The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	唾液糖タンパクを分解するStreptococcus sanguis ATCC 10557株由来のα-L-フコシダーゼの精製とその性質
Author(s)	雫石, 聰
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/32008
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

唾液糖タンパクを分解するStreptococcus sanguis ATCC 10557株由来のα-L-フコシダーゼの精製とその性質

栗石 聰

序言

L-フコースはオリゴ糖類や糖タンパクおよび糖脂質などの複合糖質のオリゴ糖側鎖の非還元末端部に位置し、高等動物の細胞膜，体液および分泌物などの重要成分として広く分布している。これらのオリゴ糖類や複合糖質中のL-フコースの動向はその物質のもつ生物活性に大きな影響を及ぼしていることが判明してきた。特に血球表面の複合糖質，胃粘膜や卵巣嚢腫液に存在する糖タンパクおよび人

乳少糖などによるABH式やLewis式血液型活性の発現にはL-フコースが不可欠であることが確認されている[1]。

α-L-フコシダーゼ(α-L-Fucose fucohydrolase, EC 3.2.1.51.)はL-フコースとα-グリコシド結合をもつ物質，例えばp-ニトロフェニル-α-L-フコシドや4-メチルウンベリフェリル-α-L-フコシドなどの合成基質のほか，オリゴ糖類や複合糖質の非還元末端よりL-フコースを遊離する酵素で，糖タンパクの構造解析，血液型物質の免疫化学や複合糖質代謝の遺伝的異常症などに関連して，微生物[2)-4)]，植物[5)]，軟体動物[6)]のほか，哺乳動物の肝臓，腎臓，脳，副睾丸，胎盤，血清および尿中のもの[7)-10)]について詳しく報告されている。過去の研究の多くは合成基質を用いて検索されたものであるが，近年になって人乳少糖や糖タンパクの抽出精製法が確立され，天然基質に対する作用が追求されるようになった。その結果，本酵素には非常に基質特異性の強いものが存在する

ことが判明してきた。特に Aspergillus niger[2)]，Clostridium perfringens[3)]，Bacillus fulminans[4)]（B. cereus の変種）より抽出された酵素（EC 3.2.1.63.）はL-フコースがガラクトースにα-(1→2)で結合したものだけを特異的に切断し、広い基質特異性をもつα-L-フコシダーゼ（EC 3.2.1.51.）とは区別されるようになった[11)]。この酵素は血液型物質のH型血液型活性を決定しているFucα1→2Gal結合を切断するところからH型分解酵素ともいわれている。

近年，獲得被膜の構成成分として注目されているヒト唾液糖タンパクには，牛や羊のものとは異なり，シアル酸よりもL-フコースが比較的多量に含まれていると報告されている[12)-14)]。さらに歯垢の形成機序についてLeachは、歯垢には唾液糖タンパクの重要構成成分であるL-フコースおよびシアル酸がほとんど検出されないことから，これらの糖を分解する口腔細菌由来のグリコシダーゼの存在を予見し，唾液糖タンパクの糖側鎖を失ったペプチ

ド鎖が歯垢の基質形成に関与している可能性を示唆した。[15] 口腔レンサ球菌由来のグリコシダーゼのなかで，シアリダーゼ（ノイラミニダーゼ）に関しては若干の知見が得られているが[16),17)]，フコシダーゼについてはStreptococcus mutansおよびS. sanguisに本酵素活性を報じたPinter, Hayashi and Bahn[18)]や，S. mitisについてのNord and Wadströmの研究[19)]があるのみである。これらの研究やMenguy, Masters and Desbaillettsが見出したヒト唾液由来のα-L-フコシダーゼの報告[20)]はいずれも合成基質のみを用いており、したがって前述のA. niger等のα-L-フコシダーゼについての所見を勘案すると，口腔内の本酵素が果してヒト唾液糖タンパクに作用するかどうかは不明で推測の域を出ない。

著者は非還元末端部にL-フコースがα-(1→2)でガラクトースに結合しているブタ顎下腺ムチンを基質として用い，唾液，歯垢および口腔レンサ球菌のα-L-フコシダーゼ活性を試行的に検索したところ，S. sanguis ATCC 10557株の培

養上清に強い活性の存在を見出した。そこで本酵素を分離・精製し、その性質の一端を明らかにすると共に、唾液糖タンパクに対する作用を追求する目的で以下の実験を行なった。

実験材料ならびに方法

1. 唾液および歯垢の採取

試料は20-30才の健康な成人28名より氷冷下で採取した。食後少なくとも2時間のちに、混合唾液は無刺激で、耳下腺唾液は甘味刺激でKeeneの方法[21]によって、また顎舌下腺唾液はクエン酸刺激でBlock and Brottmanの方法[22]により採取した。各唾液はそのまま酵素標品として用いた。歯垢は一晩口腔清掃しない状態で上下顎歯牙表面より採取したのち、0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)に懸濁して用いた。

2. 供試菌株

S. mutans HS-1, E 49, FA-1, BHT, NCTC 10449, Ingbritt, GS 5, B 13, OMZ 176, LM 7, P 4, OMZ 175, SE 11, K1R, OMZ 65,

コクヨ 20×20

S. mitis ATCC 9811, S. salivarius ATCC 9222, S. sanguis ATCC 10556, ATCC 10557, M-5 株は本学口腔細菌学教室小谷尚三教授より．また，あらたにヒト口腔内より分離した株，S. salivarius HT-3, HT-9, S. sanguis ST-6, ST-8 株は同じく口腔細菌学教室浜田茂幸講師より分与を受けた。

以上の口腔レンサ球菌は Trypticase soy agar (BBL, Cockeysville, Md, U.S.A.) の高層培地に穿刺培養したのち冷所保存し，1ケ月毎にあらたな培地に穿刺継代培養した。

3．酵素標品

上記菌株を10mlの3% Trypticase soy broth (BBL) に接種し，37°Cで12時間静置培養したものを同培養液200mlに接種し，更に37°Cで24時間静置培養した。そして培養液を4°Cに冷却したのち，菌体と培養上清とを10000×g，15分間遠心分離した。培養上清は80%飽和の硫酸アンモニウムにより塩析し，10000×g，60分間遠心して得られた沈渣を0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に溶解し酵素標品として用いた。

4、基質の調製

ブタ顎下腺ムチン(PSM)はDeSalegui and Plonskaの方法[23]により新鮮なH型血液型活性を示す腺組織から抽出・精製した。シアル酸除去ブタ顎下腺ムチン(DS-PSM)はPSMを0.01 N H_2SO_4で70℃，4時間加水分解してN-グリコリルノイラミン酸を切断[24]後，充分透析して調製した。シアル酸除去ブタ顎下腺糖ペプチドはDS-PSMをプロナーゼ(Calbiochem. LaJoll, Calif., U.S.A.)で2回，パパイン(Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo., U.S.A.)で1回消化したのち，Sephadex G-50ゲル沪過により分離したものを用いた。またシアル酸除去ブタ顎下腺オリゴ糖はDS-PSMからKatzman and Edwinの方法[25]により調製した。

分泌型ヒト耳下腺唾液の糖タンパクはSephadex G-200ゲル沪過により得られた糖含有量の多いタンパク画分を用いた。

H型ブタ胃粘膜(PGL)，H型ヒト胃粘膜(HGL)，H型ヒト卵巣嚢腫液(HOCF)から抽出した血液型物質は群馬大の古川研教授より，またト

リチウムでラベルしたラクト-N-フコペンタイトールI (LNF-I), II (LNF-II), III (LNF-III) およびラクト-N-テトライトール (LNT) は神戸大の木幡陽教授より供与されたものを用いた。

4-メチルウンベリフェリル-α-L-フコシドおよび p-ニトロフェニルグリコシド類は Koch-Light Laboratories Ltd. (Buckinghamshire, England) より、またヒト血漿グリコプロテイン Fr. VI は Miles Laboratories Inc. (Elkhart, Ind., U.S.A.) より購入した。

5. 酵素活性の測定

α-L-フコシダーゼ活性の測定は次のようにして行なった。天然基質（人乳少糖は除く）を用いた場合の反応液は、0.6 ml の 0.1 M リン酸ナトリウム－0.05 M クエン酸緩衝液 (pH 5.5) の中に、300 nmoles のフコースを含む基質と適量の酵素を含み、37°C で 2 時間反応させた。その後ただちに 100°C で 3 分間煮沸して反応を止め、遊離したフコースを Bhattacharyya and Aminoff の Conway unit 法[26] により日立 124 型分光光度計を用

いて波長 224 nm の紫外部吸収により測定した。p-ニトロフェニル-α-L-フコシド(p-NP-α-L-Fuc)を基質として用いた場合は、1 ml の 0.3 M リン酸ナトリウム - 0.15 M クエン酸緩衝液(pH 6.0)に 2 μmoles の基質と適当量の酵素を含む反応液を 37 °C で 2 時間反応させたのち、0.5 M グリシン - 水酸化ナトリウム緩衝液 (pH 10.6) 0.7 ml を加えて反応を停止させ、遊離した p-ニトロフェノールを日立101型分光光度計により 400 nm の波長で測定した。また 4-メチルウンベリフェリル-α-L-フコシドを基質とした場合は Alhadeff らの方法[7]に準じて酵素活性を測定した。特に記述のない場合は全て DS-PSM を基質として用いた。なお歯髄中の活性測定は 37 °C で振盪しながら反応を行なった。

