

歯垢中に存在する *Eubacterium* sp. S-1 株が細胞外に 産生する不溶性多糖について

小 柳 英 男

新潟大学歯学部口腔細菌学教室 (指導: 近藤 亘教授)

(昭和54年11月13日受付)

Studies on Extracellular Insoluble Polysaccharide Produced by *Eubacterium* sp.
Strain S-1 Isolated from Human Dental Plaque

Hideo OYANAGI

Department of Oral Microbiology, Niigata University School of Dentistry
(Director: Prof. Wataru Kondo)

緒 論

Eubacterium に属する細菌種はグラム陽性、嫌気性の長い連鎖桿菌で glucose を利用して細胞内に大量の glycogen 顆粒を蓄積する特徴をもっている。口腔、特に歯表面に着生している *Eubacterium* の多くは *Eubacterium saburreum* と同定される細菌種であって、これらは血清学的に6つの型に分類されている¹⁾。

1972年、近藤・ら²⁾ はやはり人の歯垢から、*E. saburreum* とは異なる *Eubacterium* の新種 (S-1 株, J-92 株) を分離した。この細菌種は上記と同一の形態学的特徴をもっているが、細胞が大型であることと、何種類かの糖分解性を欠如 (galactose, mannose, arabinose, xylose, trehalose) する点で *E. saburreum* とは明らかに性状を異にする細菌種であった。また、この細菌種の特記すべき特徴は glucose, maltose, あるいは sucrose を基質として細胞壁の表層に大量の粘性不溶性の多糖を合成し、そのために液体培地中では個々の細胞同士が互に融合を起し、巨大な菌塊として発育してくることである。しかし、この菌が上記の如き不溶性多糖を合成する性状は安定でなく、液体培地で本菌の継代培養を繰り返すと、徐々に水溶性多糖を合成する変異株を

生じ、液体培地全体をゼリー状化して発育するようになる。この変異株の産生する水溶性多糖が一種の proteoglycan であることは既に Kondo・ら³⁾ によって証明されている。しかしながら、この原株が産生する細胞壁表層の不溶性多糖についてはその可溶化が困難であったため、その研究は進められていなかった。唯、1974年近藤・ら⁴⁾ はアルカリを用いてこの不溶性多糖を可溶化し、その一部の性状を報告しているが、この様な方法で可溶化された多糖についてはその糖鎖構造の安全性を保障することはできなかった。

そこで、この研究においては、アルカリの使用を避け、種々の蛋白消化酵素を利用することによって、この物質の可溶化を試み、可溶化された物質の物理的性質、糖鎖部分の化学組成並びにこの物質の糖-peptide の結合様式について検討を加えたので、その成績を報告する。

材 料 と 方 法

1. 不溶性多糖の可溶化とその精製

使用した菌株は人の歯垢より分離した *Eubacterium* sp. S-1 株である。使用した培地の組成は以下の如くである。Proteose peptone No. 3 (Difco) 10 g, Yeast extract (Difco) 5 g, K_2HPO_4 2.5 g, NaCl 5 g, glucose 20 g, 水 1 l,

pH 7.2。上記の培地に菌接種後、37 °C、18時間嫌氣的に培養した。この培養菌体を水で3回遠心洗浄した後、菌体の3倍量の水を加え Teflon のホモジナイザーで攪拌し、これを遠心して上清中に含まれる少量の水溶性分画を除き、菌体と結合したまま沈澱する不溶性多糖を可溶化実験の出発材料とした。

この不溶性多糖を可溶化するため、出発材料に以下の条件で3種類の蛋白消化酵素を作用させた。

- ① 出発材料を0.2M Tris-HCl buffer (pH 8.0) に浮遊させ、1 mg/ml の trypsin (Motida) と 0.08% NaN_3 を加え、37 °C、18時間消化した。
- ② 出発材料を0.2M Tris-HCl buffer (pH 8.0) に浮遊させ、1 mg/ml の pronase (科研化学) と 0.08% NaN_3 を加え、37 °C、18時間消化した。
- ③ 出発材料を 0.2 M PBS (pH 6.9) に浮遊させ、1 mg/ml の papain (Merck), 50 mM cystein-HCl, 10 mM EDTA, および 0.08% NaN_3 を加え、37 °C、18時間消化した。

