Streptococcus sobrinus の 1,3- α -D-glucan synthase による 1,3,6分岐構造の形成に関する研究

九州歯科大学口腔衛生学講座 (指導: 竹原直道教授)

西 原 正 治

平成元年 8 月24日受付

Formation of 1, 3, 6 Glucoside Linkage by 1, 3- α -D-Glucan Synthase from *Streptococcus sobrinus*

Masaharu Nishihara

Department of Preventive Dentistry (Director: Prof. Tadamichi Takehara)
Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

1, 3- α -D-Glucan synthase from *Streptococcus sobrinus* synthesizes water-insoluble glucan in the presence of a sucrose as a substrate and 1, 6- α -D-glucan as an acceptor. On the other hand, in the presence of an acceptor, the enzyme shows only sucrose hydrolysis activity and fails to synthesize any glucan. In this study, relationship between the enzyme and an acceptor during insolubilization of an acceptor was examined.

Preincubation of the enzyme with dextran T10 in the absence of a sucrose showed delayed migration in polyacrylamide gel electrophoresis and produced a white band of water-insoluble glucan which corresponded with a protein band with incubation in the reaction buffer, even in the absence of an acceptor. These results indicate that the covalent binding between the enzyme and an acceptor occurs irreversibly at first step of the insolubilization of the acceptor.

Total glucans in the reaction mixture of the enzyme were harvested by ethanol precipitation at 15, 30, 60, 120 and 240 min after initiation of reaction. These obtained glucans were methylated, degraded, and then evaluated by gas chromatography (GC) and gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). On the basis of the GC and GC/MS analysis described above, while ratio of 2, 4, 6-tri-O-methyl-D-glucose to 2, 4-di-O-methyl-D-glucose increased in accord with increment of the reaction time, ratio of 2, 3, 4-tri-O-methyl-D-glucose, which means branch residue, did not increase. That is, with increment of the reaction time, number of 1, 3- α -D-glucoside linkage increase and number of 1, 3, 6- α -D-glucoside linkage did not change. These findings indicate that elongation of a side chain of 1, 3- α -D-glucoside linkage is achieved by the sole enzyme.

Upon the facts in this study, in *S. sobrinus*, the following mechanism of synthesis of water-insoluble glucan was supposed. At first, water-soluble glucan synthases provide an acceptor for 1, 3- α -D-glucan synthase. Second, 1, 3- α -D-glucan synthase irreversibly binds with the acceptor and produces 1, 3, 6- α -D-glucoside residue as branch residue.

Finally, the enzyme elongates unique side chain of the acceptor and the acceptor becomes water-insoluble glucan.

Key words : *Streptococcus sobrinus* / 1, 3- α -D-glucan synthase / Glucan

緒 言

我が国において口腔の二大疾患の一つである齲蝕は、一方で乳歯齲蝕の減少が指摘されながらも全体としては増加の一途をたどっている^{1,2)}。したがって齲蝕の予防は、社会的にもきわめて今日的課題であり、あらゆる手段を講じてその実現に力をそそぐことは、歯科医療関係者の重要な責務である。すべて疾患の予防は、臨床的すなわち対症的に行われることが優先するのはもちろんであるが、最も有効な予防手段は、その病因論に基づくことによって、はじめて効率的かつ正確なものになるであろう。すなわち齲蝕の病因の解明は、その予防の為に必要不可欠である。

齲蝕ならびに歯周疾患は歯垢 (dental plaque) によってひきおこされることはよく知られている^{3,4)}。歯垢は齲蝕や歯周疾患の病原細菌を含んでいる。これまで齲蝕の原因菌として *Streptococcus mutans* と称されてきた一連の齲蝕原性連鎖球菌群は、最近必ずしも同一の菌種としてまとめられるものではなく、*S. cricetus*, *S. downei*, *S. ferus*, *S. macacae*, *S. mutans*, *S. rattus*, *S. sobrinus* の7つの subspecies に分類すべきであるという考え方が示された⁵⁾。現在ではこれらの連鎖球菌群は *mutans streptococci* と総称されている。*mutans streptococci* のうちヒトの齲蝕にかかわりを持つものは、事実上 *S. mutans* と *S. sobrinus* の二種に限られる。したがってヒトにおいて発生する齲蝕は、*S. mutans* によってひきおこされるM型感染、*S. sobrinus* によってひきおこされるS型感染およびこれら両菌の混合による混合型感染 (MS型感染) の3つの感染パターンに大別される。これらの *mutans streptococci* によっておこる齲蝕の病原性に、菌体外酵素である glucosyltransferase (GTase) が最も重要な役割をはたしていることは良く知られている⁶⁻¹⁰⁾。*mutans streptococci* の GTase が sucrose より合成する非水溶性 glucan (IG) は、1,3- α -結合した glucan の直鎖が主鎖を形成し、これに1,6- α -結合した glucose 残基の側鎖が分岐するという説^{11,12)}や、1,6- α -結合と1,3- α -結合が混在した樹状構造をとるという説¹³⁾が一般的であった。IG 合成のメカニズムを明らかにするためには、

