原 著

口腔連鎖球菌由来の菌体外プロテ アーゼについて*

戸 田 恭 司** 大 塚 誠** 石 川 康 子**
野 中 秀 樹** 中 村 亮**

概要：口腔連鎖球菌27株を用いてプロテアーゼ活性の存在について検索し、培養上清画分に強い活性の認められた *S. sanguis* ATCC 10557株の培養上清画分プロテアーゼについて若干の性質を検討した。

口腔連鎖球菌を Brain heart infusion で培養した後、培養上清画分と菌体画分とに分け、pH 4.0, 6.5, 8.5の異なった pH の反応液中でサクシニルヘモグロビンを基質にしてプロテアーゼ活性を測定した。その結果、ほとんどの菌体画分に pH 6.5 と pH 8.5 でプロテアーゼ活性が認められた。一方、培養上清画分では *S. mitis* ATCC 15912及び *S. sanguis* ATCC 10557, ST 6の3株に pH 6.5と8.5でプロテアーゼ活性が認められた。しかし、pH 4.0での測定では培養上清画分、菌体画分ともにプロテアーゼ活性は認められなかった。

次いで *S. sanguis* ATCC 10557 株の培養上清画分を硫酸塩析し、Sephadex G-200 でゲル濾過した後、活性画分を集め、凍結乾燥したものを標品として若干の性質を検討した。その結果、至適 pHは6.5でサクシニルヘモグロビンに強い基質親和性を示し、Phenylmethane sulphonylfluoride 及び Cu, Hg イオンにより強い活性阻害が認められることがわかった。

緒 言

ヒト唾液や歯垢、あるいは口腔内への組織浸出液中に蛋白分解酵素が存在することが報告され、う蝕や歯周疾患の発病と進行に何らかの役割を果しているのではないかと古くから注目されている¹⁻⁸⁾。う蝕成因説における proteolytic theory⁴⁾や、proteolysis-chelation theory⁵⁾のなかでも早くから蛋白分解酵素とう蝕成因との関係を予測し、一方では口腔内に存在する蛋白分解酵素と歯周疾患との相関^{6,7)}や、歯石形成との相関なども報告されている⁸⁾。これらの蛋白分解酵素は口腔細菌由来であるとするものや、組織由来であるとするものなど様々であるが、一般には口腔細菌由来であると推測している報告が多い^{9,10)}。

口腔常在菌のもつ蛋白分解酵素としては、*S. sanguis*

の IgA-protease が注目され、IgA による口腔粘膜の特異免疫機構との関連で詳しく報告されている¹¹⁾。しかしながら、この酵素は IgA に対してのみ作用するという強い基質特異性を示し、他の蛋白に対しては作用しない¹²⁾。非特異的な蛋白分解酵素としては、*S. mutans*, *S. mitis* などの連鎖球菌の他、*Bacillus*, *Bacteroides*, *Spirochaeta*, *Candida albicans* などについて、酵素の存在報告が認められるが¹³⁻¹⁸⁾、それらの性質や生理的意義について不明な点が多い。

今回、著者らは口腔連鎖球菌の標準菌株について培養上清ならびに菌体の蛋白分解酵素（以後、プロテアーゼとする）について活性のスクリーニングを行い、このなかで特に強い活性を示した *S. sanguis* ATCC 10557の培養上清より部分精製した酵素について若干の性質を検討した。

* 本論文の要旨の一部は昭和56年11月第30回日本口腔衛生学会総会において発表した。

** 徳島大学歯学部予防歯科学教室（主任：中村 亮教授）

* Department of Preventive Dentistry, School of Dentistry, The University of Tokushima (Director: Prof. Ryo NAKAMURA)

昭和57年5月4日受付

材料ならびに方法

(1) 供試菌株

S. mitis 株 ATCC 15909, 15910, 15911, 15912, 15913 は American Type Culture Collection (Rockville, Md.) より, *S. mutans* 株 E 49, Ingbritt, 6715, LM 7, P 4, OMZ 175, SE 11, KIR, *S. sanguis* 株 ST 6 は国立予防衛生研究所歯科衛生部浜田茂幸部長より, 他の連鎖球菌は愛知学院大学歯学部口腔細菌学教室守山隆章教授より供与を受けた。以上の口腔連鎖球菌は Brain heart infusion agar (Difco, Detroit, Mich.) の高層培地に穿刺培養したのち冷所に保存し, 1 カ月毎に新たな培地に穿刺継代培養した。

