原	著
---	---

ヒト歯垢より分離された *Bacteroides* の不溶性 多糖分解性について

高 橋 信 義 堀 川 高 大
水 野 芙 美 子* 鷹 森 健 志 郎*

東京医科歯科大学歯学部口腔細菌学教室

* 昭和大学歯学部口腔細菌学教室

(指導: 堀川高大教授)

(1980年 3 月 6 日 受付)

Insoluble Glucan Degrading Activity of *Bacteroides* Isolated from Human Dental Plaque

Nobuyoshi Takahashi, Takahiro Horikawa, Fumiko Mizuno*
and Kenshiro Takamori*

Department of Oral Bacteriology, Faculty of Dentistry, Tokyo Medical and Dental University

* Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Showa University

(Director: Prof. Takahiro Horikawa)

Glucan hydrolyzing activities of *Bacteroides oralis*, isolated from human dental plaque, and *Bacteroides fragilis*, isolated from rat dental plaque, were studied. Crude enzymes were obtained by salting out with 60% saturation of ammonium sulfate from the culture of *B. oralis* and *B. fragilis* respectively. The activities were determined by using of commercial dextran T-2,000 (Pharmacia, M. W. 2,000,000) (SG), insoluble glucan produced by *Streptococcus mutans* FA-1 (IsG) and partially Smith degraded IsG (M-IsG) which contained α -(1-3) bond in most proportion of linkage. Commercial dextranase from *Penicillium* spp. (Worthington) was used as control.

Commercial dextranase degraded SG almost completely, but showed weak or no activity to IsG and M-IsG. It was natural for the enzyme which was α -(1-6) glucanase. The enzymes of *B. fragilis* showed similar activity to the 3 kinds of glucan. They were active against SG, but less active against IsG or M-IsG. On the other hand, enzymes isolated from *B. oralis* degraded IsG and M-IsG as well as SG. This was also detected on thin layer chromatography. These results indicated that *B. oralis* produced the enzymes hydrolyzing each of α -(1-3) linkage and α -(1-6) linkage of glucan produced by *S. mutans*.

緒 言

ヒト口腔内における Dextran 分解菌の存在は, de Costa ら¹⁾, Staat ら^{2,3)}, 中村ら⁴⁾, Guggenheim ら⁵⁾, Takamori ら⁶⁾, Matsuda⁷⁾ によって報告された。しかし, 歯垢のマトリックスと

しては, *Streptococcus mutans* が sucrose より合成する多糖のうち, α -(1-3) 結合をもつ不溶性 glucan (mutan) が, 重要な問題であるが, dextranase は, これに対してきわめて作用しにくいことが, 明らかとなった⁸⁾。そこで最近 α -(1-3) 結合を開裂する mutanase に関する研究が行

われ, *Trichoderma viride*⁹⁾, *Trichoderma harzianum*¹⁰⁾, *Aspergillus nidulans*¹¹⁾, *Streptomyces* spp^{12, 13)} などからの産生が, 報告されている。しかし, これらの菌は, いずれも土壌菌であり, 口腔内の細菌からの mutanase に関する報告は, ほとんどない。

当教室で口腔内における dextranase 産生菌を検索したところ, 数種の dextran 分解菌が存在し, なかでも *Bacteroides* が, この酵素を強く産生することをみいだした^{6, 7)}。

さらに一部の *Bacteroides oralis* は, mutanase を産生する可能性を持つと思われた⁷⁾。

一方, 実験う蝕の研究に用いられる Wister 系ラットの口腔内にも dextran 分解菌が存在し, その代表として *B. fragilis* が見出された¹⁴⁾。そこでわれわれは, ヒト口腔由来の *B. oralis* とラット由来の *B. fragilis* を用いて, 可溶性ならびに不溶性多糖に対する活性を検討した。

実験方法

供試菌株: 当教室においてラットの口腔より分離された *B. fragilis* strain 4, *B. fragilis* strain 8¹⁴⁾ およびヒト口腔より分離された *B. oralis* strain I₂, *B. oralis* strain S₆ を用いた。

菌株の培養: 内容 1 l の嫌気培養用ボトルに, TYD broth (Tryptose 1 %, Yeast extract 0.2 %, Dextran 0.1 %) に, 500 µg/ml の割合で hemin を加えた液体培地を入れ, あらかじめ同じ培地に 37℃ で 24 時間嫌気培養した新鮮培養菌液を 10 ml 接種し, 72 時間, リン燃式ジャーで嫌気培養した。この培養液を 8,000 rpm で連続遠心して菌体を除き, 培養上清を得た。