ノイラミニダーゼ活性はヒト血漿グリコプロテイン Fr.VI を基質として Moriyama and Barksdale の方法[27]に準じて測定し、また α-D-, β-D-, β-L-フコシダーゼ, β-ガラクトシダーゼ, β-N-アセチルグルコサミニダーゼ, α-マ

ンノシダーゼは各々のp-ニトロフェニルグリコシドを基質としてPinterらの方法[16]に準じて活性の測定を行なった。プロテアーゼ活性はカゼインを基質としてKunitzの方法[28]に準じて測定した。

以上の酵素活性の測定にはいずれも、100℃で5分間煮沸して失活させた酵素を反応液に加えたものを盲検とした。

酵素活性の定義――上記の条件下により37℃で1時間に1 μmoleの単糖またはアグリコンを遊離する酵素量を1コニットと規定した。比活性はタンパク1 mg当りのユニット数で表わした。

6. 糖およびタンパク定量

ヘキソースの定量はフェノール硫酸法[29]により、またフコースはGibbonsのチオグリコール酸法[30]で、シアル酸はWarrenのチオバルビツール酸法[31]に従って定量した。タンパクはLowryらの方法を改良したHartreeの方法[32]により定量した。標準タンパクには牛血清アルブ

ミン（再結晶，Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.,U.S.A.）を用いた。

7. ディスク電気泳動

電気泳動はDavisの方法[33]に準じて5%のポリアクリルアミドゲルを支持体として行なった。ゲル（0.4 x 10 cm）をガラスカラムに調製し，3 mA/tube の条件下で2時間電気泳動を行ない，タンパクはアミドブラック10Bを用いて検出した。

8. 分子量の測定

Andrewsの方法[34]に従って行ない，既知タンパクとしてはカタラーゼ，牛血清アルブミン，卵白アルブミン，キモトリプシノーゲンA（Boehringer Manheim GmbH, Manheim, West Germany）を使用した。1 x 70 cm のカラムに0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.0）で平衡化した Sephadex G-200 を充填したのち，精製酵素（3 μg）ならびに既知タンパク（各2mg）を展開させた。流速は5 ml/hr で，1 ml毎に分取した

9. 等電点分画

Vesterberg and Svensson の方法[35]に従って行なった。pH 3-10 の Carrier ampholyte (LKB-produkter AB, Bromma 1, Sweden) を1%濃度で使用し，蔗糖で0-50%(w/v)の濃度勾配を作った。カラム(110 ml, LKB-produkter AB) へ酵素標品を添加し，4°C，350Vで40時間通電した。等電点分画終了後，2mlの画分を採取した。各画分はpHを測定したのち，緩衝液に対して透析し，透析内液についてOD280の吸光度およびα-L-フコシダーゼ活性を測定した。

10. ガスクロマトグラフィ

水素炎イオン化検出器付ガスクロマトグラフィ GC-4CMPF型（島津製作所，京都）および日Ⅱ056型記録計を使用した。60-80メッシュのChromosorb W. を1.5%シリコンSE-30で処理してガラス製U字型カラム(0.3 x 100 cm)に充填した。完全に乾燥した反応試料をN,O-ビストリメチルシリルアセタミド，トリメチルクロロシランおよびピリジン(4:1:1)溶液0.1mlを加えて、70°Cで15分間湯浴しトリメチルシリル化(

TMS 化）した。TMS 化した試料 4 μl をカラムに注入し、カラムの温度を 120 ℃から 210 ℃まで 5 °C/min の割合で昇温した。キャリアガスには窒素ガスを用い、流速は 60 ml/min とした。注入口ならびに検出器の温度は 300 ℃に保った。

11. フコースの結合様式に対する精製酵素の基質特異性

反応は Nishigaki らの方法[6] に準じて行ない、反応液は全量 40 μl の 0.1 M リン酸ナトリウム－0.05 M クエン酸緩衝液 (pH 5.5) に酵素タンパク 1.8 μg と人乳少糖 (43780 dpm, 163 mCi/mmole) を含み、少量のトルエン存在下で 37 °C, 15 時間インキュベートしたのち、0.1 ml のエタノールを加え反応を停止した。反応液をペーパークロマトグラフィ（溶媒：酢酸エチル：ピリジン：水＝12：5：4）で 6 日間展開したのち、1 cm 間隔に切断した沪紙を 0.5 ml の蒸留水で糖を抽出し、ジオキサンシンチレーター（ナフタリン 120 g/l, POPOP 50 mg/l, PPO 4 g/l ）を用いて Aloka Liquid Scintillation Counter LSC-673（アロカ株式会

社，東京）により放射能を測定した。

12. 精製酵素標品による血液型活性の変化

血液型物質の本酵素処理による反応液は全量0.2 mlの0.03Mリン酸ナトリウム－0.015Mクエン酸緩衝液(pH 5.5)に血液型物質400 μg（乾燥重量），塩化ナトリウム30 μgに精製酵素0.158 units（対照としては失活酵素）を含み，37°C，20時間反応を行なったのち，3分間煮沸して反応を停止した。なおヒト混合唾液は採取後ただちに100°C，20分間煮沸したのち，3000 rpm，10分間遠心し，その上清0.1 mlをそのまま血液型物質として用いた。

血液型活性は血球凝集阻止反応[4]により判定した。この反応に用いた血球および血球凝集物質は下記の通りである。H型は2%H型血球とレクチンH (DADE Division, American Hosp. Supply Corp., Miami, Fla., U.S.A.)を，Le^a型は5%H，Le^a型血球と抗Le^aヒト血清(DADE Division)を，Le^b型は5%H，Le^b型血球と抗Le^bヤギ血清(Ortho Diagnotics Inc.,

.N.J., U.S.A.) を使用した。阻止反応にはマイクロタイタープレートを用い，血液型活性は二倍連続稀釈法により凝集を阻止する最小量を反応液1 ml当りのμg乾燥重量で示した。そして唾液の血液型活性のみはHartreeの方法で測定したタンパク量をもとにして，反応液1 ml当りのμgタンパク量で表わした。

実験結果

1. 歯垢および唾液のα-L-フコシダーゼ活性

歯垢および唾液のα-L-フコシダーゼ活性を表1に示した。p-NP-α-L-Fucに作用するα-L-フコシダーゼ活性は，歯垢，混合唾液，耳下腺および顎舌下腺唾液に認められたのに対して，DS-PSMに作用するα-L-フコシダーゼ活性は歯垢および混合唾液のみに認められた。この結果DS-PSMに作用するα-L-フコシダーゼは歯垢お

よび混合唾液中に存在する口腔細菌に由来する可能性が示唆された。

表1

2. 口腔レンサ球菌の培養上清のα-L-フコシダーゼ活性

表2に示す如く、今回検索した24株の口腔レンサ球菌の培養上清にはp-NP-α-L-Fucに作用するα-L-フコシダーゼ活性は認められなかった。一方DS-PSMに作用するα-L-フコシダーゼ活性は S. sanguis ATCC 10557株および S. mitis ATCC 9811株に認められたが、それ以外の S. sanguis, S. mutans, S. salivarius には認めることはできなかった。

表2

3. S. sanguis ATCC 10557株のα-L-フコシダーゼの精製

(1) 菌の培養

菌の発育曲線とα-L-フコシダーゼ活性との関係は、図1に示すように静止期に入り培養上清中の酵素活性が最大に達することがわか

った。そこで培養時間は24時間として以下の実験を行なった。S. sanguis ATCC 10557株を4 l の Trypticase soy broth の入った5 l マイヤーで37°C，24時間静置培養した。培養終了後，培養液を4°Cに冷却し，10000×g，15分間遠心しその上清を集めた。この操作を反復し得られた培養上清12 l を酵素精製に用いた。以下の精製操作は全て4°Cで行なった。

図1

(2) 硫安濃縮

12 l の培養上清を硫安80%飽和で塩析し、10000×g，60分間遠心して得られた沈渣を0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)に溶解し130 ml の画分を得た。

(3) 第一回Sephadex G-200によるゲル沪過

硫安濃縮により得られた画分を，0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)で平衡化したSephadex G-200カラム(5.5 x 100 cm)で2回に分けてゲル沪過した。この操作により培地成分を多く含む画分とグリコシダーゼ活性を示す画分と

に分かれ，グリコシダーゼ類を含む画分にα-L-フコシダーゼ活性が認められた。他のグリコシダーゼをできる限り除くようにしてα-L-フコシダーゼ画分(460 ml)を集めた。

(4) 硫安分画

上記の活性画分に硫安を添加し得られた30-80%飽和の沈渣を0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)に溶解し，同一緩衝液に対して一昼夜透析した。

(5) DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィ

0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.0)で平衡化したDEAE-Sephadex A-50カラム(3 x 25 cm)に上記透析試料(8.6 ml)を吸着させ，0.1M，0.25M，0.4Mおよび0.8MのNaClを含む同緩衝液で段階的に溶出した。流速は30 ml/hrで10 ml毎に分取した。その溶出展開図を図2に示した。0.4M NaClで溶出される画分にα-L-フコシダーゼ活性を示した。この操作でβ-ガラクトシダーゼおよびβ-N-アセチルグルコサミニダーゼを分離