(2) 粗酵素標品の調製

上記保存菌株を 3.7% Brain heart infusion broth 10ml に接種し, 37°C で一夜静置培養したものをさらに同培養液 200ml に接種し, 再び 37°C で 18 時間静置培養した。そして培養液を 4°C に冷却した後, 15,000×g, 10 分間遠沈し, 菌体と培養上清とに分離した。培養上清は 80% 飽和の硫酸アンモニウムにより塩析し, その沈渣を 15,000×g, 30 分間遠沈して集めた。培養上清の硫酸塩析による沈渣と菌体は 0.01M リン酸緩衝液 pH 7.0 に溶解浮遊し, 2 l の同緩衝液に対して一夜透析を行って脱塩したものを粗酵素標品として用いた。

(3) 基質

サクシニルヘモグロビンは牛血ヘモグロビン (Type I; Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo., USA) を Schwabe の方法によりサクシニル化して調整した¹⁹⁾。ブタ顎下腺ムチンは A⁺ 血液型活性を示す顎下腺より De Saegui and Plonska の方法により調整した²⁰⁾。牛血アルブミン, 牛顎下腺ムチン (Sigma: Type I) は Sigma Chem. Co. より, 胃ムチンは半井化学 (京都) より, また PZ-peptide は Fluka AG (Buchs S.G.) より購入した。なお, ブタ顎下腺ムチン, 牛顎下腺ムチン, 胃ムチンについては使用前に Cowman, Perrella and Fitzgerald らの方法¹⁸⁾により 0.01N NaOH により 48hr 処理したのち中和したものを使用した。

(4) 酵素活性の測定

プロテアーゼ活性の測定は Esumi らの方法²¹⁾に準じて基本的に下記の方法によった。0.2M リン酸緩衝液 pH 6.5, 0.5ml に 4% サクシニルヘモグロビン 0.25ml を加えた反応液中に 0.25ml の酵素標品を加え 1ml とし, 37°C で 4 時間反応させた。10% 三塩化酢酸を 1ml 加えて反応を停止し, 20 分間室温で放置した後, 濾過し

た。濾液 0.1ml を 0.05M リン酸緩衝液 pH 8.0, 2.4ml に加え, 0.5ml の 0.03% Fluorescamine (日本ロシユ, 東京) と反応させ, 204 形日立分光蛍光光度計 (日立製作所, 東京) により励起波長 390nm, 蛍光波長 475nm で蛍光量を測定した。

1 unit は上記条件下で Tyrosine の 1 μ mole に相当する蛍光量を 1 時間当りに遊離する酵素量を 1 unit とした。

蛋白量の測定は牛血清アルブミン (Sigma) を標準蛋白として用い, Hartree の方法²²⁾に準じて測定した。

実験結果

(1) 口腔連鎖球菌のプロテアーゼ活性

各菌株の菌体画分, 培養上清画分について 0.05M クエン酸-0.1M リン酸緩衝液 pH 4.0, 0.1M リン酸緩衝液 pH 6.5, および 0.1M パルピタール緩衝液 pH 8.5 の 3 つの異なった pH の反応液中で活性を測定したが, pH 4.0 での測定では全菌株について培養上清画分, 菌体画分ともに活性は認められなかった。Table 1 に示したように培養上清画分に活性が認められたのは, pH 6.5 および pH 8.5 で, *S. mitis* ATCC 15912, *S. sanguis* ATCC 10557, ST 6 の 3 株であった。菌体画分ではほとんどの菌株に pH 6.5, pH 8.5 で活性を認めた。両画分で *S. sanguis* ATCC 10557 の活性が最も高い値を示した。このことから, *S. sanguis* ATCC 10557 株を用いて培養上清画分に生成されるプロテアーゼについて以下のような若干の性質を調べた。