酵素標品の調整: 培養上清に (NH₄)₂SO₄ を, 最終濃度が, 60% 飽和 (390 g/l) となるように加えて, 一夜氷室に放置した。塩析した培養上清を, 8,000 rpm の連続遠心で除き, その沈渣を少量の蒸留水に溶解し, セロファン・チューブ (Visking Co.) に入れて, 蒸留水で 48 時間透析を行い, 不溶物を遠心で除去し, 上清を凍結乾燥して, 酵素標品とした。使用時には, 5 mg/ml となるように,

緩衝液に溶解して, 酵素液とした。

対照として, *Penicillium* 由来の市販の dextranase (Worthington Biochem. Co) を, 酢酸緩衝液 (0.05 M, pH 5.0) およびリン酸緩衝液 (0.05 M, pH 7.2) に, 34 u/ml になるように溶解して用いた。

不溶性 glucan の調整: 不溶性 glucan は, Guggenheim ら¹⁵⁾ の方法に従って調整した。すなわち, *Streptococcus mutans* FA-1 を, 10% に sucrose を添加した heart infusion broth で 30 時間嫌気培養後, 連続遠心で沈渣を集め, その沈渣に 1N-KOH を加え, 不溶性 glucan を溶解させ菌体を除いた。

不溶性 glucan は, 70% ethanol により沈殿させ, 蒸留水で洗浄した。この操作を 3 回繰り返した後, ethanol, acetone で粉末にして, insoluble glucan (IsG) とした。

過ヨウ素酸化 (Smith 分解): 不溶性 glucan に含まれる α-(1-6) 結合の glycopyranosyl linkage を開裂するために, Goldstein らの方法により, 部分的過ヨウ素酸化を行った¹⁶⁾。IsG 2 g を 0.002 M 酢酸緩衝液 1 l に浮遊し, meta-periodic acid を 0.02 M となるように加えた。この混合液を 15℃ で暗所に放置し, 十分に酸化した。96 時間後に meta-periodic acid の消費が平衡に達したので, 過剰の試薬を除去するために, ethylene glycol を加えて 20 分間振盪した後, 遠心し, 沈渣を集めて, 蒸留水で 2 回洗浄した。さらにこれに sodium borohydride を 0.02 M になるように加え, 一昼夜還元した後, 6 N 酢酸で中和し, 蒸留水で透析を行い, 得た沈殿物を modified IsG (M-IsG) とした。

M-IsG は, ethanol と acetone で脱水, 乾燥し, 粉末として使用した。

酵素活性測定法: 酵素活性の測定は, Guggenheim⁸⁾ の方法を一部を変更して行った。0.05 M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) および 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 7.2) に, 基質をそれぞれ 1% に含むように溶解し, これに同じ緩衝液 2 ml, 酵素液 1 ml を加え, 37℃ で反応させた。反応時間 1, 2, 3,

6 時間後に反応液の一部を取り出し、100℃、3 分加熱して反応を停止させ、Amberlite IRA 411, IRC-120 を用いて、除蛋白、脱塩した後、濃縮し、遊離された還元糖を、Nelson-Somogyi 法^{17,18)}により測定した。

基質としては、調整した IsG および M-IsG のほかに、対照として市販の dextran T-2,000 (Pharmacia, M. W. 2,000,000) を用いた。

糖の薄層クロマトグラフィー(TLC): 脱塩、濃縮した試料を、silica gel plate 60 F₂₅₄ (Merck) 上にスポットした。

展開液は、n-butanol: pyridine: 水(6:4:3 v/v) を用い、室温で上昇法により展開し、アルカリ・硝酸銀法で発色させた。

結 果

市販dextranase の活性：

市販dextranase は、pH 5.0~7.0の範囲に至適 pH があり、特に pH 5.0 において SG に対して強い分解能を示し、IsG に対しては、わずかに活性を示した。これに対し、 α -(1-6) 結合を開裂した M-IsG に対しては、全然作用しなかった(図 1)。

このことは、TLC でも示された。

すなわち、市販dextranaseをSGに作用させた場合には、glucoseのほか、2, 3の糖が検出されたが、IsGにおいては、glucoseが、わずかに検出されたのみであり、さらにM-IsGでは、glucoseをはじめ、小糖類も全く検出されなかった。

Bacteroides fragilis の酵素活性：

ラット由来の *B. fragilis* strain 4 および strain 8 を各基質に作用させた結果は、図 3 に示した。*B. fragilis* strain 4 の場合、SG に対しては、pH 7.2 で、わずかな活性を示したが、pH 5.0 では、ほとんど活性は、みられなかった。IsG、M-IsG に対しては、全く活性は、認められなかった。一方、*B. fragilis* strain 8 の場合は、SG に対しては、pH 7.2 において strain 4 よりも強い活性を示し、pH 5.0 では、pH 7.2 におけるより弱いけれども酵素活性が認められた。IsG に対しては、pH 7.2 に、わずかに活性が認められたが、pH 5.0

