Streptococcus mutans g 型菌の 1,3- α -D-glucan synthase

による水溶性グルカンの非水溶化機構

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)

伊東美幸・花田信弘・竹原直道・佐伯榮一

昭和60年12月25日受付

Analytical Study of the Conversion of Water-Soluble Glucan into Water-Insoluble Glucan by 1,3- α -D-Glucan Synthase from *Streptococcus mutans* (Serotype g)

Miyuki Itoh, Nobuhiro Hanada, Tadamichi Takehara and Eiichi Saeki

Department of Preventive Dentistry (Chief: The Late Prof. Eiichi Saeki and Associate Prof. Tadamichi Takehara)

Insolubilization mechanism of water-soluble glucan was studied. 1,3- α -D-glucan synthase solution containing primer dextran (DT 2000) and sucrose was incubated at 37 °C. Water-insoluble glucan was synthesized by 1,3- α -D-glucan synthase. At the same time, water-soluble glucan, mainly derived from DT 2000, decreased with time. Linkage analysis of glucan of this reaction mixture was made by periodate oxidation and Smith degradation. Periodate oxidation of glucan showed that 1,3- α -D-glucoside linkages increased with time.

High molecular weight primer dextran was insolubilized by 1,3- α -D-glucan synthase more completely than low molecular weight dextran.

The data strongly suggest a water-insoluble glucan having linear 1,6- α -linkages, with random 1,3- α -branches.

Key words : Glucan/1,3- α -D-glucan synthase/Periodate oxidation

結 言

Streptococcus mutans の glucosyltransferases が sucrose 存在下に合成する非水溶性グルカン (IG) は同菌の歯牙表面への付着, 歯苔形成に重要な役割をはたしている. 更にこの IG は歯苔中の酸の拡散バリアーとしても働いており, 酸による歯牙の脱灰を誘発させる¹⁾.

この IG の構造の分析はこれまでに多くの研究者により報告がなされており, 一般に 1,3- α 結合したグルコー

ス残基よりなる直鎖が骨格構造部 (主鎖) を形成し, これを構成するグルコース残基の一部の 6 位の炭素から 1,6- α 結合した側鎖が分枝した構造をとるものとされている^{2,3)}. しかし, 従来の研究の多くは, 粗酵素反応系を用いたものであり, 反応は複雑で多くの因子が存在し解析を困難にしていた.

我々はこの IG 合成のメカニズムを解明するため, 部分精製をした非水溶性グルカン合成酵素 (1,3- α -D-glucan synthase) とプライマーとして市販のデキストラ

ンを加えたより簡単なモデル実験系を用い、水溶性グルカン (SG) の非水溶化の仕組みを明らかにしようと試みた。

材料および方法

I. 菌株ならびに培地

S. mutans AHT-k 株 (血清型 *g*)⁴⁾ は井上昌一教授 (鹿児島大学予防歯科学教室) より分与された。培地は Trypticase, tryptose, yeast extract を主成分とする Hamada ら (1978)⁵⁾ の TTY 培地を用いた。

II. glucosyltransferase 活性の測定

A. 全グルカン合成活性

5% sucrose, 5 mM NaF 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時間反応させた。この反応液に70%になるようにエタノールを加え、-20°C以下に4時間以上静置後遠心 (1,500×*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 1 M NaOH を加え、回収した多糖類を、glucose を標準として Halhoul and Kleinberg (1972)⁶⁾ のアンスロン法で定量した。産生されたグルカン量をもって全グルカン合成活性とした。

B. IG 合成活性

5 mg/ml の DT10 (Pharmacia) を含む 5% sucrose, 5 mM NaF, 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時間反応させた。反応液に蒸留水を加えて遠心 (1,500×*g*, 30分間) し、再度同様の操作を行い、IG を洗浄した後、沈渣に反応液と同量の 1 M NaOH を加えて回収した多糖類を溶解し、アンスロン法で IG を定量した。

III. 1,3- α -D-glucan synthase の調製

S. mutans AHT-k 株の100 μ l 培養液を遠心 (7,000×*g*, 20分間) して菌体を除去したのち、50%飽和硫酸塩析を行った。沈渣を 20mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) に溶解し、同緩衝液に対して透析して DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーを行った。4つの全グルカン合成活性ピーク⁷⁾のうち IG を合成するピーク部分のフラクションを集めて濃縮、脱塩し、再度 DEAE-cellulose カラムに添加、溶出した。IG 合成活性画分を集めて濃縮、脱塩して 1,3- α -D-glucan synthase 画分とした。