粗酵素に含まれる GTase を各々単離精製し、この精製酵素を用いて再構成する必要がある。*S. mutans* の GTase の精製は極めて困難であって、この菌の GTase の酵素学的解明は難しい。そこでこの菌では組み換え DNA 実験による GTase 遺伝子のクローニングを行うことによって GTase の同定を行うことが試みられてきた¹⁴⁻¹⁸⁾。一方、*S. sobrinus* については酵素学的アプローチが主に追及されている。すなわち、*S. sobrinus* は1種類の1,3- α -D-glucan synthase と3種類の1,6- α -D-glucan synthase を分泌する¹⁹⁻²⁴⁾。*S. sobrinus* の1,3- α -D-glucan synthase は sucrose を基質として1,6- α -D-glucan synthase 群の産生する、あるいは外挿された1,6- α -D-glucan を acceptor として、これらの C-3 の位置に1,3- α -D-glucoside 結合の分岐を形成し、その分岐から1,3- α -D-glucoside 鎖を伸長させるのではないかと考えられる^{25,26)}。ちなみにこの1,3- α -D-glucan synthase は1,6- α -D-glucan が存在しないと1,3- α -D-glucan の合成を行えない。

本論文では以上の推定をより明確にし、骨格構造である外挿型の acceptor, すなわち1,6- α -D-glucan に対する1,3,6分岐の形成と、1,3- α -D-glucoside 結合の側鎖の伸長のメカニズムを明らかにする。

材 料 と 方 法

I. 菌株ならびに培地

S. sobrinus AHT-k 株は井上昌一教授 (鹿児島大学予防歯科学教室) より分与された²⁷⁾。

培地は trypticase, tryptose, yeast extract を主成分とする Hamada ら (1978) の TTY 培地²⁸⁾を用い、37°C, 18時間嫌気培養した。1ℓあたりの TTY 培地の組成は、trypticase (BBL, Cockeysville, MD, U.S.A.), 15g; tryptose (Difco Lab., Detroit, MI, U.S.A.), 4g; yeast extract (BBL), 4g; K₂HPO₄, 2g; KH₂PO₄, 5g; NaCO₃, 2g; NaCl, 2g; glucose, 10g である。

II. glucan 合成と分画

glucan 合成活性は産生された全 glucan 量で表わした。すなわち0.72mg/ml DT2000および5% sucrose,

5mM NaF を含む0.1M 酢酸緩衝液 (pH 6.0) に 1,3- α -D-glucan synthase を加えた反応液を、37°C で反応させ、15, 30, 60, 120および240分後に合成された全 glucan を70%になるようエタノールを加え、-20°C 以下で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、沈査に反応液と同量の 1MNaOH を加え、回収した glucan を glucose を標準として Halhoul and Kleinberg (1972) のアンスロン法²⁹⁾で定量した。

別に上記と同じ反応液を 37°C で、それぞれ 15, 30, 60, 120および240分間反応させ合成された全 glucan を 70%エタノール沈澱法で回収した。得られた glucan は 2 回洗浄した後、蒸留水に懸濁して超音波処理し、凍結乾燥した。

