

Title	唾液糖タンパクを分解するStreptococcus sanguis ATCC 10557株由来の $\alpha$ -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	<a href="https://hdl.handle.net/11094/32008">https://hdl.handle.net/11094/32008</a>
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

1  
唾液糖タンパクを分解する Strepto-  
coccus sanguis ATCC 10557 株由来の  $\alpha$ -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行置し、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<sup>1)</sup>。

α-L-フコシターゼ (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<sup>2)-4)</sup>, 植物<sup>5)</sup>, 軟体動物<sup>6)</sup>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<sup>7)-10)</sup> 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

ことが判明して来た。特に Aspergillus niger<sup>2)</sup> ,  
Clostridium perfringens<sup>3)</sup> , Bacillus fulminans<sup>4)</sup> ( 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  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2) で結合したもののだけを持要的に切断し、広い基質特異性をもつ  $\alpha$ -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<sup>11)</sup>。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 Fuc  $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 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<sup>12)-14)</sup>。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<sup>15)</sup>。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(ノイラミンダーゼ)に関しては若干の知見が得られているが<sup>16), 17)</sup>、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<sup>18)</sup> や、S. mitis についての Nord and Wadströmの研究<sup>19)</sup> があるのみである。これらの研究や Menguy, Masters and Desbaillets が見出したヒト唾液由来の $\alpha$ -L-フコシダーゼの報告<sup>20)</sup> 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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 2)でガラクトースに結合しているブタ膵下腺ヒン素を基質として用い、唾液、歯垢および口腔レンサ球菌の $\alpha$ -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名より水浄下で採取した。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<sup>21)</sup>によって、また顎舌下腺唾液はフエン酸刺激でBlock and Brotzmanの方法<sup>22)</sup>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, KLR, OMZ 65,

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、あう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ヶ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<sup>23)</sup>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  $70^\circ C$ , 4 時間加水分解して N-グリコリルノイラミン酸を切断<sup>24)</sup>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 をプロトナーゼ (Calbiochem. LaJoll, Calif., U.S.A.) で 2 回、パイン (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo., U.S.A.) で 1 回消化したのち、Sephadex G-50 ゲル濾過により分離したものをを用いた。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<sup>25)</sup>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 ゲル濾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 (HOCP) 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



リテ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- $\alpha$ -L-フコシドお  
 る  $\beta$ -ニトロフェニルグリコシド類は Koch--  
 Light Laboratories Ltd. (Buckinghamshire, England) より  
 得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

$\alpha$ -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、0.6mlの0.1Mリン酸  
 ナトリウム-0.05M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<sup>26)</sup>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- $\alpha$ -L-フコシド (p-NP- $\alpha$ -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  $\mu$ moles 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  
 ニールを日立 10J 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- $\alpha$ -L-フコシドを基質とした場合は Alhadeff  
 らの方法<sup>7)</sup> 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。なお歯垢中の活性測定は 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フ  
 ロテイン Fr.VI を基質として Moriyama and Barksdale  
 の方法<sup>27)</sup> に準じて測定し、また  $\alpha$ -D-、 $\beta$ -D-、  
 $\beta$ -L-フコシダーゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、  
 $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ、 $\alpha$ -マ

ンノシターゼは各々の p-ニトロフェニルグリ  
コシドを基質として Pinter らの方法<sup>16)</sup>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<sup>28)</sup>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<sup>に</sup> 1  $\mu$ mole の単糖またはアグリコン  
を遊離する酵素量を1ユニットと規定した。  
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<sup>29)</sup>に  
より、またフコースは Gibbons のチオグリコー  
ル酸法<sup>30)</sup>で、シアル酸は Warren のチオバルビ  
ツール酸法<sup>31)</sup>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<sup>32)</sup>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<sup>33)</sup> 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 10 B を用いて検出した。

## 8. 分子量の測定

Andrews の方法<sup>34)</sup> 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 Mannheim GmbH, Mannheim, West Germany) を使用した。1 x 70 cm のカラムに 0.01 M 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 2 mg) を展開させた。流速は 5 ml/hr で、1 ml 毎に分取した。

## 9. 等電気分画

Vesterberg and Svensson の方法<sup>35)</sup>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 OD<sub>280</sub> の吸光度および  $\alpha$ -L- フコシダーゼ活性を測定した。

## 10. ガスフロマトグラフィ

木素炎イオン化検出器付ガスフロマトグラフィ GC-4CMPF 型 (島津製作所, 京都) および日立 056 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  $\mu$ l をカラムに注入し、カラムの温度を 120 $^{\circ}$ C から 210 $^{\circ}$ C まで 5 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ C 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<sup>6)</sup> に準じて行ない、反応液は全量 40  $\mu$ l 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  $\mu$ g と人乳少糖 (43780 dpm, 163 mCi/mmol) を含み、少量のトルエン存在下で 37 $^{\circ}$ 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 間隔に切断した濾紙を 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 (アフラリン 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

