Streptococcus mutans の産生する 溶菌酵素に関する研究

IV *Streptococcus mutans* AL 7-1 株による溶菌酵素産生 のための chemically defined medium の調製

馬 場 久 衛 鎌 口 有 秀

東日本学園大学歯学部口腔細菌学教室（主任：秋貞泰輔教授）

〔受付：昭和59年6月4日〕

Studies on the lytic enzyme from *Streptococcus mutans*

IV Preparation of a chemically defined medium for the production of lytic enzyme from *Streptococcus mutans* AL7-1 strain

Hisae Baba and Arihide Kamaguchi

Department of Oral Microbiology, Higashi Nippon Gakuen University,
School of Dentistry, Tobetsu, Ishikarigun,
Hokkaido 061-02

(Chief: Prof. Taisuke Akisada)

〔Accepted for publication June 4, 1984〕

Key words: lytic enzyme / chemically defined medium / *Streptococcus mutans*

Abstract: Preparation of a chemically defined medium suitable for the production of lytic enzyme from *Streptococcus mutans* AL 7-1 strain was investigated. L-cysteine, vitamins and sodium carbonate, especially for this strain, were essential for the growth of this organism. In a synthetic medium containing twenty-one kinds of amino acids, glucose, vitamins and several kinds of salts, this strain was cultured to produce the lytic enzyme. Up to a given time, the amount of lytic enzyme activities increased following its growth as more glucose was added, but after this time, a decrease was seen brought about by a lowering of pH of the culture medium in accordance with the acid production of this organism. As a result of statistical examinations of the factors interacting on the amount of the lytic enzyme activities and its stabilities in the medium, the most suitable condition was seen when the initial pH of the medium containing 0.5 % of glucose and 0.08 mole of phosphates was 7.0, and the culture period was six hours. The preparations by fractionation on a Sephadex G 75 column of the lytic enzyme from a chemically defined medium were not contaminated with the components of the medium, and showed a value of approximately 1.9 times the protein contents and ten fold relative activities as compared with that of an organic medium.

緒 言

う蝕の発生に伴って、歯垢中の *Streptococcus*

北海道石狩郡当別町字金沢1757 (〒 061-02)

(以下 *Str.*) *sanguis* が減少し、*Str. mutans* が増加してくることが報告されている¹⁻⁷⁾。この変動に関与する因子の一つを検索する目的で、幼児の歯垢材料より *Str. sanguis* を溶解する菌株の分

離を試みた。その結果、小窩裂溝の菌垢材料より、*Str. sanguis* を溶解する菌株が多数分離された。諸性状の検査結果から、これらの *Str. sanguis* 溶解菌株はいずれも、同一菌種で、それは *Str. mutans* と同定された⁸⁾。さらに、これらの *Str. sanguis* 溶解菌株の溶菌作用は、菌体外に産生される溶菌酵素によることが判明した^{9,10)}。そこで、この *Str. mutans* の産生する溶菌酵素の諸性状を明らかにするため、その精製を種々試みてきたが、従来から用いている市販の Trypticase soy broth を主とする organic medium では、その複雑な培地成分のため、酵素の純化が極めて困難であった。

本報告では、この organic medium に含まれる複雑な培地成分の影響を避けるため、簡単な種々の既知成分よりなる chemically defined medium を作製し、これによる溶菌酵素の産生条件を種々検討した。その結果、良好な成績が得られたので報告する。

研究材料ならびに方法

1. 供試菌株

溶菌酵素産生用の菌株は第Ⅲ報¹⁰⁾で用いた *Str. mutans* AL 7-1 株を、溶菌酵素の基質用の菌株は *Str. sanguis* ATCC 10558 株をそれぞれ用いた。また、これらの菌株の保存には GAM 半流動培地（日水）を用いて6週間毎に継代する方法を用いた。

2. 溶菌酵素産生用培地

第Ⅲ報¹⁰⁾で用いた THY-M 培地より *Str. mutans* E-49 株の加熱菌体を除いた THY 培地 (Trypticase soy broth 21 g, Heart infusion broth 3 g, Yeast extract 3 g, K_2HPO_4 1.6 g, deionized water 1 l, pH 7.3) を使用した。また、カザミノ酸を含む partially defined medium (以下 PD 培地) は池田ら¹¹⁾の処方をもとに、種々の組成の培地を作製し、溶菌酵素産生のための培地成分の大まかな検討を行った。さらに chemically defined medium (以下 CD 培地) は、上記の PD 培地の、カザミノ酸を20種のアミノ酸に置きかえたものを基本とし、その組成の構成成分の数ができるだけ少く、かつ溶菌酵素の産生性が高い処方