IV. グルカンの合成

5% sucrose, 1,3- α -D-glucan synthase およびプライマーとして各種デキストラン (Pharmacia) を含む反応液を 37°C で反応させた。遠心して沈渣を IG とし、

上清を70%エタノール沈殿により回収して SG とした。グルカンはアンスロン法により測定した。

V. グルカンの結合分析

上記反応液を 37°C で一定時間反応させた後、70%エタノール沈殿により回収した全グルカン (IG と SG を含む) を過ヨウ素酸酸化後、スミス分解^{8,9)} した。分解物は Shimadzu SCR-101 N カラムを高速液体クロマトグラフ (LC-3 A, 島津) に接続したものをを用いて定量した。

結 果

図1に 1,3- α -D-glucan synthase と sucrose 更にプライマーデキストランとして DT 2000 (Pharmacia) を加えた反応系による IG 合成量の経時的増加と SG の減少を示す。反応0分における SG はほとんどプライマーとして加えた DT 2000 である。反応0分における IG は遠心操作中に反応が進行したものである。反応45分後

図1 グルカン量の経時的変化

DT 2000存在下、1,3- α -D-glucan synthase による sucrose からのグルカンの合成。

○ : SG, ● : IG, △ : TG (SG+IG)

には大部分のプライマーは非水溶化して IG となっている。

図1と同じ反応系の反応液を一定時間 37°C で反応させた後、エタノール沈殿により回収した全グルカンのグルコシド結合様式を調べた。1,3- α -グルコシド結合と、

図2 全グルカン中のグルコシド結合量の経時的変化

全グルカン中の 1,6- α 結合グルコース残基と 1,3- α 結合グルコース残基の量.

- : 1,3- α 結合グルコース残基
- : 1,6- α 結合グルコース残基

1,6- α -グルコシド結合量の経時的増加を図2に示す. 1,6- α -グルコシド結合の増加に比べて 1,3- α -グルコシド結合量の増加率が大きく反応開始後150分では 1,3- α -グルコシド結合量は開始時の12.3倍になっているのに対し, 1,6- α -グルコシド結合は1.7倍になっているにすぎない.

図3は分子量の異なる各種の市販デキストランをプラ

図3 デキストランの分子量と非水溶化の関係
反応液の遠心上清に残存するプライマーデキストランの量.

酵素濃度: 反応液中の酵素濃度は図1の実験時の $\frac{1}{2}$ である.

イマーとして 1,3- α -D-glucan synthase, sucrose と 12時間反応させたときの遠心上清中の残存 SG 量を示すものであるが, この条件下では高分子量のデキストランほど, 非水溶化されやすい.

考 察

S. mutans の glucosyltransferases によって合成される IG は SG に比べて 1,3- α -グルコシド結合量が低い¹⁰⁾ことから, 一般に IG 合成酵素は 1,3- α -D-glucan synthase であると考えられている. さて Ebisu ら (1974)¹¹⁾ および Hare ら (1978)¹²⁾ は, IG の骨格構造部 (主鎖) が直鎖の 1,3- α -D-グルカンであると報告している. 一方著者らは 1,3- α -D-glucan synthase を高度に精製したが, 同酵素はプライマーとしての 1,6- α -D-グルカン非存在下では全くグルカンを合成しないことが明らかになった (未発表). これに反して, 1,6- α -D-glucan synthase (pI 5.8) はプライマーグルカンを必要としない¹³⁾. このため, *in vivo* においても, プライマー非要求性でかつ高分子の 1,6- α -D-グルカンを合成する 1,6- α -D-glucan synthase (pI 5.8) がまず長大な 1,6- α -D-グルカンの合成を開始し, これにプライマー要求性の 1,3- α -D-glucan synthase がとりつき, 1,3- α -D-グルカンの側鎖を形成し始めると考えたほうが妥当だと思われる. この考えは, 1,3- α -D-glucan synthase に対する特異抗血清を用いた著者らの実験¹⁴⁾でも傍証を得ることができた. すなわち *S. mutans* AHT 株の glucosyltransferases の粗酵素は, sucrose 存在下にグルカンを合成するが, この大部分は IG で SG は少ない. ところが 1,3- α -D-glucan synthase の抗血清を反応液中加入すると IG 合成は抑制され, グルカンは3種類の水溶性グルカン合成酵素によって合成された SG となる. しかも抗血清量を増加させることによって 1,3- α -D-glucan synthase の酵素活性を抑制すればするほど IG が減少し, それに伴って SG 量が増加する. 最終的には抗血清を含まない反応液で合成される IG の74%に相当するグルカンが, 抗血清によって非水溶化から解放され SG に変換したことになる. このことから 1,3- α -D-glucan synthase は非水溶性グルカン合成酵素というよりも, SG の非水溶化酵素であると考えられる. 実際, 本実験のように短時間で且つ外部から長い直鎖の 1,6- α -D-グルカン (DT 2000) のプライマーを加える反応系では, プライマーとして加えた DT 2000が一旦分解し, IG の骨格構造をなす 1,3- α -グルコシド結合の主鎖に転移して 1,6- α -D-グルカン