することができたが，ノイラミニダーゼは除去できなかった。得られたα-L-フコシダーゼ活性画分はコロジオンバッグにより濃縮した。

図2

(6) 第二回 Sephadex G-200 によるゲル沪過

上記試料を0.01Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.0）で平衡化した Sephadex G-200 カラム（1 x 115 ml）でゲル沪過し，図3に示すような結果を得た。Fr.15 から Fr.19 を集めることによりα-L-フコシダーゼ活性画分からノイラミニダーゼを完全に分離除去することができた。ノイラミニダーゼを除いたα-L-フコシダーゼ画分をコロジオンバッグにより濃縮したものを精製酵素標品とした。

図3

以上の精製の各段階における結果を表3に示した。精製酵素標品はその比活性が435units/mg で，培養上清を硫安濃縮したものの19520倍に精製された。なお精製酵素標品にはα-D-

，β-D-，β-L-フコシダーゼ，ノイラミニダーゼ，β-N-アセチルグルコサミニダーゼ，β-ガラクトシダーゼ，α-マンノシダーゼ活性およびカゼインに作用するプロテアーゼ活性は認められなかった。

表3

4. S. sanguis ATCC 10557 株のα-L-フコシダーゼの一般的性状

(1) 精製酵素の均一性

図4は30%-80%飽和硫安画分（右側）と精製酵素標品（左側）を用いてディスク電気泳動を行なったのち，タンパクを染色したものである。最も陽極側に認められるバンドはブロムフェノールブルーであり，精製酵素標品はこのバンドに近いところに単一のバンドとして認められた。

図4

(2) 分子量の測定

図5に示す如く，ゲル沪過法で本精製酵素はカタラーゼと牛血清アルブミンの間の画分

に溶出され，分子量は約12万と推定された。

図5

(3) 至適pH

本酵素の至適pHは図6に示す如く，0.1Mリン酸ナトリウム－0.05Mクエン酸緩衝液を用いた場合，至適pHは5.5であった。

図6

(4) pH変動による酵素の安定性

0.02Mリン酸ナトリウム－0.01Mクエン酸緩衝液(pH 3-PH 8)および0.01M炭酸緩衝液(pH 9-pH 12)中で25℃，1.5時間酵素をインキュベートしたのち，α-L-フコシダーゼ活性を測定した。処理前の酵素活性を100として表わしたのが図7である。本酵素はpH 5-pH 9の間で安定であることがわかった。

図7

(5) 耐熱性

40℃，50℃，60℃の0.02Mリン酸ナトリウム－0.01Mクエン酸緩衝液(pH 7.0)中にて本酵素を所定時間インキュベートしたのち，酵素活性

を測定したのが図8である。40℃では1時間でも活性はほとんど失なわれないが，50℃，30分間で半減，60℃では20分間以上でほぼ活性は消失することから，本酵素は熱に不安定である。

図8

(6) 等電点

図9は部分精製酵素標品(DEAE-Sephadex A-50 画分)の等電点分画パターンで pI 5.0 付近にα-L-フコシダーゼ活性を認め，本酵素は酸性タンパクであるといえる。

図9

(7) Km

図10に示す如く，DS-PSM を基質として酵素活性を測定し，Lineweaver-Burk のプロット[36]によってKmを求めたところ，0.29 mM の値を得た。

図10

5. S. sanguis ATCC 10557 株の精製α-L-フコシダーゼによる分解産物の同定

ガスクロマトグラフィに用いた反応試料は、全量0.1mlの0.03Mリン酸ナトリウム－0.015Mクエン酸緩衝液に10μgのL-フコースを含むDS--PSMと精製酵素0.158 unitsを含み、少量のトルエンを添加した。37℃，20時間反応させたのち、3分間煮沸して反応を停止し、ガスクロマトグラフィにより反応産物を検索した。対照は上記反応液に5分間，100℃で煮沸し失活させた酵素標品を加えたものを用いた。

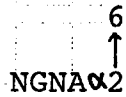
その結果は図11に示す如く，既知のL-フコースと同一相対保持時間のところに分解産物と考えられる新しいピークが出現し、本酵素の作用によりL-フコースが遊離することを確認した。なおD-ガラクトース，N-アセチル-D-ガラクトサミンなどの単糖類は分解産物として検出されなかった

図11

6. S. sanguis ATCC 10557 株の精製α-L-フコシダーゼの基質特異性

表4はDS-PSMに対する加水分解値を100と

した時の精製酵素のいろいろな基質に対する相対加水分解度を表わしたものである。本酵素は p-NP-α-L-Fuc および 4-メチルウンベリフェリル-α-L-フコシドといった合成基質にはまったく作用しなかった。しかし PSM, DS-PSM, シアル酸除去ブタ顎下腺糖ペプチドおよびシアル酸除去ブタ顎下腺オリゴ糖などの天然基質に対して全て反応した。またこれらの中では DS-PSM を最もよく加水分解した。ちなみにH型血液型活性を示す PSM の糖側鎖構造は



である。その他のH型血液型物質である PGL, HGL および HOCF に対して，それぞれ加水分解度に差は認められたが、全て L-フコースを遊離した。これらの結果から，本酵素は合成基質には作用せず，非還元末端部に Fucα1→2Gal 結合をもつ糖タンパクに働くことを示唆した。また分泌型ヒト耳下腺唾液の糖タンパクにも ABH血液型に関係なく作用し，L-フコースの遊離が認められた。

表4

7. S. sanguis ATCC 10557 株の α-L-フコシダーゼの結合様式に対する基質特異性

本実験に用いた人乳少糖の糖鎖配列は図12のごとくである。精製酵素を人乳少糖に作用させたのち、ペーパークロマトグラフィを行ない放射能を指標として定性分析を行なった結果を図13に示した。本酵素をLNF Iに作用させると、全てLNTに変化したのに対して、LNF IIおよびLNF IIIには全く作用しなかった。この結果から本酵素はFucα1→2Gal結合に特異的に作用することが考えられる。

図12　図13

8. S. sanguis ATCC 10557 株の α-L-フコシダーゼの血液型活性に対する作用

H型，Le^a型およびLe^b型活性をもつ血液型物質に対して精製酵素を作用させた時の血液型活性の変化を血球凝集阻止反応を指標として検討した結果が表5である。PSM, PGL, HGL およ

コクヨ 20×20

び HOCF の H 型血液型活性は全て減少した。また HGL および HOCF の Le^b 型活性は減少し、各々の Le^a 型活性は逆に増加した。これは Le^b 型物質が Le^a 型物質に転換したことを示唆している。また本酵素は分泌型および非分泌型のヒト混合唾液に作用させたところ、分泌型のヒト混合唾液では H 型および Le^b 型活性の減少、Le^a 型活性の増加が認められたが、非分泌型の Le^a 型活性は変化しなかった。これらの結果は本酵素が Fucα1→2Gal 結合に特異的に作用するという結果と一致する。

表5

考　察

歯垢における糖タンパクの構成糖に関連して、Middleton は歯垢にメチルペントースとしてラムノースは存在するが、フコースは認められないことを記載し、さらに混合唾液を 37

℃でインキュベートするとフコースが消失するが，Curbyカップや Schneyer 装置を用いて採取した純唾液ではフコースは消失しないことを報告している[37]。シアル酸についても同様の事実を確認していたLeach はフコースについての Middleton の成績を追試確認し[38]、唾液の糖タンパクからこれらの糖を遊離させるのは口腔細菌由来のグリコシダーゼによるとし、糖側鎖を失ったペプチド鎖が歯垢の基質形成に関与しているという仮説をたてた[15]。一方、口腔レンサ球菌由来のα-L-フコシダーゼに関する研究については、序言で触れている如く、Pinter ら[18]や Nord and Wadström[19]の報告があり、そのいずれもが基質として p-ニトロフェニル-α-L-フコシドを用いている。この酵素は合成基質と天然基質に対しての特異性が異なるために、Middleton やLeach の考えを支持するには詳細な実験的根拠を提示する必要があろう。著者は天然基質としてブタ顎下腺より抽出したシアル酸除去ブタ顎下腺ムチンを用いて

検索したところ、ヒト耳下腺ならびに顎舌下腺唾液に存在するα-L-フコシダーゼはp-ニトロフェニル-α-L-フコシドを分解するが、シアル酸除去ブタ顎下腺ムチンに対しては反応しなかった。これに対して混合唾液および歯垢にはシアル酸除去ブタ顎下腺ムチンを分解するα-L-フコシダーゼ活性が存在することを確認した。この事実から本酵素活性は恐らく口腔細菌由来のものと推定されたので、口腔レンサ球菌24株の培養上清についてシアル酸除去ブタ顎下腺ムチンを分解するα-L-フコシダーゼ活性を検索したところ、S. sanguis ATCC 10557株およびS. mitis ATCC 9811株に強い活性を見出した。この両株はノイラミニダーゼ活性を示し、また両株の細菌学的特性は互に類似していることが報告されている[17),39)]。近年になって、S. sanguis ATCC 10557株のようなS. sanguis serotype IIに属する株は、S. mitiorに分類した方がよいともいわれており[40)]、Coykendall and Specht もDNA塩基の類似性の面からこの考え方を支持して

