

第61回 日本細菌学会総会

総会長 金政泰弘 岡山大学医学部細菌学教室

期 日 昭和63年4月5日(火), 6日(水), 7日(木)

会 場 岡山プラザホテル

E-1-17 *Streptococcus mutans* (血清型 c) の菌体結合グルコシルトランスフェラーゼの分離・精製と性状

○堀越俊雄^{1,2)}, 古賀敏比古²⁾, 岡橋暢夫²⁾, 浜田茂幸¹⁾
(大阪・歯・口腔細菌¹⁾, 予研・歯科衛生部²⁾)

目的 *S. mutans* はう蝕の主要な病原因子である。本菌種は血清学的特異性に基づいて a から h までの 8 型に分類され、中でも c 型菌がヒトからの全分離株の約 80% をしめる。*S. mutans* は食物中の多くの糖を分解し酸を産生する他、スクロースを基質として非水溶性でかつ付着性のグルカンを産生する特性を有する。この過程は、本菌の産生するグルコシルトランスフェラーゼ (GTase) 群によって触媒され、本菌がう蝕原性を発揮するためのビルレンス因子になっている。しかし、従来 GTase に関する研究は d/y 型菌について主として行われ、c 型菌については未解決の問題が多い。c 型菌には強い菌体結合 GTase 活性が認められ、今回同酵素の精製と生物学的性状についていくつか興味ある知見をえたので報告する。

材料と方法 (1) 菌株: 日本人小児う窩から分離した *S. mutans* MT8148 株 (血清型 c) を主な被験菌株として用いた。(2) 酵素活性: GTase 活性は 10 μ L の 20 mM の [¹⁴C-グルコース] スクロースを被験溶液 (10 μ L) と混和し、37°C, 1 時間保温後、ろ紙片にスポットし、メタノール洗浄を行い、紙片上の残留放射能 (¹⁴C-グルカン) を測定した。混在するフルクトシルトランスフェラーゼ活性は [¹⁴C-フルクトース] スクロースを用いて同様に測定した。なお、酵素 1 単位は、1 分間あたり 1 μ mol のスクロースを多糖に転移する活性と定義した。(3) 抗 GTase 抗体: MT8148 株の菌体外 GTase を硫酸沈殿、クロマトフォーカシング、ヒドロキシアパタイト (HA) 法により精製した。同精製製品に対するモノクローン抗体は常法に従ってえた。また菌体結合 GTase に対する特異抗体としては、精製製品をマウスに注射免疫してえた抗血清を用いた。

結果 MT8148 株を Brain heart infusion ブロース (BHI) あるいは Todd-Hewitt ブロース (TH) で培養するといずれの場合にも強い菌体結合 GTase 活性が検出された。BHI 培養菌体から

同活性を 8 M 尿素, 6 M グアニジン塩酸, 1 M NaCl, 及び超音波処理で可溶化を試みた。その結果 8 M 尿素の 25°C, 1 時間抽出により全活性の 95% が抽出された。これを 60% 硫酸沈殿で濃縮、透析後、DEAE-Sephacel にかき、0.6 M NaCl で溶出した画分をさらに HA カラムにかき、0.5 M のリン酸塩で溶出した画分を純化 GTase 製品とした。SDS-PAGE を行くと、本製品は分子量 160K の単一バンドを形成した。スクロースに対する Km 値は、11.1 mM で、デキストラン T10 によるブライマー効果 (活性化) は 1.7 倍であった。至適 pH はやや高く、pH 6.7~7.0 であった。最も特徴的な所見は、同酵素によるスクロースからの生成産物は 98% が非水溶性のグルカンで、これは菌体外 GTase が大部分 (>98%) 水溶性グルカンを合成するのとは極めて対照的である。さらに酵素免疫法で検出したところ、精製した菌体結合 GTase タンパクは同製品のマウス抗体と強く反応するのに対し、抗菌体外 GTase モノクローン抗体とはほとんど反応を示さなかった。

考察 c 型 *S. mutans* の GTase システムについてもいくつかの報告が散見されるが、菌体外および菌体結合 GTase の関係については明確にされていない。本研究で精製した菌体結合 GTase は、同じ菌株の菌体外 GTase と分子量は酷似しているが、免疫学的特異性は全く異なるタンパクである。またスクロースからの産物は前者が非水溶性であるのに対し、後者は水溶性であり、また至適 pH も 5.5~6.5 であり、菌体結合 GTase とは明らかに異なる。デキストランによるブライマー効果も菌体外 GTase の方が菌体結合型のそれより明確に強く認められた。