



Title	ヒト耳下腺唾液に存在するプロリン量の多い塩基性糖タンパクの構造とその口腔連鎖球菌との結合性
Author(s)	柴田, 聡明
Citation	大阪大学, 1979, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/32534
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

ヒト耳下腺唾液に存在するプロリン量の
多い塩基性糖タンパクの構造とその口腔
連鎖球菌との結合性

柴田 聡 明

序 言

唾液の糖タンパクは、歯のエナメル質表面に形成される獲得被膜の構成成分であり、歯垢の基質形成に関与する重要な因子として考えられている。¹⁻⁵⁾ そのほか唾液のもつ血液型活性^{6,7)} 菌凝集活性⁸⁻¹⁵⁾ さらに免疫学的活性^{16,17)} などの発現にも関与していることが、次第に明らかにされてきた。

近年、唾液中の糖タンパクのもつ生物学的諸活性のうち、口腔細菌との凝集性に関連して、唾液糖タンパクと口腔細菌との直接的な結合性について注目され始めた。Gibbonsらはヒト混合唾液に含まれる血液型活性をもつムチンが、口腔連鎖球菌とくに S. mutans H12株、A4株と結合する可能性を血球凝集阻止活性を指標として指摘し、¹⁸⁾ 更に上記のムチンを³Hあるいは¹⁴Cで標識することにより、同菌株と確実に結合することを報告している。¹⁹⁾ 一方、ヒト耳下腺より分泌される糖含量の高い糖タンパクは、Levine^{21,22)} らや Mandel²³⁾ らによって

分画され、その血液型活性や構成糖についての報告がなされており、部分精製されたこの糖タンパクは、プロリンを多量に含有し、プロリニ-リッチ糖タンパクと呼称されている。

Hay²⁴⁻²⁷⁾ Bennick^{28,29)}らはヒト唾液中にはプロリニ-リッチタンパクが存在し、唾液中のリニ酸カルシウムの沈殿の阻害因子として働いていると述べている。しかしながら、このプロリニ-リッチ糖タンパクが、口腔内の生理的、および病理的過程に重要な係りをもっていると考えられるにもかかわらず、その糖鎖構造と生物活性については現在全く不明である。

そこで本研究ではヒト耳下腺唾液中にプロリンと糖の含量の高い塩基性糖タンパク、プロリニリッチ糖タンパク(以下PGPと略す)を、Friedmanらの方法⁶⁾に準拠して、セファデックスG-200のゲル濾過、ならびにCM-セルロースにより分画した。この糖タンパク画分が、コンカナバリンA(ConA)と沈降反応を示すことを予備実験で確認した。そこでPGP

の精製においては、セファデックス G-200 ゲル
濾過後、Con A-セファローズ・アフィニティーク
ロマトグラフィを用いて、分離精製を行った。
次に、この精製された PGP の糖鎖構造を、メ
チル化、Smith 分解、種々のグリコシダーゼや
酸緩和水分解を組み合わせで解析した。引き
続いて、この精製標品の非還元末端部に存在
するガラクトースをトリチウムで標識し、各
種口腔連鎖球菌との結合性を追究する目的で
以下の実験を行った。

実験材料ならびに方法

1. ヒト耳下腺唾液の採取

耳下腺唾液は、20-30才の健康な成人10名より氷冷下で採取した。食後少なくとも2時間後に甘味刺激で耳下腺開口部より直接 keeneの方法³⁰⁾に従って採取した。採取した唾液は必要量に達するまで -20°C にて凍結保存した。なお、採取した唾液は、すべて分泌型であり、非分泌型のものは本実験から除外した。

2. PGPの分離精製

1). セファデックス G-200 によるゲル濾過

ヒト耳下腺より採取した唾液1ℓを20-80%飽和の硫酸アンモニウムで沈殿させ、充分透析後、0.05 M 重炭酸アンモニウム塩緩衝液、 $\text{pH} 7.8$ にて平衡化したセファデックス G-200 (Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden) カラム (2.4 $\times$ 100 cm) でゲル濾過した。流出速度は5ml/hrで5mlごとに分取し、各画分の一部をとり、中性糖とタンパク量の測定および血液型活性を調べた。

2). アフィニティークロマトグラフィ

ゲル濾過により得られた糖タンパク画分は濃縮透析後、0.15M PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.0 にて平衡化した Com A-セファロース (Pharmacia Fine Chem.) カラム (1.5 × 40 cm) に吸着させ、同緩衝液でよく洗浄後、50mM d-メチルマニツドを含む同一緩衝液で吸着画分を溶出させた。流速は 5ml/hr で 5ml ごとに分取した。各画分のタンパク量を測定し、同時に中性糖の測定も行った。

3). バイオゲル P-2 によるゲル濾過

アフィニティークロマトグラフィにより得られた吸着画分を蒸留水により透析し、濃縮後、PGP を分離するため、バイオゲル P-2 (Bio-Rad Laboratories, Richmond, Calif., U.S.A.) カラム (1 × 100 cm) にてゲル濾過した流速は 5ml/hr とし 3ml ごとに分取した。各画分についてタンパクと糖の定量を行った。

3. ディスク電気泳動

電気泳動は Reisfeld³¹⁾ の方法に準じて 10% の

ポリアクリルアミドゲルを支持体として行った。ゲルをガラスカラム ($0.4 \times 10 \text{ cm}$) に調製し、アラニン緩衝液 pH 4.6 を用い、 5 mA /管の条件下で/時間電気泳動を行い、タンパクはアミドブラック 10 B を用いて検出した。

4. 分子量の測定

Andrews の方法³²⁾に従って行い、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、キモトリプシン、ノーゲン A およびチトクローム C (Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, West Germany) を使用した。 $1 \times 100 \text{ cm}$ のカラムに 0.01 M リン酸塩緩衝液 pH 7.0 で平衡化したセファデックス G-200 を充填したのち、精製 PGP ならびに既知タンパク (各 2 mg) を展開させた。流速は 3 ml/hr で 1 ml ごとに分取した。

5. 定量沈降反応

Goldstein らの方法³³⁾に準じて精製 PGP とコニカナバリン A、トラ豆レクチンの定量沈降反応を行った。反応液は $400 \mu\text{l}$ の PBS 中に、ComA 2 mg またはトラ豆レクチン 5.2 mg を含み、

精製 PGP を適量加え、 20°C で 48 時間反応させた。その後 $1,500 \times g$ 15 分間の遠心により沈査を回収し、同一緩衝液にて 3 回洗浄後、タンパク量を Hartree の方法³⁴⁾ により定量した。

6. 血球凝集阻止活性

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 $1,500 \times g$ 10 分間遠心し、その上清 0.1ml を血液型物質の試料として用いた。精製過程において分画された各段階の糖タンパクのもつ血液型活性を調べるため、各画分より $100\mu\text{l}$ ずつ分取し、マイクロタイタープレート(ニ光純薬株式会社、東京)を用い、2 倍連続稀釈法で力価を判定した。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。

A 型および B 型血球は、生理食塩水で 3 回洗浄後、同液に 2% 濃度になるように浮遊させたものを用い、O 型は 1% のものを用いた。

血球凝集には、抗 A、抗 B 血清 (DADE, U.S.A.) および レクチン H を使用した。血球凝集阻止反応は上記試薬と唾液ならびに分画して得た

試料を室温で1時間反応させた後、各血球浮遊液を加えて更に1時間反応させた。この時の血球凝集を阻止する試料の最少量をカ価とした。

7. 糖およびタンパク定量

タンパクは Hartree の方法³⁴⁾により、ヘキソースはフェノール硫酸法³⁵⁾により、リアル酸は Warren の方法³⁶⁾に従って定量した。標準物質としてタンパクには牛血清アルブミン(再結晶、Sigma Chem.)、ヘキソースには D-グルコース、リアル酸には N-アセチルノイラミニン酸を使用した。

8. 糖ペプチドの調製

酵素処理およびメチル化を行い糖鎖構造を解析するため、以下に示す方法で精製PGPより糖ペプチドを調製した。コア-タンパクを pH 7.9 トリス-塩酸緩衝液中で、重量比で 2% のプロナーゼ(使用した酵素の由来は一括して後述する。)を加えて、37℃で24時間加温し、消化させた。反応液に 2~3 滴のトルエンを加

え、24時間ごとに重量比で2%のフロナーゼを追加し、計72時間反応させた。反応終了後、蒸留水で洗淨したセファデックス G-50 カラム ($1.5 \times 100 \text{ cm}$) で分画した。糖およびタンパク量を測定後、糖ペプチド画分をプールした。この消化と精製を4回くり返し精製糖ペプチドを得た。

9. アミノ酸分析

精製 PGP および精製 PGP より得られた糖ペプチドのアミノ酸組成は以下の方法により分析した。各試料 2 mg を 6 N 塩酸に溶解した後、真空封管を行い 105°C で24時間加水分解した。試料はロータリーエバポレーターにより乾固させた後、日立アミノ酸自動分析装置により、アミノ酸組成を調べた。N-アセチルグルコサミンの測定は、グルコサミンとして定量し、アスパラギン酸とのモル比を求めた。なお、アミノ酸分析は武田薬品中央化学研究所の御協力を得た。

10. 糖ペプチドの分解

1) 酸緩和加水分解

糖ペプチドの酸緩和加水分解は、Pigman³⁷⁾の方法に準拠した。試料(5mg)を0.05N硫酸1mlに溶解後、80°Cで1時間加温し、直ちに冷却し、炭酸バリウムを加えてpH7.0に調整した。この調製試料を15,000×g 30分間遠心し、上清のみを分離濃縮した後、0.05M リン酸塩緩衝液で平衡化したバイオゲルP-2カラム(1×100cm)を用いて分画し、糖ペプチド画分を得た。

2) Smith分解

過ヨウ素酸による酸化はHickman³⁸⁾の方法に従って行った。約5mgの糖ペプチドを0.05M×9過ヨウ素酸ナトリウム2ml中に溶解し、0.05M酢酸塩緩衝液、pH4.5を加えて20時間4°Cに保った。エチレンジグリコールを添加して反応を停止させ、その後水素化ホウ素ナトリウム(NaBH_4)にて還元し、セファデックスG-15により脱塩を行った。被酸化試料は0.1N硫酸にて18時間室温で加水分解した後中和し、バイオゲルP-2により分離を行った。その後、アルミ

トールアセチル化した後、ガスクロマトグラフ法により分析した。

3). 糖分解酵素による加水分解

糖ペプチドの酵素分解は次の条件で行った。

β -ガラクトシダーゼはクエニ酸塩緩衝液 pH 3.5、 β -N-アセチルヘキソサミンダーゼはクエニ酸塩緩衝液 pH 5.0、 α -マニノシダーゼはクエニ酸塩緩衝液 pH 4.5、 α -フコシダーゼはクエニ酸塩緩衝液 pH 5.5 として endo^型 N-アセチルグルコサミンダーゼ D はクエニ酸塩緩衝液 pH 6.5 を用いて 37°C で 4~15 時間反応させた。反応終了後、セファデックス G-50 により糖および糖ペプチドを分離した。使用したグリコシダーゼは試料 5~10 mg に対し 0.2~5 ユニット (1 ユニットは各メーカーのカatalogに記載された量を基準とした。) であった。なお α -フコシダーゼは試料 5mg に対し 0.5 ユニット (1 ユニットは リアル酸除去ブタ顎下腺ムチンを基質とし 37°C で 1 時間に 1 μ モルのフコースを遊離する酵素量で表わす。) を使用した。

11. ガスクロマトグラフィおよびガスクロマトグラフ質量分析装置による糖の分析

1) 加水分解

加水分解は4N 三フッ化酢酸(TFA)を用いて行った。試料を4N TFAに溶解し封管後、オイルバス中で100℃で5時間加水分解を行った。TFAは、ロータリーエバポレーターにより減圧下で除去し、さらに試料を蒸留水で数回洗浄後0.5mlの蒸留水に溶解した。

2) アルジトール・アセチル化³⁹⁾

加水分解後の単糖は、アコモニアを用いてpHを上昇させた後、過剰の NaBH_4 を加えて一夜放置することにより還元した。余剰の NaBH_4 は酢酸で分解後メタノールを加え減圧下で除去した。アルジトール化された糖に無水酢酸0.5mlを加え100℃で2時間加熱してアルジトールアセテイト誘導体とし、減圧下で酢酸を除去後、クロロホルムにて糖の抽出を行った。