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 0.03 M リン酸ナトリウム - 0.015 M グイン酸緩衝液 (pH 5.5) に血液型物質 400  $\mu$ g (乾燥重量)，窒化ナトリウム 30  $\mu$ g 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うち，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 分間煮沸したのうち，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<sup>4)</sup>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 型血球としクテン H (DADE Division, American Hosp. Supply Corp., Miami, Fla., U.S.A.) を，Le<sup>a</sup>型は 5% H，Le<sup>a</sup>型血球と抗 Le<sup>a</sup>ヒト血清 (DADE Division) を，Le<sup>b</sup>型は 5% H，Le<sup>b</sup>型血球と抗 Le<sup>b</sup>ヤギ血清 (Ortho Diagnostics Inc.,

.N.J., U.S.A.) を使用した。阻止反応にはマイクロナ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 $\mu\text{g}$ 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 $\mu\text{g}$ タンパク量で表わした。

## 実験結果

### 1. 歯垢および唾液の $\alpha$ -L-フコシダーゼ活性

歯垢および唾液の $\alpha$ -L-フコシダーゼ活性を表1に示した。 $\text{p-NP-}\alpha\text{-L-Fuc}$  に作用する $\alpha$ -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、 $\text{DS-PSM}$  に作用する $\alpha$ -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 $\text{DS-PSM}$  に作用する $\alpha$ -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 $\alpha$ -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- $\alpha$ -L-Fuc に作用する  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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 $\alpha$ -L-フコシダーゼの精製

### (1) 菌の培養

菌の発育曲線と  $\alpha$ -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

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) 硫酸濃縮

12 l の培養上清を硫酸80%飽和で塩析し、10000×g、60分間遠心して得られた沈渣を0.01 M 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 によるゲル濾過

硫酸濃縮により得られた画分を、0.01 M 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 × 100 cm) で2回に分けてゲル濾過した。この操作により増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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -L-フコシダーゼ画分 (460 ml) を集めた。

#### (4) 硫酸分画

上記の活性画分に硫酸を添加し得られた 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

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 $\alpha$ -L-フコシダーゼ活性を示した。この操作で $\beta$ -ガラクトシダーゼおよび $\beta$ -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 $\alpha$ -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 によるゲル濾過

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)でゲル濾過し、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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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435 units/mgで、培養上清を硫酸濃縮したものの19520倍に精製された。なお精製酵素標品には $\alpha$ -D-

,  $\beta$ -D-,  $\beta$ -L- フコシダーゼ, ノイラミニダーゼ,  $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ,  $\beta$ -ガラクトシダーゼ,  $\alpha$ -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 $\alpha$ -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%飽和硫酸画分(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もの、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、ゲル濾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) 最適 pH

本酵素の最適 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、最適 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°C, 1.5 時間酵素をインキュベートしたのち、 $\alpha$ -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°C, 50°C, 60°C 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われぬが、50℃、30分間で半減、60℃では20分間以上では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  $\alpha$ -L-7 コシグーゼ活性を認め、本酵素は酸性タンパクであるといえる。

図9

### (7) $K_m$

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<sup>36)</sup> によって  $K_m$  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  $\alpha$ -L-7 コシグ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 0.1 ml の 0.03 M リン酸ナトリウム - 0.015 M クエン酸緩衝液に 10  $\mu$ g 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°C, 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°C 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  $\alpha$ -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の基質に対する  
 相対加水分解度を表わしたものである。本酵  
 素は p-NP- $\alpha$ -L-Fuc および 4-メチルウンベリフェ  
 リル- $\alpha$ -L- フコシドといった合成基質にはま  
 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  $\text{Fuc}\alpha 1$ -  
 $\rightarrow 2\text{Gal}\beta 1 \rightarrow 3\text{GalNAc}$  である。その他の H 型血液型  
 $\begin{array}{c} 6 \\ \uparrow \\ \text{NGNA}\alpha 2 \end{array}$   
 物質である PGL, HGL および HOCP 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  $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}$  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  $\alpha$ -L-フコシ  
グ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、全く 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  $\text{Fuc}\alpha 1 \rightarrow 2\text{Gal}$  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  $\alpha$ -L-フコシ  
グーゼの血液型活性に対する作用  
H型,  $\text{Le}^a$ 型および  $\text{Le}^b$ 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

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 キト 混  
 合 唾液 に 作用 させた ところ、分泌 型の キト 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 しなかつ た。これら の 結果は 本 酵  
 素が  $Fuc\alpha 1 \rightarrow 2Gal$  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 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<sup>37)</sup>。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<sup>38)</sup>、唾液の糖  
 タンパクかう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<sup>15)</sup>。一方、  
 口腔レンサ球菌由来の $\alpha$ -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<sup>18)</sup>やNord and Wadström<sup>19)</sup>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- $\alpha$ -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るらう  
 。著者は天然基質としてブタ膵下腺より抽出  
 したシアル酸除去ブタ膵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中に存在する  $\alpha$ -L-フコシダーゼは p-ニトロフェニル- $\alpha$ -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  $\alpha$ -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で推定されたので、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  $\alpha$ -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<sup>17), 39)</sup>。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<sup>40)</sup>、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<sup>41)</sup>。

