Osaka University Knowledge Archive

Title	う蝕病原菌Streptococcus mutansの菌体外多糖生合成酵素に関する研究
Author(s)	亀高, 茂
Citation	大阪大学, 1987, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35632
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【3】

氏名・(本籍)	亀高茂（かめたかしげる）
学位の種類	薬学博士
学位記番号	第 7861 号
学位授与の日付	昭和62年9月16日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**う蝕病原菌Streptococcus mutansの菌体外多糖生合成酵素に関する研究**
論文審査委員	(主査) 教授 近藤 雅臣 (副査) 教授 岩田平太郎　教授 三浦 喜温　教授 内田 驍

論文内容の要旨

う蝕病原菌Streptococcus mutansは，Sucroseを基質として菌体外にグルカンおよびフルクタンを産生することが知られている。グルカンおよびフルクタンはそれぞれ菌体外酵素Glucosyltransferase（GTase）およびFructosyltransferase（FTase）によって合成され，う蝕の発生と進行に重要な役割を演じていることが明らかとなっている。

S.mutansは，いろいろな性状から均質な菌種とは言えず，さらに細かく分類される。最も一般的には菌体表層の多糖抗原の種類によりａ～ｇの７種の血清型に分けられており，これら血清型間の類縁性と相違性についてはいろいろな方法によって研究されている。

本研究では先ず，放射性Sucroseを基質に用い，血清型ａ～ｇのS.mutans計17株の菌体外粗多糖合成酵素（GTaseとFTaseを含む）を作用させ，不溶性多糖と可溶性多糖の合成率を比較した。その結果，血清型ｄとｇの菌株は，他の菌株に比較して不溶性多糖の合成率が高かまった。また，各菌株の粗酵素のGTase活性とFTase活性の測定を行ったところ，血清型ａ・ｄ・ｇの株はFTase活性を示さず，GTase活性のみ示したのに対し，他の菌株の酵素からは，両活性が共に検出された。

次に，これら粗多糖合成酵素を，ＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）とポリアクリルアミド尿素ゲル等電点電気泳動（ＰＡＧ－ＩＥＦ）によって分離し，活性染色法を検討した。泳動後のゲルをTriton Ｘ－100を含有する酢酸緩衝液によってよく洗浄し，さらにSuctoseとTriton Ｘ－100を加えた緩衝液中で反応させることによって，酵素の位置に多糖バンドが形成された。形成されたバンドをゲルから切り離して，加水分解し，構成糖の定性分析を行うことによって各バンドがGTaseかFTaseかを知ることが可能であり，また，ゲルをＰＡＳ染色することにより，多糖合成酵素の

高感度の活性染色が可能であった。

S.mutans17菌株から，ＳＤＳ－ＰＡＧＥにより見かけ上７種の活性バンドが得られ，その構成糖の定性分析から，高分子側の３種がGTase（分子量：156Ｋ，146Ｋ，135Ｋ）で，低分子側の４種がFTase（分子量：108Ｋ，95Ｋ，80Ｋ，76Ｋ）であることが明らかとなった。FTaseバンドは血清型ａ・ｄ・ｇの酵素の泳動レーンからは検出されず，先に述べたａ・ｄ・ｇ型の粗酵素がFTase活性を示さない，という結果を支持していた。

一方、ＰＡＧ－ＩＥＦの活性バンドの定性分析からpI4.25と4.60の２種のFTaseバンドと，pIが4.25，4.60，4.85，5.00，5.55，5.70の６種と，さらにpI5.70付近に２．３種のGTaseバンドが検出された。

２種の電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ，ＰＡＧ－ＩＥＦ）の泳動パターンにより各菌株の粗酵素は，血清型ａ，血清型ｂ，血清型ｃ，ｅ，ｆ，血清型ｄ・ｇの４グループに分類された。

これらの分類は，既に報告されているS.mutans各菌株のＤＮＡ塩素のＧＣ比に基づく遺伝学的分類や，糖の分解性などに基づく生物学的分類とよく一致していた。

これらの検討で，菌体外にFTaseを分泌しないことが判明した血清型ａ・ｄ・ｇの菌株の中から，S.mutans ＯＭＺ 176株（血清型ｄ）を選んで，GTaseの精製を試みた。本菌を，Brain heart infusion brothで37℃，18時間培養した培養液から，遠心分離によって菌体を除き，50％飽和の硫安塩析と透析によって粗酵素溶液を得た。

粗酵素溶液をSepharose ６Ｂのカラムにかけたところ活性部分は素通り画分に現れたので，これを限外沪過によって濃縮し，Chromatofocusingカラムにかけた。分離用ゲルとしてPolybuffer exchanger ＰＢＥ 94を用い，溶出液として，Pharmalyte pH 2.5－５を用いてChromatofocusingを行ったところpH 5.5から2.5の良好なpH勾配が形成され，GTase－１～３の３つの活性成分に分離した。

先ず，これら３種の酵素の活性の比較を行った。不溶性グルカンと可溶性グルカンの生成割合を検討したところ，GTase－１とGTase－３は不溶性グルカンの生成率がそれぞれ17％，13％で可溶性グルカンの生成量が優っていたが，GTase－２では可溶性グルカンは全く生成せず，不溶性グルカンのみが合成された。

GTase活性は，プライマーの存在で活性化されることが知られている。そこでプライマーとしてDextran Ｔ－10を濃度を変えて反応系に添加して活性化のされ方を比較した。GTase－１はDextran Ｔ－10の添加によってもほとんど活性化されなかった。これに対しGTase－２はDextran Ｔ－10の添加によって濃度依存的に不溶性グルカン合成活性が活性化された。一方，GTase－３では可溶性グルカン合成活性が活性化された。

次にこれら３酵素によって合成されたグルカンの結合様式を調べた。各酵素に５％Sucroseを作用させ，不溶性および可溶性グルカンを合成させ，よく洗浄した。これらのグルカンは箱森法によって完全にメチル化し，加水分解後還元した糖アルコールとしたのち，アセチル化としたものをガスクロによって分析してそれぞれの結合に由来するアルジトールアセテート体の比によってグルカンの結合様式の比を算出した。

その結果，GTase－１の合成するグルカンは不溶性，可溶性共にα－１，６結合が多かった。これに

対し，GTase－２は不溶性グルカンのみを合成し，80%近くα－１，３結合であった。またGTase－３の合成するグルカンは，それぞれ不溶性にはα－１，３結合が，可溶性にはα－１，６結合が多かったが，それ以上に特徴的なことは，いずれも非還元末端と分岐部のGlucose残基が多くみられたことである。

菌体の歯面への付着や菌体間の凝集など，歯垢形成に関与している粘着性のグルカンは，これらの性質の異なるGTaseの相乗効果によって生成するものと考えられる。

論文の審査結果の要旨

S.mutansはａ～ｇの７種の血清型に分類されているが，これらの菌種が産生するGlucosyltransferase（GTase）を精製し，これを指標としてその泳動パターンにより，血清型間の類似性を検討した。その結果ａ～ｇの７種の血清型は更にａ型，ｂ型，ｃ・ｅ・ｆ型およびｄ・ｇ型の４種類に細分できることが明らかとなった。

また，血清型Ｄ型のGTaseは３種あり，それぞれが性質の異なったグルカンを生成することを明らかにし，歯垢形成に関与している粘着性のグルカンはこれらの性質の異なるGTaseの相乗効果によって生成するものとした。これらの成果は薬学博士の学位を授与するに値するものと判定した。