3) メチル化

精製糖ペプチドのメチル化は箱守らの方法⁴⁰⁾

に準拠した三崎らの方法⁴¹⁾に従って行った。メチル化に用いるジメチルスルフィニルカルバニオンは三崎らの方法⁴¹⁾に従い、窒素気流下で水素化ナトリウムとジメチルスルホキッド(DMSO)より調製した。試料(5~10mg)をメチル化容器中で減圧乾固し、DMSO 2mlを加え窒素封管した後、20℃で撹拌しながら溶解させた。引き続きジメチルスルフィニルカルバニオン 0.5mlを静かに滴下し、20℃で3時間の撹拌を行った後、同一温度を保ちながらヨウ化メチル 1.5mlを静かに滴下し、1.5~2時間撹拌した。反応終了後、少量の水を加え分液ロートを用いてクロロホルム各 20mlでメチル化糖を5回抽出した。試料を減圧濃縮した後、残余のDMSOを除くためクロロホルム:メタノール(2:1V/V)に溶解し、同液にて平衡化したセファデックス LH-20カラム(1×22 cm)で分画した。糖陽性反応の認められた画分をプールし、この試料が完全メチル化されているかどうかを確認するため赤外線吸収スペクトロメーター(IR-400 Infrared spec-

trophotometer, 島津製作所, 京都)を用いて $3400 \sim 3600 \text{ cm}^{-1}$ の -OH による吸収を測定した。メチル化の操作はこの吸収が消失するまでくり返し行った。

4) ガスクロマトグラフィ分析

水素炎イオン検出器付ガスクロマトグラフ GC-4CMPF 型(島津製作所)および日立 056 型記録計を使用した。中性糖の検出には 3% ECNSS-M を被覆した 100~200 メッシュのガスクローム Q をガラス製 U 字型カラム ($0.3 \times 200 \text{ cm}$) に充填したものをいい中性糖およびアミノ糖の検出には 1.5% OV-17 を被覆した 80-100 メッシュのクロモゾルブ W を同 U 字型カラム ($0.3 \times 100 \text{ cm}$) に充填したものをいった。3% ECNSS-M カラムを用いた検出は、 190°C の恒温分析で行い、注入口温度は 220°C 、キャリアガスは 60 ml/min に保った。1.5% OV-17 を用いた検出は、カラム温度を毎分 10°C 上昇させ、 $150 \sim 205^\circ\text{C}$ の昇温分析を行い、注入口温度を 220°C に保った。記録は 5 mm/min のチャート速度で行い、これにより相対保持時間およびピーク面積を求めた。中性糖の標準メチル化物

は、大阪市立大学三崎教授より供与されたものを用い、アミノ糖は、キトビオースをメチル化し標準物質とした。ピークの同定は相対保持時間ならびに、以下に述べるマスフラグメントを用いて分析した。

5. ガスクロマトグラフ質量スペクトロメトリーによる糖の分析

ガスクロマトグラフ質量スペクトロメトリーは島津LKB9000(島津製作所)を用いて行った。カラムは1.5%OV-17を充填したリングガラスカラム(0.3×100 cm)を用い、 $150^{\circ}\text{C} \sim 205^{\circ}\text{C}$ の昇温で分析した。フラッシュヒーター -230°C 、セパレーター -210°C 、セパレーターライン 240°C 、イオン源 250°C 、イオン化電圧 70 eV 、加速電圧 3.5 kV 、イオン化電流 $60\text{ }\mu\text{A}$ およびフィラメント電流は 4.2 A の条件下で行った。得られたマスフラグメントの値を標準メチル化糖のマスフラグメントの値と比較し、各ピークの相対保持時間を合せて検討して各糖の結合様式を決定した。

12. 使用した酵素とレクチン

1. 糖およびタンパク分解酵素

β -ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.23)、 β -N-アセチル
 ルヘキシサミニダーゼ (EC 3.2.1.52) および α -マン
 ノシダーゼ (EC 3.2.1.24) は Li^+ & Li^+ の方法⁴²⁾に従い、
 ジャック豆 (Sigma Chem. St. Louis, Mo., U.S.A.) より
 分離抽出したものを用了。トリプシン (Sigma
 Chem.) (EC 2.6.1.5)、プロナーゼ (B grade, Calbiochem., San
 Diego, Calif., U.S.A.) および endo 型 N-アセチルグルコ
 サミニダーゼ-D と α -ガラクトシダーゼ (EC 3.2.1.22)
 (生化学工業、東京) は市販のものを用了。 S.
sanguis ATCC 10557 株由来の α -L-フコシダーゼは予
 防歯科学教室の栗石講師より分与を受けた。⁴³⁾

2) レクチン

トラ豆レクチンは、大阪市立大学三崎教授よ
 り分与された。⁴⁴⁾ コニカナバリニン A (Con A) (Calbiochem.)
 レクチン H (DADE Division, American Hosp. Supply Co.,
 Miami, Fla., U.S.A.) は市販のものを用了。

13. 精製 PGP のトリチウムラベル

精製 PGP の非還元末端部に存在するガラク
 トースのトリチウムラベルは、Morell らの方法⁴⁵⁾

に従った。5ml の 0.05M リン酸塩緩衝液, pH 7.0 中には 0.05M 塩化ナトリウムと 100 μ l トルエンを加え、45 mg の PGP を含む基質と 150 ユニットのガラクトースオキシダーゼ (EC 1.1.3.9) (Sigma Chem) を加え、37°C で 24 時間反応させた。その後直ちに 100°C で 3 分間煮沸して反応を停止し、アモニアを添加後、25 mCi の $\text{NaB}[^3\text{H}]_4$ で 5 時間還元した。続いて過剰量の NaBH_4 を加えて未還元 of ガラクトースを処理した後、0.1M 酢酸塩緩衝液 (pH 5.6) で一昼夜透析した。さらに蒸留水により十分に透析した後、Com A-セファロースによるアフィニティークロマトグラフィーにより、 $[^3\text{H}]$ -PGP 標品を得た。

14. 供試菌株

S. mutans BHT 株、Ingbritt 株、S. mitis ATCC 9811 株、S. salivarius 9222 株、S. sanguis ATCC 10557 株は本学口腔細菌学教室より、また S. mutans 6715 株は、国立予防衛生研究所荒谷真平教授より分与を受けた。S. mitis ATCC 9895 株、ATCC 15909 株、ATCC 15911 株、ATCC 15912 株、ATCC 15913 株、ATCC 15914 株はサニスタ-歯磨基礎研究所より、S. sanguis ATCC 10558 株、

66x49株、M-5株は Professor Rosan, B. (Center for Oral Health Research, Univ. of Pennsylvania, U.S.A.) より分与を受けた。以上の口腔細菌は、トリプロテイナー・ソイ・アガー (BBL, Cokeysvills, Md., U.S.A.) の高層培地に穿刺培養した後、冷所保存し、1ヶ月ごとにあらたな培地に穿刺継代培養した。

15. PGP の口腔細菌への結合性

菌体は、200ml のトリプロテイナー・ソイ・ブロース (BBL) に移植後 37°C で 9 時間培養し、1500 x g 15 分の遠心操作により集菌した。集菌した菌体は、0.15M PBS で 3 回洗浄後、適当量を用い [³H]-PGP と 4°C で 2 時間反応させた。なお、菌体量、PGP 量、反応温度、反応時間、緩衝液濃度および pH は実験の目的に応じて条件を設定した。反応後、さらに菌体を 0.15M PBS にて 4 回洗浄し、NCS Tissue solubilizer (Packard Instrument, Co., IL, U.S.A) 0.5ml に溶解後、トルエニシン・レーショニ液 (2.5-ジフェニルオキサゾール 4g/l, 1.4-ビス[(5-フェニルオキサゾリル)]-ベンゼン 25mg/l) 12ml を加えてアロカ液体シン・レーショニカ

ウンター LSC-673 (Aloka 株式会社, 東京) により放射能を測定した。菌体のトリプシンによる処理は、0.15M PBS 中で 37°C で 1.5 時間行い、熱処理は、100°C で 10 分間加熱した。エチレンジアミンテトラアセテイト (EDTA) による処理は、最終濃度 30mM となるように EDTA を加え一夜放置した。すべての処理後、菌体を十分に洗浄し、PGP と菌との結合性を調べた。結合阻害実験は、種々の単糖、オリゴ糖を 50mM になるように調製した反応液中で行った。

実験結果

1. 耳下腺唾液より PGP の精製

リセファデックス G-200 による分画

耳下腺唾液の糖タンパクおよびタンパクの
リセファデックス G-200 による分画パターンを図
1 に示した。図 1-a に示す如く Void Volume 直後に
(図 1)
ヘキソースおよびタンパク量が低い画分が最
初に流出し、この画分には図 1-b に示すように、
A, B および H 型の血液型活性が認められた (画分 I)。次にヘキソースおよびタンパクを多
量に含む画分が流出し、この画分は H 型の血
液型活性のみが認められた (画分 II)。最後にほ
とんどタンパクのみの画分が流出し、この画
分にはいずれの血液型物質としての活性も認
められなかった (画分 III)。

2. アフィニティクロマトグラフィ

上記のセファデックス G-200 ゲル淨過より得
られた画分 II の糖タンパクと ConA とが沈殿す
ることを確認後、ConA-セファロースによるア
フィニティクロマトグラフィを行い図 2 に示

す結果を得た。非吸着画分を 50mM α-メチルマ
 ニノリドにより溶出し、透析濃縮後バイオゲ
 ル P-2 によるゲル浮過を行った結果、図表に
 は示さなかったが、Void Volume 画分に PGP が存
 在すると考えられた。この画分には H 型血液
 型活性のみが認められた。^(図 2) 精製段階における
 タンパクとヘキソース量の収量を表 1 にまと
 めた。(表 1)

2. 精製 PGP の一般的性状

1. 均一性

図 3 は精製標品を酸性緩衝液, pH 4.6, 中でディ
 スク電気泳動を行ったのち、タンパクをアミ
 ドブラック 10B で染色したものである。精製
 PGP は陽極側にやや不鮮明であるが単一バン
 ドとして認められた。同時に pH 8.6 のグリシン
 - 塩酸緩衝液を用いた Davis の方法⁴⁶⁾で電気泳
 動を行ったところ、原点以外にはタンパクバ
 ンドは検出できなかった。 図 3, 表 1

2) 分子量

ゲル浮過法による分子量測定の結果精製 PGP

はアルドラーゼと牛血清アルブミンとの間の画分に溶出され、分子量は約75,000と推定された。

3) 定量沈降反応

精製PGPとComAおよびトラ豆レクチン⁴⁴⁾との定量沈降反応を図4に記した。精製標品とComAとの沈降量は、0.15M PBS中でComA 200 μ gに対し精製PGP 70~80 μ gで最大量を示した。これに対しトラ豆レクチンとの反応では、同緩衝液中でトラ豆レクチン 520 μ g_(10⁴倍)に対しPGP約100 μ gで最大量に達し、300 μ gまで一定の沈降量を示した。

3. 精製PGPより糖ペプチドの分離

精製PGPの糖鎖配列とコアータニパクのアミノ酸との結合様式を明らかにするために、まずコアータニパクをプロナーゼにより分解させた後、セファデックス G-50を用いて糖ペプチド画分を得た。切断された糖ペプチドは、4回プロナーゼで処理を行うことにより、オリゴ糖鎖に数種類のアミノ酸をもつ糖ペプチドとして分離され、その糖ペプチドのアミノ酸組成を表2に示した。なお、この糖ペプチ

ドを 0.1N の水酸化ナトリウム中に室温で 24 時間放置しても糖鎖の遊離はほとんどみられなかった。

1) 精製 PGP と精製 PGP より得られた糖ペプチドのアミノ酸組成

精製標品とそれより得られた糖ペプチドのアミノ酸組成を表 2 に示した。精製 PGP のコアータニパクにはプロリンが多量に含まれ、全構成アミノ酸の $\frac{1}{3}$ をしめ、次いでグルタミン酸、グリシンが多く、この 3 種のアミノ酸は全体の約 80% 近くを占めることがわかった。
(表 2)

プロナーゼにより 4 回処理したのちの糖ペプチドのアミノ酸組成は、アスパラギン酸(アスパラギン由来の)とグリシンであった。さらに N-アセチルグルコサミンをグルコサミンとして分析を行った結果、精製糖ペプチドにおいて、アスパラギン酸とグルコサミンの相対比は、1:4.4 であった。

2) 糖ペプチドの構成糖

糖ペプチドを加水分解したのち、アルツト

- ルアセチル化し、ガスクロマトグラフィによる分析を行ったところ次の結果が得られた。構成糖として、フコース、ガラクトース、マンノースおよび N-アセチルグルコサミンが検出され、相対モル比は約 2:3:3:4 であった。

(表5) また、シアリ酸の定量的ため 0.01N 硫酸で 70°C で 4 時間加熱したのちシアリ酸含量を求めたが、全糖量の 1% 以下の値であった。図表には示さなかったが、ABO 式型により型別に分析を行ったところ、分泌型の被採取者において差は認められなかった。