一般に  $\alpha$ -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  $\alpha$ -L-フコシダーゼの精製標品がいくつか得られているが<sup>2)-4)</sup>、著者が分離・精製した S. sanguis ATCC 10557 株の  $\alpha$ -L-フコシダーゼの比活性は 435 units/mg で Cl. perfringens<sup>3)</sup> の 476 units/mg とほぼ同程度の値を示し、培養上清を硫酸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、 $\beta$ -ニトロフェニルグリコシドに作用するエミソグリコシダーゼ活性ある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  $\alpha$ -L-フコシダーゼの至適 pH は 5.5 で分り量は約 12 万であるが、これを Cl. perfringens と B. fulminans<sup>4)</sup> 由来のものと比較すると、前者の至適 pH は 6.0、分り量は約 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 $\alpha$ -L-フコシダーゼの性状は互いに相違がみられる。

天然基質に作用する $\alpha$ -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<sup>42)</sup>。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示しているものである。著者の精製した $\alpha$ -L-フコシダーゼは後者に属しているといえる。本酵素のブタ膵下腺ムチンとそのペプチド鎖および糖側鎖を修飾した物質に対する加水分解度は、シアル酸除去ブタ膵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、高カブ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

ヒト卵巣囊腫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  $\text{Fuc}\alpha 1\text{-}2\text{Gal}$  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*<sup>2)</sup>、*Cl. perfringens* および *B. fulminans* とよく似ており、 $\text{Fuc}\alpha 1\text{-}2\text{Gal}$  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、 $\text{Fuc}\alpha 1\text{-}4\text{GlcNAc}$  結合をもつ II や  $\text{Fuc}\alpha 1\text{-}3\text{GlcNAc}$  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  $\text{Fuc}\alpha 1\text{-}2\text{Gal}$  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、 $\alpha\text{-}(1\text{-}4)$  または  $\alpha\text{-}(1\text{-}3)$  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  $\alpha\text{-L-}$ フコシダーゼの作用として、*B. fulminans* の H 型分解酵素は  $\text{Fuc}\alpha 1\text{-}2\text{Gal}$  結合を切断し、そのため H 型および L 型活性が減少する。それに伴い  $\text{Fuc}\alpha 1\text{-}2\text{Gal}\beta 1\text{-}3$



(Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc- 構造が Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3(Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc- となり Le<sup>a</sup>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  $\alpha$ -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 Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Gal 結合を切断することが確認できた。

今回の実験によつて、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<sup>b</sup>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  $\alpha$ -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 Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 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 Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 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  $\alpha$ -L-フコシダーゼは p-ニトロフェニル- $\alpha$ -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<sup>43)</sup>。唾液の血液型物質とラッセル<sup>44)</sup>および歯周疾患<sup>45)</sup>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<sup>46)</sup>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腺下腺ムチンに作用する  $\alpha$ -L-フコシダーゼを菌体内に持っているものが、*S. sanguis* の数株にみられた<sup>47)</sup>。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

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 $\alpha$ -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る。

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<sup>48)</sup>。従って口腔レンサ球菌より由来する $\alpha$ -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、菌垢の形成過程において唾液の糖タンパクが果た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

パフ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<sup>49), 50)</sup>、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 $\alpha$ -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<sup>51)</sup>や Leptotrichia bu-  
ccalis 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<sup>52)</sup>もある。これらの事柄から  
 考え、口腔レンサ球菌由来の $\alpha$ -L-フコシダー

せ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. san-  
guis ATCC 10557 株由来の  $\alpha$ -L-フコシターゼの影  
 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  $\alpha$ -L-フコシターゼ  
 を Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Gal 結合をもつシアル酸除去ブク下  
 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  $\alpha$ -L-フコシターゼ  
 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  $\alpha$ -L-フコシターゼ活性を調べてみると、

シアル酸除去ブノ顎下腺ムチンに作用する $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Gal結合に強い特異性を示し、p-ニトロフェニル- $\alpha$ -L-フコシドや4-メチルウンベリフェリル- $\alpha$ -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 Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc結合やIIIの Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 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。

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<sup>b</sup>型活性の減少と同時にLe<sup>a</sup>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たきました本学部口腔細菌学教室小谷尙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り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。

PURIFICATION AND SOME PROPERTIES OF  $\alpha$ -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- $\alpha$ -L-fucoside were used as substrate. Few of these enzymes exhibited activity towards naturally occurring oligosaccharides and glycoproteins. Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Gal-linkages are located at the ends of the carbohydrate chains in porcine submandibular mucin (PSM). This work firstly demonstrated that  $\alpha$ -L-fucosidase from the growth culture of Streptococcus sanguis ATCC 10557 reacted with PSM, but did not hydrolyze the synthetic substrate, *p*-nitrophenyl- $\alpha$ -L-fucoside (*p*-NP- $\alpha$ -L-Fuc). Further studies on the purification and some properties, particularly substrate specificity of the  $\alpha$ -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.