(2) *S. sanguis* ATCC 10557 株の発育と培養上清のプロテアーゼ活性

S. sanguis ATCC 10557 株を前述の方法で濁度が 630nm の波長で 0.5 になるまで培養し, その 10ml ずつを新たな 3.7% Brain heart infusion broth 200ml に接種した。37°C で所定時間培養後, 再び 630nm の波長で濁度を測定し, ただちに遠心分離を行って前記方法により培養上清画分を取り出した。プロテアーゼ活性は 0.1M リン酸緩衝液 pH 6.5 の反応液中で測定した。Fig. 1 は, *S. sanguis* ATCC 10557 株の発育と培養上清画分のプロテアーゼ活性との関係を継続的に示したものである。菌の発育が静止期に入ると同時に酵素活性は最大に達し, その後, 漸次低下する傾向を示した。

(3) *S. sanguis* ATCC 10557 株の培養上清画分プロテアーゼの性質

S. sanguis ATCC 10557 株を 1.5 l 中で Brain heart infusion broth 中の 37°C, 10 時間培養後, 遠心分

Table 1 Protease Activity of Some Oral Streptococci

Strain (Serotype)	Enzyme Activity* pH 6.5	Enzyme Activity* pH 8.5	Strain (Serotype)	Enzyme Activity pH 6.5	Enzyme Activity pH 8.5
Extracellular Fraction			Bacterial Cell Fraction		
<i>S. mitis</i>			<i>S. mutans</i>		
ATCC 15912	0.10	0.08	OMZ 175 (f)	0.69	0.77
<i>S. sanguis</i>			SE 11 (f)	N.D.	0.32
ATCC 10557	0.14	0.13	K 1 R (g)	0.96	0.53
ST 6	N.D.**	0.07	OMZ 65 (g)	0.54	0.73
			6715 (d/g)	N.D.	N.D.
Bacterial Cell Fraction			<i>S. mitis</i>		
<i>S. mutans</i>			ATCC 9811	1.44	0.89
HS 1 (a)	0.58	0.52	ATCC 9895	1.35	1.60
HS 6 (a)	0.18	0.54	ATCC 15909	2.53	1.30
E 49 (a)	N.D.	Tr.***	ATCC 15910	0.44	0.37
FA 1 (b)	N.D.	Tr.	ATCC 15911	0.74	0.75
BHT (b)	N.D.	1.10	ATCC 15912	1.63	0.81
NCTC 10449 (c)	1.00	Tr.	ATCC 15913	2.52	2.90
Ingbritt (c)	0.36	0.61	<i>S. sanguis</i>		
SG 5 (c)	Tr.	0.41	ATCC 10556	0.39	0.66
OMZ 176 (d)	Tr.	0.33	ATCC 10557	4.76	2.30
LM 7 (e)	Tr.	0.27	M 5	1.45	1.50
P 4 (e)	0.04	0.20	ST 6	1.88	0.80

* Enzyme Activity was expressed as units per mg protein

** N.D.: Not detectable

*** Tr.: Trace

Fig. 1 Cell growth and Extracellular Protease Production of *S. sanguis* ATCC 10557

離により得られた上清画分を80%硫酸塩析により濃縮した。得られた試料を透析後、0.1M リン酸緩衝液 pH 7.2 で平衡化した Sephadex G-200のゲル濾過の結果を

Fig. 2 Sephadex G-200 Chromatogram of Extracellular Protease of *S. sanguis* ATCC 10557

Fig. 2 に示した。ボイドボリューム付近にプロテアーゼ活性が認められ、最も高い活性が得られたチューブでは蛋白比活性で約20倍上昇した。

活性の認められた画分を集め凍結乾燥により濃縮後、次の性質を検討した。

a) 至適 pH

0.05M クエン酸-0.1M リン酸緩衝液 (pH 5.0~

Fig. 3 Optimum pH of Extracellular Protease of *S. sanguis* ATCC 10557

- 0.05M Citrate-0.1M Phosphate buffer
- 0.1M Phosphate buffer
- ▲—▲ 0.1M Barbital buffer
- △---△ 0.1M Carbonate-Bicarbonate buffer

