Streptococcus mutans g 型菌に dextranase は存在するか

九州歯科大学口腔衛生学講座 (主任: 故佐伯榮一教授, 竹原直道助教授)

花 田 信 弘・竹 原 直 道
中 山 浩太郎・佐 伯 榮 一

昭和60年12月20日受付

Streptococcus mutans Serotype g Secrete DextranaseNobuhiro Hanada, Tadamichi Takehara,
Kohtaro Nakayama and Eiichi SaekiDepartment of Preventive Dentistry (Director: The late prof.
Eiichi Saeki, Associate prof. Tadamichi Takehara)
Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

An extracellular dextranase has been detected and isolated from *Streptococcus mutans* AHT (serotype g). Dextranase was partially purified from the culture supernatant of *S. mutans* AHT by precipitation with ammonium sulfate, chromatography on DEAE-cellulose. DEAE-cellulose column chromatography permitted the removal of a large proportion of the extracellular glucosyltransferases. But glucosyltransferase isozyme (pI 4.2) remained with the dextranase solution.

Dextranase activity in DEAE-cellulose fraction was detected by method of agar plate containing DT2000 and newly method of polyacrylamide gel electrophoresis containing Blue dextran.

The remaining glucosyltransferase isozyme (pI 4.2) in DEAE-cellulose fraction was attempted to separate from dextranase by filtration on Ultrogel AcA34, fast protein liquid chromatography (FPLC, Mono Q column). But we could not completely separate glucosyltransferase isozyme (pI 4.2) from dextranase.

Key words: *Streptococcus mutans*/Dextranase/Glucosyltransferase/
Glucan/Dental caries

緒 言

dextranase (EC 3.2.1.11) の産生はカビで最も多く知られているが放線菌, 細菌でも見られる。う蝕原性細菌である *Streptococcus mutans* も菌体外に dextranase を産生する。 *S. mutans* の dextranase は同菌の glucosyltransferases が sucrose より産生するグルカン (dextran) を分解し, 自らの炭素源として利用す

るばかりでなく, glucosyltransferases が産生するグルカンの分枝構造の決定, ひいてはう蝕原性の発現に積極的役割を果している可能性が考えられる¹⁾。

Staat and Schachtele (1974)²⁾, Donkersloot and Harr (1979)³⁾ および当教室の児島 (1981)⁴⁾ は, dextran を誘導基質として含む培地を用いて dextranase 活性を検出する方法により, *S. mutans* の各血清型に属する菌株の dextranase 産生能を調べた。児島 (19

81)⁴⁾は、*S. mutans* *g*型菌(6715および K1-R 株)には構成酵素として dextranase 活性が存在することを明らかにした。このなかで Staat and Schachtele (1974)²⁾が dextranase 活性を検出できなかった AHT 株においても dextranase が存在することをはじめて報告した。ところが最近 *g*型菌(6715株)に dextranase が存在しないという報告⁵⁾が見られる。我々は *S. mutans* AHT 株を用いてグルカン合成のメカニズムを解明しようとしているが、その一環として、この株に Dextranase が存在することを再び確認するとともにその部分精製を試みたので報告する。

実験材料ならびに方法

I. 菌株と培地

井上昌一教授(鹿児島大学予防歯科学教室)より分与された *S. mutans* AHT-k 株(血清型 *g*)⁶⁾を、培地には trypticase, tryptose, yeast extract を主成分とする Hamada ら(1978)⁷⁾の TTY 培地を用いた。

II. 培養

前培養した *S. mutans* AHT-k 株を上記 TTY 培地 100 μ l に接種し、テーパー式アナエロ・ボックス ANB-1 型(平沢製作所, 東京)で N₂, 80%; H₂, 10%; CO₂, 10%混合ガスにより 37°C, 18時間嫌気培養した。

III. dextranase の精製法

S. mutans AHT-k 株の 100 μ l 培養液を遠心(7,000 $\times g$, 20分間)し、その遠心上清をトーヨー 101(東洋濾紙, 東京)でろ紙ろ過した。ろ液に50%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、一夜塩析した後、遠心(11,000 $\times g$, 60分間)した。沈渣を 20mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)に溶解し、同緩衝液に対し一夜透析し、粗 dextranase 標品を得た。粗酵素標品から以下の方法により dextranase を部分精製した。

なお、操作は生体高分子用高速液体クロマトグラフィー(FPLC)を除き、すべて 4°C で行った。

A. DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィー

20mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)に平衡化した DEAE-cellulose, DE 52(Whatman, UK)を充填した工業用クロマトカラム(9 $\times$ 36cm)に酵素液を添加、吸着させた。カラムを 280nm の吸光度での吸収がなくなるまで同緩衝液で十分洗った後、0 から 0.4M の NaCl/20mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.5) 6,000ml によって直線的にグラジエント溶出した。活性画分を集め、アミコン PM 10(Amicon Co., Danvers, MA, U.S.A.)で濃縮し、これを DEAE-cellulose 画分と