の検討を行なった。培地類は全て 121°C 15 分間の高圧滅菌を行なって使用した。

3. 培養方法

Str. mutans AL 7-1 株を THY 培地に接種し、一夜培養したのち、遠沈により集菌した。これを同量の滅菌 phosphate buffered saline (以下 PBS) で2回洗浄したのち、同量の PBS に再浮遊した。これを種々の培地に1:20の割合で接種し培養した。培養は、混合ガス (N_2 : 70%, CO_2 : 15%, H_2 : 15%) と酸化パナジウムの触媒を用いた嫌気条件下で 37°C で行なった。

4. 菌の発育、培養上澄の pH および溶菌酵素活性の測定方法

上記の培養液を経時的に 10 ml/ ずつ採取し、菌の発育と培養上澄の pH および溶菌酵素活性をそれぞれ測定した。菌の発育は、培養液の OD 600 nm を測定して行なった。ついで、培養液を 3600 rpm 30分の遠沈を行ない、上澄の pH を pH メーター (TOA electric Co., Ltd. 製) で測定した。

さらに、この上澄を凍結乾燥後、これを 2.5 ml の M/15 phosphate buffer に溶解 (pH 6.5) し、この 1 ml を用いて上澄中の溶菌酵素活性を測定した。

5. 溶菌酵素の部分精製

Str. mutans AL 7-1 株の培養上澄を分子量1万のフィルターを用いて限界濾過濃縮し、これを Sephadex G75 column (size 2.6×90 cm) にかけて、 H_2O で溶出した。UV モニターにより OD 280nm を測定したのち、10 ml/ ずつに分画し、その 1 ml を用いて溶菌活性を測定した。

6. 溶菌酵素活性の測定方法

M/15 PB または、0.03M Tris-Maleate NaOH buffer (以下 TMB), (pH 6.5) に溶解した酵素溶液 1 ml に、*Str. sanguis* ATCC 10558 株の加熱菌体浮遊液 (OD 600nm: 1.20~1.25) 2 ml を加え、37°C で120分間反応させたのち、100°C 7分間の加熱処理をして反応を停止させ、その OD 600nm を測定した。あらかじめ、同様の加熱処理をした失活酵素反応液との OD の差 (ΔOD) を溶菌酵素活性量とした。また、単位の測定は第Ⅲ報¹⁰⁾と同じ方法により行なった。

Table 1 Composition of partially defined medium (PD-I, PD-1~4)

components	PD-I*	PD-1	PD-2	PD-3	PD-4
casamino acids	5g**	+	+	+	+
L-cysteine	0.2g	+	+	+	+
L-tryptophane	0.1g	+	+	+	+
L-alanine	0.1g	+	+	+	+
L-aspartic acid	0.3g	+	+	+	+
adenine	10mg	+	+	+	+
guanine	10mg	+	+	+	+
uracil	10mg	+	+	+	+
riboflavin	2mg	+	+	+	+
pyridoxin hydrochloride	2mg	+	+	+	+
nicotinic acid	2mg	+	+	+	+
calcium pantothenate	2mg	+	+	+	+
thiamine hydrochloride	1mg	+	+	+	+
folic acid	0.05mg	+	+	+	+
p-aminobenzoic acid	0.05mg	+	+	+	+
biotin	0.005mg	+	+	+	+
sodium acetate	10g	+	+	+	+
sodium carbonate	0.5g	+	+	+	+
ammonium chloride	3g	+	+	+	+
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g	+	+	+	+
MnSO ₄ ·H ₂ O	7.5mg	+	+	+	+
FeCl ₃	2mg	+	+	+	+
K ₂ HPO ₄	0.65g	3.5g	3.5g	3.5g	3.5g
KH ₂ PO ₄	0.50g	1.5g	1.5g	1.5g	1.5g
glucose	5g	1g	2g	3g	5g
pH	6.9	7.3	7.3	7.3	7.3

*: T. Ikeda et al., Infect. Immun. 19(2) : 477-480, 1978.