3) Smith 分解

糖ペプチドの Smith 分解を行ったのち、単糖および糖アルコールを分離除去したのちについて構成糖を分析した。その結果 1 モルのマンノースと 2 モルの N-アセチルグルコサミンが得られた。これより 1→3 結合またはガラクトースを持つマンノースに 2 モルの N-アセチルグルコサミンをもつオリゴ糖の存在が明らかになった。

4). メチル化と exo 型グリコシダーゼによる分析

糖ペプチドを完全メチル化し、酸加水分解した後、アルビトールアセチル化を行い、ガスクロマトグラフィおよびガスクロマトグラフ質量分析装置によって分析した結果、メチル化オリゴ糖側鎖中に、^(図5, 表3) 2,3,4-トリ-O-メチルフコース, 2,3,4,6-テトラ-O-メチルガラクトース, 3,4,6-トリ-O-メチルマニース, 3,4,6-トリ-O-メチルガラクトース, 2,4-ジ-O-メチルマニース, 3,6-ジ-O-メチル N-アセチルグルコサミンおよび6-モノ-O-メチル N-アセチルグルコサミンが確認され、相対比は約 2:2:1:2:1:2:2 であった(表3)。

以上よりオリゴ糖側鎖の非還元末端部に2モルのフコースと2モルのガラクトースが存在し、1→2結合のマニース2モル, 1→2結合のガラクトース1モル, 1→4結合の N-アセチルグルコサミン1モルおよびC-3, C-6に分枝をもつ N-アセチルグルコサミン1モルが存在することがわかった。N-アセチルグ

ルコサミンを除く他のメチル化単糖のマスフ
 ラグメントは標準物質と一致した。N-アセ
 チルグルコサミンの結合部位はキトビオース
 を標準物質とし、マスフラグメントを指標と
 して決定した。続いて非還元末端部に存在す
 るフコースと一部のカラクトースの結合を切
 断する条件で酸緩和加水分解を行、たのちメ
 チル化し、そのメチル糖の比を表4に示した。
 この結果フコースの大部分が切断され非還元
 末端部のカラクトースの少量の増加が認めら
 れ、1→2結合のカラクトースが減少し、1→3,
 4結合のN-アセチルグルコサミンが大きく
 減少し1→4結合のN-アセチルグルコサミン
 の増加が認められた。このことより1モルの
 フコースが1→2結合でカラクトースに結合し、
 さらに1モルがN-アセチルグルコサミンに
 1→3結合していることが推定された。一方
 1→2結合に特異性をもつフコツダーゼを用い
 て非還元末端部に存在するフコースに作用さ
 せたところ図6-aおよび表4に示す如く1モ

ルのフコースが切断され、同時に1→2結合の
 ガラクトースが消失し、非還元末端部のガラ
 クトースが1モル近く増加した。残存するフ
 コース1モルは切断されず他のメチル糖の構
 成比も変化は認められなかった。このことか
 ら糖鎖中にフコースと1→2ガラクトースの構
 造が存在し、一方のフコースは1→2結合以
 外で他の糖と結合していることが確認できた。
 また、 β -ガラクトシダーゼを作用させたところ、
 図6-bおよび表4に示すように1モルの
 非還元末端部のガラクトースが消失し、1モ
 ルの N-アセチルグルコサミンが露出した。
 さらに β -ガラクトシダーゼを作用させたが、
 1モルのガラクトースは切断されず、サザエ
 由来の α -ガラクトシダーゼを用いてもガラ
 クトースは切断されなかった。次に β -ガラク
 トシダーゼを作用させた後、exo型 N-アセ
 チルグルコサミニダーゼを作用させたところ、
 図6-c, 表4に示すように、非還元末端部の
N-アセチルグルコサミンが消失し、1→2結

合のマニノースの減少と1モルのマニノースの露出が認められた。以上より、一方の糖鎖構造としてガラクトース $\beta 1 \rightarrow 4$ N-アセチルグルコサミン $\beta 1 \rightarrow 2$ マニノースの結合が明らかになった。

(表 4)

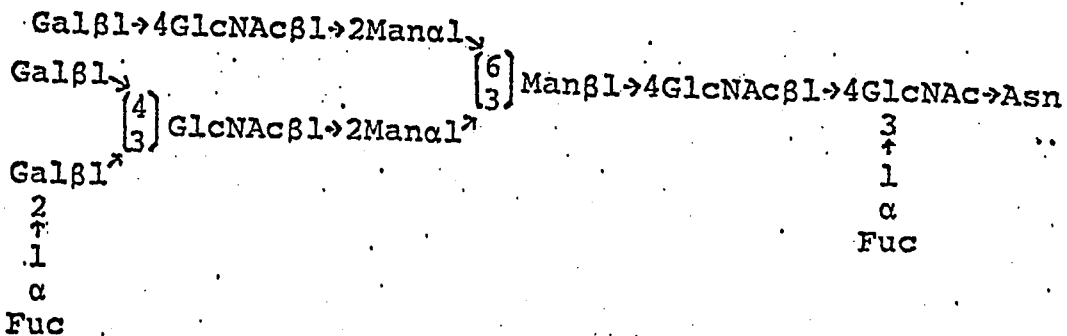
5) endo 型 N-アセチルグルコサミニダーゼによる分解

これまでの結果より糖ペプチドの糖鎖配列がヒト血清糖タンパク型とよく類似した構造を示すことが推定されたため、次に endo 型 N-アセチルグルコサミニダーゼ⁴⁹⁾ による分解を行い、コアータンパクに結合する糖の構成をガスクロマトグラフィによって分析した。表5に示されるように酵素処理した後、Com A-セファロースに吸着しなり画分中に、ほぼ等モルのフコースと N-アセチルグルコサミニンが見出された。他に少量のマニノースとガラクトースが検出されたが、これは酵素処理中の未分解物や、ミクロヘテロジェニティが

考えられる。このことから7コースは、ユア
タニパクに結合したN-アセチルグルコサミ
ンに1→3結合していることが推定される。糖
鎖と結合するアミノ酸は、表2に示されるよ
うに、アスパラギン酸として定量されている
が、これまでに報告された文献^{38, 48, 52, 53)}より
みて、このアミノ酸はアスパラギンとしてペ
プチド中に存在していると思われる。

4. 糖ペプチドの糖鎖構造

糖ペプチドとレクチンHとの血球凝集阻止
反応およびCon A, トウモロコシレクチンとの定量
沈降反応に加えて上記のガスクロマトグラフ
とガスクロマトグラフ質量分析による結果を
総合して、以下に示す構造が推定された。



5. PGPと口腔連鎖球菌との結合性

1) PGPのトリチウムによる標識

Com A - セファロースで精製した $[^3\text{H}]$ -PGPは $0.58 \mu\text{Ci}/\text{mg}$ で、PBSに溶解後の放射能は $1.47 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ のPGPで 1875dpm であった。

2) PGPと口腔連鎖球菌の結合性のスクリーニング

供試菌17株に結合したPGP量を表6に示した。S. mutansへの結合性は供試した3株には認められず、S. salivariusにおいても同様に結合しなかった。S. mitisでは、調べた菌株全てに結合性がみられたが、結合量には大きな差が認められた。そして、S. sanguisにおいてはATCC 10557株にのみ結合性がみられ、他の菌株には、結合性が認められなかった。

6. S. mitis ATCC 9811株およびS. sanguis ATCC 10557株とPGPの結合性に影響を及ぼす因子

1). pH

pHによる結合性への影響を図7に示した。

pH 3~6 はクエンス酸塩緩衝液、pH 7.0 はリニ酸

塩緩衝液, pH 8~9 はトリス-塩酸緩衝液を用いた。両菌株とも酸性溶液中では著しく結合性が低下し、塩基性溶液中で結合性を示した。

S. mitis ATCC 9811 株においては pH 7.0 で、S. sanguis ATCC 10557 株では pH 8.0~9.0 で最大の結合性を示した。

(図 7)

2) 緩衝液濃度

緩衝液の濃度を 0~0.5 M (S. mitis の場合) トリス-塩酸緩衝液, pH 7.0, S. sanguis の場合 トリス-塩酸緩衝液, pH 8.0 および各等モルの塩化ナトリウムを含む) まで変化させた時の結合量を図 8 に示した。結合量は 2 株間において差が認められ、S. mitis ATCC 9811 株においては、0.15 M 濃度で最大結合量を示し、緩衝液濃度の増加に伴い減少を示した。一方、S. sanguis ATCC 10557 株においては 0~0.05 M 濃度で最大量を示し、緩衝液濃度の上昇に伴い、減少を示した。

3) 反応時間

PGP と菌体との結合時間を図 9 に示した。

氷冷下で菌体浮遊液 0.5 ml に $[^3\text{H}]$ -PGP 25 μl を加えた時を反応開始時点とし、氷冷下のまま所定の時間反応させた後、直ちに集菌を行い、同一緩衝液にて3回洗浄した。両菌株とも PGP との結合反応は、氷冷下においても速やかに起こり、約 10 ~ 15 分でほぼ最高値に達した。従って以下の実験においては、*S. mitis* ATCC 9811 株との結合実験では、0.15 M PBS pH 7.0 を用い、*S. sanguis* ATCC 10557 株では 0.05 M トリス-塩酸緩衝液 pH 8.0 を用いて 4°C で行った。

4) 耐熱性

菌体を 100°C 10 分間加熱し、4°C に冷却後、PGP との結合性を調べた。表 7 に示すように両菌株とも結合性は加熱により著しく減少した。

(表 7)

5) トリプシンによる菌体処理

各菌体浮遊液にトリプシン、0.5 ユニット (pH 7.6 の緩衝液中で 25°C で反応させ、1 分間に α -N-ベンゾイル-L-アルギニン・エチルエステルの ΔA_{256} を 0.001 さげる量を 1 ユニツ

トとする)を加え、 37°C で1.5時間反応させ、直ちに同一緩衝液で4回菌体を洗浄後結合性を調べた。その結果、表7に示すように両菌株とも結合性は著しく減少した。

6) EDTA 処理

EDTA, および2価金属イオンの結合性に対する影響を表8に示した。各菌体浮遊液中に最終濃度 30mM になるようEDTAを加え 4°C で20時間放置した。菌体を充分洗浄したのち、結合性を調べた結果、2株間に大きな結合性の差が認められた。*S. mitis* ATCC 9811株では、著しく結合性が低下したが、*S. sanguis* ATCC 10557では、ほとんど影響を受けなかった。さらに菌体のEDTA処理後、 Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} イオンを加えて結合性の変化を実験してみたが、両菌株とも影響を殆んど受けなかった。

(表8)

7) 単糖および少糖による結合性阻害

種々の糖添加による結合性阻害の成績を表

9に示した。D-ガラクトース, ラクトースおよびラクトサミン 50mM 濃度において、両菌株と PGP の結合性は、ほぼ 100% 近く阻害された。アミノ糖においては、S. mitis ATCC 9811 株では著しい阻害がみられたのに対し、S. sanguis ATCC 10557 株では 50% 以下の阻害率であった。ペントース群では特にアラビノースが高い阻害率を示し、ヘキソース群では、ほぼ 50% の阻害率が認められたが、他の単糖、少糖においてほとんど阻害を認めなかった。

(表 9)

8) 結合量

一定の菌数に対する PGP の結合量を図 10, 11に示した。結合量は、変曲点をすぎた後にみられる結合量の各スポットを結んだ直線が縦軸と交わる点を求めて算定してみると、S. mitis ATCC 9811 株では菌体乾燥重量 1mg に対し、約 0.7 μ g であった。他方 S. sanguis ATCC 10557 株においては、PGP 量の増加に伴い、結合量も増加する傾向が認められたが、前記

の算定法で計算してみると、菌体乾燥重量 1mg に対し約 0.8 μ g となった。菌表層部と PGP との間の結合性を考える場合、S. mitis では、変曲点に達するまでは特異的結合で、その後は非特異的結合が起っているように考えられる。しかし、S. sanguis では特異的と非特異的結合を区別することは、本実験からは難しかった。

考 察

唾液糖タンパクの口腔内における生理的および病理的過程に果たす役割に関して現在まで多くの研究がなされてきた。特に歯垢の基質形成における糖タンパクの役割について Leach は、口腔細菌の働きにより糖タンパクの構造が修飾され、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主張している。

3-5) しかしながら、現在までこの考えを実験的に確証した事実はなく、エナメル質表面に獲得被膜として存在する唾液糖タンパクと口腔細菌との凝集に関する報告は緒言で列挙した如く、数が多い。この凝集機構には唾液糖タンパクと細菌との特異的な結合がまず最初に起ると考えられており、Gibbons は¹⁹⁾ ヒト混合唾液に存在する血液型活性をもつ唾液ムチンが口腔連鎖球菌、特に S. mutans H12 株と結合することを $[^3\text{H}]$ あるいは $[^{14}\text{C}]$ で標識したムチンと菌体との結合性を指標として明らかにしている。この結合性は、100mM のグル