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

$\alpha$ -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 Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Gal in lacto-N-fucopentaitol I [ Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 2Gal  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc-O( $^3$ H) ] and was not active on lacto-N-fucopentaitol II [ Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3(Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4)GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc-O( $^3$ H) ] and III [ Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4(Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 3)GlcNAc $\beta$ 1 $\rightarrow$ 3Gal $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4Glc-O( $^3$ H) ] in which the fucosidic linkage is  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 4) and  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 3), respectively. The enzyme did not react with synthetic substrates, p-NP- $\alpha$ -L-Fuc and 4-methylumbelliferyl- $\alpha$ -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., Elsevier, Amsterdam, 830-891.
- 2) Bahl, O. P. (1970) : Glycosidases of Aspergillus niger. II. Purification and general properties of 1,2- $\alpha$ -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  $\alpha$ -L-fucosidase from Clostridium perfringens. J. Biol. Chem. 245, 1659-1669.
- 4) Kochibe, N. (1973) : Purification and properties of  $\alpha$ -L--fucosidase from Bacillus fulminans. J. Biochem. 74, 1141-1149.
- 5) 尾形美登瑠, 村松 喬, 木幡 陽 (1974) : Almond Emulsin の  $\alpha$ -L-フコシターゼ : Fuc $\alpha$ 1 $\rightarrow$ 4(3)GlcNAc に 特異的な 酵素 の 単離 と 性質 . 生化学, 46, 663. 昭和 49 .

- 6) Nishigaki, M., Muramatsu, T., Kobata, A. and Maeyama, K. (1974) : The broad aglycon specificity of  $\alpha$ -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  $\alpha$ -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  $\alpha$ -Fucosidase. Purification and properties. Biochim. Biophys. Acta 429, 527-537.
- 9) Carlsen, R. B. and Pierce, J. G. (1972) : Purification and properties of an  $\alpha$ -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. Elsevier, Amsterdam.

- 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  
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) : Neura-  
minidase 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

Biol. 14, 735-744.

- 19) Nord, C. and Wadström, T. (1972) : Formation of  $\alpha$ -L-- and  $\beta$ -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 Brotzman, 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-

- 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. I. 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-

- 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 their 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.

- 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 穰, 大沢利昭. (1976) : フコシターゼ; 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: 栗石 聰, 常光 祖.
- 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.



Res. 11, 116-120.

- 46) 山本 茂.(1972): ABOとルイス型に關する  
 唾液血液型物質の構成成分の性状につ  
 いて. 北関東医学, 22, 31-48, 昭和47.
- 47) Shizukuishi, S., Taniguchi, T., Nakamura, R. and  
 Tsunemitsu, A. (1976):  $\alpha$ -L-Fucosidase activity of some  
 oral streptococci. Archs. Oral Biol. 21, 781-783.
- 48) Witebsky, E. and Satoh, T. (1933): Zur Frage des Blut-  
 gruppenferment und der Ausscheidung von Blutgruppensub-  
 stanz. 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 for-  
 mation of dental plaque. Nature 199, 486-487.
- 50) 林 博雄.(1977): 獲得被膜形成に關する基  
 礎的研究 - 獲得被膜モデルの形成と唾液  
 糖蛋白シアル酸の關係についての走査型  
 電顕による觀察 - 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.

- 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.

## 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-グリコシルノイラミン酸: NGNA , [<sup>3</sup>H]-ソルビトール: Glc-O[<sup>3</sup>H].