いる[41)]。

一般にα-L-フコシダーゼの分離・精製には、他のグリコシダーゼやプロテアーゼ活性などを完全に取り除くことが難しい。これまで微生物由来の天然基質に働くα-L-フコシダーゼの精製標品がいくつか得られているが[2)-4)]、著者が分離・精製した S. sanguis ATCC 10557 株のα-L-フコシダーゼの比活性は 435 units/mg で Cl. perfringens[3)] の 476 units/mg とほぼ同程度の値を示し、培養上清を硫安濃縮した画分の比活性の19520倍にも上昇した。精製酵素標品はノイラミニダーゼ活性のほか、p-ニトロフェニルグリコシドに作用するエキソグリコシダーゼ活性およびカゼインに作用するプロテアーゼ活性を全く示さず完全に分離・精製することができた。S. sanguis ATCC 10557 株由来のα-L-フコシダーゼの至適 pH は5.5で分子量は約12万であるが、これを Cl. perfringens と B. fulminans[4)] 由来のものと比較すると、前者の至適 pH は6.0、分子量は約20万で、後者の至適 pH は6.3-6.6、分

子量は7万－8万であり，これらの菌由来のα-L-フコシダーゼの性状はお互いに相違がみられる。

天然基質に作用するα-L-フコシダーゼは，その基質に対する特異性から二つに大別することができる[42]。一方はp-ニトロフェニルグリコシドと天然基質の双方に作用し，また天然基質のフコシド結合をその結合様式にかかわらず分解するもので，他方はp-ニトロフェニルグリコシドに作用せず，天然基質のみ分解し，またフコースの結合様式に特異性をもっているものである。著者の精製したα-L-フコシダーゼは後者に属しているといえる。本酵素のブタ顎下腺ムチンとそのペプチド鎖ならびに糖側鎖を修飾した物質に対する加水分解度は，シアル酸除去ブタ顎下腺ムチンがその糖ペプチドおよびオリゴ糖よりも大きく，B. fulminans と同様，高分子糖タンパクに強い反応性を示した。実験結果に示されたH型血液型活性をもつブタ胃粘膜，ヒト胃粘膜および

ヒト卵巣嚢胞液に対する加水分解度の差は恐らく糖側鎖の構造の相違やFucα1—2Gal結合とそれ以外のフコシド結合との含有比率の違いによるものと考えられる。結合様式に対する本酵素の特異性は，A. niger[2)]，Cl. perfringensおよびB. fulminansとよく似ており，Fucα1→2Gal結合をもつラクト-N-フコペンタイトールⅠのみを分解し，Fucα1→4GlcNAc結合をもつⅡやFucα1→3GlcNAc結合をもつⅢに対しては作用せず，天然基質の非還元末端部のFucα1→2Gal結合を特異的に切断した。本酵素はラクト-N-フコペンタイトールⅡおよびⅢには作用しないことが証明されたが，α-(1→4)またはα-(1→3)フコシド結合をもつ他のオリゴ糖およびこれら以外のフコシド結合様式をもつ基質に対して作用するかどうかは今後検討を要する。

血液型活性に対するα-L-フコシダーゼの作用として，B. fulminansのH型分解酵素はFucα1→2Gal結合を切断し，そのためH型およびLe^b型活性が減少する。それに伴いFucα1→2Galβ1→3

(Fucα1→4)GlcNAc- 構造が Galβ1→3(Fucα1→4)GlcNAc- となりLe^{a}型活性の増強が認められている。今回精製した酵素は B. fulminans 由来のα-L-フコシダーゼの血液型物質に対する作用とよく一致しており、本酵素は、血液型活性の面からもFucα1→2Gal結合を切断することが確認できた。

今回の実験によって、本酵素が分泌型ヒト耳下腺唾液の糖タンパクよりL-フコースを遊離し、また混合唾液のH型およびLe^{b}型血液型活性を破壊する能力を有することにより、口腔由来と考えられるレンサ球菌のα-L-フコシダーゼが分泌型ヒト唾液糖タンパクの分解に作用していることを提示した。本酵素がFucα1→2Gal結合を切断することから、分泌型ヒト耳下腺唾液糖タンパクにはFucα1→2Gal結合をもつ糖側鎖が存在することが推定し得るであろう。ちなみにABH分泌型のヒトより得たそれぞれの耳下腺唾液糖タンパクに対する加水分解度の差は本実験では認められなかった。なお結果には示していないが、耳下腺唾液に存在

するα-L-フコシダーゼはp-ニトロフェニル-α-L-フコシドには作用するが、血液型物質や耳下腺唾液糖タンパクには作用しないことを同時に確認している[43]。唾液の血液型物質とう蝕[44]および歯周疾患[45]との関連性については若干の報告があるが，いずれも疫学的研究が多く未だ不明なところが多い。今回用いた混合唾液の血液型活性と他の研究者によるデータと対比してみると、血液型物質の抽出法，血球凝集物質の種類，血液型活性の表示法などが統一されていないため比較が困難であるが，混合唾液の血液型活性の強さは山本の報告[46]とほぼ同程度の値であった。

実験に供試した口腔レンサ球菌のなかにはシアル酸除去ブタ顎下腺ムチンに作用するα-L-フコシダーゼを菌体内にもっているものが，S. sanguis の数株にみられた[47]。そのなかでM-5, ST-6 および ST-8 株はヒト歯垢より分離されたものである。口腔内には複雑な因子が介在しており、細菌の自己融解や何らかの環境

コクヨ 20×20

因子の変化によって菌体内の酵素が菌体外へ遊離する可能性も充分考えられる。従って口腔レンサ球菌由来のα-L-フコシダーゼの生理学的かつ病理学的意義を考える場合，菌体外酵素のみならず，菌体内酵素も含めて勘案する必要があろう。

ヒト混合唾液を用いて血液型を判定する際，採取後ただちに加熱処理しないと血液型の判定を誤ることがあることが知られているが，これは血液型分解酵素により血液型活性が破壊されるためであろうといわれている[48]。従って口腔レンサ球菌より由来するα-L-フコシダーゼが，他のグリコシダーゼと共に，唾液の血液型活性に影響を与えていることは充分考えられる。

近時，歯垢の形成過程において唾液の糖タンパクが果す役割として二つの現象が注目されている。その一つは獲得被膜として唾液の糖タンパクが選択的にエナメル質表面に吸着する現象で，その機序については唾液糖タン

パクの糖側鎖に非還元末端糖として存在するシアル酸の動向が重視されているが[49),50)]，もう一つの非還元末端糖であるL-フコースもこの吸着現象に何らかの役割をもっている可能性があり，この際口腔レンサ球菌由来のα-L-フコシダーゼの関与も無視し得ないと思われる。他の一つは唾液糖タンパクと口腔細菌との結合現象であり、S. mutans の産生する不溶性グルカンによる菌の凝集とともに、唾液糖タンパクが菌の獲得被膜への付着や歯垢の蓄積に密接に関与していることが考えられる。特に血液型活性をもつ唾液ムチンが各種口腔レンサ球菌と結合すること[51)]や Leptotrichia buccalis の赤血球ならびにヒト唾液糖タンパクとの凝集はラクトースやN-アセチル-D-ガラクトサミンにより強く抑制されることから、この凝集反応にはD-ガラクトースを非還元末端にもつ唾液糖タンパクが関与しているのではないかという報告[52)]もある。これらの事柄から考え、口腔レンサ球菌由来のα-L-フコシダー

ゼが唾液糖タンパクの末端からL-フコースを切断することにより、菌との結合に何らかの係わりをもっている可能性は全く否定し得ない。また唾液免疫グロブリンに対するS. sanguis ATCC 10557株由来のα-L-フコシダーゼの影響についての問題も残されており、本酵素のもつ生理学的かつ病理学的意義についての詳細な解析は今後の研究に待ちたい。

結　論

唾液糖タンパクの糖側鎖の非還元末端よりL-フコースを加水分解するα-L-フコシダーゼをFucα1→2Gal結合をもつシアル酸除去ブタ顎下腺ムチンを基質として検索したところ、耳下腺および顎舌下腺唾液にはα-L-フコシダーゼ活性はなく、混合唾液および歯垢に認められた。そして種々の口腔レンサ球菌の培養上清中のα-L-フコシダーゼ活性を調べてみると、

シアル酸除去ブタ顎下腺ムチンに作用するα-L-フコシダーゼが S. sanguis ATCC 10557 株に見出された。そこで本菌株培養上清からα-L-フコシダーゼを分離・精製して、その性状を調べた結果、以下の結論を得た。

1. 分子量は約12万と推定された。
2. 本酵素の等電点は5.0で、その至適pHは5.5であった。また60℃，20分間の加熱によりほぼ失活し、pH変動に対してはpH 5-pH 9の間で安定であった。
3. 精製酵素は、天然基質の非還元末端部にあるFucα1→2Gal結合に強い特異性を示し、p-ニトロフェニル-α-L-フコシドや4-メチルウンベリフェリル-α-L-フコシドといった合成基質やラクト-N-フコペンタイトールⅡのFucα1→4GlcNAc結合やⅢのFucα1→3GlcNAc結合には作用しなかった。
4. 本酵素を分泌型ヒト耳下腺唾液より分離した糖タンパクに作用させたところ、L-フコースが遊離した。

コクヨ 30×30

5．本酵素はH型血液型物質ならびに分泌型のヒト混合唾液に反応し，H型血液型活性を減少させた。またLe^{b}型活性の減少と同時にLe^{a}型活性を増加させた。

稿を終るに臨み，終始ご懇篤なるご指導とご校閲を賜わった常光旭教授に謹しんで感謝の意を表します。また実験の細部にわたってご助言をいただきました本学部口腔細菌学教室小谷尚三教授ならびに生化学教室鈴木不二男教授に深謝致します。