Ⅲ. 1,3- α -D-glucan synthase の精製

精製酵素は次のようにして得た。すなわち前培養した *S. sobrinus* AHT-k 株を TTY 培地 100l に接種し、テハー型アナエロボックス 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。この後の操作は FPLC (Pharmacia) を除き、すべて 4°C で行った。培養液を遠心 (7,000×g, 20分間) して菌体を除去したのち、50%硫酸アンモニウムで一夜塩析し、これを粗酵素標品とした。この粗酵素標品を DEAE-cellulose (DE 52, Whatman) カラムに添加、溶出させ、4つの全 glucan 合成活性ピークのうち IG を合成するピークのフラクションを集めて濃縮、脱塩した。これをさらに DEAE-cellulose, Bio-gel A-5m, Octyl-Sepharose CL-4B, FPLC (Mono Q カラム), TSK-gel G 3000 SW および TSK-gel phenyl 5PW カラムクロマトグラフィーによって、高度に精製した 1,3- α -D-glucan synthase を得た²³⁾。得られた精製酵素はポリアクリルアミドゲルディスク, SDS-ポリアクリルアミドゲルおよび等電点のいずれの電気泳動においても、単一蛋白であることを確認した。この精製酵素は -20°C で凍結保存した。なお、この標品は acceptor としての 1,6- α -D-glucan 非存在下では glucan を合成しない。

Ⅳ. 精製 1,3- α -D-glucan synthase の acceptor との前処理および処理酵素のポリアクリルアミドゲル電気泳動

精製 1,3- α -D-glucan synthase を 1mg/ml の DT 10 を含む 50mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) 中で 25°C 30分間前処理を行った後、5mM トリス/グリシン緩衝液 (pH 8.0) で透析を行った。透析後の酵素は二分し、そ

れぞれを 7.5% ポリアクリルアミドゲルに添加して、4°C, 4mA 定電流の条件で 3時間電気泳動を行った。電気泳動後、一方のゲルは Coomassie brilliant blue R-250 で蛋白染色を行い、他方のゲルは活性染色を行い、ゲル中の 1,3- α -D-glucan synthase 活性を白色のバンドとして検出した。活性染色には 100mM の sucrose および 5mM NaF を含む 100mM 酢酸緩衝液 (pH 6.0) を用い、この反応液中でゲルを 37°C で 4時間反応させた。acceptor と前処理を行わなかった精製酵素について上記と同様の操作を行いそれぞれのコントロールとした。

Ⅴ. IG のメチル化

メチル化は Hakomori (1964) が記載した方法³⁰⁾を参考にした。真空下で十分乾燥した IG 0.5—2.0mg に 0.5ml の脱水ジメチルスルホキシドを加え、超音波処理 (28kHz/sec, 10秒間) した。窒素ガスで置換した後、ジメチルスルホキシド 2N に調整したカルバニオン 0.5ml を加え、室温で 4時間攪拌した。氷冷下で 0.5ml のヨウ化メチルを滴下し、さらに 2時間攪拌した後蒸留水に対して透析した。その後透析膜内液を減圧濃縮し、クロロホルムで抽出した。上記操作を再び行いメチル化多糖を得た。

得られたメチル化多糖の純度は赤外吸収スペクトル分析装置 (Beckman, Fullerton, U.S.A.) で確認した。

メチル化多糖の加水分解は Yakushiji ら (1984) の方法³¹⁾に従った。メチル化多糖は 0.5ml のギ酸と 100°C, 6時間加熱後減圧濃縮して酸を除去し、さらに 0.5ml の 2M トリフルオロ酢酸で 100°C, 6時間処理し濃縮した。このメチル化単糖の水溶液に過剰の水素化ホウ素ナトリウムを加えて一夜還元した。残存する水素化ホウ素ナトリウムを H⁺型の Amberlite IR 120 B (Rohm and Haas Co., Philadelphia, U.S.A.) で分解し、濃縮乾固を繰り返してホウ酸を除去した。ピリジン-無水酢酸混液 (1:1) を加えて 30°C, 一夜処理してアセチル化した後、減圧濃縮を繰り返して部分メチル化アルジトールアセテートを得た。

これを少量のクロロホルムに溶かしてガスクロマトグラフ (GC) およびガスクロマトグラフ質量分析計 (GC/MS) で分析した。

Ⅵ. IGの部分メチル化アルジトールアセテートの GC および GC/MS による分析

GC による分析は薬師寺 (1983) の方法³²⁾によった。分析に用いた装置は島津 GC-14A で、各ピークは相対

保持時間から同定し, Guggenheim (1970) の記載³³⁾を参考にして定量値を求めた.