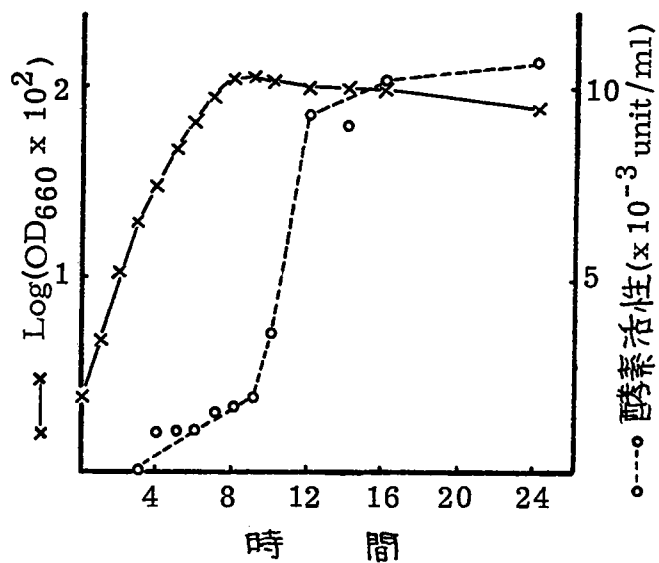


図1 S. sanguis ATCC 10557 株の発育  
 曲線と培養上清の $\alpha$ -L-フコシダーゼ  
 活性

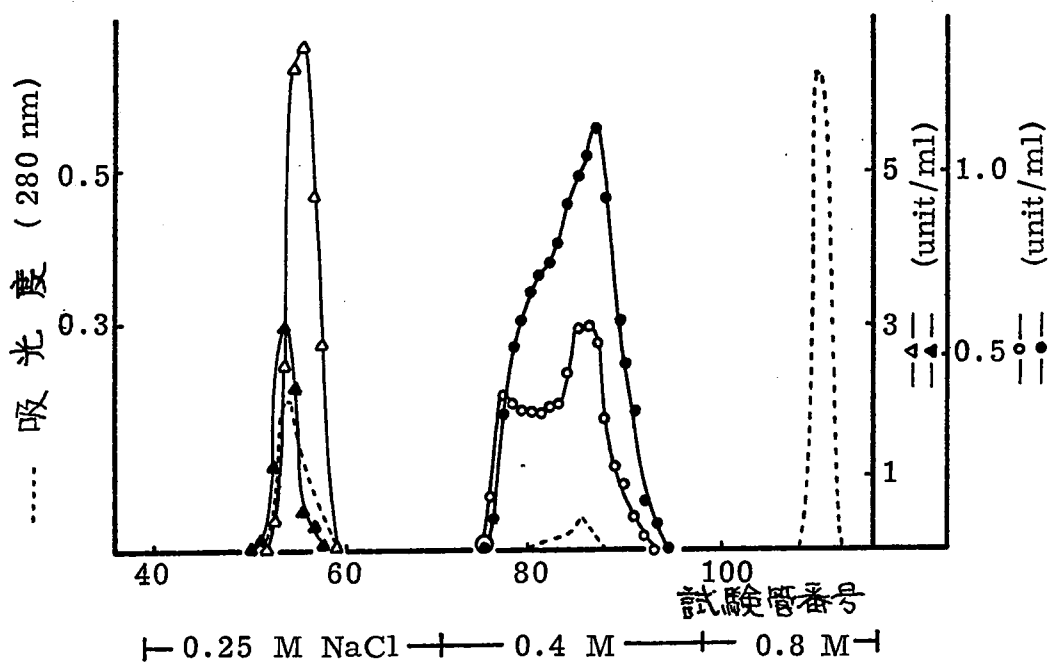


図2 S. sanguis ATCC 10557 株の $\alpha$ -L-フコシダーゼ  
の DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィ

- :  $\alpha$ -L-フコシダーゼ
- : ノイラミニダーゼ
- ▲—▲ :  $\beta$ -ガラクトシダーゼ
- △—△ :  $\beta$ -N-アセチルグルコサミニダーゼ

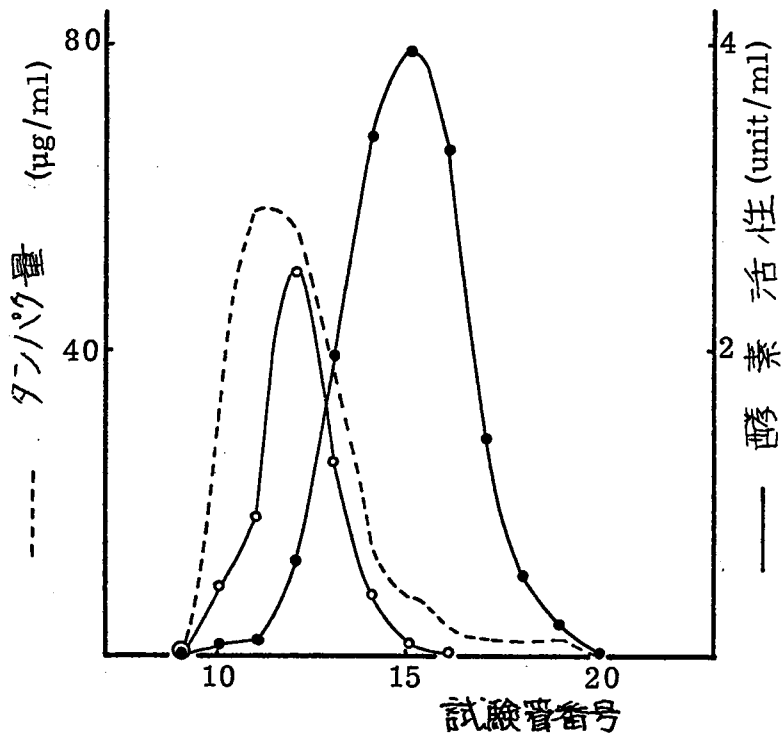


図3. *S. sanguis* ATCC 10557 株の $\alpha$ -L-フコシターゼの第二回 Sephadex G-200によるゲル透過  
 ●—● :  $\alpha$ -L-フコシターゼ  
 ○—○ : ノイテミニターゼ

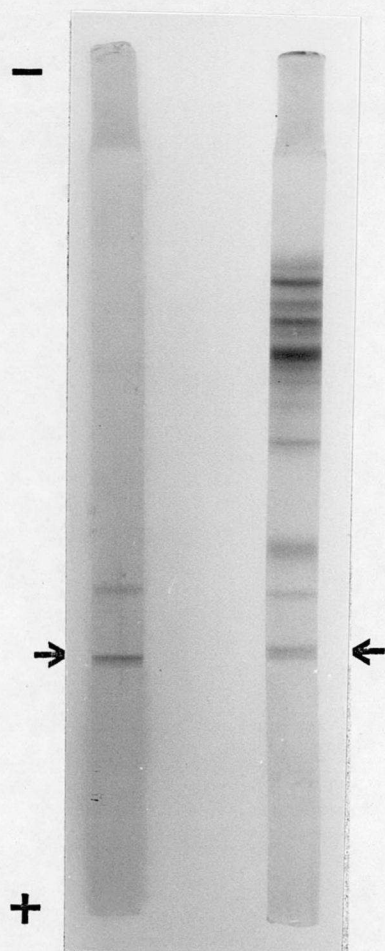


図4.