さらに貴重な試料をご提供下さいました神戸大学医学部第一生化学教室木幡陽教授ならびに群馬大学医学部法医学教室古川研教授にお礼申し上げます。

なお本研究を遂行するにあたりひとかたならぬご指導とご校閲を賜わりました予防歯科学教室中村亮助教授に厚くお礼申し上げますとともに，予防歯科学教室の諸先生方に謝意を表します。

コクヨ 20×20

PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF α-L--FUCOSIDASE ISOLATED FROM STREPTOCOCCUS SANGUIS ATCC 10557 : ROLE OF THE ENZYME IN DEGRADATION OF SALIVARY GLYCOPROTEIN

Satoshi SHIZUKUISHI

Department of Preventive Dentistry, Osaka University Dental School, 32 Joan-cho, Kita-ku, Osaka, Japan

Fucosidase is an exoglycosidase that cleaves fucose-containing glycosides, oligosaccharides, glycolipids and glycoproteins to fucose and the corresponding aglycon. The enzyme has been detected in a number of sources, including human saliva, mammalian organs and tissues, molluscs, moulds and microorganisms. In most of these studies, synthetic substances, p-nitrophenyl- or 4-methyl-umbelliferyl-α-L-fucoside were used as substrate. Few of these enzymes exhibited activity towards naturally occurring oligosaccharides and glycoproteins. Fucα1→2Gal-linkages are located at the ends of the carbohydrate chains in porcine submandibullar mucin (PSM). This work firstly demonstrated that α-L-fucosidase from the growth culture of Streptococcus sanguis ATCC 10557 reacted with PSM, but did not hydrolyze the synthetic substrate, p-nitrophenyl-α-L-fucoside (p-NP-α-L-Fuc). Further studies on the purification and some properties, particularly substrate specificity of the α-L-fucosidase from Strep. sanguis ATCC 10557 were carried out. The biological effects of the enzyme on human salivary glycoprotein were also surveyed. The results obtained were summarized as followed.

α-L-Fucosidase activities in human saliva and dental plaque were determined using p-NP-α-L-Fuc and desialized PSM (DS--PSM) as substrates. Dental plaque and whole saliva possesed the enzyme activity against both substrates. Parotid and sub-maxillary-sublingual saliva exhibited the activity on p-NP-α-L-Fuc, but did not on DS-PSM.

α-L-Fucosidase acting on naturally occurring substrates was highly purified from the growth culture of Strep. sanguis ATCC 10557. The molecular weight of the enzyme was approximately 120,000 and the optimal pH was at 5.5. The purified sample was specific for the linkage of Fucα1→2Gal in lacto-N-fucopentaitol I [Fucα1→2Gal β1→3GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glc-O(^{3}H)] and was not active on lacto--N-fucopentaitol II [Galβ1→3(Fucα1→4)GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glc-O(^{3}H)] and III [Galβ1→4(Fucα1→3)GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glc-O(^{3}H)] in which the fucosidic linkage is α-(1→4) and α-(1→3), respectively. The enzyme did not react with synthetic substrates, p-NP-α-L-Fuc and 4-methylumbelliferyl-α-L-fucoside. The enzyme released fucose from salivary glycoprotein and also changed the serological activities.

The results described above may be of importance in the elucidation of the structure and the biological functions of salivary glycoprotein in the oral cavity.

文　献

1) Watkins, W. M. (1972) : Glycoproteins ; their composition, structure and function. (Gottschalk, A., editor). Part B, 2nd ed., Elsvier, Amsterdam, 830-891.

2) Bahl, O. P. (1970) : Glycosidases of Aspergillus niger. II. Purification and general properties of 1,2-α-L-fucosidase. J. Biol. Chem. 245, 299-304.

3) Aminoff, D. and Furukawa, K. (1970) : Enzymes that destroy blood group specificity. I. Purification and properties of α-L-fucosidase from Clostridium perfringens. J. Biol. Chem. 245, 1659-1669.

4) Kochibe, N. (1973) : Purification and properties of α-L--fucosidase from Bacillus fulminans. J. Biochem. 74, 1141-1149.

5) 尾形美登璃，村松　喬，木幡　陽 (1974)：Almond Emulsin のα-L-フコシダーゼ：Fucα1→4(3)GlcNAcに特異的な酵素の単離と性質．生化学，46，663．昭和49．

コクヨ 20×20

6) Nishigaki, M., Muramatsu, T., Kobata, A. and Maeyama, K. (1974) : The broad aglycon specificity of α-L-fucosidases from marine gastropods. J. Biochem. 75, 509-517.

7) Alhadeff, J. A., Miller, A. L., Wenger, D. A. and O'Brien, J. S. (1974) : Electrophoretic forms of human liver α-L-fucosidase and their relationship to fucosidosis (mucopolysaccharidosis F). Clin. Chim. Acta 57, 307-313.

8) DiMatteo, G., Orfeo, M. and Romeo, G. (1976) : Human α-Fucosidase. Purification and properties. Biochim. Biophys. Acta 429, 527-537.

9) Carlsen, R. B. and Pierce, J. G. (1972) : Purification and properties of an α-L-fucosidase from rat epididymis. J. Biol. Chem. 247, 23-32.

10) Kuwahara, M. D., Lyons, S. A., Rosenblit, P. D. and Metzger, R. P. (1976) : Effect of streptozotocin diabetes on selected enzymatic activities in rat urine. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 153, 305-308.

11) Enzyme nomenclature : Recommendations (1972) of the International Union of Pure and Applied Chemistry and the International Union of Biochemistry. Elsvier, Amsterdam.

コクヨ 20×20

12) Mandel, I. D., Thompson, R. and Ellison, S. A. (1964) : The carbohydrate components of human submaxillary saliva. Archs. Oral Biol. 9, 601-609.

13) Levine, M. J., Ellison, S. A. and Bahl, O. P. (1973) : The isolation from human parotid saliva and partial characterization of the protein core of a major parotid glycoprotein. Archs. Oral Biol. 18, 827-837.

14) 中村　亮，常光　旭．(1975)：唾液のグリコプロテイン．国際歯科ジャーナル，2，515-526，昭和50．

15) Leach, S. A. (1970) : Dental plaque. (Mchugh, W. D., editor). E&S Livingstone, Edinburgh, 143-156.

16) Pinter, J. K., Hayashi, J. A. and Bahn, A. N. (1968) : Extracellular streptococcal neuraminidase. J. Bacteriol. 95, 1491-1492.

17) Fukui, K., Fukui, Y. and Moriyama, T. (1971) : Neuraminidase activity in some bacteria from the human mouth. Archs. Oral Biol. 16, 1361-1363.

18) Pinter, J. K., Hayashi, J. A. and Bahn, A. N. (1969) : Carbohydrate hydrolases of oral streptococci. Archs. Oral

コクヨ 20×20

Biol. 14, 735-744.

19) Nord, C. and Wadström, T. (1972) : Formation of α-L-- and β-D-fucosidase in cultures of Streptococcus mitis. Med. Microbiol. Immunol. 159, 95-103.

20) Menguy, R., Masters, Y. F. and Desbaillets, L. (1970) : Human salivary glycosidases. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 134, 1020-1025.

21) Keene, H. J. (1963) : Parotid fluid collection system with vacuum-trap modification. J. Dent. Res. 42, 1041.

22) Block, P. L. and Brottman, S. (1962) : A method of submaxillary saliva collection without cannulization. N. Y. State D. J. 28, 116-118.

23) DeSalegui, M. and Plonska, H. (1969) : Preparation and properties of porcine submaxillary mucins. Archs. Biochem. Biophys. 129, 49-56.

24) Payza, N., Rizui, S. and Pigman, W. (1969) : Studies of action of acids and bases on porcine submaxillary mucin. Archs. Biochem. Biophys. 129, 69-74.

25) Katzman, R. L. and Edwin, H. E. (1966) : The isolation and characterization of a trisacchride from porcine sub-

コクヨ 20×20

maxillary glycoproteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 23, 769-774.

26) Bhattacharyya, A. K. and Aminoff, D. (1966) : Estimation of free methylpentoses in the presence of glycosidically bound sugar. Analyt. Biochem. 14, 278-289.

27) Moriyama, T. and Barksdale, L. (1967) : Neuraminidase of Corynebacterium diphtheriae. J. Bacteriol. 94, 1565-1581.

28) Kunitz, M. (1947) : Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. J. Gen. Physiol. 30, 291-310.

29) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. (1956) : Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analyt. Chem. 28, 350-356.

30) Gibbons, M. N. (1955) : The determination of methylpentoses. Analyst. 80, 268-276.

31) Warren, L. (1959) : The thiobarbituric acid assay of sialic acids. J. Biol. Chem. 234, 1971-1975.

32) Hartree, E. F. (1972) : Determination of protein : A modification of the Lowry method that gives a linear photo-

コクヨ 20×20

metric response. Analyt. Biochem. 48, 422-427.

33) Davis, B. J. (1964) : Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. Ann. N. Y. Acad. Sci. 121, 404-427.

34) Andrews, P. (1965) : The gel filtration behaviour of proteins related to thier molecular weights over a wide range. Biochem. J. 96, 595-606.

35) Vesterberg, O. and Svensson, H. (1966) : Isoelectric fractionation, analysis, and characterization of ampholytes in natural pH gradients. IV. Further studies on the resolving power in connection with separation of myoglobins. Acta Chem. Scand. 20, 820-834.

36) Lineweaver, H. and Burk, D. (1934) : The determination of enzyme dissociation constants. J. Am. Chem. Soc. 56, 658-666.