**: per liter

7. 溶菌酵素標品の蛋白質量の測定

溶菌酵素標品中の蛋白質含有量の測定は、Lowry-Folin 法¹²⁾により bovine serum albumin (Wako pure chemical Co., Ltd 製) 量に換算して求めた。

研究成績

1. PD 培地による溶菌酵素の産生

1) グルコースとリン酸塩濃度の影響

Table 1 に Ikeda ら¹¹⁾ の partially defined medium (以下 PD-I) と、PD-I のリン酸塩濃度を K₂HPO₄ を 0.65 g から 3.5 g, KH₂PO₄ を 0.50 g から 1.5 g と増量し、さらにグルコース濃度を 0.1% (PD-1), 0.2% (PD-2), 0.3% (PD-

3) および 0.5% (PD-4) とした処方を示した。

なお、各培地の initial pH はいずれも pH 7.3 に調製した。また Table 中の+の印は左側に示した成分と量の添加を、-は不添加を示す。これらの培地に *Str. mutans* AL 7-1 株を接種して、経時的にその発育と培地の pH および溶菌酵素活性を測定した結果を Fig. 1 に示した。菌の発育はグルコースの濃度に比例して増加し、培地の pH は逆に低下する傾向を示した。また、溶菌酵素活性は培養 6 時間までは菌の発育に比例して増加し、PD-4 と PD-I がほぼ等しく、ついで PD-3, PD-2, PD-1 の順に高い活性量を示した。しかし、培養時間が 8 時間以降では、PD-4 と PD-I は培地の pH の低下に伴い酵素活性量が

Fig. 1 Effect of the concentration of glucose and phosphates in PD medium on growth and lytic enzyme productivity of *Str. mutans* AL-7-1 strain, and pH of the culture

急激に低下した。これに対し、PD-3 は前2者に比べ発育量ならびに活性量ともにやや低い傾向を示したが、8時間の培養でも酵素活性量はわずかながら上昇傾向を示し、それ以後もゆるやかに下降する傾向を示した。このことから、PD-3 培地は溶菌酵素の採取に際して、培養時間に余裕があり、かつ比較的一定で高活性の溶菌酵素が得られることが判明した。

2) 培地成分の影響

PD-3 の処方では、カザミノ酸、グルコースおよび各種の無機塩以外の成分について、溶菌酵素産生に及ぼす影響を検討した。すなわち、Table 2 に示すように、L-システイン、その他の3種のアミノ酸、プリン、ピリミジン塩基類、ビタミン類、

酢酸ナトリウムおよび炭酸ナトリウムに群別し、これらの要素を一群ずつ欠いた PD-5~10 培地を作製し、これらの要素の菌の発育と溶菌酵素産生に及ぼす影響について検討した。

Fig. 2 はその結果で、PD-3 より L-システイン (PD-5, ▲)、ビタミン類 (PD-8, ■) および炭酸ナトリウム (PD-10, □) を除くと *Str. mutans* AL 7-1 株は、発育量ならびに溶菌酵素活性量ともに低く抑えられた。これに対して、L-アラニンを含む3種のアミノ酸 (PD-6, △) やプリン、ピリミジン塩基類 (PD-7, ○) を除いても菌の発育と酵素活性量は、PD-3 と同等であった。一方、酢酸ナトリウム (PD-9, ◎) は、無添加の方が菌の発育は PD-3 より良好であるが、培地の pH が培養4時間以後急激に低下するとともに、溶菌酵素活性量も急激に低下した。このことから酢酸ナトリウムは、産生された溶菌酵素の安定化に必要であると考えられた。

2. CD 培地による溶菌酵素の産生

1) CD-1 培地による溶菌酵素の産生

上記の PD-3 培地より、L-アラニン、L-トリプトファン、L-アスパラギン酸および、アデニン、グアニン、ウラシルの6成分を除いた PD-11 培地、ならびにこの PD-11 培地のカザミノ酸を20種のアミノ酸に置き換えた CD-1 培地を作製 (Table 3) し、両培地による菌の発育と溶菌酵素の産生性とを比較検討した、なお CD-1 培地のアミノ酸の添加量は、Terleckyj ら¹³⁾ の FMC 処方を参考にした。Fig. 3 はその結果で、菌の発育、溶菌活性量ともにほぼ同等であった。