GC/MS による分析に用いた装置は, 島津 GCMS-QP 1000 四重極形ガスクロマトグラフ質量分析計 (EI/CI) で, ガスクロマトグラフ GC-9A (島津製作所, 京都) に接続して使用した. 0.3% の OV-275 と 0.4% の GEXF-1150 を塗布した Uniport HP (80-100メッシュ; ガスクロ工業, 東京) の充填カラムを用いた. 流速 25ml/分のヘリウムをキャリアガスとして, 1°C/分の割合で 120°C から 180°C までの昇温分析を行った. 試料気化室温度, セパレーター温度は 250°C とした. マススペクトル条件は電子衝撃型イオン化で, イオン化電圧 70eV, イオン化電流 60 μ A, イオン源温度 250°C であり, 質量範囲 m/z 40-250 までのマススペクトルから部分メチル化アルジトールアセテートの同定を行った.

結 果

図 1 に sucrose 非存在下で, acceptor としての DT10 を加えて前反応させた精製 1,3- α -D-glucan synthase の電気泳動パターンを示す. 前反応させなかった酵素は coomassie brilliant blue で着色された単一のタンパクバンドとして泳動しているのがわかる (図 1-A). この酵素は acceptor なしで 37°C over night,

図 1 acceptor との前処理が精製 1,3- α -D-glucan synthase の電気泳動パターンに及ぼす影響.

A, B: タンパク染色, C, D: 活性染色
A, C: 未処理, B, D: acceptor 前処理.

100mM sucrose と反応させてもホワイトバンドとして検出される IG を生成しなかった (図 1-C). 一方 acceptor としての DT 10 を加えて前反応させた酵素は電気泳動によってあまり移動していない (図 1-B). これに sucrose をくわえて上記と同様に反応させると, タンパクバンドと一致した位置に IG のホワイトバンドが生成された (図 1-D). この結果は, 酵素と acceptor の結合は sucrose 非存在下においても発生していることを示唆している.

図 2 に 1,3- α -D-glucan synthase と sucrose および acceptor としての DT 2000 (0.72mg/ml) を加えた反応系において, 15, 30, 60, 120 および 240 分後に合成され 70% エタノール沈澱法により回収された全 glucan の量を示す.

図 2 1,3- α -D-glucan synthase による全 glucan 合成の経時的変化.

反応開始後 60 分までは全 glucan 量は急激に増加し, その後 120, 240 分後では頭打ちの状態になった.

表 1 に, 0 分から各時間反応させた後にエタノール沈澱により得られた全 glucan をメチル化し GC および GC/MS で分析した結果を示す. 時間の経過に伴って, 1,3- α -グルコシド結合の割合は増加しているが, 1,6- α -グルコシド結合, 非還元末端および 1,3- α -結合と 1,6- α -結合の分岐部の割合は減少していた.

このデータは主に GC で測定し, GC/MS のデータで補正した. GC/MS ではマススペクトル分析も行い, 得られた各ピークの同定も行った. ちなみに GC および GC/MS のピークの比率に大差は認められなかった.

表 1 の結果から各々の glucose 残基の数を計算する

表1 経時的に回収された全 glucan のメチル化分析

反応時間 (分)	O-メチル-D-グルコース (mol %)			
	2,3,4,6- テトラ-	2,4,6- トリ-	2,3,4- トリ-	2,4- ジ-
15	1.7	52.1	44.3	1.9
30	1.3	67.8	29.5	1.4
60	1.1	73.3	24.4	1.2
120	1.4	75.0	22.5	1.1
240	1.2	76.2	21.5	1.1

表2 メチル化分析より得られた acceptor 上の 1,3,6分岐部の間隔(m)と1,3側鎖の長さ(n)の経時的变化

反応時間(分)	m	n
15	23.3	27.4
30	21.0	48.4
60	20.3	61.1
120	20.5	68.2
240	19.5	69.3

$$m = \frac{2,4\text{-ジ-} + 2,3,4\text{-トリ-}}{2,4\text{-ジ-}} - 1, \quad n = \frac{2,4,6\text{-トリ-}}{2,4\text{-ジ-}}$$

図3 1,3-α-D-glucan synthase により合成された IG の推定構造。

と表2が示される。表2の結果を既に Hanada ら (1986)²⁵⁾ および安東 (1987)²⁶⁾ によって示された 1,3-α-D-glucan synthase と acceptor としての 1,6-α-D-glucan により合成される glucan の推定構造 (図3) を念頭におきながら図示すると、図4のごとくなる。図3における 1,6-α-結合は acceptor として外挿された