37) Middleton, J. D. (1964) : Methyl pentoses in human saliva and dental plaque. Nature 202, 392-393.

38) Leach, S. A. and Critchley, P. (1966) : Bacterial degradation of glycoprotein sugars in human saliva. Nature 209, 506.

コクヨ 20×20

39) Carlsson, J. (1968) : A numerical taxonomic study of human oral streptococci. Odont. Revy. 19, 137-160.

40) Colman, G. and Williams, R. E. O. (1972) : Streptococci and streptococcal diseases. (Wannamaker, L. W. and Matsen, J. M., editor). Academic Press, New York, 281-299.

41) Coykendall, A. L. and Specht, P. A. (1975) : DNA base sequence homologies among strains of Streptococcus sanguis. J. Gen. Microbiol. 91, 92-98.

42) 福田 穣, 大沢利昭. (1976) : フコシダーゼ; 糖質の化学 (日本生化学会編). 第4巻, 東京化学同人, 東京, 549-552, 昭和51.

43) 未発表 : 雫石 聰, 常光 旭.

44) Arneberg, P., Kornstad, L., Nordbo, H. and Gjermo, P. (1976) : Less dental caries among secretors than among non-secretors of blood group substance. Scand. J. Dent. Res. 84, 362-366.

45) Thaler, R., Froum, S., Chuba, J. V. and Scopp, I. W. (1976) : A quantitative study on the relationship of salivary blood group substances to periodontal disease. J. Periodont.

コクヨ 20×20

Res. 11, 116-120.

46) 山本　茂.(1972)：ABOとルイス型に関するヒト唾液血液型物質の構成分の性状について．北関東医学，22，31-48，昭和47.

47) Shizukuishi, S., Taniguchi, T., Nakamura, R. and Tsunemitsu, A. (1976) : α-L-Fucosidase activity of some oral streptococci. Archs. Oral Biol. 21, 781-783.

48) Witebsky, E. and Satoh, T. (1933) : Zur Frage des Blutgruppenferment und der Ausscheidung von Blutgruppensubstanz. Klin. Wochenschr. 12, 948-949.

49) Leach, S. A. (1963) : Release and break down of sialic acid from human salivary mucin and its role in the formation of dental plaque. Nature 199, 486-487.

50) 林　博雄.(1977)：獲得被膜形成に関する基礎的研究．－獲得被膜モデルの形成と唾液糖蛋白シアル酸の関係についての走査型電顕による観察－，日歯周誌，19，109-142，昭和52.

51) Qureshi, V. and Gibbons, R. J. (1977) : Specific binding of blood group reactive salivary mucins by strains of S. mutans and other oral bacteria. J. Dent. Res. 56, B54.

コクヨ 20×20

52) Kondo, W., Sato, M. and Ozawa, H. (1976) : Haemagglutinating activity of Leptotrichia buccalis cells and their adherence to saliva-coated enamel powder. Archs. Oral Biol. 21, 363-370.

コクヨ 20×20

表題脚注

大阪大学歯学部予防歯科学教室
（主任　常光　旭教授）

本論文の要旨は，昭和51年8月の第25回口腔衛生学会総会，昭和52年10月の第26回口腔衛生学会総会ならびに昭和52年12月の第25回IADR日本部会総会において発表した。

単糖類には下記の略語を用いた。

L-フコース：Fuc，D-ガラクトース：Gal，N-アセチル-D-グルコサミン：GlcNAc，N-アセチル-D-ガラクトサミン：GalNAc，D-グルコース：Glc，N-グリコリルノイラミン酸：NGNA，[^{3}H]-ソルビトール：Glc-O[^{3}H].

コクヨ 20×20

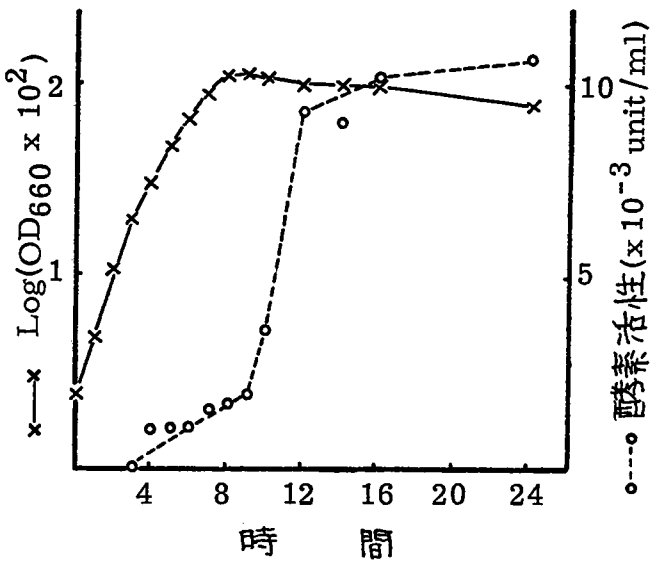


図1　S. sanguis ATCC 10557 株の発育曲線と培養上清のα-L-フコシダーゼ活性

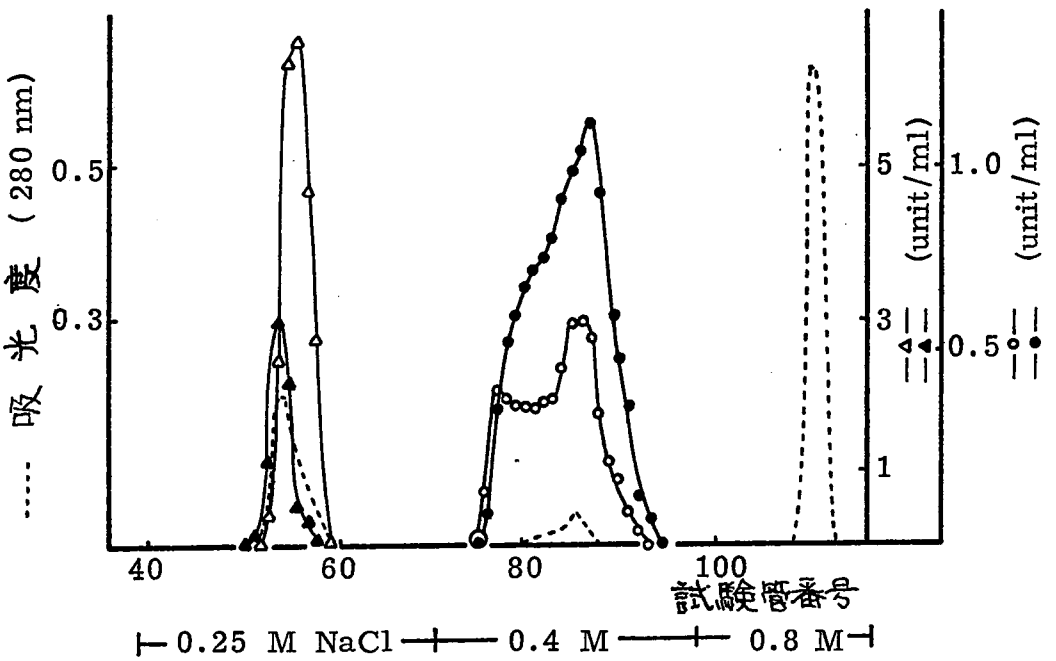


図2　S. sanguis ATCC 10557 株のα-L-フコシダーゼの DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィ

●—●　：α-L-フコシダーゼ
○—○　：ノイラミニダーゼ
▲—▲　：β-ガラクトシダーゼ
△—△　：β-N-アセチルグルコサミニダーゼ

栗石

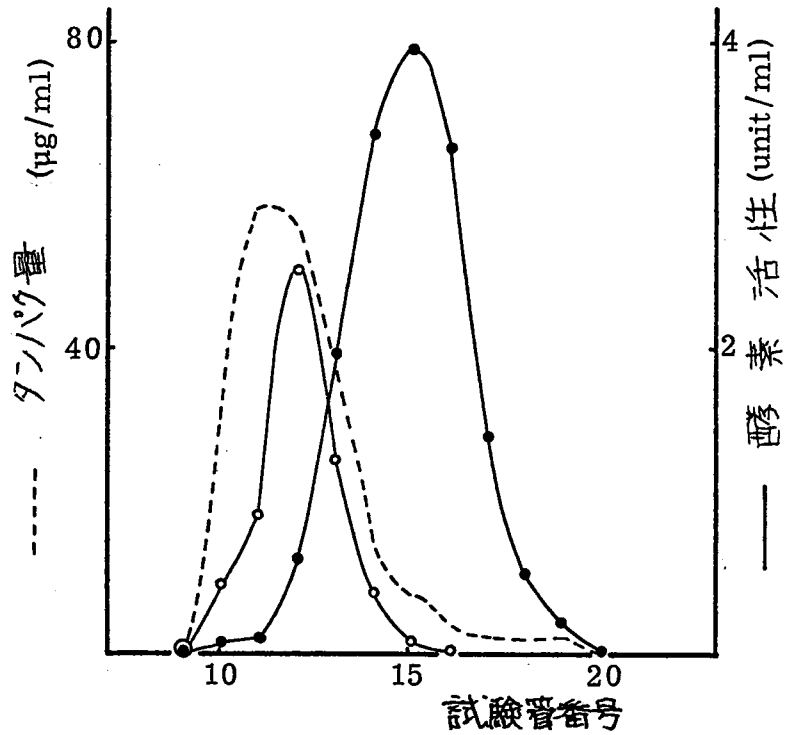


図3. S. sanguis ATCC 10557 株の α-L-フコシダーゼの第二回 Sephadex G-200によるゲル沪過

●—● : α-L-フコシダーゼ

○—○ : ノイラミニダーゼ

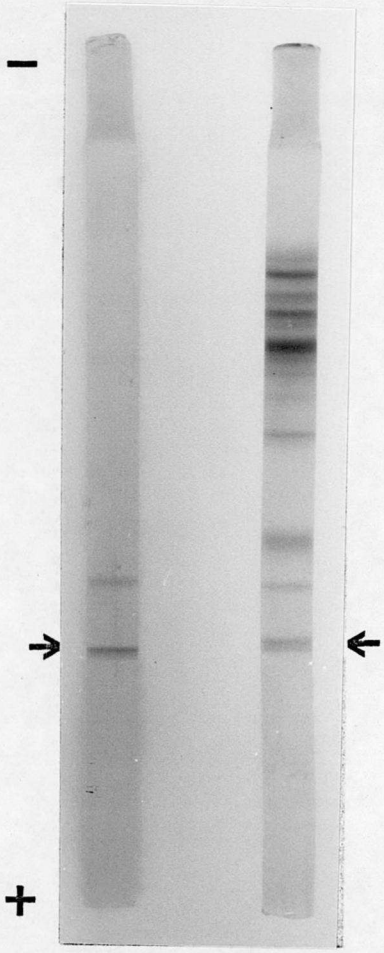


図4. S. sanguis ATCC 10557のα-L-フコシダーゼのディスク電気泳動パターン

検出は アミドブラック 10Bによった

右 : 30%—80% 飽和硫安画分

左 : 精製酵素

→ : ブロムフェノールブルー

栗石聡

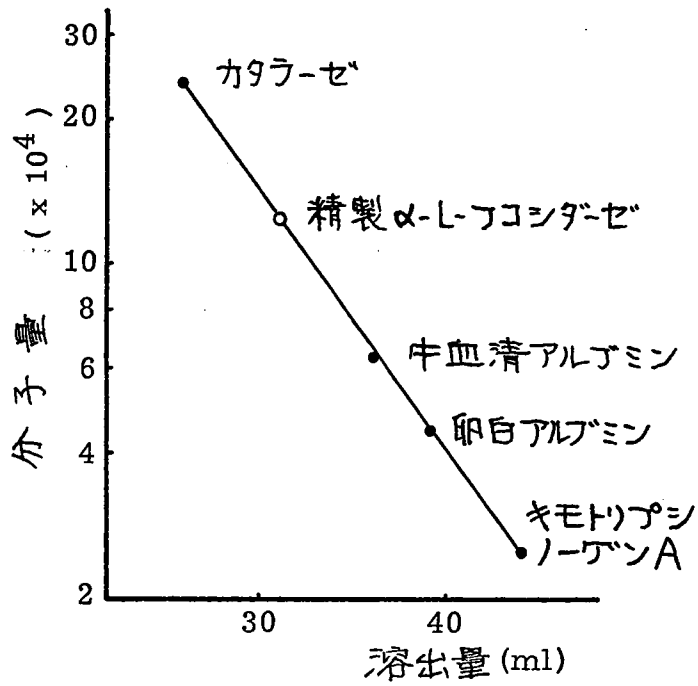


図5. Sephadex G-200 ゲル沪過による精製酵素の分子量測定

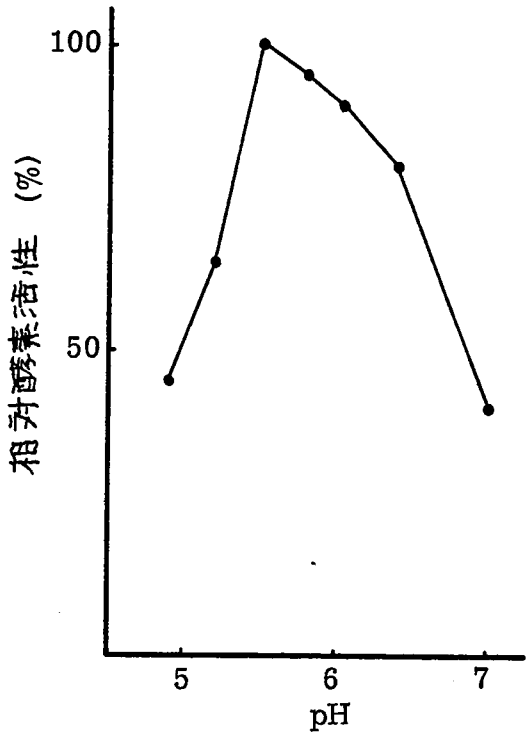


図6　精製酵素の至適pH

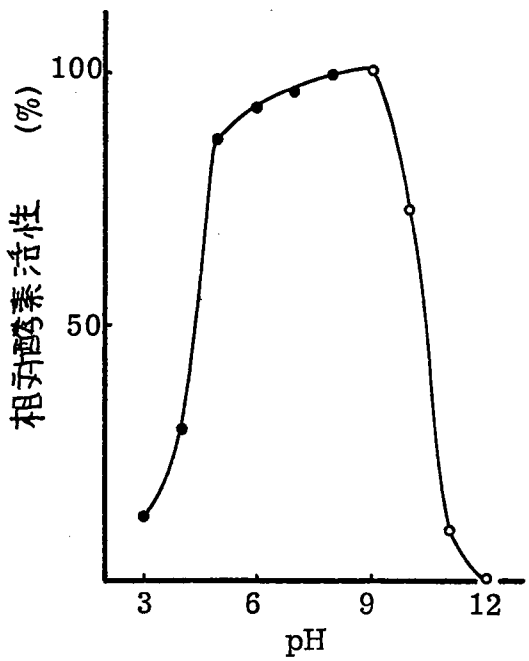


図7　pH変動による精製酵素の安定性

●—●：リン酸ナトリウム－クエン酸緩衝液

○—○：炭酸緩衝液

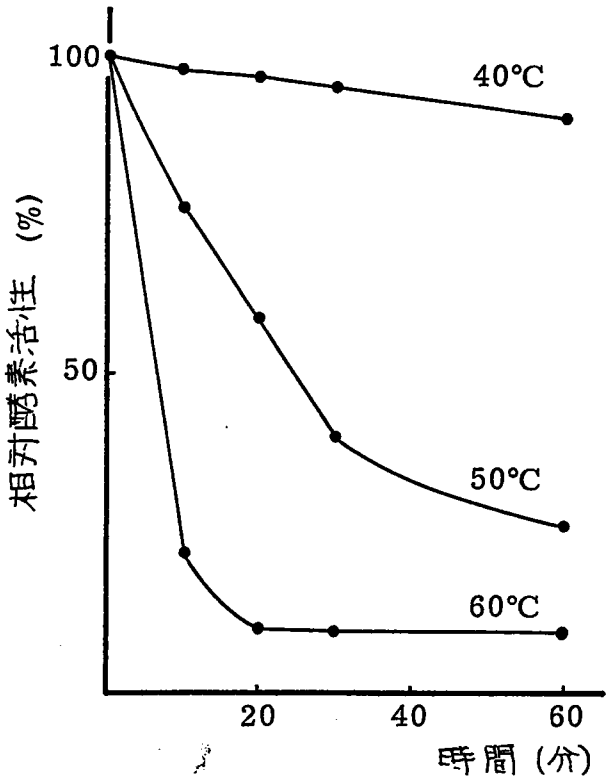


図 8. 精製酵素の耐熱性

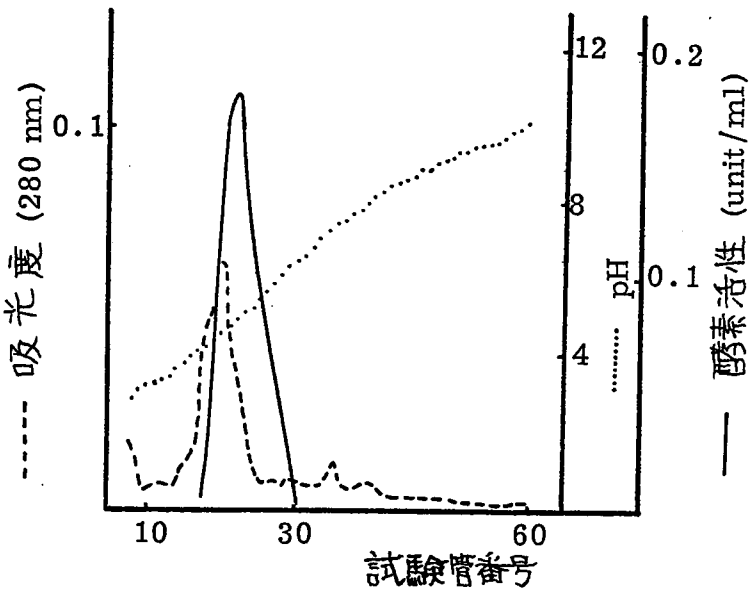


図9　S. sanguis ATCC 10557 株のα-L-フコシダーゼの等電点分画

本実験には DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィより得た酵素を用いた。

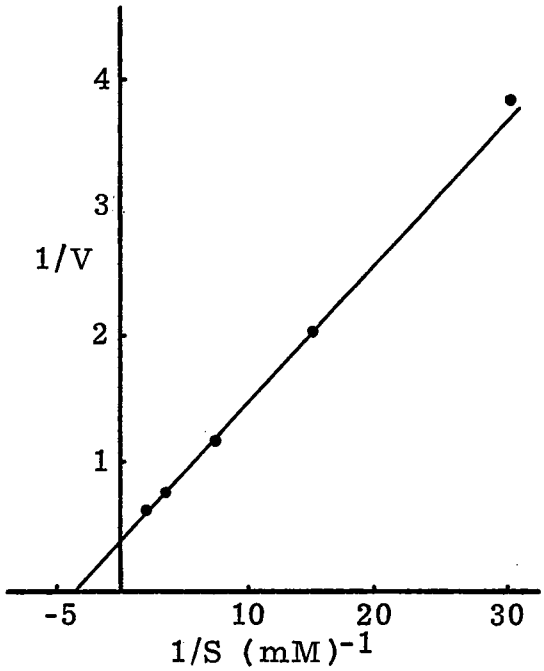


図10. 精製酵素による Lineweaver -Burk のプロット

昭石聡

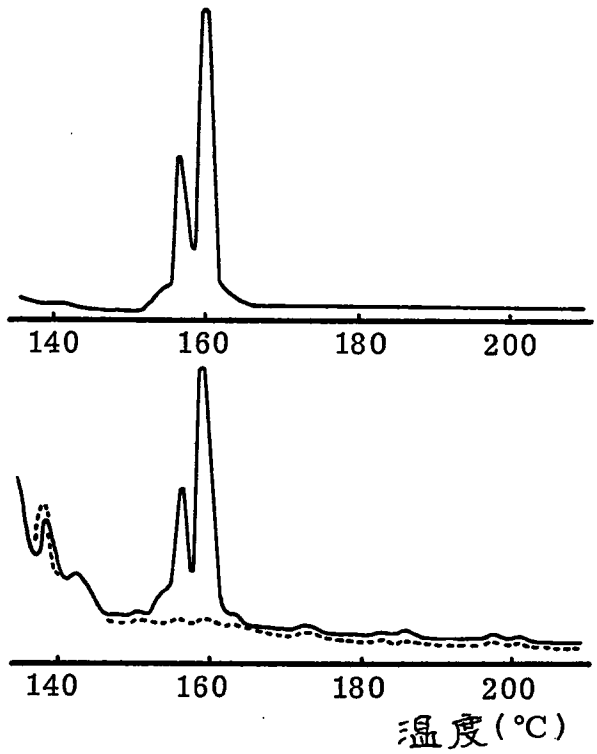


図11　精製酵素をシアル酸除去ブタ顎下腺ムチンに作用させた場合に生ずる分解産物のガスクロマトグラフィ

上：—— L-フコース
下：—— 反応液（＋精製酵素）
　　---- 対　照（＋失活酵素）

LNT : ラクト-N-テトライトール

Galβ1→3GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glc-O[^{3}H]

LNF I : ラクト-N-フコペンタイトールI

Galβ1→3GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glc-O[^{3}H]
2
↑
Fucα1

LNF II : ラクト-N-フコペンタイトールII

Galβ1→3GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glc-O[^{3}H]
4
↑
Fucα1

LNF III : ラクト-N-フコペンタイトールIII

Galβ1→4GlcNAcβ1→3Galβ1→4Glc-O[^{3}H]
3
↑
Fucα1

図12　人乳少糖の糖鎖配列

要石見

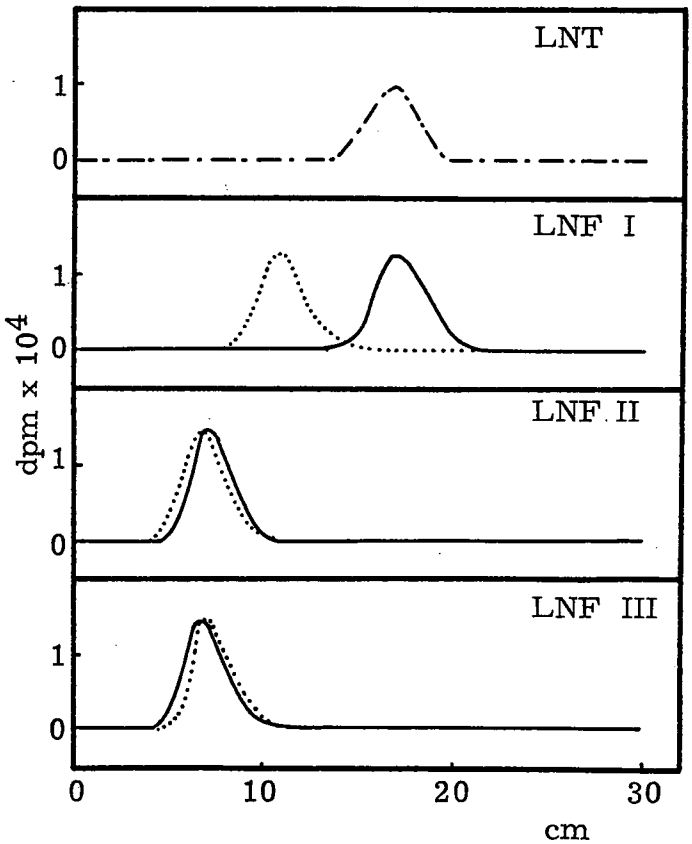


図13. 精製酵素による人乳少糖に対する作用

図はLNF I, II, IIIに精製酵素を37℃15時間反応させたのち，ペーパークロマトグラフィを行ない，放射能を測定したものである。

---- : LNT
—— : 反応液（＋精製酵素）
····· : 対　照（＋失活酵素）

表1　歯垢および唾液のα-L-フコシダーゼ活性