コサミンにより 50% 近く阻害されるという¹⁹⁾。
 一方、耳下腺唾液に多量に含まれる糖タンパクについては、Mandel,²³⁾ Levine²¹⁾, Friedman⁶⁾ および Degand⁴⁸⁾ らによると、アミノ酸組成として多量のプロリンを含み、プロリナーリッチ糖タンパクと呼称され、約 40% の糖を含み構成糖としてはフコース、ガラクトース、マンノース、N-アセチルグルコサミンと少量の N-アセチルノイラミニン酸が見出されている。そして、電気泳動により塩基性糖タンパクであることが確認され、Levine らは²¹⁾ 超遠心分析法により、分子量を 36,000 と推定している。

このように構成糖およびアミノ酸組成についての報告があるけれども、この糖タンパクの生物学的活性については、いまだ知られていない。

Hay²⁴⁻²⁷⁾, Bennick^{28, 29)} らは唾液中の磷酸カルシウムの沈殿抑制因子として、プロリナーリッチ-タンパクおよびチロシン-リッチ-タンパクを見出しているが、このタンパクは精製

PGP とは全く別の物であることを著者は予備実験で確認している。

著者は、このプロリン-リッチ-糖タンパク (PGP) の生物学的活性の追究には、その構造、特に糖鎖部分の構造分析が重要と考え、Friedman らの方法⁶⁾に従い糖タンパクの精製を試みた。硫酸濃縮画分 (20-80%) をセファデックス G-200 でゲル濾過し、CM-セルロースによる分画の結果、2つの糖タンパク画分を見出し、構成糖、メチル化糖を分析したが、この両画分において構成糖比には、ほとんど差が認められなかった。さらに糖鎖中に 2- α -結合マニノースの存在が確認されたことから、Com A との沈降反応を試みたところ、白色沈殿を生じた。このことから、より効率の高い精製法として、Com A-セファロースによるアフィニティークロマトグラフィを行ったところ、効果的に分離精製に成功した。Com A は非還元末端部に存在する α - $\underline{D}$ -マニノピラノシルまたは、 α - $\underline{D}$ -グルコピラノシル残基 2 分子

に特異的に結合するとされてきたが、⁴⁹⁾最近分子内の 2- α -結合マノノピラノシル残基にも結合することが明らかになり⁵⁰⁾糖タンパクやオリゴ糖の精製にも使用されていることから、この PGP も糖鎖中に同様の構造をもつことが考えられた。しかし、Com A に親和性を持つ画分は、必ずしも完全な単一物質であると言う確証はなく、未完成糖鎖を持つ糖タンパクや末端構造の差などによりミクロヘテロジェニティの存在が考えられる。しかし、糖ペプチドの均一質性検定の現行の基準からすれば、成績の部に示したように構造分析に耐える画分として PGP を分離できたと考える。この PGP の分子量は、セファデックス G-200 を用いたゲル濾過法により、約 75,000 と推定された。この数値は Levine ら²¹⁾の報告した数値の約 2 倍であるが構成糖、電気泳動のパターンおよびアミノ酸組成から考え、精製 PGP は Levine ら²¹⁾の精製した糖タンパクと同一のものと思われる。この分子量の違いについては、Levine ら²¹⁾

の行、た、約40%の糖(ヘキソース+アミノ糖)を含む鎖状糖タンパクの超遠心分析法による分子量測定の誤差に起因しているのかも知れない。構成糖は、フコース、ガラクトース、マニースおよびN-アセチルグルコサミンであり、Levineらの数値²¹⁾とほぼ近いモル比を示したが、シアル酸は本精製標品中には極微量しか含まれていなかった。次にPGPの糖鎖配列を推定するために、メチル化、Smith分解、酸緩和水分解および種々のグリコシダーゼを組み合わせて解析してみたところ、実験成績に示した推定構造式を得た。PGPのプロナーゼ処理によりDegandら⁴⁸⁾が指摘しているように糖側鎖還元末端部にアスパラギンもしくはグリッンのみをもつこと、また弱アルカリ性に対して糖鎖の遊離をみないこと、さらにはSmith分解およびendo型N-アセチルグルコサミンダーゼD⁴⁹⁾による分解の結果を勘案してみると、糖鎖中のキトビオースがアスパラギンにN-グリコシルアミン結合している

ことが推定された。⁵¹⁾ 同様の共通構造をもつ糖鎖の構造は、ヒト・ミエローマ Ig⁵²⁾、 γ M-Immunoglobulin,³⁸⁾ フコッドーツス患者尿中の糖ペプチドにおいてもみられている。⁵³⁾ また、メチル化による構造解析と、各種シクチンとの反応の結果から、2- α -結合マニノース2分子が、Com A との反応に関与していることがわかり、マニノース3分子による分岐状構造も推定できた。一方、このマニノースの非還元末端部に続く糖鎖については、PGP が Ulex europaeus およびトラ豆由来のシクチン⁴⁴⁾ と反応することから、糖側鎖中に、Fuc α 1 $\rightarrow$ 2Gal β 1 $\rightarrow$ 3 or 4GlcNAc, および Gal $\rightarrow$ GlcNAc $\rightarrow$ Man の構造をもつことが推定され、酵素分解、酸緩和水分解により確認ができた。しかしながら、マニノースより分枝した一方の糖鎖と他方の糖鎖について逐次酵素分解を試みたが、一方について各一分子づつのガラクトース、N-アセチルグルコサミンの遊離をみ、 α -マニノースの露出を確認したのみで他方の非還元末端部に存在する

ガラクトースを、ジャック豆由来の β -ガラクトシダーゼを用いて数回に渡り分解を試みたにもかかわらず分解できなかった。さらにサガエ由来の α -ガラクトシダーゼを用いても同様にガラクトースの遊離は認められなかった。このことについて、多くの β -ガラクトシダーゼが $\text{Gal} \beta 1 \rightarrow 3 \text{ (or } 1 \rightarrow 4) \text{ GlcNAc}$ 結合の N-アセチルグルコサミンにさらにフコースなどが結合している場合、この末端のガラクトースに作用せず、隣接するフコースが障害になるという事実からも考えられることである。引き続き $\alpha 1 \rightarrow 2$ フコースに特異性をもつ、

S. sanguis ATCC 10557 株由来のフコシダーゼによる分解の結果、 $\text{Fuc} \alpha 1 \rightarrow 2 \text{ Gal} \rightarrow$ という構造が考えられ、他方の糖鎖が推定構造に示すような結合様式をもつことがわかった。一般に生体中の糖タンパクに関して大きく、血清糖タンパク型およびムチン型に分けられ⁵⁾ 唾液の糖タンパクは、主に顎舌下腺からはムチン型が、耳下腺からは血清糖タンパク型が分

泌されるといわれているが精製 PGP 標品においても以上に述べた種々の特徴から血清糖タンパク型であると考えられる。

次に PGP の生物学的活性の一端を知る目的で PGP の非還元末端部に存在するガラクトースをトリチウムで標識し、口腔連鎖球菌との結合性を調べてみたところ、実験結果に示した如く、S. mitis に属する全ての菌株と S. sanguis ATCC 10557 株にのみ結合性が認められた。しかし S. sanguis ATCC 10557 株は、S. mitior ともいわれており⁵⁴⁾、S. mutans 3 株、S. salivarius 1 株、S. sanguis ATCC 10556 株、ATCC 10558 株やヒト唾液由来の 66 × 49 株、M-5 株、6249 株などには結合性が認められないことから今回用いた菌株のうち S. mitis に属する菌のみに結合性が見出されたことになる。しかしながら反応条件を吟味しつつ PGP と本実験に用いた菌株以外の口腔微生物との結合性と凝集性について幅広いスクリーニングが今後必要であると思われる。しかし、歯垢中の菌叢のうち初期の段

階で連鎖球菌、なかでも S. mitis が数多く見られることから⁵⁷⁾、獲得被膜を構成する糖タンパクと S. mitis が結合するという新発見は、歯垢の形成機序を解明する上で一つの重要な手掛りを提供するものと言えよう。

次に PGP と比較的強い結合性を示した S. mitis ATCC 9811 株とその類似菌と考えられている、S. sanguis ATCC 10557 株の 2 株を選択し、菌体を熱およびトリプシン処理した際の結合性への影響を調べたところ、両株とも熱処理によって結合性が失われ、またトリプシン消化によっても著しく結合性が失われた。また、特定の糖によって結合性が阻害されることから、レクチン様物質（糖結合性タンパク）が菌体表層部に存在することが強く示唆された。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 あるいは、S. mitis に分類した方がよいともいわれており⁵⁵⁾、Coykendall and Specht⁵⁴⁾ も DNA 塩基の類似性の面からこの考え方を支持してい

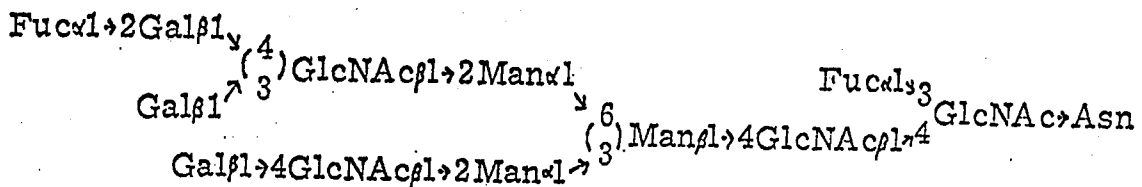
るが、本株には、S. mitis ATCC 9811株と同様菌体表層にレクチン様物質をもっている可能性が本実験で示唆されたことから本株は、S. mitisと位置づけた方がよいと思われる。しかし、両菌株のもつレクチン様物質の性質は異なるようであり、EDTA処理ならびに Ca^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} などの添加実験の結果からも推定できるように菌体表層での存在状態も異なっていると考えられる。種々の糖による阻害実験の結果、両菌株ともガラクトース、ラクトースおよびラクタミンによって強く阻害されることから、Mäkeläによる植物性レクチンの分類⁵⁶⁾のオ2群に属するレクチン様物質が菌体表層部に存在していると思われる。現在、菌体表層よりレクチン様物質を抽出、分離、精製し、その特性を明らかにしつつある。

結 論

ヒト耳下腺唾液に存在するプロリコ量の多い塩基性糖タンパク (PGP) を ConA-セファローズ、アフィニティークロマトグラフィーを用いて効率よく分離精製し、種々のグリコシダーゼ、および酸緩和加水分解、Smith 分解、メチル化を組み合わせ構造解析を行った。精製 PGP の非還元末端部に存在するガラクトースをトリチラムで標識し、口腔連鎖球菌との結合性を調べた結果、以下の結論を得た。

1) 精製 PGP の分子量は約 75,000 と推定され、この標品は、ユパータンパク中にプロリコを多量に含む塩基性糖タンパクである。

2) 糖鎖配列は次のように推定された。



以上の推定構造から、PGP は H^{II} 型血液型活性を有する血清糖タンパク型であると考えら

れる。

- 3) PGP は供試した口腔連鎖球菌 17 株のうち S. mitis ATCC 9811 株, ATCC 15909 株, ATCC 15911 株, ATCC 15912 株, ATCC 15913 株, ATCC 15914 株および S. sanguis ATCC 10557 株とのみ結合性を示した。
- 4) この結合性は氷冷下で、非常に速やかにおこるが、菌体を熱処理、トリプシン処理すれば、この結合性は著しく減少した。
- 5) S. mitis ATCC 9811 株に対する結合性の至適条件は pH 7.0, 緩衝液濃度 0.15 M の濃度であった。他方 S. sanguis ATCC 10557 株においては至適 pH は 8.0 であり、緩衝液濃度は低い程結合性が増加した。
- 6) EDTA 処理によりこの結合性は、S. sanguis ATCC 10557 株では影響を受けないが、S. mitis ATCC 9811 株は著しく結合性が減少した。
- 7) この結合性は、D-ガラクトース, ラクトース, ラクトサミン, N-アセチルグルコサミンなどにより著しく阻害された。
- 8) 以上の結果から両株の菌体表層部にはシク

チン様物質の存在が強く示唆された。

稿を終わるに臨み、終始ご懇篤なご指導
とご校閲を賜わった常光 旭教授に謹んで
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いた本学部口腔細菌
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。

さらに糖鎖構造の決定にあたり、ひとかた
ならぬご指導を賜わりました大阪市立大学生
活科学部三崎 旭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
らぬご指導とご助言を賜わりました徳島大学
予防歯科学教室中村 亮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。

表題脚注

大阪大学歯学部予防歯科学講座
(主任 常光 旭教授)

本論文の要旨は昭和54年3月の第57回
国際歯科研究学会 (I. A. D. R.)、米国ニ
ューオリンズにおいて一部を発表した。

本研究は一部文部省科学研究費 (昭和
53年度, No. A-344067) によった。

第1ページ脚注

単糖およびアミノ酸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, D-マンノース: Man, N-アセチル-D-グルコサミン: GlcNAc, アスパラギン: Asn,

文 献

- 1) Sönju, T. and Röllä, G. (1973) : Chemical analysis of the acquired pellicle formed in two hour on cleaned human teeth in vivo. Caries Res., 7, 30-38.
- 2) Armstrong, W.G. (1968) : The composition of organic films formed on human teeth. Caries Res., 1, 89-103.
- 3) Leach, S.A., Critchley, P., Kolendo, A.B. and Saxton, C.A. (1967) : Salivary glycoproteins as components of the enamel integuments. Caries Res., 1, 104-111.
- 4) 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.
- 5) Leach, S.A. (1970) : In Dental Plaque, W.D.Mchugh ed., E.&S.Livingstone, Edinburgh, 143-156.
- 6) Friedman, R.J., Merrit, A.D., and Bixler, D. (1971) : Immunoglobical and chemical composition of heterogeneous basic glycoproteins in human parotid saliva. Biochim Biophys Acta, 230, 599-602.
- 7) 松沢茂隆(1954) : 唾液中の血液型物質の研究. 日本法医学雑誌, 8, 423-442, 昭和29.
- 8) Ericson, T. and Magnusson, J. (1976) : Affinity for hydroxyapatite of salivary substances inducing aggregation of oral streptococci. Caries Res., 10, 8-18.
- 9) Kashket, S. and Donaldson, C.S. (1973) : Saliva-induced aggregation of oral streptococci. J. Bacterial, 26, 624-626.