2) グルコース量と培地の initial pH およびリン酸塩濃度の検討

以上の PD 培地での検討の結果、溶菌酵素の産生量は菌の増殖量に比例し、菌の増殖量はグルコース濃度と関連することが判明した。しかし培地中のグルコース濃度を上げると、*Str. mutans* AL 7-1 株によって産生される酸により、培地の pH が低下し、それが産生された酵素の安定性と関連する。また、培地の pH は initial pH および培養時間とも関係する。そこで、これらの関係を検討するため CD-1 培地のグルコース量 (B) と、リン酸塩濃度 (C) および培地の initial pH (D) の

Table 2 Composition of partially defined medium (PD-3, PD-5~10)

components	PD-3	PD-5	PD-6	PD-7	PD-8	PD-9	PD-10
casamino acids	5g*	+	+	+	+	+	+
L-cysteine	0.2g	—	+	+	+	+	+
L-tryptophane	0.1g	+	—	+	+	+	+
L-alanine	0.1g	+	—	+	+	+	+
L-aspartic acid	0.3g	+	—	+	+	+	+
adenine	10mg	+	+	—	+	+	+
guanine	10mg	+	+	—	+	+	+
uracil	10mg	+	+	—	+	+	+
riboflavine	2mg	+	+	+	—	+	+
pyridoxin hydrochloride	2mg	+	+	+	—	+	+
nicotinic acid	2mg	+	+	+	—	+	+
calcium pantothenate	2mg	+	+	+	—	+	+
thiamine hydrochloride	1mg	+	+	+	—	+	+
folic acid	0.05mg	+	+	+	—	+	+
p-aminobenzonic acid	0.05mg	+	+	+	—	+	+
biotin	0.005mg	+	+	+	—	+	+
sodium acetate	10g	+	+	+	+	—	+
sodium carbonate	0.5g	+	+	+	+	+	—
ammonium chloride	3g	+	+	+	+	+	+
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g	+	+	+	+	+	+
MnSO ₄ ·H ₂ O	7.5mg	+	+	+	+	+	+
FeCl ₃	2mg	+	+	+	+	+	+
K ₂ HPO ₄	3.5g	+	+	+	+	+	+
KH ₂ PO ₄	1.5g	+	+	+	+	+	+
glucose	3g	+	+	+	+	+	+
pH	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3	7.3

* : per liter

3 因子を Table 4 に示すように各々 3 水準とり、これを L₉ の直交配列に組み、欄外に培養時間 (A) を 3 水準とり、これら 4 因子の最適組み合わせを検討した。なお、B×C の交互作用は、有意でないことを予備実験により確認した。また、Table 4 の右欄の数値は 各々の組み合わせ実験により生じた溶菌酵素活性量で、OD 600nm の減少 (ΔOD) で示した。

Table 5 はその分散分析表で、 $\epsilon [e_1 + e_2 + (A \times B)]$ をプールした] で各因子を検定した結果、培養時間が 5 % の危険率で、グルコース量、initial pH およびリン酸塩濃度は、1 % の危険率でいずれも有意となった。Fig. 4 は各因子の 95 %

の信頼度での区間推定のグラフで、これよりグルコース量は 0.5 %、培地の initial pH は 7.0、リン酸塩濃度は 0.08 モルで、培養時間が 6 時間が本実験での最適組み合わせ (CD-2) で、その時の平均の溶菌活性量は ΔOD 0.177 でその推定範囲は ΔOD 0.150~0.204 であった。

Fig. 5 はその最適組み合わせ CD-2 培地での確認実験で、菌の発育は培養 6 時間で OD が 1.40 を示し、CD-1 の 1.10 に比べて約 1.3 倍発育量が増加し、また溶菌活性量は ΔOD 0.195 となり CD-1 の ΔOD 0.165 に比し約 1.2 倍増加した。

3. CD-2 と THY 培地により産生される溶菌酵素の活性の比較

Fig. 2 Effect of various components in PD medium on growth and lytic enzyme productivity of *Str. mutans* AL 7-1 strain, and pH of the culture

1) 菌の発育と溶菌酵素の産生

CD-2 と THY 培地を用いたときの *Str. mutans* AL 7-1 株の発育と溶菌酵素活性量との比較を Fig. 6 に示した。

培養時間 6 時間では、CD-2 培地の方が THY 培地に比べて、菌の増殖 (OD 600nm) で約 1.5 倍、溶菌酵素活性量で約 2.4 倍高い値を示した。