次いで、これらの蛋白消化物の遠心上清に0.5% 酢酸カリを含む3倍量のエタノールを加え、多糖の沈澱形成によって不溶性多糖の可溶化を判定した。多糖の沈澱が認められる場合はこのエタノールによる沈澱を3回繰り返した後、これを少量の水に溶かし Sepharose 6B のカラム (2.4×110 cm) で gel 濾過を行った。溶媒としては0.02% NaN_3 を含む 0.15 M NaCl を用いた。gel 濾過で得られた各フラクション (10 ml) に含まれる中性糖含量を glucose を standard として、phenol- H_2SO_4 法⁵⁾ で測定した。また同時に、各フラクションの OD_{280} を測定した。

2. 一般的分析方法

多糖に含まれるアミノ糖は試料を減圧下で封管して、4 N HCl 100 °C 4時間水解後、glucosamine を standard として、アミノ酸自動分析計 (Hitachi Amino Acid Analyzer KLA 3B) を用いて定量した。

アミノ酸は試料を減圧下で封管して、6N HCl

110 °C 24時間水解後、アミノ酸自動分析計で定量した。

粘度は Ostwald's viscometer No. 3 を用いて、25.0 °C の恒温槽中で測定した。

超遠心は Beckman Model E Ultracentrifuge を用い、60,000 r. p. m., 5.2 °C~6.0 °C で測定した。

電気泳動は cellulose acetate 膜上 (Separax, 6×11 cm) で 28 V/cm の定電圧で行った。染色は 0.5% alcian blue で行ない、buffer として、0.05 M acetate buffer (pH 4.9) と 0.05 M sodium citrate-HCl buffer (pH 2.4) の2種類を用いた。

ペーパークロマトは東洋濾紙 No. 51 を使い、溶媒として 1-butanol : pyridine : 水, (6:4:3, v/v) を用いて、上昇法で18時間展開した。染色はアルカリ性硝酸銀で行った。

g. l. c. は Hitachi 063 を用いた。カラムは 3%OV-17 でコートした Schmalite W (80-100 mesh) を充填したガラスカラム (0.3×300 cm) を用いた。カラム温度は150 °C~250 °C まで 5 °C/min の割合で昇温した。g. l. c.-m. s. は Hitachi RMU 7M を用いた。

糖類の還元は NaBH_4 を用い、密栓して 37 °C、18時間 incubate した後、Dowex 50 (H^+) のカラムを通して Na を除き、減圧濃縮後、メタノールを加え減圧濃縮を3回繰り返してホウ酸を除いた。

糖類の N-アセチル化は Marcus・ら⁶⁾ の方法にならい、4容の試料に1容の saturated NaHCO_3 と1容の5%無水酢酸を加え密栓して 37 °C、18時間 incubate した後、Dowex 50 (H^+) のカラムを通して脱塩した。

3. 構成糖の同定

試料中に含まれる中性糖の組成を調べる場合、試料を 1 N HCl 100 °C 4時間水解した後、Dowex 50 (H^+) と Dowex 1 (CH_3COO^-) のカラムを通し中性糖分画を得、この分画に含まれる中性糖をペーパークロマトにかけ、その R_f 値を標準糖と比較同定した。また同時にこの中性糖を還元して糖アルコールに変え、その TMS 誘

導体を g.l.c. で分析し、その保持時間を測定して、標準糖のそれと比較同定した。アミノ糖の組成を調べる場合、試料を 4 N HCl 100°C 4時間水解した後、Dowex 50 (H⁺) のカラムに吸着させ、カラムの4倍量の 1 N HCl で溶出し、得られたアミノ糖分画を N-アセチル化した後、還元して糖アルコールに変え、その TMS 誘導体を g.l.c. で分析し、標準糖と比較してアミノ糖の同定を行った。