した。

B. Ultrogel AcA 34 ゲルろ過

Ultrogel AcA 34(LKB, Bromma, Sweden)のゲルろ過カラム(1.6 $\times$ 100cm)に DEAE-cellulose 画分を添加し、0.02% NaN₃を含む 50mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)で溶出した。流速は 25ml/時、分画容量は 5 ml/管であった。dextranase 活性画分を集め、アミコン PM 10で濃縮し、Ultrogel AcA 34 画分とした。

C. 生体高分子用高速液体クロマトグラフィー(FPLC)

20mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.5)で平衡化した FPLC 用 Mono Q カラム(Pharmacia, Uppsala, Sweden)に Ultrogel AcA 34 画分を添加し、同緩衝液で十分洗った後、0 から 0.4M の NaCl/20mM トリス塩酸緩衝液(pH 7.5) 40ml で直線的にグラジエント溶出した。dextranase 活性画分を集め、ミリポア Immersible CX-30(Millipore Co., Bedford, MA, U.S.A.)で濃縮後、50mM 酢酸緩衝液(pH 6.0)に対して透析し、これを FPLC 画分とした。

IV. 酵素活性の測定法

A. dextranase 活性

dextranase 活性の検出は DT 2000(Pharmacia)の分解活性を指標とした。すなわち 0.5mg/ml の DT 2000 を含む 0.1M 酢酸緩衝液(pH 6.0)中に適量の酵素液を加えたものを反応液とし、37°C, 18時間反応させ、100°C, 15分間加熱して反応を停止させた。反応前後の遊離還元基量を glucose を標準として Park and Johnson(1949)⁸⁾の方法で測定し、増加した遊離還元基量をもって dextranase 活性とした。dextranase 活性の単位は、上記反応系において、1時間に 1 nmole の glucose に相当する還元基を遊離させる酵素量を 1 単位(unit)とした。

B. glucosyltransferases 活性

glucosyltransferases 活性はグルカン合成活性として表わした。すなわち、5%の sucrose を含む 0.1M 酢酸緩衝液(pH 6.0)中に適量の酵素液を加えたものを反応液とし、37°C, 18時間反応させ、この反応液に70%になるように ethanol を加え、-20°C 以下に4時間以上静置後、遠心(1,500 $\times g$, 30分間)した。再度同様の操作を行った後、沈渣に反応液と同量の 1M NaOH を加えて、回収した多糖類を glucose を標準として Halhoul and Kleinberg(1972)⁹⁾のアンスロン法で定量し、合成されたグルカン量をもって glucosyltransfer-

ases 活性とした. glucosyltransferases 活性の単位は上記反応液において1時間に1 μ mole の glucose に相当するグルカンを合成する酵素量を1単位 (unit) とした.

V. 寒天平板法による dextranase 活性の検出

寒天平板上で肉眼的に dextranase 活性を観察するため, 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 存在下に調整した 0.5% の DT 2000 を含む寒天平板上に穿孔したウェルに DEAE-cellulose 画分を添加し, 37°C, 24時間反応させた後, ethanol を平板上に添加し, 4~5時間後に出現するウェル周囲の透明帯の有無により dextranase 活性を検出した. 対照として, 100°C, 10分間の熱処理をほどこした酵素液を同じ寒天平板上の別のウェルに添加した.

VI. 電気泳動による dextranase 活性の検出

0.13% Blue dextran を含む7.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) を行った. DEAE-cellulose 画分を添加し 1.5mA/管の定電流で4時間泳動後 0.1M 酢酸緩衝液 (pH 5.5) 中にゲルを入れ 37°C, 数時間反応させ, Blue dextran の青色の消失を観察した.

VII. 分子量の測定

dextranase の分子量は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用分子量 マーカー, MW-Marker (HPLC), (オリエンタル酵母, 東京) を標準として, TSK-gel G 3000 SW (東洋曹達, 東京) による HPLC で測定した. すなわち, 50 μ l の酵素液を添加し, 0.1M NaCl, 0.02% NaN₃ を含む 50mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) で溶出した. 流速は 1 ml/min, 分画容量は 1 ml/管であった. dextranase の溶出位置は分取したフラクション中の酵素活性を測定することにより決定した. 分子量マーカー蛋白は 280nm での蛋白質吸収ピークで検出した.