2) Sephadex G75 の分画画分の蛋白質含量と溶菌活性の比較

CD-2 培地と THY 培地を用いて得られた溶菌酵素を、Sephadex G75 column にかけて、H₂O で溶出し、UV モニターにより 280nm を測定したときのパターンを Fig. 7 に実線で示した。白丸 (○) の線は分画画分の溶菌酵素活性を、また黒丸 (●) の線は培地のみの OD 280nm の吸収パターンを示した。この結果、両培地とも void volume

に溶出する F1 画分のみに溶菌酵素活性がみられた。また、CD-2 培地のみの溶出パターンからは、溶菌酵素活性を示す F1 画分の位置に培地成分の存在は認められない。これに対し、THY 培地のみのパターンでは、F1 画分部位に培地成分によるピークが存在した。このことから、THY の F1 画分には培地成分による夾雑物の存在が明らかである。両培地の F1 画分を凍結乾燥し、蛋白質含量と溶菌酵素活性を測定した結果を Table 6 に示した。蛋白質含量は、bovin serum albumin 量に換算し%で示した。CD-2 培地の F1 画分の蛋白質量は 67.5% で、THY 培地の F1 画分のそれは 35 % を示し、前者は後者の約 1.9 倍高い値を示した。

さらに、溶菌活性は、THY F1 画分は mg 当り 0.8 単位と低く、これに対して CD-2 F1 画分は mg 当り 8 単位と高い活性を示し、酵素量当りで約 10 倍高い値を示した。

このことから、CD-2 培地を用いた方が THY 培地を用いた時より、夾雑物のない比較的高活性の溶菌酵素が得られることが判明した。

考 察

Str. mutans の産生する溶菌酵素について、その諸特性を明らかにするため、種々精製を試みてきた。しかし、市販の organic medium を用いているために、培地成分が共存する他の酵素類やタイコ酸などとともに、酵素の精製に影響し、純化が極めて困難であった。そこでまず、培地成分の影響を除去するために、既知の簡単な成分よりなる chemically defined medium の作製を試み、これによる溶菌酵素の産生を検討した。

まず、その前段階として Ikeda ら¹¹⁾ が *Str. mutans* 6715 株の発育に用いたカザミノ酸をベースとする partially defined medium (PD-I) による本菌での溶菌酵素の産生条件を調べた。その結果、PD-I 培地でも溶菌酵素は産生されることが判明した。しかし PD-I 培地による溶菌酵素の産生は、培養 6 時間までは急激に増加するが、それ以後は急激に活性が減少した。この現象は *Str. mutans* がグルコースから産生する酸によって、培地の pH が急激に低下するために酵素の安定

Table 3 Composition of partially defined medium-11 (PD-11) and chemically defined medium-1 (CD-1)

components	PD-11		CD-1
casamino acids	5g*	————→	glycine 0.2g
L-cysteine	0.2g	+	L-alanine 0.1g
riboflavine	2mg	+	L-valine 0.1g
pyridoxin hydrochloride	2mg	+	L-leucine 0.1g
nicotinic acid	2mg	+	L-isoleucine 0.1g
calcium pantothenate	2mg	+	L-serine 0.1g
thiamine hydrochloride	1mg	+	L-threonine 0.1g
folic acid	0.05mg	+	L-cystine 0.2g
p-aminobenzoic acid	0.05mg	+	L-methionine 0.1g
biotine	0.005mg	+	L-phenylalanine 0.1g
sodium acetate	10g	+	L-tyrosine 0.2g
sodium carbonate	0.5g	+	L-tryptophane 0.2g
ammonium chloride	3g	+	L-proline 0.2g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2g	+	L-hydroxyproline 0.2g
MnSO ₄ ·H ₂ O	7.5mg	+	L-aspartic acid 0.3g
FeCl ₃	2mg	+	L-glutamic acid 0.3g
K ₂ HPO ₄	3.5g	+	L-glutamine 5mg
KH ₂ PO ₄	1.5g	+	L-lysine 0.1g
glucose	3g	+	L-arginine 0.2g
			L-histidine 0.2g

* : per liter

pH 域⁹⁾ 以下になって酵素が失活することに起因すると考えられる。従って、高活性の酵素を得るためには、産生された酵素がある一定時間安定であることが必要である。そこで、産生された酸を中和するために、リン酸塩の濃度を 0.006 モルから 0.033 モルに上げ、そのときのグルコース濃度を 0.1 % ~ 0.5 % まで変え、それぞれの培地で産生された酵素が、ある一定時間比較的安定であるような条件を検討した。その結果、グルコース濃度が 0.3 % の時に酵素の活性量も高く、また、培養時間 6 時間から 8 時間までの間は比較的安定であることが判明した。

