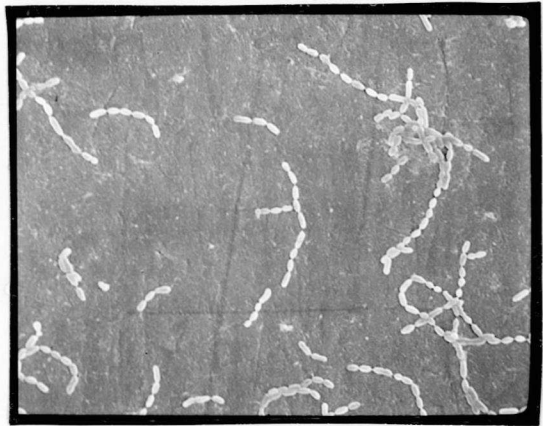


図 7 *S. mutans* OMZ 176 株の歯面への定着に
対する EK-14 酵素の作用

a) 滅菌精製水を加えたもの

b) EK-14 酵素を加えたもの

(いずれも直接倍率 $\times 3,000$)

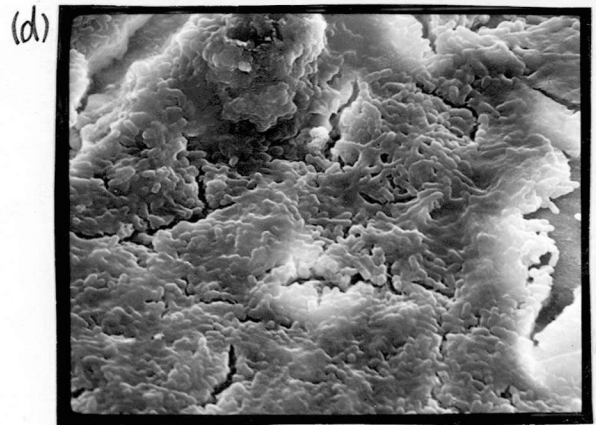
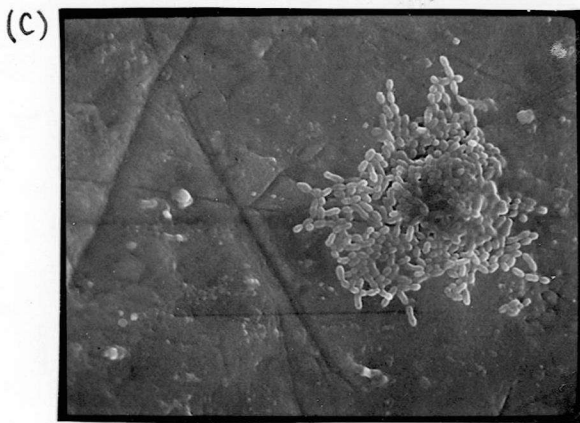
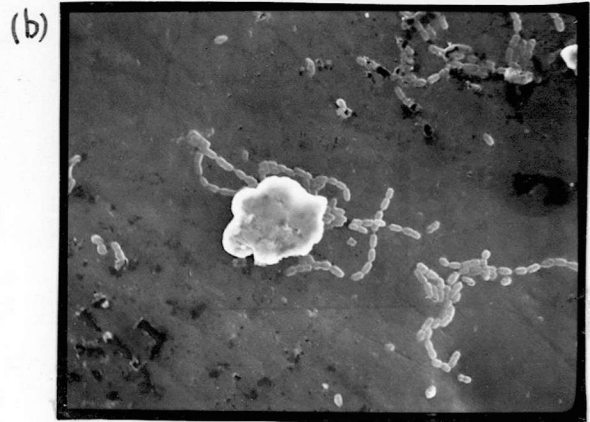
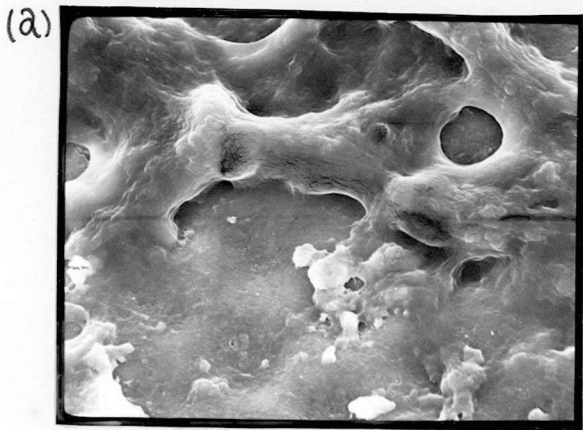


図 8 *In vitro* で *S. mutans* OMZ 176 株が歯面に形成したプラークに対する EK-14 酵素および *Spicaria* デキストラナーゼの作用

a) 滅菌緩衝液にさらしたものの

b) EK-14 酵素を作用させたものの

c) EK-14 酵素および *Spicaria* デキストラナーゼを作用させたものの

d) *Spicaria* デキストラナーゼを作用させたもの

(いずれも直接倍率 $\times 3,000$)