S. sanguis ATCC 10557の $\alpha$ -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による

右：30%—80%飽和硫酸画分

左：精製酵素

→：ブロムフェノールブルー

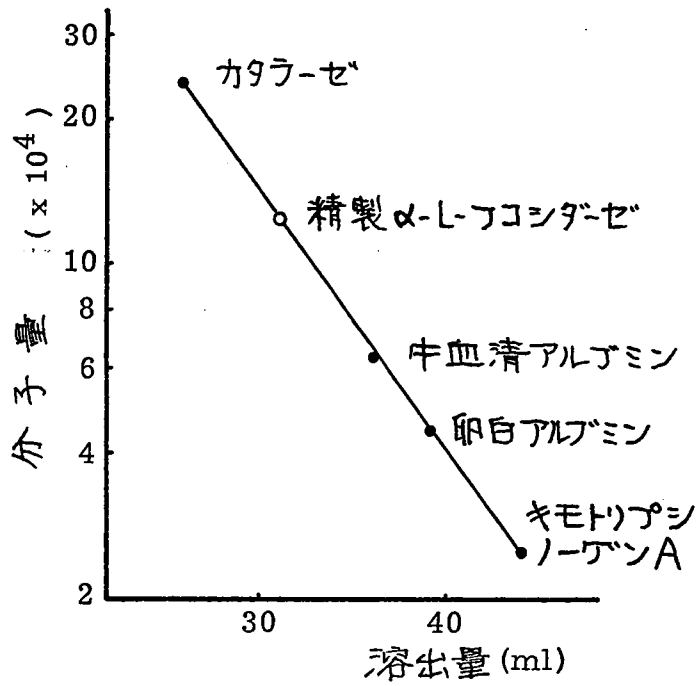


図5. Sephadex G-200ゲル透過による  
精製酵素の分子量測定



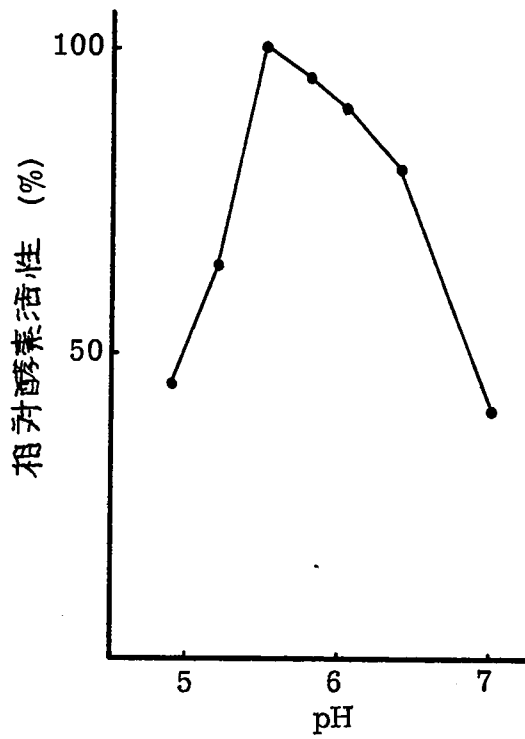


図6 精製酵素の至適pH

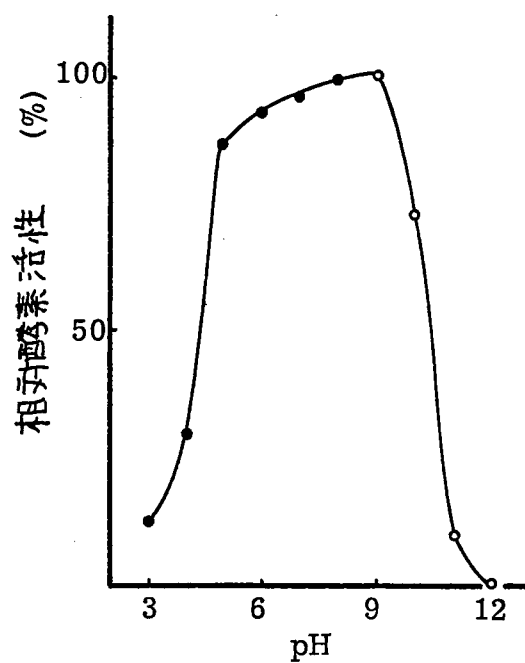


図7 pH変動による精製酵素  
の安定性

- : リン酸トリウム-クエン酸緩衝液
- : 炭酸緩衝液