結 果

I. dextranase 部分精製

S. mutans AHT-k株 (血清型 g) の培養上清中には dextranase と glucosyltransferases が混在している¹⁰⁾. その硫酸塩析画分を DEAE-cellulose カラムにかけ, 0~0.4M の NaCl でグラジエント溶出すると, 4つの glucosyltransferases 画分が分離溶出してくる. このうち最後に溶出してくる glucosyltransferase イソ酵素 (pI 4.2) 画分¹⁰⁾ に dextranase が混在している. この画分をプールして, 限外ろ過濃縮し, Ultrogel AcA 34 を用いてゲルろ過を行った. 溶出してきた dextranase 活性画分を濃縮後, FPLC (Mono Q) により

Fig. 1 Chromatography of dextranase on Mono Q column.

高速液体クロマトグラフィーを行った (Fig. 1). dextranase は, この精製操作でも glucosyltransferase イソ酵素 (pI 4.2) と完全に分離することができなかった.

II. dextranase 活性の確認

A. 寒天平板法

DEAE-cellulose 画分中に dextranase 活性が存在するかどうかを確認するため, DT 2000を含む寒天平板を用いる児島の方法⁴⁾を行った. すなわち, Fig. 2に示すように粗酵素を添加したウェル周囲に出現した6 mm幅の透明帯は dextranase によって DT 2000の 1, 6- α グルコシド結合が切断され低分子化したため, DT 2000 の ethanol 沈殿操作によっても沈殿せず, 寒天平板が白濁しなかった. これに対して対照として用いた,

Fig. 2 Detection of dextranase activity by the method of agar plate containing DT 2000.

C: Inactivated dextranase (100°C, 10 min)

E: Active dextranase

100°C, 10分間の熱処理をほどこした酵素液を加えたウェルの周囲は, 約3 mm幅の小さい透明帯しか出現しなかった。

B. 電気泳動

Blue dextran を含む 7.5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によると Fig. 3 に示すように, dextranase 活性は一つのシャープなバンドともう一つの幅広いバンドの二つに分かれて認められた。

Ⅲ. dextranase の分子量

TSK-gel G 3000 SW カラムを用いた HPLC によって分子量は約18万と推察された (Fig. 4)。

Fig. 3 Detection of dextranase activity by Blue dextran-PAGE.

↑ : dextranase activity

Fig. 4 Estimation of the molecular weight of dextranase by gel filtration on TSK-gel G3000SW column.

考 察

S. mutans のう蝕原性の発現はこの菌が菌体外に産生する glucosyltransferases がスクロース存在下に合成するグルカンの性状により規定される。著者らは既に *S. mutans* AHT 株 (血清型 g) の glucosyltransferases には各々性状の異なる 4 種のイソ酵素が存在する

ことを示した¹⁰⁾。う蝕原性をもつ粘着性非水溶性グルカンは, これらのイソ酵素の複雑な組合せにより合成される。 *S. mutans* は glucosyltransferases と共に菌体外に dextranase を産生し, この dextranase は *S. mutans* のグルカンの構造に影響を及ぼしているものと推測される。実際, Ebisu, *et al.* (1974)¹¹⁾, Koga and Inoue (1979)¹²⁾ は, 外来の dextranase の存在が *S. mutans* のグルカンの構造に影響を及ぼすことを詳細に研究し報告している。しかし, *S. mutans* 自らが産生する dextranase は彼らが用いた市販の dextranase よりもはるかに酵素活性が低いため, グルカンの性状に変化を及ぼすほどの影響を持つかどうかは現在のところ不明である。

Shimamura ら (1982)¹³⁾ は, *S. mutans* 6715株43ℓ の培養上清から等電点 4.1 の glucosyltransferases を精製した。この酵素が合成したグルカンをメチル化分析したところ高度 (35%) な分枝構造をもつ 1, 6- α -D-グルカンであった。しかしこの研究では dextranase 活性を測定しておらず, 分枝合成活性が glucosyltransferases によるものか dextranase が関与したものかが明確ではない。Shimamura らが分離した酵素は, 著者らが DEAE-cellulose で分離した dextranase 活性を含む等電点 4.2 の glucosyltransferase と同じものと考えられる。この DEAE-cellulose 画分から dextranase の分離, 精製を試みたが Ultrogel AcA 34 を用いたゲルろ過, Mono Q カラムを用いたイオン交換クロマトグラフィー (Fig. 1) によっても dextranase と glucosyltransferase イソ酵素 (pI 4.2) とを完全に分離することはできなかった。glucosyltransferase イソ酵素 (pI 4.2) が 1, 3, 6- α 分枝合成活性を持つのか, あるいはこの分枝構造がこの酵素に混在する dextranase の作用によるものかはさらに検討する必要がある。

さて, g 型菌の 6715 株には dextranase 活性が存在しないという報告⁵⁾があった。そこで, DEAE-cellulose 画分を用いて dextranase 活性を確認したところ, Fig. 2 に示すように dextranase 活性は確かに存在していた。