図4 acceptor 上の1,3,6分岐部の間隔と1,3側鎖の長さの経時的变化。

■ ; 1,3,6分岐部の間隔(m)
 ▨ ; 1,3側鎖の長さ(n)。

DT 2000のことであり、1,3-α-結合は、1,3-α-D-glucan synthase によって新たに合成された glucan を示している。すなわち acceptor 存在下で合成される glucan は、主鎖の 1,6-α-D-glucan 上の 1,3,6分岐部の間隔(m)は反応時間が異なる glucan においてはほぼ不変であるのに対し、側鎖の 1,3-α-D-glucan の長さ(n)は経時的に増加することが示された。ただし反応開始120, 240分後では 1,3-α-D-glucan の伸長は頭打ちになっており、これは図2に示した全 glucan 合成量の経時的变化と一致していた。

考 察

mutans 連鎖球菌群は、a-hの8種類の血清型に分類されてきた。しかし今日では主にその生化学的特性によって7つのグループに分けることが提唱されている。すなわち *S. cricetus* (血清型 a), *S. downei* (血清型 h), *S. ferus* (血清型 c), *S. macacae* (血清型 c), *S. mutans* (血清型 c, e と f), *S. rattus* (血清型 b), *S. sobrinus* (血清型 d, g または h) である。このうちヒトの齲蝕原因菌とみなされるのは事実上、*S. mutans* と *S. sobrinus* である。これら2種の菌が菌体外に産生する GTase は、その数や特性が、酵素学的にも免疫学的にも異なっている。*S. mutans* および *S. sobrinus* がどの程度口腔内から分離されるかについては諸説があるが、日本人の場合、その検出頻度は *S.*

mutans で 25—90% であり, *S. sobrinus* は 30—45% であるという³⁴⁻³⁶⁾. 諸外国の例でも *S. mutans* が *S. sobrinus* より検出頻度が高く, *S. mutans* の方が *S. sobrinus* より重要であるとする考え方もある. しかし, 象牙質齲蝕からは *S. sobrinus* の方の検出頻度が高いとする報告³⁷⁾もあり, どちらの菌がより齲蝕病原性が高いかは明らかではない. 現時点では *S. sobrinus* の齲蝕原性に対する重要度は否定できないであろう.

さてこの *S. sobrinus* の 4 種の菌体外 GTase は, 互いの共同作用により, sucrose から glucan を合成する²⁰⁾. これらの glucan は水に不溶性であり, *S. sobrinus* 菌体を歯牙表面へしっかりと固定, 定着させるばかりでなく, 他の口腔内細菌をも取り込んで glucan 接着による歯垢を形成する⁶⁾. この glucan は歯垢の形成のみならず, *S. sobrinus* 菌体および他の口腔内細菌によって産生された酸 (主に乳酸) の拡散バリアーとして働く³⁸⁾. したがって *S. sobrinus* が産生する IG はこの菌の病原性にとって最も重要である.

mutans streptococci の glucan の性状および化学構造を明らかにする試みがこれまでに数多くなされてきた³⁹⁻⁴¹⁾. Hare ら (1978)¹³⁾によると, *S. sobrinus* OMZ 176 株の菌体外の粗 GTase が合成した IG は, 1,6 結合と 1,3 結合が複雑に混在しているという.

Ebisu ら (1974)¹¹⁾は同じ菌株の IG の化学分析から, 1,3- α -結合を主鎖とし, 1,6- α -結合の側鎖が分岐するという構造を推定している. Shibata ら (1983)¹²⁾も, ある種の連鎖球菌の Glucan の構造を分析し, 1,3 結合の主鎖に 1,6- α -結合の側鎖が分岐した構造をとると述べている.

それに対して Fukui ら (1982)⁴²⁾は *S. sobrinus* の glucosyltransferase を精製し, acceptor としての DT10 の glucose 残基の C-3 位に glucose を転移させて分岐部を作り, そこから 1,3- α -結合を伸長させるという仮説を示した.

しかし最近でも Davis ら (1986)^{43,44)}は, *S. sobrinus* の D-glucosyltransferase (1,3- α -D-glucan synthase と思われる) が産生する IG を, 1,3- α -D-glucan が主鎖をなし 1,6- α -D-glucan の側鎖が分岐するという構造を持つと推定している. その推定構造は参考のため図 5 に示しておいた. この結果は, Fukui ら⁴²⁾, Hanada ら²⁵⁾の推定と真っ向から対立するものとなっている. したがって 1,6- α -D-glucan が主鎖か, 1,3- α -D-glucan が主鎖かということに限ってみても結論が下された訳ではないといえる.