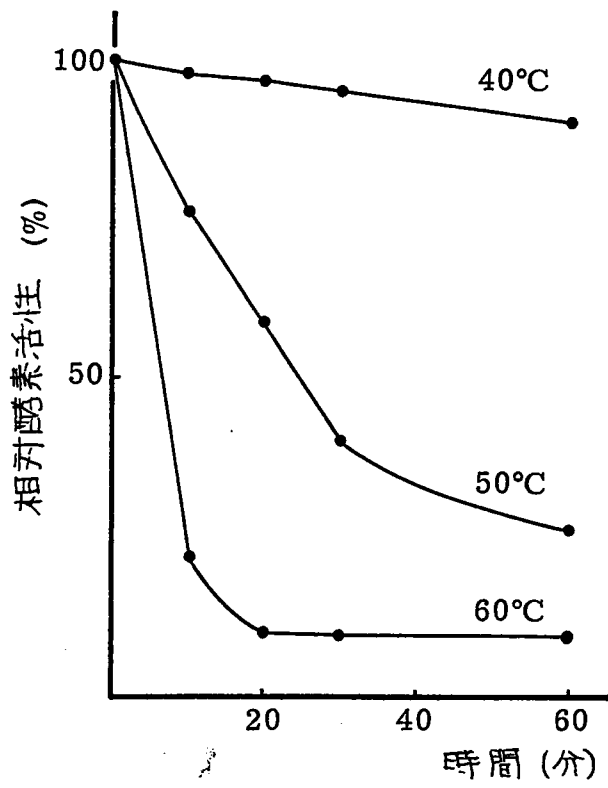


図8. 精製酵素の耐熱性

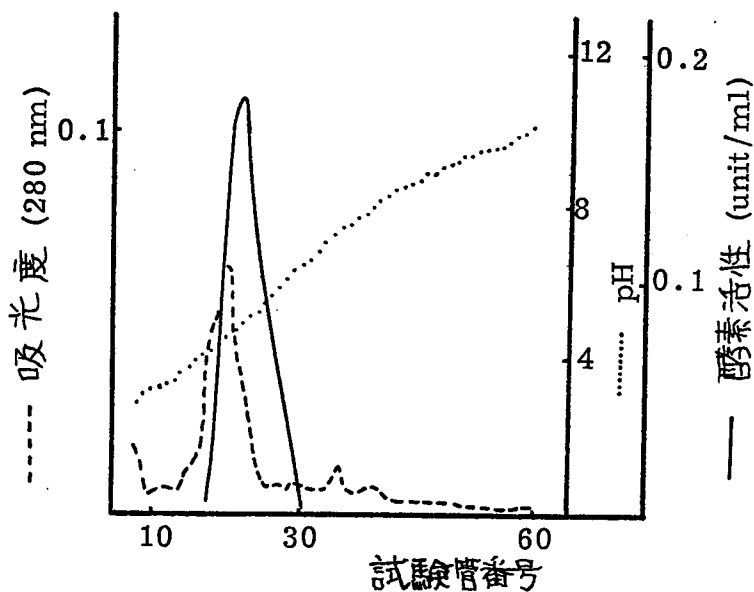


図9 S. sanguis ATCC 10557 株の $\alpha$ -L-7D  
シダーゼの等電点分離

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。

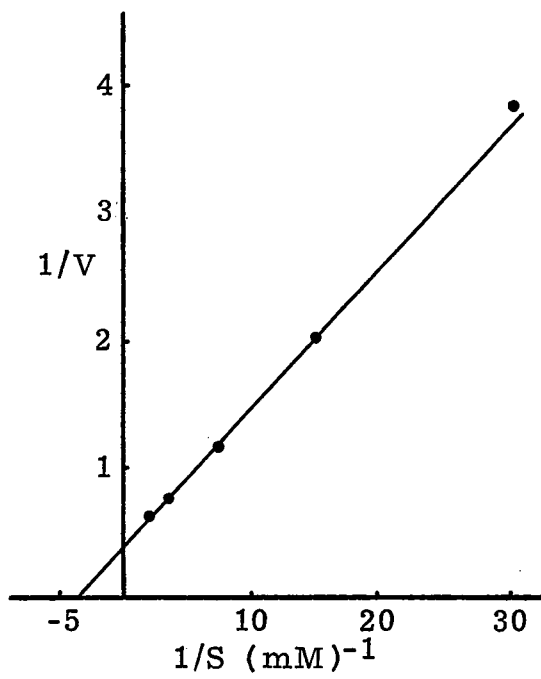


図10. 精製酵素による Lineweaver-Burk のプロット

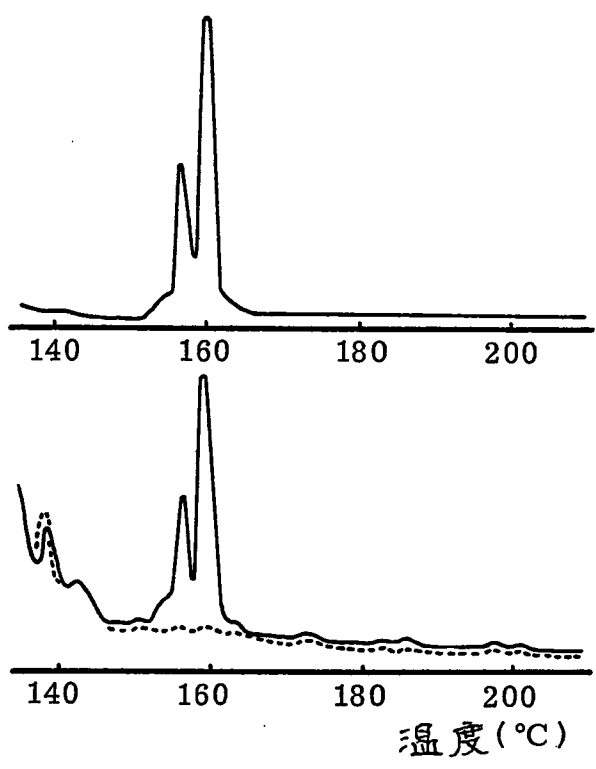
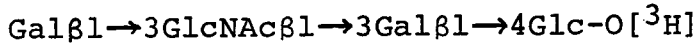