の側鎖を形成するとは考えにくく, DT 2000に1,3- α -グルコシド結合の分枝, ないし側鎖が転移したと考える方がわかりやすい. すくなくともプライマー外挿型の短時間反応系では, IG の骨格構造部(主鎖)は1,6- α -D-グルカンであろう.

結 論

SG(デキストラン)が非水溶化する仕組みを, より簡単なプライマー外挿型の短時間反応によるモデル実験系を用いて, 明らかにしようと試みた.

プライマーデキストランとして DT 2000 を加えた, 1,3- α -D-glucan synthase と sucrose の反応液を37°Cで反応させると, IG 合成量は経時的に増加する.

それに伴って SG は減少する.

この反応系での全グルカンのグルコシド結合様式を調べると, 1,3- α -グルコシド結合が経時的に増加していることがわかった.

本実験条件下では, プライマーデキストランの分子量が大きいほどより完全に非水溶化する.

以上のことから, すくなくともプライマー外挿型の短時間反応系では, IG の骨格構造部(主鎖)は, 1,3- α -D-グルカンでなく1,6- α -D-グルカンであると推定された.

本論文の要旨は, 昭和60年10月19日第34回日本口腔衛生学会総会において発表した.

引 用 文 献

- 1) Takehara, T., Itoh, M., Hanada, N. and Saeki, E.: pH change in artificial dental plaque formed by glucosyltransferase and some oral bacteria during batch and continuous culture. *J. Dent. Res.* **64**: 447—449, 1985.
- 2) Hamada, S. and Slade, H.D.: Biology, Immunology, and Cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.* **44**: 331—384, 1980.
- 3) 井上昌一: 口腔レンサ球菌の産生する菌体外多糖類の化学構造と微細形態. 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: 31—68.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Halhoul, M.N. and Kleinberg, I.: Differential determination of glucose and fructose, and glucose- and fructose- yielding substances with anthrone. *Anal. Biochem.* **50**: 337—343, 1972.
- 7) 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.
- 8) Hamilton, J.K. and Smith, F.: Reduction of periodate oxidation of carbohydrate. II. A new method for the end-group assay of amylopectin. *J. Am. Chem. Soc.* **78**: 5907—5909, 1956.
- 9) Takehara, T. and Inoue, M.: Inhibitory effects of endo- α -1,3-glucanase on glucan film formation and glucan synthesis by the glucosyltransferase of the oral bacterium *Streptococcus mutans*. *Archs oral Biol.* **26**: 217—222, 1981.
- 10) Guggenheim, B.: Enzymatic hydrolysis and structure of water-insoluble glucan produced by glucosyltransferases from a strain of *Streptococcus mutans*. *Helv. Odontol. Acta* **14**: 89—108, 1970.
- 11) Ebisu, S., Misaki, A., Kato, K. and Kotani, S.: The structure of water-insoluble glucans of cariogenic *Streptococcus mutans*, formed in the absence and presence of dextranase. *Carbohydr. Res.* **38**: 374—381, 1974.

- 12) Hare, M.D., Svensson, S. and Walker, G.J. : Characterization of the extracellular, water-insoluble α -D-glucans of oral streptococci by methylation analysis, and by enzymic synthesis and degradation. *Carbohydr. Res.* **66** : 245—264, 1978.
- 13) 花田信弘 : *Streptococcus mutans* AHT 株 (血清型 *g*) の水溶性グルカン合成酵素の精製ならびに性状に関する研究. 九州歯会誌 **38** : 1072—1084, 1984.
- 14) 竹原直道・伊東美幸・花田信弘・佐伯榮一 : *Streptococcus mutans* AHT 株 (血清型 *g*) のグルコシルトランスフェラーゼイソ酵素 (pI 5.1) 抗血清による酵素活性の阻害効果. 口腔衛生会誌 **35** : 174—175, 1985.