図 1 市販Dextranaseによる多糖の分解

- SG (pH 5.0)
- // (pH 7.2)
-□ IsG (pH 5.0)
-□ // (pH 7.2)
- ×.....× M-IsG (pH 5.0)
- ×.....× // (pH 7.2)

SG	IsG	M-IsG	SG	IsG	M-IsG
pH 7.2			pH 5.0		

図 2 市販 Dextranase による多糖の分解 (TLC)

図3 *B. fragilis* strain 4 による多糖の分解
(図1の説明参照)

Glucose ● ○ ○

図5 *B. fragilis* strain 8 による多糖の分解(図1
の説明参照)

Glucose ● ● ● ○ ● ●
Isomaltose ○

SG	IsG	M-IsG	SG	IsG	M-IsG
pH 7.2			pH 5.0		

図4 *B. fragilis* strain 4 による多糖の分解(TLC)
SG(pH 7.2) 以外には遊離糖はほとんど検出
されない。

においては、認められず、M-IsG に対しては、全く作用しなかった(図5)。TLC における結果も同様で、strain 4 の場合、pH 7.2 においてわずかに glucose が検出されたが、他の場合は、痕跡程度で、活性はないものと考えられた。strain 8 の場合は、SG に対しては、pH 5.0 および pH 7.2 とも glucose が、検出され、IsG に対しては、pH 7.2 の場合、glucose が検出された。M-IsG

SG	IsG	M-IsG	SG	IsG	M-IsG
pH 7.2			pH 5.0		

図6 *B. fragilis* strain 8 による多糖の分解(TLC)

では、遊離糖は、痕跡程度であった。

Bacteroides oralis の酵素活性：

ヒト由来の *B. oralis* strain I₂ および strain S₆ を各基質に作用させた結果は、図7、9 に示した。図に示したように、この2株の産生する酵素は、ほぼ同じ作用を示した。

すなわち、両者とも pH 7.2 においては、SG に対しては、市販の dextranase に匹敵する強い活性を示し、IsG に対しても、SG と同じ程度の強

図7 *B. oralis* strain I₂ による多糖の分解 (図1の説明参照)

図8 *B. oralis* strain I₂ による多糖の分解 (TLC)

い活性を示した。さらに、この株の粗酵素は、M-IsG に対して活性を有していた。

pH 5.0 の場合は、pH 7.2 と比較して、全般的に活性は弱い、ほぼ同様の活性を有していた。TLC では、両酵素とも、いずれの基質からも glucose を産生しており、特に pH 7.2 において、M-IsG より glucose, isomaltose など 2, 3 の糖が

図9 *B. oralis* strain S₆ による多糖の分解 (図1の説明参照)

図10 *B. oralis* strain S₆ による多糖の分解 (TLC)

検出された。しかし pH 5.0 では、M-IsG からは、少量の glucose が、検出されただけであった。

考 察

本実験は、ヒト口腔由来の *B. oralis* の産生する多糖分解酵素の各種 glucan に対する作用を調べ

た。

不溶性多糖は、*Streptococcus mutans* FA-1 の産生する不溶性 glucan (IsG)(α -(1-6) 結合および α -(1-3) 結合混合物) および IsG を部分的に過ヨウ素酸酸化 (Smith 分解) し、 α -(1-6) 結合を開裂した glucan (M-IsG) を用い、対照として、 α -(1-6) 結合よりなる多糖、dextran T-2,000 (SG) を用いた。

さらに、*B. oralis* の多糖分解性を知るために、ラット由来の *B. fragilis* より抽出した粗酵素および市販の dextranase (Worthington Biochem. Co.) を用いた。

市販 dextranase は、SG に対しては、強い分解能を有していたが、IsG では、はるかに弱く、M-IsG には、全く活性を示さなかった。

この酵素は、IsG に対して α -(1-6) 結合部に作用した場合、glucose を遊離するが、 α -(1-3) 結合には、全く作用していないと考えられる。

B. fragilis の酵素は、市販の dextranase と性状において、ほぼ同様であったが、活性は、かなり弱く、IsG に対して、ほとんど作用しなかった。これは、用いた酵素が、粗酵素であり、不純物が、かなり含まれているためと思われる。両者の相違は、市販 dextranase は、酸性域で強い活性を示すが、*B. fragilis* の産生する酵素は、中性域で強い活性を示した。

このことは、*B. fragilis* の酵素は、少なくとも、至適 pH において、カビ由来の酵素と異なると考えられる。

Sery¹⁹⁾によれば、*Bacteroides* は、endo-および exo-type の dextranase を産生し、糖化作用は、pH 7.0~7.5 で、最も強く発現することを報告しているが、本実験は、その報告と一致するものと思われる。