ついで、*Str. mutans* AL 7-1 株による溶菌酵素の産生において、PD-I 培地の各成分の酵素産生に及ぼす影響を調べた。その結果、カザミノ酸以外にさらに添加した 4 種のアミノ酸のうち、L-シスチンは *Str. mutans* AL 7-1 株においても必須のアミノ酸であるがそれ以外の 3 種のアミノ酸ならびにアデニン、グアニン、ウラシルの 3 種

の塩基類は無添加でも酵素産生に影響はないことが判明した。Carlsson¹⁴⁾ によれば、L-シスチンは、*Str. mutans* の発育には必須の栄養素であるとしている。Terleckyj¹⁵⁾ らもシスチンは培地の oxidation reduction potential を下げる成分としてよりも true nutritional requirement として必要であるとしている。その理由として、シスチンを L-アスコルビン酸に置き換えた場合、菌は発育できないが、S-S 型のシスチンの場合は発育可能であるとしている。また、ある一定量までのシスチンの添加は発育と並行することをあげている。

一方、酢酸ナトリウムは、無添加の方が発育が良好であった。Carlsson¹⁴⁾ らも同様の結果を報告しているが、無添加の場合、菌の発育は良好であるがそれとともに培地の pH の著しい低下が起こり溶菌活性が低下する。このことから、本実験では酢酸ナトリウムは酸に対する緩衝作用を行なっているものと考えられる。

Fig. 3 Growth and lytic enzyme productivity of *Str. mutans* AL 7-1 strain in PD-11 and CD-1 medium, and pH of the culture

Terleckyj¹⁵⁾ らによれば、CO₂ は緩衝能の増加と物質代謝における CO₂ の固定のために必要とされ、また、嫌気培養時にはガス状の CO₂ を利用するため、加えた Na₂CO₃ または NaHCO₃ は、発育とかアミノ酸要求性にほとんど影響しないとしている。しかし、本実験では、ガス状の CO₂ 存在下 (15%) で嫌気培養しているにもかかわらず、Na₂CO₃ を添加しない場合は、発育とそれに伴う溶菌酵素の産生に大きな影響がみられることから、*Str. mutans* AL 7-1 株では本物質が物質代謝に大いに関与しているものと思われる。

PD-3 培地のカザミノ酸を 20 種のアミノ酸に置き換えた完全な人工合成培地である CD-1 培地でも、*Str. mutans* AL 7-1 株は PD 培地と同様に発育し、かつ、溶菌酵素も産生した。一方、Fig.

2 の実験結果から溶菌酵素の産生量は、菌の発育に影響され、菌の発育は、培地中のグルコース量によって規制される。CD-1 培地でさらに高活性量の酵素を得るには、グルコースの増量が必要となるが、これは菌によって産生される酸の量を増加させ、これが培地の pH を低下させて、産生された酵素の安定性に影響を及ぼすと考えられる。そこで産生された酸の量に関するグルコース濃度、酸の中和に関するリン酸塩濃度、さらに培地の initial pH および培養時間の 4 因子を各々 3 水準ずつとって直交実験により溶菌酵素産生に最適な条件を検討した。その結果グルコースを 0.5 %、リン酸塩を 0.08 モルの濃度に添加し、initial pH を 7.0 にした培地で、培養時間が 6 時間のときに最大の溶菌酵素活性量が得ることがわかった。なお Handelman¹⁶⁾ らは、*Str. mutans* の発育と酸の産生との関係において、酸の中和能としてのリン酸塩濃度を検討しており、リン酸塩濃度は 0.1 モル以上になると菌の発育が抑えられると報告している。従って、本実験では、リン酸塩濃度の上限を 0.08 モルとした。この溶菌酵素産生に最適な CD-2 培地を用いて抽出した溶菌酵素は、THY 培地を用いた場合に比較して溶菌活性を示す F1 画分に培地成分の混入は認められず、蛋白質含量でも約 1.9 倍高い含有量を示し、さらに、酵素 mg 当りの活性値でも約 10 倍高い値を示した。このことから、簡単な既知成分よりなる CD-2 培地は、比較的酵素活性も高く、培地成分による夾雑物のない溶菌酵素標品が得られ、酵素の精製もより容易になるものと考えられる。