図5 DAVIS ら^{43,44)}による IG の推定構造.

さて安東 (1987)²⁶⁾は, 著者と同じ精製 1,3- α -D-glucan synthase を用いて, acceptor としての 1,6- α -D-glucan が非水溶化するメカニズムを研究した. その結果, 水溶性 glucan である 1,6- α -D-glucan に対して, 1,3- α -D-glucan synthase は不均一に結合し (取りつき), 主鎖に対する 1,3,6 分岐の間隔が密であれば側鎖の長さが短くても非水溶化し, 一方, 1,3,6 分岐の間隔が疎であれば, 側鎖の長さがより長く伸長しなければ非水溶化しない.

すなわち主鎖に対して側鎖が疎に分岐していれば非水溶化に時間がかかるという. この実験では 1,3- α -D-glucan synthase に acceptor を加えて, sucrose とともに反応させ, 一定時間ごとに遠心によって生成された IG を回収し, 上清は更に反応を続行させた. このようにして得られた IG の結合分析を行った.

1,3- α -D-glucan synthase の sucrose に対する反応は図 6 に示すような schema で説明できる. すなわち acceptor 非存在下では図 6-A の様に glucan は合成されず, sucrose は glucan と fructose に分解される. この反応では図 1-A および C にも示されるようにホワイバンドとして検出される IG は合成されていない.

一方, 図 6-B の反応は acceptor としての 1,6- α -D-glucan 存在下に起こり, acceptor 上に 1,3- α -D-glucoside 結合した側鎖が形成され, これらが一体となって非水溶化し, IG となる. この場合, 図 1 の結果からわかるように酵素と acceptor の結合は sucrose からの glucan 合成反応を必要としない. 言葉を変えていうと, 1,3,6 分岐の位置は, sucrose 非存在下あるいは反応の最初期に決定され, その後は, その部位からの 1,3- α -D-glucoside 側鎖の伸長反応のみが起こっていると考えられる.

以上の結果及び安東 (1987)²⁶⁾の結果から見て, *S.*

図6 1, 3- α -D-glucan synthase の反応機構.

A : acceptor 非存在下での反応, B : acceptor 存在下での反応,

IGTase : 1, 3- α -D-glucan synthase,

Acceptor : 1, 6- α -D-glucan.

sobrinus の IG 合成機構は次のような過程を経るものと思われる.

① 3種の菌体外 1, 6- α -D-glucan 合成酵素 (様々な分子量あるいは性状を持つ水溶性 glucan を合成する) が sucrose より 1, 6- α -D-glucan を合成する.

② 1, 3- α -D-glucan synthase はこの 1, 6- α -D-glucan を acceptor として結合する. (この場合 sucrose の存在は必須条件ではない.)

③ 1, 3- α -D-glucoside 結合を持つ側鎖が形成される.

④ 1, 6- α -D-glucan に対して側鎖の数が多いか, あるいは側鎖の長さが十分に伸長すると, 水溶性であった 1, 6- α -D-glucan は順次非水溶化する.

結 論

S. sobrinus の精製菌体外酵素 1, 3- α -D-glucan synthase を, 外挿した 1, 6- α -D-glucan を acceptor, sucrose を基質として反応させ, 合成される全 glucan のメチル化による結合分析を GC および GC/MS を用いて調べ以下の結論を得た.

1. sucrose 非存在下において acceptor として挿入した 1, 6- α -D-glucan と前反応させた後, 電気泳動すると 1, 3- α -D-glucan synthase は 1, 6- α -D-glucan

と結合し, 泳動によってほとんど移動しなかった.

これに sucrose を加えて反応させると, IG がホワイトバンドとして生成された. この結果は酵素と acceptor の結合が sucrose 非存在下においても発生していることを示唆している.

2. 1, 6- α -D-glucan 存在下に sucrose を基質として 1, 3- α -D-glucan synthase を反応させ, 経時的に合成された全 glucan の結合分析を行うと, 得られた glucan の主鎖である 1, 6- α -D-glucan 上の 1, 3, 6 分岐部の間隔は, 反応時間が異なって合成される glucan においてほぼ同じであった. すなわち 1, 3- α -D-glucoside 結合の側鎖は主鎖である 1, 6- α -D-glucan 上の同じ位置からその伸長をスタートさせている.