- 10) Levine, M.J., Herzberg, M.C., Levine, M.S., Ellison, S.A., Stinson, M.W., Li, H.C. and Van Dyke, T. (1978) : Specificity of salivary-bacterial interactions : Role of terminal sialic acid residues in the interaction of salivary glycoproteins with Streptococcus sanguis and Streptococcus mutans, Infect. Immun., 19, 107-115.
- 11) Kondo, W., Sato, M. and Sato, N. (1978) : Properties of the human salivary aggregating factor for Leptotrichia buccalis cells. Archs oral Biol., 23, 453-458.
- 12) Balekjian, A.Y., Tow, H.D. and Hoerman, K.C. (1971) : In vitro agglutination of oral microorganisms by parotid fluid. IADR abstracts, 101.
- 13) McBride, B.C. and Gisslow, M.T. (1977) : Role of sialic acid in saliva-induced aggregation of Streptococcus sanguis. Infect. Immun., 18, 35-40.
- 14) Gibbons, R.J. and Spinell, D.M. (1970) : Salivary induced aggregation of plaque bacteria. In McHugh, W.D. (ed.), Dental Plaque, E. & S. Livingstone, Inc., Edinburgh, 207-215.
- 15) Pollock, J.J., Iacono, V.J., Bicker, H.G., Mackay, B.J., Katano, L.J. and Taichman, L.B. (1976) : The binding, aggregation and lytic properties of lysozyme. In Styles, H., Loesche, W. and O'Brien (ed.), Microbial Aspects of Dental Caries, 2, 325-352.
- 16) Bratthal, D. and Gibbons, R.J. (1975) : Changing agglutination activities of salivary immunoglobuline A preparations against oral streptococci. Infect. Immun., 11, 603-606.
- 17) Williams, R.C. and Gibbons, R.J. (1972) : Inhibition of bacterial adherence by secretory immunoglobulin A : a

- mechanism of antigen disposal. Science, 177, 697-699.
- 18) Gibbons, R.J. and Qureshi, J.V. (1976) : Interactions of Streptococcus mutans and other oral bacteria with blood group reactive substances. Microbial Aspects of Dental Caries, 1, 163-181.
- 19) Gibbons, R.J. and Qureshi, J.V. (1978) : Selective binding of blood group-reactive salivary mucins by Streptococcus mutans and other oral organisms. Infect. Immun., 22, 665-671.
- 20) Gibbons, R.J. and Houte, J.V. (1975) : Bacterial adherence in oral microbial ecology. Annu Rev. Microbial., 29, 19.
- 21) 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.
- 22) Levine, M.J., Well, J.C. and Ellison, S.A. (1969) : The isolation and analysis of a glycoprotein from parotid saliva. Biochim Biophys Acta, 188, 165-167.
- 23) Mandel, I.D., Hampar, B., Thompson, Jr. R.H. and Ellison, S.A. (1961) : The carbohydrates of human parotid saliva. Archs oral Biol., 3, 278-282.
- 24) Oppenheim, F.G., Hay, D.I. and Franzblau, C. (1971) : Proline-rich proteins from human parotid saliva. I. Isolation and partial characterization. Biochemistry, 10, 4233-4238.
- 25) Hay, D.I. (1973) : The isolation from human parotid saliva of a tyrosine-rich acidic peptide which exhibits high affinity for hydroxyapatite surface. Archs oral Biol., 18, 1531-1541.
- 26) Hay, D.I. and Belenz, D. (1977) : Identification of human

anionic proline-rich proteins as inhibitors of calcium phosphate precipitation. J.Dent.Res., 56, Special Issue A, 61.

- 27) Hay, D.I. and Gron, P. (1976) : Inhibitors of calcium phosphate precipitation in human whole saliva. Microbial Aspects of Dental Caries, 1, 143-150.
- 28) Bennick, A. (1977) : Chemical and Physical characterization of a phosphoprotein, protein C, from human saliva and comparison with a related protein A. Biochem.J., 163, 229-239.
- 29) Bennick, A. (1977) : The binding of calcium to a salivary phosphoprotein, protein C, and comparison with calcium binding to protein A, a related salivary phosphoprotein. Biochem.J., 163, 241-245.
- 30) Keene, H.J. (1963) : Parotid fluid collection system with vacuum-trap modification. J.Dent.Res., 42, 1041.
- 31) Reisfeld, R.A., Lewis, U.J. and Williams, D.E. (1962) : Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gels. Nature, 195, 281-283.
- 32) Andrews, P. (1965) : The gel filtration behaviour of proteins related to their molecular weight over a wide range. Biochem.J., 96, 595-606.
- 33) Goldstein, I.J., Hollerman, C.E. and Merric, J.M. (1965) : Protein carbohydrate interaction, I. The interaction of polysaccharides with concanavalin A. Biochim Biophys Acta, 97, 68-76.
- 34) Hartree, E.F. (1972) : Determination of protein : A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Analyt. Biochem., 48, 422-427.

- 35) Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F. (1956) : Colorimetric method for determination of sugar and related substances. Analyt. Chem., 28, 350-356.
- 36) Warren, L. (1959) : The thiobarbituric acid assay of sialic acids, J.Biol.Chem., 234, 1971-1975.
- 37) Payza, N., Rizvi, S. and Pigman, W. (1969) : Studies of action of acid and bases on porcine submaxillary mucin. Archs oral Biol., 129, 68-74.
- 38) Hickman, S., Kornfeld, R., Osterland, C.K. and Kornfeld, S. (1972) : The structure of the glycopeptides of a human γ M-Immunoglobulin. J.Biol.Chem., 247, 2156-2163.
- 39) Björndal, H., Lindberg, B. and Svensson, S. (1967) : Gas-liquid chromatography of partially methylated alditols as their acetates. Acta Chem. Scand., 21, 1801-1804.
- 40) Hakomori, S. (1964) : A rapid permethylation of glycolipid and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. J.Biochem., 55, 205-208.
- 41) Misaki, A and Goldstein, I.J. (1977) : Glycosyl miety of the Lima Bean lectin. J.Biol.Chem., 252, 6995-6999.
- 42) Li, S.C. and Li, Y.T. (1972) : α -Mannosidase, β -N-acetyl--hexosaminidase and β -galactosidase from Jack bean meal. in Methods in Enzymology, 28, (Ginsburg, V., editor), Academic Press, New York, 702-713.
- 43) Shizukuishi, S., Taniguchi, T., Shibata, S., Nakamura, R., Tsunemitsu, A. and Uesugi, Y. (1978) : Purification and some properties of α -L-fucosidase isolated from Streptococcus sanguis, J.Dent.Res., 57, 1028-1035.

- 44) Ohtani, K., Shibata, S. and Misaki, A. (1979) : Purification and characterization of tora-bean (Phaseolus vulgaris) Lectin. J. Biochem., in presentation.
- 45) Morell, A.G., Hamer, V.D. and Scheinberg, I.H. (1966) : Physical and chemical studies on ceruoplasmin. J. Biol. Chem., 241, 3745-3749.
- 46) Davis, B.J. (1964) : Disk electrophoresis-II, Method and application to human serum protein. Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 404-427.
- 47) Koide, N. and Muramatsu, T. (1974) : Endo- β -N-acetylglucosaminidase acting on carbohydrate moieties of glycoproteins. J. Biol. Chem., 249, 4897-4904.
- 48) Degand, P., Boersma, A., Roussel, P., Richet, C. and Biserte, G. (1975) : The peptide moiety of the region carrying the carbohydrate chains of the human parotid glycoprotein. Febs letters, 54, 189-192.
- 49) So, L.L. and Goldstein, I.J. (1967) : Protein-carbohydrate interaction of the quantitative precipitation method to polysaccharide-concanavalin A interaction. J. Biol. Chem., 242, 1617-1622.
- 50) Goldstein, I.J., Reichert, C.M. and Misaki, A. (1974) : Interaction of concanavalin A with model substrates. Ann. N.Y. Acad. Sci., 234, 283-296.
- 51) 高崎誠一 (1979) : 糖タンパク質の糖鎖構造. 化学, 34巻 6号, 9-17, 昭和 54.
- 52) Kornfeld, R., Keller, J., Baenziger, J. and Kornfeld, S. (1971) : The structure of the glycopeptide of human β G

Myeloma Proteins, J.Biol.Chem., 246, 3259-3268.

- 53) Tsay, G.C., Dawson, G. and Sung, S.S.J. (1976) : Structure of the accumulating oligosaccharide in fucosidosis, J.Biol.Chem., 251, 5852-5859.
- 54) Coykendall, A.L. and Specht, P.A. (1975) : DNA base sequence homologies among strains of Streptococcus sanguis. J.Gen.Microbial., 91, 92-98.
- 55) 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.
- 56) Mäkelä, O. (1957) : Studies in hemagglutinins of leguminosae seeds. Ann.Med.Exp.Biol.Fenn., 35, Suppl., 11, 1-133.
- 57) Gibbons, R.J. and Houte, J.V. (1973) : On the formation of Dental Plaques. J.Periodontol., 44, 347-360.

THE STRUCTURE OF A PROLINE-RICH AND BASIC GLYCOPROTEIN FROM HUMAN PAROTID SALIVA AND ITS INTERACTION WITH ORAL STREPTOCOCCI

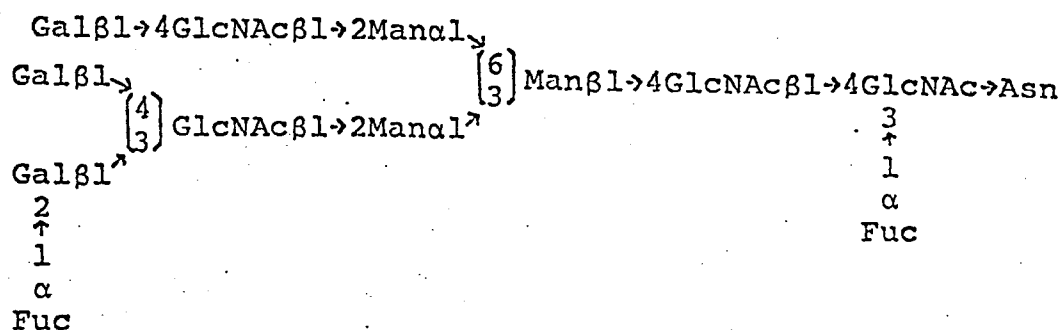
Satoaki SHIBATA

Department of Preventive Dentistry, Osaka University
Dental School, 3-48 Nakanoshima 4-Chome, Kita-Ku,
Osaka, Japan

It is postulated that an initial step in dental plaque formation is adherence of oral bacteria to the salivary pellicle that coats the enamel surface of teeth. Several salivary constituents which include specific antibodies, lysozyme and various aggregating factors such as the high molecular weight mucinous glycoproteins, interact specifically with surface components of oral bacteria. Levine and Friedman have demonstrated that a proline-rich and basic glycoprotein (PGP) is present in human parotid saliva, but its biological activity is unknown. The purpose of this study was to elucidate the structure of the PGP and its interaction with some oral streptococci.