7.0), 0.1M リン酸緩衝液 (pH 6.0~8.0), 0.1M バルビタール緩衝液 (pH 7.0~9.0), 0.1M 炭酸-重炭酸緩衝液 (pH 9.5~10.5) を用い, サクシニルヘモグロビンを基質にして至適 pH を検討した。Fig. 3 に示すようにピークは1つで pH 6.5 に最も高い活性が認められた。

b) Time course と Enzyme concentration

酵素活性と反応時間との関係について検討したところ, Fig. 4-a に示す様に, 少なくとも検討した4時間まで活性と反応時間との間に直線性が認められた。

Table 2 Effect of Some Compounds containing Protease Compounds on the Partially Purified Enzyme

Compounds	Concentration	Relative Activity (%)
None		100
PMSF*	0.1mM	13
Soybean Trypsin Inhibitor	0.1mg/ml	109
PCMS**	1 mM	97
Iodoacetate	1	98
N-Ethylmaleimide	1	103
Dithiothreitol	1	111
L-Cysteine	1	118
2-Mercaptoethanol	1	98
DNME***	1	93
Pepstatin A	1μg/ml	96
o-Phenanthroline	1mM	104
EDTA	1	116

* Phenylmethane sulphonylfluoride

** *p*-Chloromercuriphenylsulfonic acid

*** Diazoacetylnorleucine methylester

次いで, 酵素活性と酵素濃度との関係について検討した。その結果を Fig. 4-b に示した。少なくとも1 unit まで活性と酵素濃度との間に直線性が認められた。以下の実験では, これらの条件を満たす範囲内で活性測定を行った。

c) 数種のプロテアーゼ阻害物質の影響

Fig. 4 Time Course and Enzyme Concentration of Protease of *S. sanguis* ATCC 10557

a) Time course b) Enzyme concentration

Table 3 Effect of Divalent Cations on the Protease Activity

Metal Salts	Relative Activity (%)
CdCl ₂	56
CoCl ₂	79
CuCl ₂	20
HgCl ₂	12
ZnCl ₂	44
FeCl ₂	68
FeCl ₃	91
MnCl ₂	93
MgCl ₂	100
CaCl ₂	106

* Concentration : 1mM

Table 4 Hydrolysis of Some Substrates by Extracellular Protease of *S. sanguis* ATCC 10557

Substrate	Concentration	Activity(unit/ml)
Succinylated Hemoglobin	0.5%	8.9
Bovine Serum Albumin	0.5	0.5
Porcine Submaxillary Mucin	0.1	0.3
Bovine Submaxillary Mucin	0.1	0.7
Gastric Mucin	0.1	0.7
P Z-peptide*	0.2mM	0.0

* *p*-phenylazobenzyloxycarbonyl-Pro-Leu-Gly-Pro-Arg

部分精製した *S. sanguis* ATCC 10557 株の培養上清画分プロテアーゼに及ぼす阻害物質の影響を Table 2 に示した。検討した阻害剤濃度では Phenylmethane sulphonylfluoride で強い活性阻害が見られた以外、顕著な変化は認められなかった。なお、Cysteine や 2-Mercaptoethanol による活性の賦活も認められなかった。

d) 金属イオンの影響

Table 3 は、数種の金属イオンが部分精製したプロテアーゼ活性にどのような影響を及ぼすかについて示した。1mM の濃度で Cu⁺ や Hg⁺ により強い活性阻害が見られ、Cd⁺ や Zn⁺ によっても阻害される傾向が認められた。

(4) *S. sanguis* ATCC 10557 の培養上清プロテアーゼの数種の基質に対する作用

数種の基質に対する部分精製プロテアーゼの作用を検討し、その結果を Table 4 に示した。サクシルヘモグロビンは本酵素に対し最も強い分解作用を受けるが、数種のムチンは抵抗性を示し、サクシニルヘモグロビンの

1/10 以下の活性を示すにとどまった。なお、合成基質である PZ-peptide は全く分解を受けなかった。

考 察

口腔内のプロテアーゼに関して Mäkinen は唾液中の多くのペプチターゼ活性は口腔細菌により産生されることが、Söder は歯垢中のプロテアーゼは菌由来であることなどを示唆している^{9,10)}。著者らが検索した口腔連鎖球菌ではほとんどの菌体細胞と一部の上清画分にプロテアーゼ活性が認められた。これらのことから、口腔内プロテアーゼの由来の一つとして口腔連鎖球菌のプロテアーゼが十分考えられる。