これに対し, 一旦伸長を開始した側鎖は経時的にその長さを伸長させていった.

以上のように, 1, 3- α -D-glucan によって合成された glucan は主鎖である 1, 6- α -D-glucan に対し, 1, 3, 6 分岐が形成され, その位置から 1, 3- α -D-glucan の側鎖を伸長するというメカニズムが明らかになった.

稿を終わるに臨み, 御指導を賜りました竹原直道教授に感謝いたします. また本研究に対して御助言をいただきました口腔衛生学教室の皆様にも感謝します.

引 用 文 献

- 1) 厚生省医務局歯科衛生課編: 昭和56年歯科疾患実態調査報告. 口腔保健協会, 東京, 1983.

- 2) 厚生省健康政策局歯科衛生課編：昭和62年歯科疾患実態調査の概要。
- 3) Newbrun, E. : Cariology. 2nd ed., Williams & Wilkins, Baltimore and London, 1983.
- 4) Genco, R. J. and Mergenhausen, S. E. : Host-parasite interactions in periodontal diseases. American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1982.
- 5) Loesche, W. J. : Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.* **50** : 353—380, 1986.
- 6) Hamada, S. and Slade, H. D. : Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.* **44** : 331—384, 1980.
- 7) Fitzgerald, R. J. and Jordan, H. V. : Polysaccharide-producing bacteria and caries. In : *Art and science of dental caries research*. Harris, R. S. (ed.), Academic Press, New York, 1986, 79—86.
- 8) Guggenheim, B. : Extracellular polysaccharides and microbial plaque. *Int. Dent. J.* **20** : 657—678, 1970.
- 9) Gibbons, R. J. and Nyggard, M. : Synthesis of insoluble dextran and its significance in the formation of gelatinous deposits by plaque-forming streptococci. *Archs oral Biol.* **13** : 1249—1262, 1968.
- 10) Mukasa, H. and Slade, H. D. : Mechanism of adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces. I. Role of insoluble dextran-levan synthetase enzymes and cell wall polysaccharide antigen in plaque formation. *Infect. Immun.* **8** : 555—562, 1973.
- 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) Shibata, S., Goldstein, I. J. and Kirkland, J. J. : Structure of a water-insoluble D-glucan isolated from a streptococcal organism. *Carbohydr. Res.* **120** : 77—84, 1983.
- 13) Hare, M. D., Svensson, S. and Walker, G. J. : Characterization of the extracellular, water-insoluble-D-glucans of oral streptococci by methylation analysis, and by enzymic synthesis and degradation. *Carbohydr. Res.* **66** : 245—264, 1978.
- 14) Aoki, H., Shiroza, T., Hayakawa, M., Sato, S. and Kuramitsu, H. K. : Cloning of a *Streptococcus mutans* gene coding for insoluble glucan synthesis. *Infect. Immun.* **53** : 587—594, 1986.
- 15) Shiroza, T., Ueda, S. and Kuramitsu, H. K. : Sequence analysis of the *gtf B* gene from *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **169** : 4263—4270, 1987.
- 16) Hanada, N. and Kuramitsu, H. K. : Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans gtf C* gene, coding for synthesis of both soluble and insoluble glucans. *Infect. Immun.* **56** : 1999—2005, 1988.
- 17) Ueda, S., Shiroza, T. and Kuramitsu, H. K. : Sequence analysis of the *gtf C* gene from *Streptococcus mutans* GS-5. *Gene* **69** : 101—109, 1988.
- 18) Hanada, N. and Kuramitsu, H. K. : Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans gtf D* gene coding for primer-dependent soluble glucan synthesis. *Infect. Immun.* **57** : 2079—2085, 1989.
- 19) 山下喜久・竹原直道：ムシ歯菌のグルカン合成機構—4種のグルコシルトランスフェラーゼのムシ歯活性能との関連に興味—。化学と生物 **27** : 349—350, 1989.
- 20) 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.
- 21) Hanada, N., Takehara, T. and Saeki, E. : Purification and characterization of a third glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* serotype *g*. *J. Gen. Microbiol.* **133** : 1351—1358, 1987.
 - 22) Yamashita, Y., Shigeoka, T., Hanada, N. and Takehara, T. : Immunological properties of a primer-dependent glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* serotype *d* and *g*. *J. Gen. Microbiol.* **134** : 1223—1227, 1988.
 - 23) Hanada, N. and Takehara, T. : (1→3)- α -D-Glucan synthase from *Streptococcus mutans* AHT (serotype *g*) does not synthesise glucan without primer. *Carbohydr. Res.* **168** : 120—124, 1987.