Parotid saliva was collected from healthy adults, according to the procedure of Keene. The PGP was isolated by gel filtration on Sephadex G-200 after precipitation with 20 - 80 % ammonium sulfate, followed by affinity chromatography on Concanavalin A (Con A)-Sephadex. The purified sample gave a single band on polyacrylamide gel electrophoresis. The treatment of the purified PGP with pronase afforded a glycopeptide consisting L-fucose, D-galactose, D-mannose and N-acetyl-D-glucosamine residues in an approximate molar ratio of 2 : 3 : 3 : 4. The structural studies by permethylation, sequential digestion with various glycosidases, periodate

oxidation, and gas chromatographic and mass spectrometric analyses have indicated that the PGP has a sequence of the carbohydrate unit as follows.



The PGP was found to bind with Con A and Tora-bean lectin (Phaseolus vulgaris) by quantitative precipitation assay, and to inhibit the hemagglutination by lectin H (Ulex europeus).

The tritium labeling of the terminal galactosyl residue of the GP was carried out essentially as described Morell et al.

The procedure included the oxidation by galactose oxidase and the successive reduction by $\text{NaB}[\text{}^3\text{H}]_4$. The assay for the binding ability of the radioactive PGP to the bacterial cells was performed by incubating the reaction mixture contained $[\text{}^3\text{H}]$ -PGP and bacterial cells which were grown by inoculating 200 ml of 3 % trypticase soy broth. The radioactive

GP binded to the whole cells of the strains such as S. mitis ATCC 9811, 9895, 15909, 15911, 15912, 15913, 15914 and S. sanguis ATCC 10557. After the treatment of the bacterial cells with trypsin or heating, the binding ability was remarkably reduced. The binding of the radioactive PGP to S. mitis ATCC 9811 and S. sanguis ATCC 10557 was specifically inhibited with D-galactose or sugars containing β -D-galactose residue at the non-reducing terminal. These findings have strongly

suggested that lectin-like substance may be present on the bacterial cell surface.

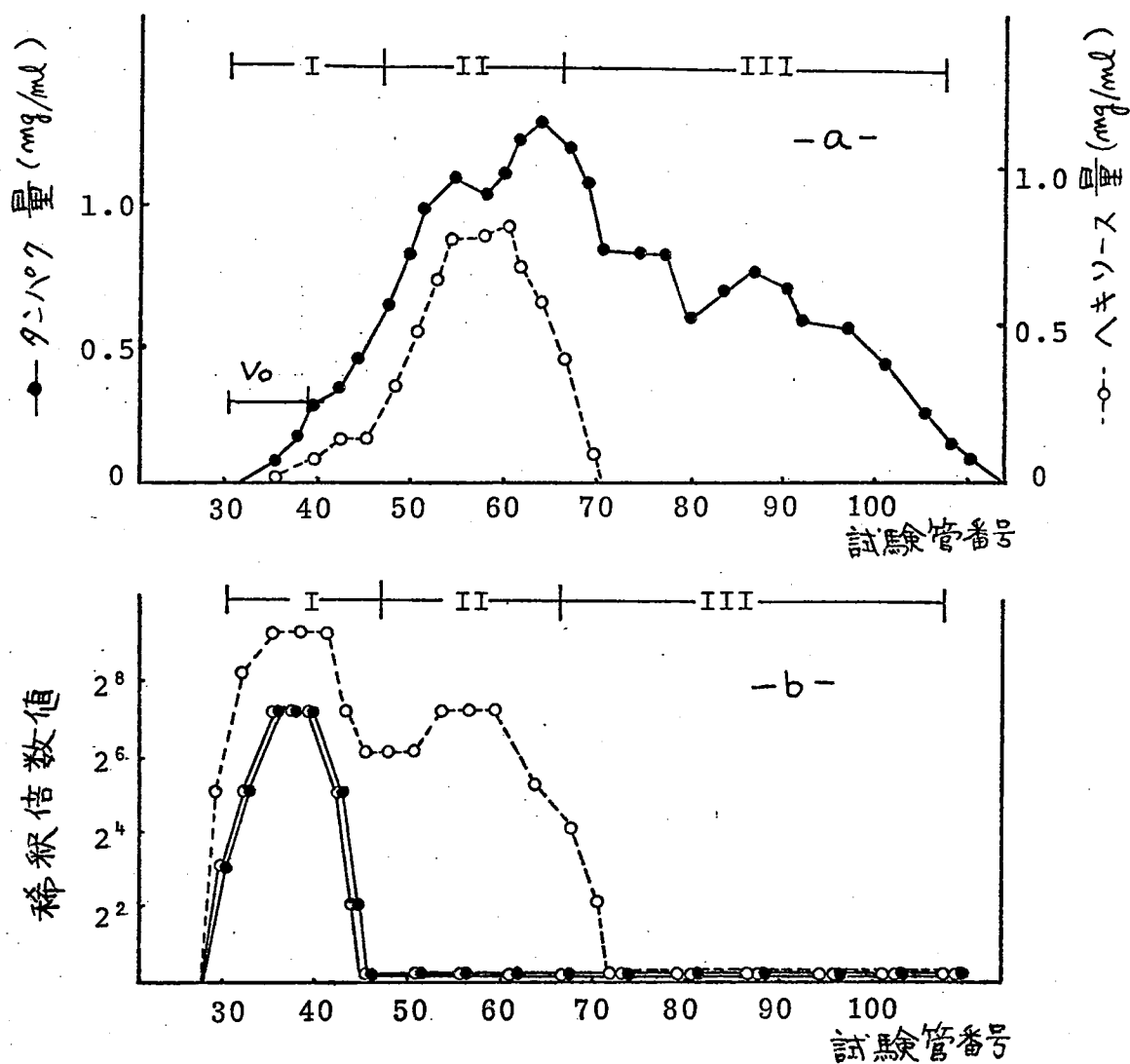


図 1-a ヒト耳下腺唾液のセファデックス G-200 による
ゲル濾過パターン。流速は 5ml/hr で 5ml/管ごとに分取した。

図 1-b 抗A血清の血球凝集を阻止する各分画試料の稀釈倍数値 (—●—)
抗B血清の血球凝集を阻止する各分画試料の稀釈倍数値 (—○—)
レクチンHの血球凝集を阻止する各分画試料の稀釈倍数値 (—○—)

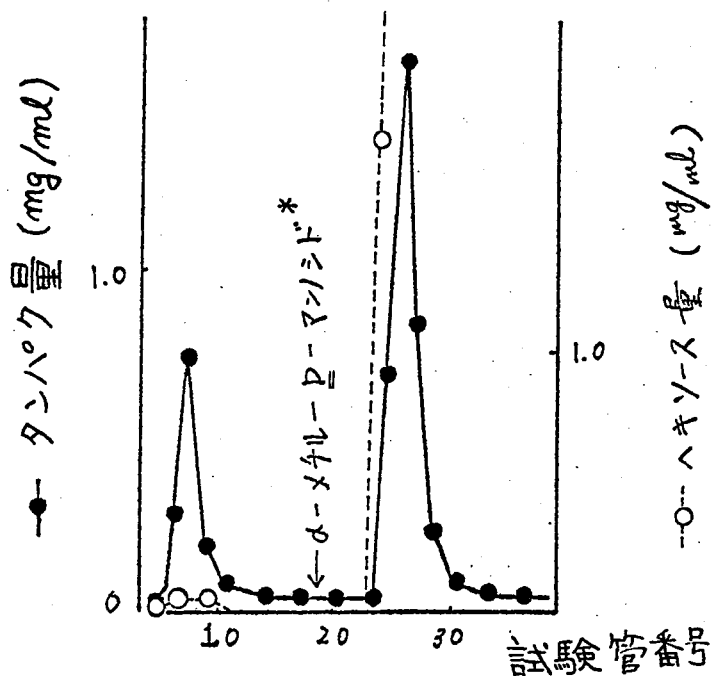


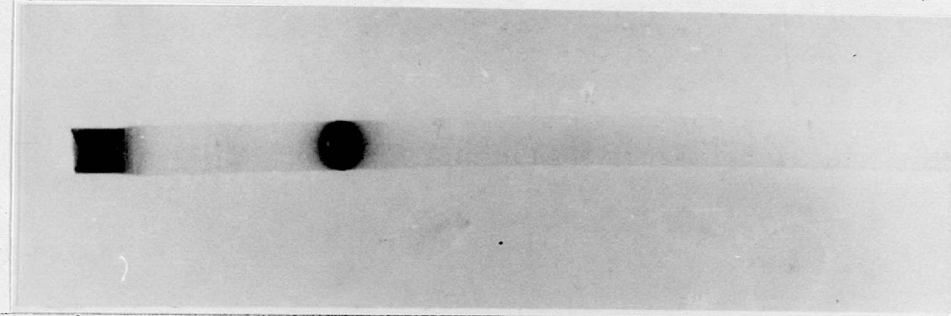
図 2. セフデックス G-200 の画分Ⅱ

Con A セフローズ・アフィニティ
クロマトグラフィー パターン

* 50 mM α -メチル-D-マンニトドを含む
0.15 M PBS, pH 7.0 にて溶出を行った。
流速は 5 ml/hr で 5 ml/管ごとに分取した。

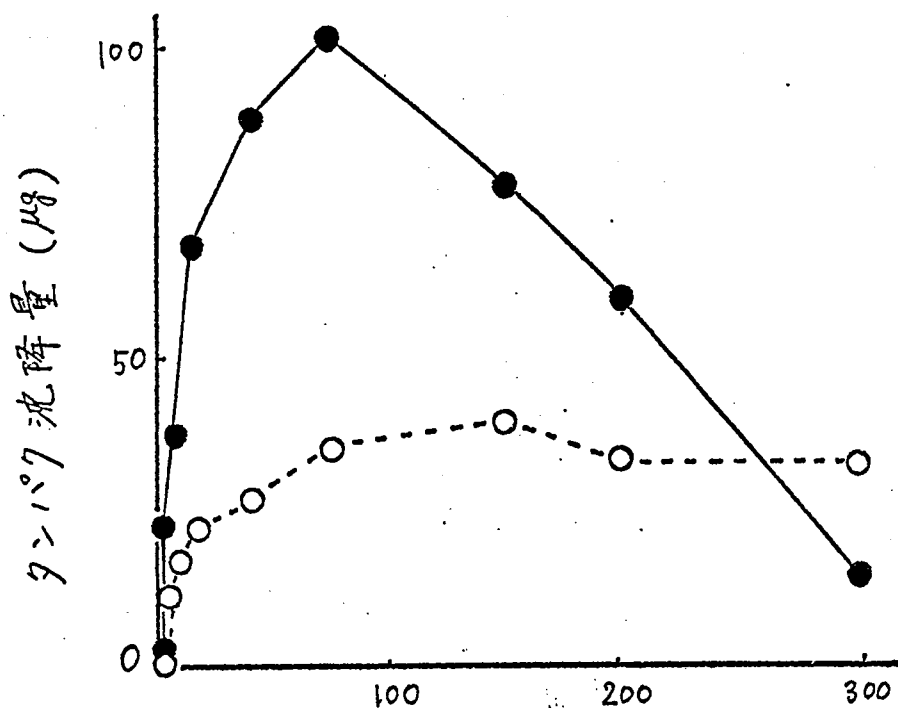
(+)

(-)



↑
原点

図3. PGPのディスク電気泳動パターン
(試料はタンパク量 $70\mu\text{g}$)



精製 PGP (μg)

図4. 精製 PGP と ConA およびトラ豆レクチンとの定量沈降反応

—●—: ConA 200 μg に対する沈降曲線

-○-: トラ豆レクチン 520 μg に対する沈降曲線

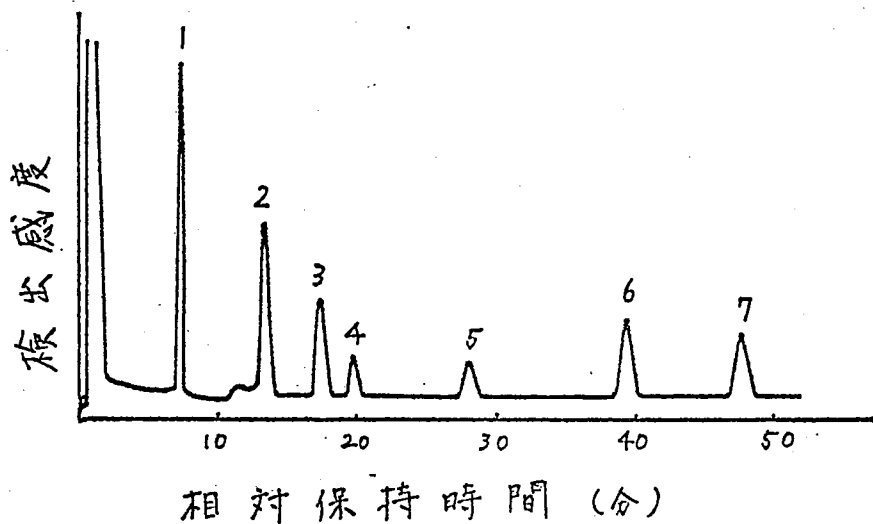


図5. 精製糖ペプチドのメチル糖ガスクロマト
グラフィ・パターン (OY-17)