結 論

Str. mutans AL 7-1 株の産生する溶菌酵素の精製を容易にするため、既知成分よりなる chemically defined medium を作製し、これによる溶菌酵素の産生性を検討した。その結果

1. 本菌株の発育には、特にシスチン、ビタミン類および炭酸ナトリウムの添加を必要とした。これらの結果を基礎として考案した 21 種のアミノ酸、グルコース、ビタミン類および数種の無機塩類を含有する完全な chemically defined

Table 4 Effect of the concentration of glucose and phosphates, initial pH of medium and incubation time on lytic enzyme productivity of *Str. mutans* AL7-1 strain

factor	glucose	phosphates	initial pH	error	incubation time		
column	B	C	D	e ₁	4hr	A 6hr	8hr
No							
1	1	1	1	1	0.081*	0.120	0.187
2	1	2	2	2	0.175	0.210	0.047
3	1	3	3	3	0.062	0.053	0.034
4	2	1	2	3	0.145	0.190	0.177
5	2	2	3	1	0.048	0.138	0.074
6	2	3	1	2	0.141	0.072	0.023
7	3	1	3	2	0.009	0.011	0.034
8	3	2	1	3	0.074	0.050	0.041
9	3	3	2	1	0.071	0.040	0.013

B-1 : 1% glucose C-1 : 0.08 M phosphate buffer (KH₂PO₄, K₂HPO₄) D-1 : pH 7.5
B-2 : 0.5% glucose C-2 : 0.05 M phosphate buffer (KH₂PO₄, K₂HPO₄) D-2 : pH 7.0
B-3 : 0.1% glucose C-3 : 0.01 M phosphate buffer (KH₂PO₄, K₂HPO₄) D-3 : pH 6.0
* : lytic enzyme activities (ΔOD 600_{nm})

Table 5 Analysis of variance

Source	Sum of squares	df	Mean Square	F Ratio
Incubation time (A)	3762	2	1881	4.24*
Glucose (B)	30949	2	15474.5	34.91**
Phosphates (C)	12168	2	6084	13.72**
Initial pH (D)	20376	2	10188	22.98**
A × B	1918	4	479.5	1.08
A × C	13893	4	3473.3	7.84
A × D	6128	4	1532	3.46
e ₁	601	2	300.5	0.68
e ₂	1914	4	479	1.08
T	101322	26	3897	8.79
e' [e ₁ +e ₂ +(A×B)]	4433	10	443.3	

* : significant at 5 % level
** : significant at 1 % level

Interval lines represent 95% confidence limits

Fig. 4 Interval estimation graphs

Fig. 5 Confirmation test of optimum condition (CD-2) on lytic enzyme productivity

Fig. 6 Growth and lytic enzyme productivity of *Str. mutans* AL 7-1 strain in CD-2 and THY medium, and pH of the culture

Fig. 7 Elution pattern of lytic enzyme preparations from THY and CD-2 medium and of medium only by gel filtration on Sephadex G-75, and lytic activity of each fraction

Table 6 Protein content and lytic activity of F1 fraction of CD-2 and THY medium

	CD-2	THY
protein content*	67.5%	35.0%
lytic activity**	8units/mg	0.8units/mg

* : calculated the amount of bovin serum albumine

** : units per mg of lytic enzyme preparation from F1 fraction

medium において、高活性の溶菌酵素が産生されることが確認できた。

2. 本合成培地で得られた溶菌酵素を Sephadex G75 を用いて分画したものは、従来の organic medium を用いて得られたものと比較して、培地成分の混入はなく、蛋白質量で1.9倍、活性で10倍高かった。このことにより酵素の精製もより容易になるものと考えられる。