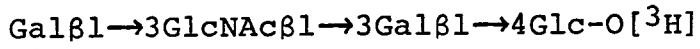
図11 精製酵素をシアル酸除去ブタ腎下腺ムチンに作用させた場合に生ずる分解産物のガスクロマトグラム

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

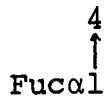
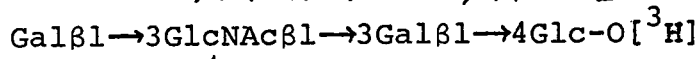
LNT : ラクト-N-テトライトール



LNF I : ラクト-N-フコペンタイトール I



LNF II : ラクト-N-フコペンタイトール II



LNF III : ラクト-N-フコペンタイトール III

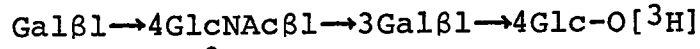


図12 人乳少糖の糖鎖配列

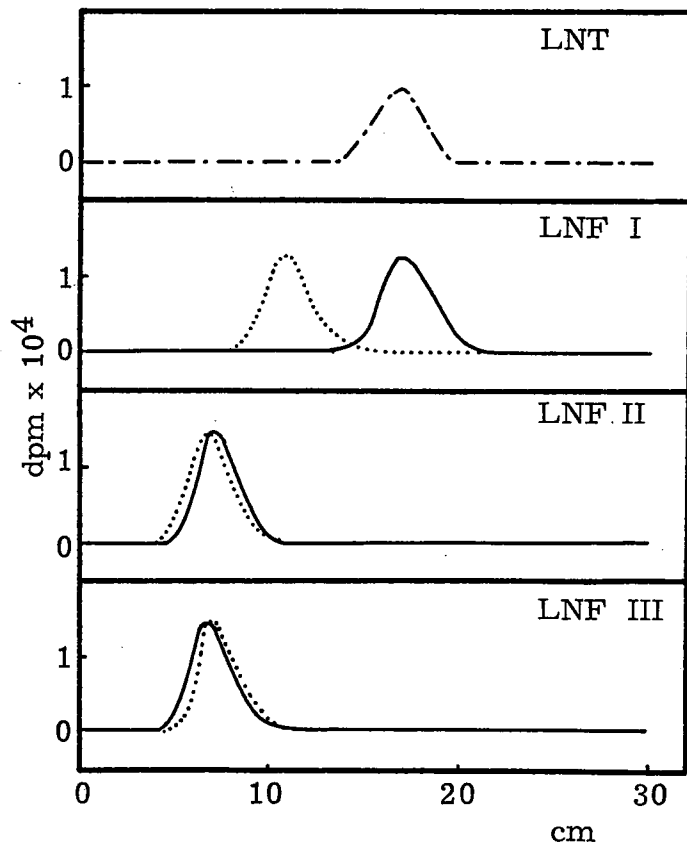


図13. 精製酵素による人乳糖に対する作用

図は LNF I, II, III に精製酵素を 37°C 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 $\alpha$ -L-フコシターゼ活性

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

( )内の数字は例数を示す。

\* 平均値  $\pm$  標準偏差

表 2. 口腔レンサ球菌培養上清の $\alpha$ -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 - $\alpha$ -L-フコシド	シアリ酸除去 ブタ腺下腺ムチン	
<u>S. mutans</u>	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
<u>S. mitis</u>			
ATCC 9811		0	0.025
<u>S. salivarius</u>			
ATCC 9222		0	0
HT-3		0	0
HT-9		0	0
<u>S. sanguis</u>			
ATCC 10556		0	0
ATCC 10557		0	0.037
M-5		0	0
ST-6		0	0
ST-8		0	0

表 3. S. sanguis ATCC 10557 株の  $\alpha$ -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 (%)
硫酸濃縮 (0-80%)	13721	306	0.022	1	100
第一回 Sephadex G-200 ゲル透過	30.4	196	6.45	289	64.1
硫酸分画 (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 ゲル透過	0.051	22.2	435	19520	7.3

表4. *S. sanguis* ATCC 10557 株の $\alpha$ -L-フコシターゼの合成基質ならずに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 $\alpha$ -L-フコシド	0
4-メチルウンベリフェリル $\alpha$ -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
ヒト卵巣囊腫液	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 <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>	H	Le <sup>a</sup>	Le <sup>b</sup>
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
ヒト卵巣囊腫液	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。