 - 24) Yamashita, Y., Hanada, N. and Takehara, T. : A novel glucosyltransferase from *Streptococcus mutans* produces oligo-isomaltosaccharides. *Biochem. Biophysic. Res. Commun.* **150** : 687—693, 1988.
 - 25) Hanada, N., Takehara, T., Itoh, M. and Saeki, E. : Insolubilization of exogenous primer dextran with 1,3- α -D-glucan synthase from *Streptococcus mutans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **36** : 173—175, 1986.
 - 26) 安東美幸 : *Streptococcus mutans g* 型菌の 1,3- α -D-glucan synthase による glucan 鎖の合成ならびに伸長に関する研究. 九州歯会誌 **41** : 1208—1218, 1987.
 - 27) 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.
 - 28) Hamada, S. and Torii, M. : Effect of sucrose in culture media on the location of glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* and cell adherence to glass surfaces. *Infect. Immun.* **20** : 592—599, 1978.
 - 29) Halhoul, M.N. and Kleinberg, I. : Differential determination of glucose and fructose, and glucose-and fructose-yielding substaces with anthrone. *Anal. Biochem.* **50** : 337—343, 1972.
 - 30) Hakomori, S. : A rapid permethylation of glycolipid, and polysaccharide catalyzed by methylsulfinyl carbanion in dimethyl sulfoxide. *J. Biochem.* **55** : 205—208, 1964.
 - 31) Yakushiji, T., Inoue, M. and Koga, T. : Inter-serotype comparison of polysaccharides produced by extracellular enzymes from *Streptococcus mutans*. *Carbohydr. Res.* **127** : 253—266, 1984.
 - 32) 薬師寺 毅 : *a—g* 血清型の *Streptococcus mutans* の産生する非水溶性および水溶性多糖の生化学的ならびに形態学的特徴. 歯基礎誌 **25** : 718—736, 1983.
 - 33) Guggenheim, B. : Enzymatic hydrolysis and structure of water-insoluble glucan produced by glucosyltransferases from a strain of *Streptococcus mutans*. *Helv. Odont. Acta* **14** : 89—108, 1970.
 - 34) Bratthall, D. : Demonstration of five serological groups of streptococcal strains resembling *Streptococcus mutans*. *Odontol. Revy* **21** : 143—152, 1972.
 - 35) Masuda, N., Tsutsumi, N., Sobue, S. and Hamada, S. : Longitudinal survey of the distribution of various serotypes of *Streptococcus mutans* in infants. *J. Clin. Microbiol.* **10** : 497—502, 1979.
 - 36) Hamada, S., Masuda, N. and Kotani, S. : Isolation and serotyping of *Streptococcus mutans* from teeth and feces of children. *J. Clin. Microbiol.* **11** : 314—318, 1980.
 - 37) Pekovic, D.D., Adamkiewicz, V.W., Shapiro, A. and Gornitsky, M. : Identification of

- bacteria in association with immune components in human carious dentin. *J. Oral Pathol.* **16** : 223—233, 1987.
- 38) 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.
- 39) Guggenheim, B. and Schroeder, H.E. : Biochemical and morphological aspects of extracellular polysaccharides produced by cariogenic streptococci. *Helv. Odont. Acta* **11** : 131—152, 1967.
- 40) Koga, T. and Inoue, M. : Cellular adherence, glucosyltransferase adsorption of extracellular glucans produced by *Streptococcus mutans* strain JC 2. *Archs oral Biol.* **22** : 281—285, 1977.
- 41) 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.
- 42) Fukui, K., Moriyama, T., Miyake, Y., Mizutani, K. and Tanaka, O. : Purification and properties of glucosyltransferase responsible for water-insoluble glucan synthesis from *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* **37** : 1—9, 1982.
- 43) Davis, H.M., Boyko, W.J. and Edwards, J.R. : Structural determination of a water-insoluble glucan from *Streptococcus mutans* 6715 by carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **152** : 279—282, 1986.
- 44) Davis, H.M., Hines, H.B. and Edwards, J.R. : Structural elucidation of a water-insoluble glucan produced by a cariogenic oral streptococcus. *Carbohydr. Res.* **156** : 69—77, 1986.