1. 2, 3, 4-トリ-O-メチルフコース
2. 2, 3, 4, 6-テトラ-O-メチルガラクトース
3. 3, 4, 6-トリ-O-メチルマンノース
4. 3, 4, 6-トリ-O-メチルガラクトース
5. 2, 4-ジ-O-メチルマンノース
6. 3, 6-ジ-O-メチル-N-アセチルグルコサミン
7. 6-モノ-O-メチル-N-アセチルグルコサミン

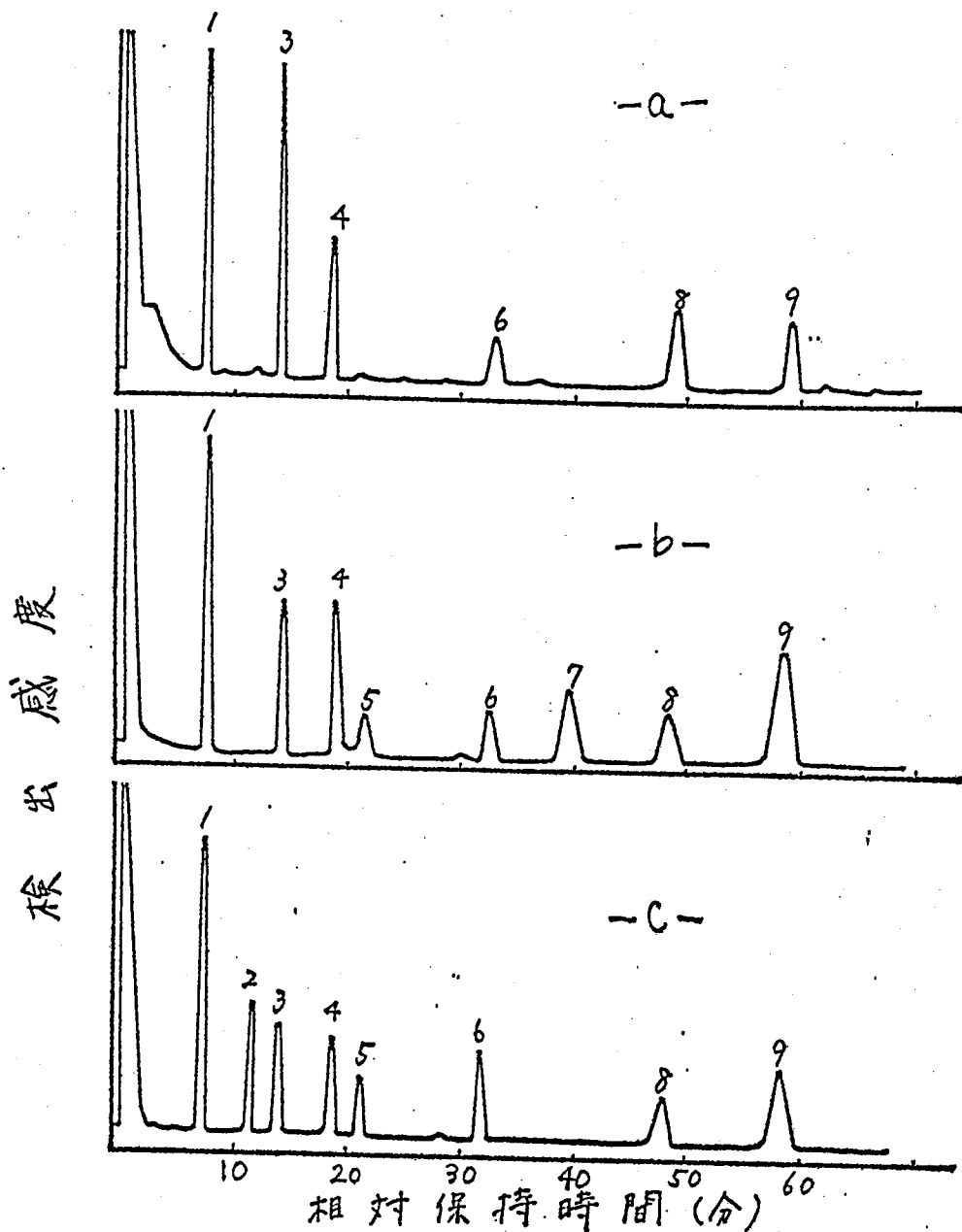


図6-a; 酸緩和水分解後のメチル糖のガスクロマトグラフィパターン
 -b; β -D-ガラクトシダーゼによる分解後のメチル糖のガスクロマトグラフィパターン
 -c; β -D-ガラクトシダーゼおよび β -N-アセチルヘキサミンダーゼによる分解後のメチル糖のガスクロマトグラフィパターン

1; 2,3,4-トリ-O-メチルフコース	2; 2,3,4,6-テトラ-O-メチルマンノース
3; 2,3,4,6-テトラ-O-メチルガラクトース	4; 3,4,6-トリ-O-メチルマンノース
5; 3,4,6-トリ-O-メチルガラクトース	6; 2,4-ジ-O-メチルマンノース
7; 3,4,6-トリ-O-メチル-N-アセチルグルコサミン	8; 3,6-ジ-O-メチル-N-アセチルグルコサミン
9; 6-モノ-O-メチル-N-アセチルグルコサミン	

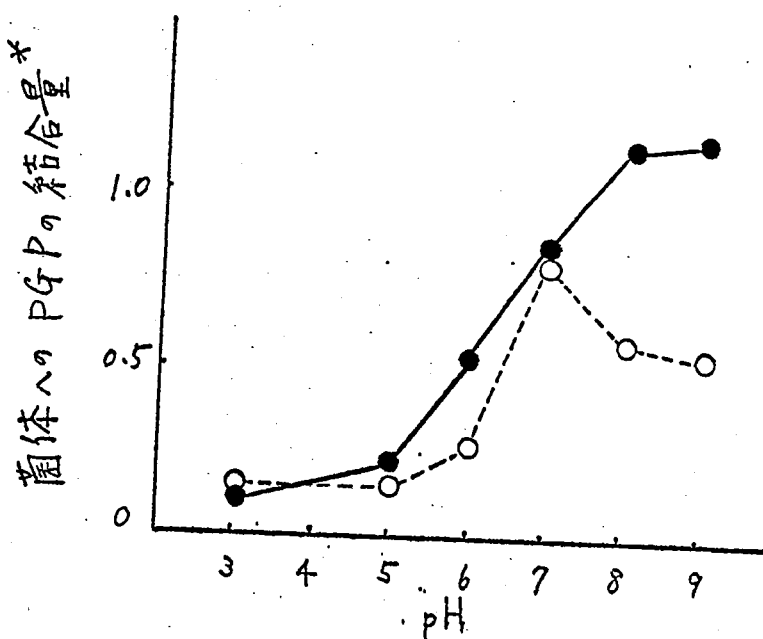


図7. PGPと菌体との結合性に対する
pHの影響

—●—: *S. sanguis* ATCC 10557株
 --○--: *S. mitis* ATCC 9811株

* 菌体乾燥重量1mgに対するPGPの
結合量(μg)を表わす。

反応条件; 両株とも、本文中に示した、0.15Mの各緩衝液(等モルの塩
化ナトリウムを含む)0.6ml中に菌体量(乾燥重量)17mgおよび
[H]-PGP 36.7μgを含ませ、pHを変え、4℃で2時間反応させた。

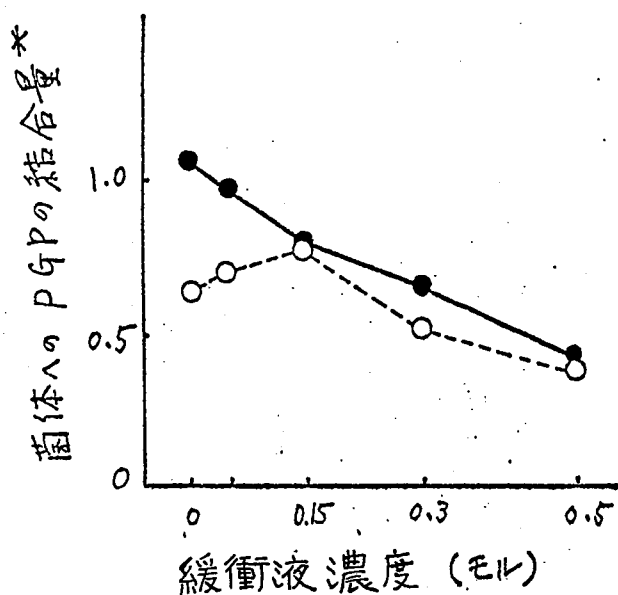


図 8. PGPと菌体との結合性には
対する緩衝液濃度の影響

●: S. sanguis ATCC 10557 株

○: S. mitis ATCC 9811 株

* 菌体乾燥重量 1mg 当りの PGP の
結合量 (μg) と表わす。

反応条件; S. mitis の場合は、リン酸塩緩衝液, pH 7.0, S. sanguis の場合は、トリス-塩酸緩衝液, pH 8.0, (両緩衝液とも等モルの塩化ナトリウムを含む) を用い、いずれも各濃度の緩衝液, 0.6ml 中に菌体量(乾燥重量) 17mg, および [H]-PGP 36.7μg を含ませ、4°C で 2 時間反応させた。

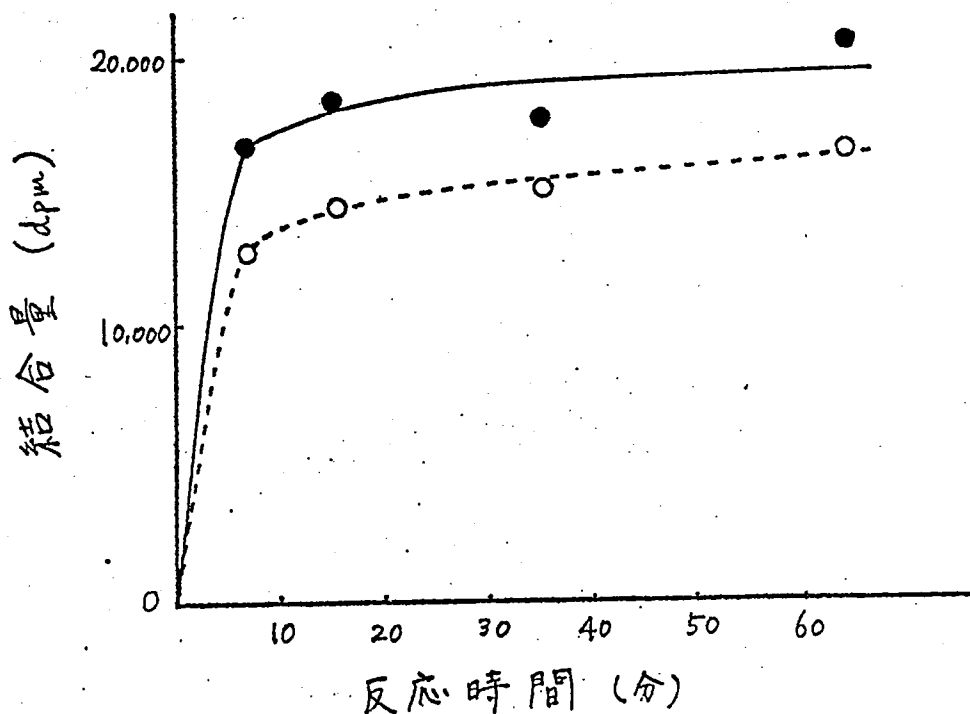


図 9. PGPと菌との結合性の時間的变化

●: *S. sanguis* ATCC 10557 株

○: *S. mitis* ATCC 9811 株

反応条件; *S. mitis* の場合は, 0.15M PBS, pH 7.0, *S. sanguis* の場合は, 0.05M トリス-塩酸緩衝液 (等モルの塩化ナトリウムを含む), pH 8.0 を用い, いずれも 0.6 ml の緩衝液中に菌体量 (乾燥重量) 17 mg および $[^3H]$ -PGP 36.7 μ g を含ませ, 氷冷下で反応させた。