Cowman, Perrella and Fitzgerald¹²⁾ はカゼイン、グリコプロテインを基質として *S. mutans* のプロテアー

ゼをスクリーニングした結果から *S. mutans* には数種の異なったタイプのプロテアーゼが存在する可能性を示している。著者らの行ったサクシニルヘモグロビンを用いた検索では、Cowman らが活性を認めた *S. mutans* FA-1, 6715 株に活性を認めることができなかった。このことは基質親和性の異なる複数のプロテアーゼが存在する可能性を示唆している。

S. sanguis ATCC 10557 の培養上清で強い活性を示したプロテアーゼは、至適 pH を 6.5 にもつ中性プロテアーゼで、サクシニルヘモグロビンに対し基質親和性の強い蛋白分解酵素であることが明らかになった。また、触媒残基による特異性を調べるため種々の活性阻害剤や金属イオンの影響を調べたところ、チオールプロテアーゼ、酸性プロテアーゼ、金属プロテアーゼ等の阻害剤によっては全く影響を受けず、わずかにセリンプロテアーゼ阻害剤の一つである Phenylmethane sulphonylfluoride によって強い阻害が認められた。しかしながら、同様の阻害剤である Soybean trypsin inhibitor には影響を受けない。Barrett²³⁾ はプロテアーゼに関する総説の

中で、このような蛋白性のセリンプロテアーゼ阻害剤はほとんどのセリンプロテアーゼに対して阻害活性が認められるが、なかには阻害を受けない酵素が存在することを記述している。本酵素がセリンプロテアーゼである可能性が示唆されながらも、このことについて明らかにするためには、なお多くの追求が必要である。

本酵素はヘモグロビンの他、ブタ顎下腺ムチン、牛顎下腺ムチン、胃粘膜ムチンに対しても活性を示すが、ヘモグロビンに比べて活性が非常に弱いことから、口腔内での作用を考えると、ヒト唾液の糖蛋白に対する本酵素の親和性は強くないものと推測される。しかしながら、唾液ムチンや糖蛋白は動物種によって構造がかなり異なることから²⁴⁾、このことについては更に詳細な検討が必要と思われる。