試料	酵素活性 (x 10^{-3} unit/mg protein)	
	p-ニトロフェニル α-L-フコシド	シアル酸除去ブタ顎下腺ムチン
歯垢 (28)	208 ± 90.8*	69 ± 34.3
混合唾液 (28)	59 ± 32.2	64 ± 35.6
耳下腺唾液 (27)	9.5 ± 2.27	0
顎舌下腺唾液 (27)	16 ± 5.82	0

( )内の数字は例数を示す。
* 平均値 ± 標準偏差

表 2. 口腔レンサ球菌培養上清のα-L-フコシダーゼ活性

菌株		酵素活性 (unit/mg protein)	
		p-ニトロフェニル-α-L-フコシド	シアル酸除去ブタ顎下腺ムチン
S. mutans	Serotype		
HS-1	a	0	0
E 49	a	0	0
FA-1	b	0	0
BHT	b	0	0
NCTC 10449	c	0	0
Ingbritt	c	0	0
GS 5	c	0	0
B 13	d	0	0
OMZ 176	d	0	0
LM 7	e	0	0
P 4	e	0	0
OMZ 175	f	0	0
SE 11	f	0	0
K1R	g	0	0
OMZ 65	g	0	0
S. mitis			
ATCC 9811		0	0.025
S. salivarius			
ATCC 9222		0	0
HT-3		0	0
HT-9		0	0
S. sanguis			
ATCC 10556		0	0
ATCC 10557		0	0.037
M-5		0	0
ST-6		0	0
ST-8		0	0

聖石聰

表 3. S. sanguis ATCC 10557 株の α-L-フコシダーゼの精製

操作	総蛋白量 (mg)	総活性量 (unit)	比活性 (unit/mg protein)	精製度 (倍)	回収率 (%)
硫安濃縮 (0-80%)	13721	306	0.022	1	100
第一回 Sephadex G-200 ゲル沪過	30.4	196	6.45	289	64.1
硫安分画 (30-80%)	18.1	176	9.72	436	57.5
DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィ	0.766	59.5	77.7	3484	19.5
第二回 Sephadex G-200 ゲル沪過	0.051	22.2	435	19520	7.3

表4. S. sanguis ATCC 10557 株のα-L-フコシダーゼの合成基質ならびにH型血液型天然基質に対する特異性

基　　質	相対加水分解度* (%)
p-ニトロフェニル-α-L-フコシド	0
4-メチルウンベリフェリル-α-L-フコシド	0
ブタ顎下腺ムチン	68
シアル酸除去ブタ顎下腺ムチン	100
シアル酸除去ブタ顎下腺糖ペプチド	78
シアル酸除去ブタ顎下腺オリゴ糖	70
ブタ胃粘膜	57
ヒト胃粘膜	82
ヒト卵巣嚢腫液	23
分泌型ヒト耳下腺唾液糖タンパク	72

*シアル酸除去ブタ顎下腺ムチンを基質とした時の一定条件における加水分解値を100として表わす。

表5. 血液型活性におよぼす S. sanguis ATCC 10557株のα-L-フコシダーゼの影響

血液型物質	血球凝集阻止活性 (μg/ml)*					
	失活酵素処理			酵素処理		
	H	Le^a	Le^b	H	Le^a	Le^b
ブタ顎下腺ムチン	125	—	—	500	—	—
ブタ胃粘膜	< 2.0	—	—	1000	—	—
ヒト胃粘膜	< 2.0	250	1.0	1000	62.5	2.0
ヒト卵巣嚢腫液	2.0	250	0.2	250	31.2	3.9
ヒト混合唾液						
分泌型 Le(a+b+)	0.4	131	1.6	13.1	65.6	6.6
非分泌型 Le(a+b−)	—	1.1	—	—	1.1	—

* 血球凝集を阻止する血液型物質の最小量で表わす。