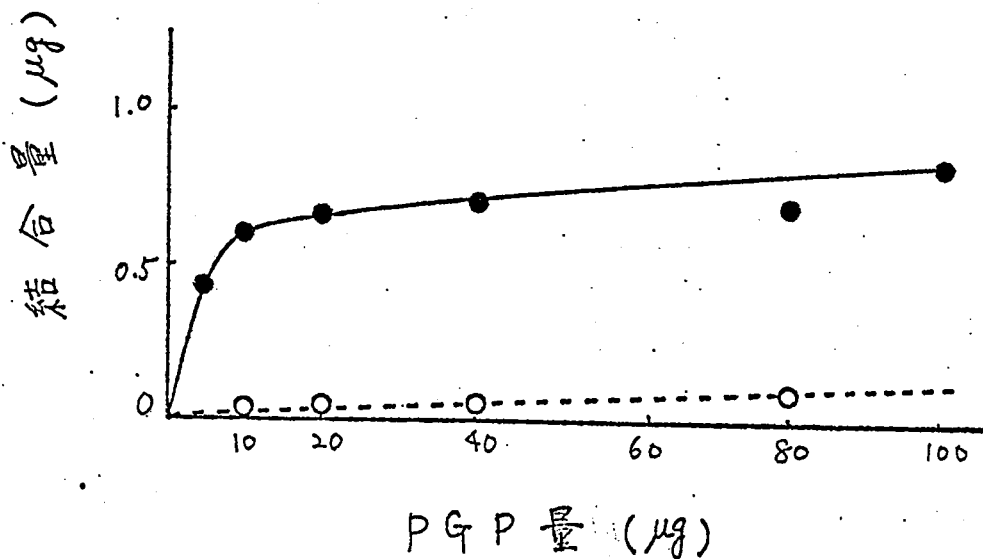


図 10 S. mitis ATCC 9811株への PGP の結合量

- : 菌体への PGP の結合量
- : 菌体を 100°C で 10 分間加熱した後の結合量

反応条件; 0.15M PBS, pH 7.0, 0.6 ml の溶液中に菌体量(乾燥重量)

17 mg および $[^3H]$ -PGP は横軸に表示した量を含み、4°C で 2 時間

反応させた。結合量は菌体乾燥重量 1 mg に対する結合 PGP 量を表わす。

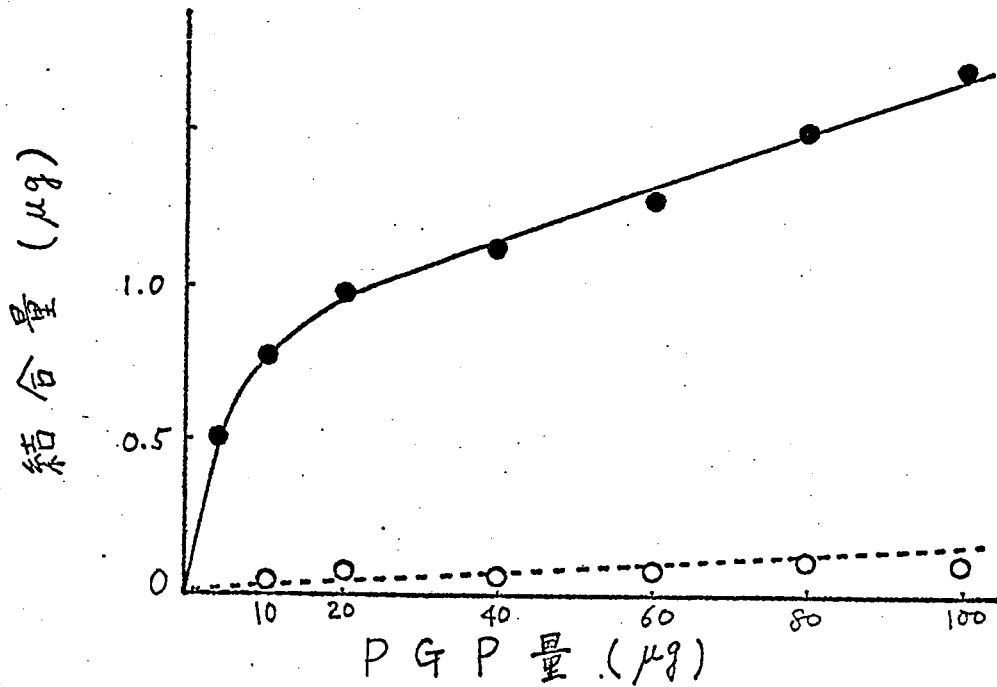


図11. S. sanguis ATCC 10557株へのPGP
結合量

● : 菌体へのPGPの結合量

---○--- : 菌体と100℃で10分間加熱した
後の結合量

反応条件; 0.05M トリス-塩酸緩衝液(筆尾の塩化ナトリウムを含む), pH 8.0, 0.6ml
の溶液中に菌体量(乾燥重量)17mg, および³H-PGP量は横軸に
表示した量を含ませ, 4℃で2時間反応させた。結合量は菌体乾燥
重量1mgに対する結合PGP量で表わす。

表1 ヒト耳下腺唾液のPGPの精製

操作	タンパク量 (mg)	ハキリス量 (mg)
唾液 (1ℓ)	2020	176
硫酸分画 (20-80%)	1415	133
セファックス G-200 による ゲルミゲーション	481	98
Con A セファローズ アフィニティクロマトグラフィ		
非吸着画分	224	6
吸着画分	190	81

表2 精製 PGP および 糖 ペプチドの アミノ酸組成

アミノ酸	精製 PGP	糖 ペプチド *
リジン	5.4	12.9
ヒスチジン	1.3	---
アルギニン	4.2	---
アスパラギン酸 **	5.2	30.7
スレオニン	0.4	8.9
セリン	4.6	---
グルタミン酸	20.2	7.9
プロリン	34.3	---
グリッソ	22.0	39.7
アラニン	2.3	---
イソ・ロイッソ	0.3	---
ロイッソ	0.6	---
バリン	0.5	---
グルコサミン **/ アスパラギン ***	1.6	4.4

各アミノ酸の数値はアミノ酸の総量を100モルとした
各相対モル数を表わしてある。

* プロナセ処理後(4回)の精製糖ペプチド。

** それぞれ、アスパラギン、および N-アセチルグルコサミンに由来する。

*** アスパラギン酸に対するグルコサミンのモル比

表3. メチル化糖 ペプチド の メチル糖 比.

<u>O</u> - <u>メチル糖</u>	結合様式	モル比 *
<u>O</u> - <u>メチル</u> - <u>L</u> - <u>フコース</u> 2,3,4-トリ-	[Fuc] 1→	2.3
<u>O</u> - <u>メチル</u> - <u>D</u> - <u>ガラクトース</u> 2,3,4,6-テトラ-	[Gal] 1→	2.2
3,4,6-トリ-	→2 [Gal] 1→	0.8
<u>O</u> - <u>メチル</u> - <u>D</u> - <u>マンノース</u> 3,4,6-トリ-	→2 [Man] 1→	2.0
2,4-ジ-	→6 →3 [Man] 1→	0.8
<u>O</u> - <u>メチル</u> - <u>N</u> - <u>アセチルグルコサミン</u> 3,6-ジ-	→4 [GlcNac] 1→	2.1
6-モノ-	→4 →3 [GlcNac] 1→	2.1

* 数値は 3,4,6-トリ-O-メチルマンノースを 2.0モルとして表わす.

表4 酸およびグリコングラーゼによる加水分解後のメチル糖比

処理法	α-メチル- L-フコース	α-メチル- D-ガラクトース		α-メチル D-マンノース			α-メチル-N- アセチル-D-グルコサミン		
	2,3,4- トリ-	2,3,4,6- テトラ-	3,4,6- トリ-	2,3,4,6- テトラ-	3,4,6- トリ-	2,4- ジ-	3,4,6- トリ-	3,6- ジ-	6- モノ-
精製糖パフチド	2.3	2.2	0.82	-	2.0	0.84	-	2.1	2.1
酸緩和加水分解	0.10	2.3	0.10	-	2.0	0.82	0.21	3.5	trace
α-(1→2)-フコングラーゼ による加水分解	1.2	2.6	0.10	-	2.0	0.79	-	2.1	2.1
β-ガラクトングラーゼ による加水分解	2.2	0.93	0.80	-	2.0	0.90	1.2	0.85	2.2
β-ガラクトングラーゼおよび* β-ヘキソサミニダーゼ による加水分解	2.3	0.95	0.82	0.90	1.0	0.85	-	0.75	2.1

数値は 3,4,6-トリ-α-メチルマンノースを 2.0 モルとして表わす。

* の場合は、3,4,6-トリ-α-メチルマンノースを 1.0 モルとして表わす。

表5 緩和 Smith 分解 および endo 型 N-アセチルグルコサミニダーゼ 処理後の構成糖比

処 理	<u>L</u> -フコース	<u>D</u> -マンノース	<u>D</u> -ガラクトース	<u>N</u> -アセチル- <u>D</u> - グルコサミン
精製糖ペプチド	0.6	1.0	0.9	1.2
緩和 Smith 分解	-	1.0	trace	2.1
エンド- <u>N</u> -アセチル * グルコサミニダーゼ	1.0	0.1	0.1	1.3

数値は D-マンノースを 1.0 モルとして表わす。

* の場合は L-フコースを 1.0 モルとして表わす。

表6 PGPと口腔連鎖球菌との結合性

菌株	放射能 dpm*	菌株	放射能 dpm*
<u>S. mutans</u>		<u>S. salivarius</u>	
BHT	59	ATCC 9222	47
Ingbritt	53	<u>S. sanguis</u>	
6715	32	ATCC 10556	57
<u>S. mitis</u>		ATCC 10557	1588
ATCC 9811	1229	ATCC 10558	68
ATCC 9895	91	66 x 49	70
ATCC 15909	1225	M-5	61
ATCC 15911	1017	6249	48
ATCC 15912	696		
ATCC 15913	761		
ATCC 15914	1424		

* 放射能量は菌体乾燥重量1mg当りで表わす。
 反応条件; 0.15M PBS, pH7.0, 0.6ml 中に各菌株の菌体量(乾燥重量)約15~20mg
 および [H]-PGP, 74 μ g を含せ、4℃で2時間反応させた。

表7 温度およびトリフッシン処理による結合性への影響

処理	<u>S.sanguis</u> ATCC 10557		<u>S.mitis</u> ATCC 9811	
	dpm	%	dpm	%
対 照	17606	100	16555	100
トリフッシン	2254	13	4718	29
加熱 (100°C, 10分)	458	3	464	3

反応条件; 本文中に記載した処理後, *S. sanguis* の場合は, 0.05M トリス-塩酸緩衝液 (等モルの塩化ナトリウムを含む) pH 8.0, *S. mitis* の場合は, 0.15M PBS, pH 7.0 を用い, いずれも 0.6ml の緩衝液中に菌体量 (乾燥重量) 17mg, および [^3H]-PGP 36.7 μg を含ませ反応系を用い, 4°C で 2 時間 反応させた。

表8 2価金属イオンによる結合性への影響

糖	<u>S. sanguis ATCC 10557</u>		<u>S. mitis ATCC 9811</u>	
	dpm	%	dpm	%
対照	15793	100	18017	100
EDTA (30 mM)	14998	94	4474	25
Ca ⁺⁺ (1 mM)	13823	87	5361	30
Mg ⁺⁺ (1 mM)	15763	99	4337	24
Mn ⁺⁺ (1 mM)	16014	100	5216	29
Ca ⁺⁺ Mg ⁺⁺	14317	90	4429	25
Ca ⁺⁺ Mn ⁺⁺	14987	94	5269	29
Mg ⁺⁺ Mn ⁺⁺	15666	98	5242	29
Ca ⁺⁺ Mg ⁺⁺ Mn ⁺⁺	14846	93	5357	30

反応条件; 表7に記載した反応系を用い. EDTA処理後, Ca⁺⁺, Mg⁺⁺, Mn⁺⁺を各最終濃度1mMになるように加え、4℃で2時間反応させた。放射エネルギーは、菌体に結合した総量を表わす。

表9 糖添加による結合性の阻害

糖 (50 mM)	相 対 阻 害 率 (%)	
	<i>S.mitis</i> ATCC 9811	<i>S.sanguis</i> ATCC 10557
無 添 加	0	0
<u>L</u> -アラビノース	79	82
<u>L</u> -ラムノース	0	0
<u>D</u> -リボース	0	0
<u>D</u> -キシロース	0	32
<u>L</u> -フコース	0	0
<u>D</u> -ガラクトース	99	99
<u>D</u> -グルコース	69	54
<u>D</u> -マンノース	60	88
<u>D</u> -フラクトース	36	20
<u>N</u> -アセチル- <u>D</u> -ガラクトサミン	87	12
<u>N</u> -アセチル- <u>D</u> -グルコサミン	90	55
α -メチル- <u>D</u> -ガラクトシド	25	4
β -メチル- <u>D</u> -ガラクトシド	51	26
α -メチル- <u>D</u> -グルコシド	31	59
β -メチル- <u>D</u> -グルコシド	20	46
α -メチル- <u>D</u> -マニシド	2	3
スクロース	36	15
ラクトース	98	99
メリビオース	0	0
ラクトサミン	98	98
キトビオース	0	0
ラフィノース	0	0

反応条件; 表7に記載した反応系を用い、各単糖または少糖を最終濃度 50mM になるように調製し、4℃で2時間反応させた。