本実験遂行に当り御協力いただいた一森雅美嬢に感謝します。

文 献

- 1) H. H. Chauncey: Salivary enzymes. *J. Amer. Dent. Assoc.*, 63: 360-368, 1961.
- 2) P. Ö. Söder, G. Lundblad and L. Lindqvist: Proteolytic activity of dental plaque material Part V. Purification of proteinases from dental plaque material by gel filtration through sephadex columns., *Acta Chem. Scand.* 20: 1504-1512, 1966.
- 3) I. Ishikawa, G. Cimasoni and C. Ahmad-Zadeh: Possible role of lysosomal enzymes in the pathogenesis of periodontitis: A study on cathepsin D in human gingival fluid., *Archs oral Biol.* 17: 111-117, 1972.
- 4) B. Gottlieb: "Dental Caries: Its etiology, pathology, clinical aspects and prophylaxis." Lea and Febiger, Philadelphia, Pennsylvania.
- 5) A. Schatz, K. E. Karlson, J. J. Martin and V. Schatz: The proteolysis-chelation theory of dental caries. Studies on the metabolism of oral proteolytic microflora., *Odont. Revy.* 8: 308-322, 1959.
- 6) Y. Kowashi. F. Jaccard and G. Cimasoni: Increase of free collagenase and neutral protease activities in the gingival crevice during experimental gingivitis in man., *Archs oral Biol.* 24: 645-650, 1979.
- 7) 中村正一: 歯周疾患と歯肉浸出液および唾液中の Protease 活性との関係について, 日歯周誌, 21: 429-434, 1979.
- 8) T. Watanabe, M. Shinmoto, K. Toda, M. Morishita and Y. Iwamoto: The relationship between calculus index and protease activity in saliva. *J. Dent. Res.* 59: 138, 1980.
- 9) K. K. Mäkinen: Studies on oral enzymes. I. Fractionation and characterization of aminopeptidases of human saliva. *Acta Odont. Scand.* 24: 579-604, 1966.
- 10) P. Söder: Proteolytic activity in the oral cavity: Proteolytic enzymes from human saliva and dental plaque material. *J. Dent. Res.* 51: 389-393, 1972.
- 11) M. Killian and K. Holmgren: Ecology and nature of immunoglobulin A1 protease producing Streptococci in the human oral cavity and pharynx. *Infect. Immun.* 31: 868-873, 1981.
- 12) R. S. Labib, N. J. Calvanico and T. B. Tomasi, Jr.: Studies on extracellular proteases of *Streptococcus sanguis*. Purification and characterization of a human IgA1 specific protease. *Biochem. Biophys. Acta*, 526: 547-559, 1978.
- 13) R. A. Cowman, M. M. Perrella and R. J. Fitzgerald: Caseinolytic and glycoprotein hydrolase activity of *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.* 55: 391-399, 1976.
- 14) G. Frostell, C. Nord and P. Söder: A study on proteolytic oral microorganisms. *Odont. Revy.* 24: 27-38, 1973.
- 15) E. Söderröding and K. U. Paunio: Conditions of production and properties of the collagenolytic enzymes by two *Bacillus* strains from dental plaque. *J. Periodont. Res.* 16: 513-523, 1981.
- 16) S. Fujimura and T. Nakamura: Isolation and characterization of proteases from *Bacteroides melaninogenicus*. *Infect. Immun.* 33: 738-742, 1981.
- 17) R. R. Omata and E. G. Hampp: Proteolytic activities of some oral Spirochaetes. *J. Dent. Res.* 40: 171-176, 1961.
- 18) G. R. Germaine and L. M. Tellefson: Effect of pH and human saliva on protease production by *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 31: 323-326, 1981.
- 19) C. Schwabe: A fluorescent assay for proteolytic enzymes. *Anal. Biochem.* 53: 484-490, 1973.
- 20) M. De Salegui and H. Plonska: Preparation and properties of porcine submaxillary mucines. *Archs. Biochem. Biophys.* 129: 49-56, 1969.
- 21) H. Esumi, S. Sato, T. Sugimura and N. Okasaki: Purification and properties of an acid protease from human ascitic fluid. *Biochem. Biophys. Acta*. 523: 191-197, 1978.
- 22) E. F. Hartree: Determination of protein:

A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal. Biochem.* 48 : 422-427, 1972.

- 23) A. J. Barrett: "Introduction to the history and classification of tissue proteinases" in pro-

teinases in mammalian cells and tissue. (A. J. Barrett ed.) pp. 1-55, North-Holland Publishing Company, New York.

- 24) 中村 亮, 常光 旭: 唾液のグロブリン. 国際歯科ジャーナル, 2 : 515-526, 1975.

Abstract: Extracellular protease activity of some oral streptococci. Kyoji TODA*, Makoto OTSUKA*, Yasuko ISHIKAWA*, Hideki NONAKA* and Ryo NAKAMURA*. Twenty seven strains of oral streptococci were examined for capacity of protease production, and some properties of extracellular protease from *S. sanguis* ATCC 10557 were studied.

The streptococcal strains were grown in brain-heart infusion broth at 37°C for 18 hr. The resulting cultures were separated by centrifugation into two fractions, i.e., the supernatant and the whole cells. Both fractions were searched for protease activity at three different pH, 4.0, 6.5, and 8.5, using succinylated hemoglobin as substrate. At both pH 6.5 and 8.5, the activity was found in many strains of cell fraction, and in only three strains of extracellular (culture supernatant) fraction. No protease activity was found at pH 4.0 in either fraction.

Extracellular fraction from *S. sanguis* ATCC 10557, which showed the highest activity, was concentrated by ammonium sulphate precipitation, and applied to a Sephadex G-200 gel column. Fractions which possessed protease activity were collected, and then frozen and dried. This sample was used for the determination of some properties of the protease. Optimum pH of the protease was 6.5, and the activity was strongly inhibited by phenylmethane sulphonylfluoride. This enzyme hydrolyzed succinylated hemoglobin specifically higher than the other substrates tested. The activity for mucin preparation was less than one tenth of the succinylated hemoglobin.