抄録：幼児の歯垢より分離した *Str. mutans* AL 7-1 株の産生する溶菌酵素の精製を容易にするため、既知成分によって構成される chemically defined medium を作製し、これによる溶菌酵素の産生性を検討した。その結果、本菌株の発育においても他の *Str. mutans* 株と同様に L- システムならびにビタミン類が必須であり、また、本菌株では特に炭酸ナトリウムの添加を必要とした。これらの結果を基礎として考案した21種のアミノ酸、グルコース、ビタミン類および数種の無機塩類を含有させた完全な chemically defined medium においても、本菌株は溶菌酵素を産生することが確認された。また、本 medium において溶菌酵素活性量はグルコースの増量に伴って増加するが、菌の増殖に伴って産生される酸のために酵素が次第に不安定となることがわかった。そこで、特に産生される酵素の活性量とその安定性とに関係する因子について、その最適組合せを直交実験によって検討した結果、グルコースを0.5%、リン酸塩を0.08モルの濃度に添加し、initial pH を7.0に調整した培地で、6時間培養したときに最も高い酵素活性量が得られることがわかった。さらに、本 medium で得られた酵素を Sephadex G75 を用いて分画したものは、従来の org-

anic medium を用いて得られたものに比較して、培地成分の混入はなく、蛋白質量で1.9倍、活性で10倍高いことが判明した。

文 献

- 1) De Stoppelaar, J. D., van Houte, J. and Dirks, O. B.: The Relationship between Extracellular polysaccharide-producing Streptococci and Smooth surface Caries in 13-years-old Children. *Caries Res.* **3** : 190-199, 1969.
- 2) Littleton, N. W., Kakehashi, S. and Fitzgerald, R.: Recovery of specific "caries inducing" streptococci from caries lesions in the teeth of children. *Archs. Oral Biol.* **15** : 461-463, 1970.
- 3) Shklair, I. L., Keene, H. J. and Simoson, L. G.: Distribution and frequency of *Streptococcus mutans* in caries active individuals. *J. Dent. Res.* **51** : 882, 1972.
- 4) 弓削朝子, 馬場久衛, 加藤敬子, 宮脇映子: 乳歯環状う蝕と歯垢中のレンサ球菌との関連性に関する研究, 口病誌 **41** : 59-68, 1974.
- 5) 富田芳巳: 人歯垢より分離した *Streptococcus mutans* 溶解菌ならびに各種レンサ球菌の分布とう蝕との関連性に関する研究. 神奈川歯学 **14** : 87-130, 1979.
- 6) 城 映雪, 富田芳巳, 馬場久衛, 弓削朝子, 大曲靖夫: 乳幼児期における歯垢中の各種レンサ球菌の変動とう蝕発生との関連性について. 歯基礎誌 **19** : 370, 1977.
- 7) 五十嵐清治: フッ化ジアミン銀 [Ag (NH₃)₂ F] の細菌学的研究—Ag (NH₃)₂F の局所塗布におけるブラーク中の *Str. mutans* の変動と抗菌効果について—小児歯科学誌 **16** : 1-18, 1978.
- 8) 馬場久衛, 五十嵐清治: *Streptococcus mutans* の産生する溶菌酵素に関する研究 I *Streptococcus sanguis* 溶解菌株の分離とその諸性状. 歯基礎誌 **25** : 932-946, 1983.
- 9) 馬場久衛, 鎌口有秀, 金森啓子: *Streptococcus mutans* の産生する溶菌酵素に関する研究. II 溶菌酵素の特性と酵素産生に及ぼす諸因子. 歯基礎誌 **25** : 947-955, 1983.
- 10) 馬場久衛, 鎌口有秀, 田中かえで, 高野一雄: *Streptococcus mutans* の産生する溶菌酵素に関する研究 III 粗溶菌酵素の各種レンサ球菌種に対する溶解性, 歯基礎誌 **26** : 185-194, 1984.
- 11) Ikeda, T., Shiota, T., Mcgee, J. R., Otake, S., Michalek, S. M., Ochiai, K., Hirasawa, M. and Sugimoto, K.: Virulence of *Streptococcus mutans*: Comparison of the effects of a coupling sugar and sucrose on certain metabolic activities and cariogenicity. *Infect. Immun.* **19** : 477-480, 1978.
- 12) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** : 265-275, 1951.
- 13) Terleckyj, B., Willet, N. P. and Shockman, G. D.: Growth of several cariogenic strains of oral streptococci in a chemically defined medium. *Infect. Immun.* **11** : 649-655, 1975.
- 14) Carlsson, J.: Nutritional requirements of *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* **4** : 305-320, 1970.
- 15) Terleckyj, B. and Shockman, G. D.: Amino acid requirements of *Streptococcus mutans* and other oral streptococci. *Infect. Immun.* **11** : 656-664, 1975.
- 16) Handelman, S. L. and Kreinices, G. H.: Effect of phosphate and pH on *Streptococcus mutans* acid production and growth. *J. Dent. Res.* **52** : 651-657, 1973.