これに対し、*B. oralis* の粗酵素は、SG, IsG を分解するとともに、M-IsG に対しても、分解能を有している。この粗酵素は、 α -(1-6) 結合とともに、 α -(1-3) 結合にも作用していることを示している。また、*B. fragilis* の酵素と比較した場合、中性域で活性が、強い点で類似している

が、M-IsG にも作用している点で、*B. fragilis* のもつ酵素の他に、Guggenheim⁵⁾の報告した mutanase とを含んでいると考えられる。

なお、これらの酵素のうち、 α -(1-6) 結合に作用する dextranase に関しては、すでに精製されている (投稿中)。

また、mutanase に関しては、現在実験中である。

B. oralis の口腔内の分布については、未だ十分に解明されていないし、その産生する酵素の歯垢沈着ないし除去に関する作用については、不明であるが、酵素として投与された dextranase の in vivo での作用から考えて、解明してゆく必要の大きい問題と思われる。

文 献

- 1) da Costa, T., Bier, L. C. & Gaida, F.: Dextran hydrolysis by a *Fusobacterium* strain isolated from human dental plaque. Archs. oral Biol., 19: 341-342, 1974.
- 2) Staat, R. H., Gawronski, T. H. & Schachtele, C. F.: Detection and preliminary studies on dextranase-producing microorganisms from human dental plaque. Infect. Immunity, 8: 1009-1016, 1973.
- 3) Staat, R. H. & Schachtele, C. F.: Analysis of the dextranase activity produced by an oral strain of *Bacteroides ochraceus*. J. Dent Res. 55: 1103-1110, 1976.
- 4) 中村 武, 高添一郎: 口腔内 Dextran 分解菌の実証. 歯科学報, 73: 1802-1809, 1973.
- 5) Guggenheim, B. & Burckhardt, J. J.: Isolation and properties of a dextranase from *Streptococcus mutans* OMZ 176. Helv. odont. Acta., 18: 101-113, 1974.
- 6) Matsuda, Y.: Dextran degrading bacteria in human oral cavity and their activity against insoluble glucan from *Streptococcus mutans*. Bull. Tokyo Med. Dent. Univ., 23: 27-40, 1976.
- 7) Takamori, K., Mizuno, F., Matsuda, Y., Takahashi, N. & Horikawa, T.: Dextran degrading activity of oral microbial flora. Bull. Tokyo Med. Dent. Univ., 23: 23-26, 1976.
- 8) 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.
- 9) Hasegawa, S., Norden, J. H. & Kirkwood, S.:

- Enzymes that hydrolyze fungal cell wall polysaccharides. J. biol. Chem., 244: 5460-5470, 1969.
- 10) Guggenheim, B. & Haller, R.: Purification and properties of an α -(1 $\rightarrow$ 3) glucanohydrolase from *Trichoderma harzianum*. J. dent. Res. 51: 394-402, 1972.
- 11) Zonneveld, B. J. M.: A new type of enzyme, an exosplitting α -1, 3 glucanase from noninduced cultures of *Aspergillus nidulans*. Biochim Biophys. Acta 258: 541-547, 1972.
- 12) Bacon, J. S. D., Jones, D., Farmer, V. C. & Webley, D. M.: The occurrence of α -(1 $\rightarrow$ 3) glucan in *Cryptococcus*, *Schizosaccharomyces* and *Polyporus* species, and its hydrolysis by a *Streptomyces* culture filtrate lysing cell walls of *Cryptococcus*. Biochim. Biophys. Acta 158: 313-315, 1968.
- 13) Inoue, M., Egami, T., Yokogawa, K., Kotani, H. & Morioka, T.: Isolation, identification and some cultural conditions of *Streptomyces* species that produce water-insoluble polyglucan hydrolase. Agr. Biol. Chem. 39: 1391-1400, 1975.
- 14) 鷹森健志郎, 水野芙美子, 高橋信義, 堀川高大: ラット口腔内の Dextran 分解菌について. 口病誌, 投稿中.
- 15) Guggenheim, G. & Schroeder, H. E.: Biochemical and morphological aspects of extracellular polysaccharides produced by cariogenic streptococci. Helv. odont. Acta, 11: 131-152, 1967.
- 16) Goldstein, I. J., Hay, G. W., Lewis, B. A. & Smith, F.: Controlled degradation of polysaccharides by periodate oxidation, reduction and hydrolysis. Methods in Carbohydrate Chemistry (Whistle, R. L., BeMiller, J. N., Wolfrom, M. L., ed.), Vol. V. General polysaccharides. Academic Press, New York & London. P. 361, 1965.
- 17) Nelson, N.: A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. J. biol. Chem., 153: 375-380, 1944.
- 18) Somogyi, M.: Notes on sugar determination. J. biol. Chem., 195: 19-23, 1952.
- 19) Sery, T. W. & Hehre, E. J.: Degradation of dextrans by enzymes of intestinal bacteria. J. Bact., 71: 373-380, 1956.