また, Blue dextran が dextranase の作用をうけて青色を消失するという現象を応用して, 電気泳動後の活性染色に用いる方法を行った。0.13% の Blue dextran を含む 7.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) 後, ゲルをインキュベートすると dextranase 活性は一つのシャープなバンドともう一つの幅広いバン

ドの二つに分かれて認められた (Fig. 3)。

なお、TSK-gel G 3000 SW カラム (東洋曹達) を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によって dextranase の分子量は約18万と推察された (Fig. 4)。これは dextranase が glucosyltransferase イソ酵素 (pI 4.2) と等電点、分子量ともに類似していることを示し、ゲルろ過あるいはイオン交換クロマトグラフィーという従来の方法では、この二つの酵素を完全に分離させることは困難と思われる。しかし、この dextranase の単離なくしては glucosyltransferases によるグルカン合成のメカニズムを解明することはできない。新たな手法によりこの二酵素の分離を追求すべきである。

結 論

S. mutans の培養上清中に dextranase 活性が存在しないという報告があるため、dextranase の存在を再確認するとともに glucosyltransferase イソ酵素 (pI 4.2) との分離を行なう目的で以下の実験を行った。寒天平板による児島の方法及び Blue dextran と電気泳動法を組合せた新しい方法により酵素活性の確認を行い

S. mutans AHT 株が菌体外に dextranase を産生することを確認した。

また、S. mutans AHT 株の4つの glucosyltransferase イソ酵素のうち DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーで最後に溶出する glucosyltransferase イソ酵素 (pI 4.2) 画分に dextranase が混在していた。この dextranase を Ultrogel AcA 34のゲルろ過、FPLC (Mono Q) で精製したが、glucosyltransferase イソ酵素 (pI 4.2) とは完全に分離することができなかった。

謝 辞

Blue dextran 電気泳動法を御教示戴きました大杉利幸博士に感謝します。

本論文の要旨は、昭和59年10月12日第33回日本口腔衛生学会総会 (神戸) において発表した。

本論文の投稿直前に当講座の主任教授、佐伯榮一先生が急逝されました。ここに慎んでご冥福をお祈り申し上げます。

引 用 文 献

- 1) 古賀敏比古: *Streptococcus mutans* のグルカン合成の抑制—おもにグルカナーゼについて。う蝕と歯周病—研究の進歩 (浜田茂幸編)。日歯評論, 東京, 1982, Vol. 2: 69—108.
- 2) Staat, R.H. and Schachtele, C.F.: Evaluation of dextranase production by the cariogenic bacterium *Streptococcus mutans*, *Infect. Immun.* 9: 467—469, 1974.
- 3) Donkersloot, J.A. and Harr, R.J.: More sensitive test agar for detection of dextranase producing oral streptococci and identification of two glucan synthesis-defective dextranase mutants of *Streptococcus mutans* 6715, *J. Clin. Microbiol.* 10: 919—922, 1979.
- 4) 児島正明: *Streptococcus mutans* が菌体外に産生する dextranase に関する研究, 九州歯会誌 35: 543—555, 1981.
- 5) 藤原 卓・岡橋暢夫・竹内 叶・古田拓司・古賀敏比古・浜田茂幸: グルコシルオリゴ糖と *Streptococcus mutans*, 日歯評論, 498: 161—171, 1984.
- 6) Hamada, S., Masuda, N. and Kotani, S.: Demonstration of serotype d and g specificities of *Streptococcus mutans* by immunodiffusion, *Archs. oral Biol.* 23: 495—499, 1978.
- 7) Hamada, S. and Torii, M.: Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surface, *Infect. Immun.* 20: 592—599, 1978.
- 8) Park, J.T. and Johnson, M.J.: A submicro determination of glucose, *J. Biol. Chem.* 181: 149—151, 1949.
- 9) Halhoul, M.N. and Kleinberg, I.: Defferential determination of glucose and fructose and glucose- and fructose-yielding substances with anthrone, *Anal. Biochem.* 50: 337—343, 1972.

- 10) Takehara, T., Hanada, N. and Saeki, E. : Interaction of glucosyltransferase isozymes on glucan synthesis by *Streptococcus mutans* AHT (serotype *g*), *Microbios Lett.* 27 : 113—120, 1984.
- 11) Ebisu, S., Misaki, A., Kato, K. and Kotani, S. : The structure of cariogenic *Streptococcus mutans*, formed in the absence and presence of dextranase, *Carbohydr. Res.* 38 : 374—381, 1974.
- 12) Koga, T. and Inoue, M. : Effects of dextranases on cell adherence, glucan-film formation and glucan synthesis by *Streptococcus mutans* glucosyltransferase, *Arch. oral Biol.* 24 : 191—198, 1979.
- 13) Shimamura, A., Tsumori, H. and Mukasa, H. : Purification and properties of *Streptococcus mutans* extracellular glucosyltransferase. *Biochim. Biophys. Acta* 702 : 72—80, 1982.