4. 糖-peptide の結合様式

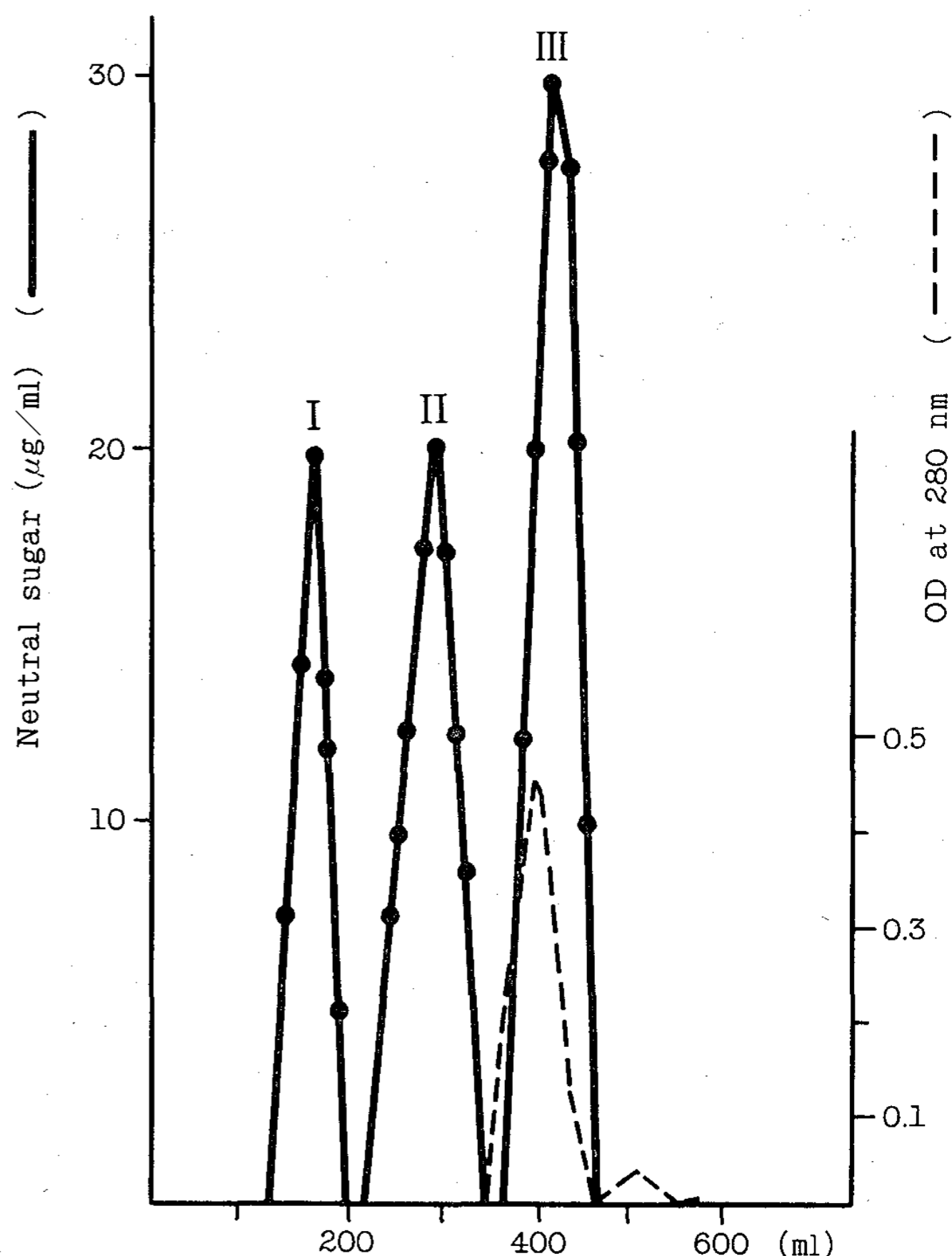
まず、可溶化した不溶性多糖の糖-peptide 結合に関与しているアミノ酸の種類を決定する場合、試料 2 ml (中性糖含量で 10 mg) に NaOH (最終濃度 0.04 M) と NaBH₄ (最終濃度 0.3 M) を加え全量 3 ml として 60°C, 48時間アルカリ還元処理を施した。次いで 1 N CH₃COOH を加えて (pH 5.0) 反応を停止させ、減圧濃縮後、メタノールを加え、減圧濃縮によりホウ酸を除き、2 ml の 6 N HCl で 110°C 24時間水解した後、アミノ酸自動分析計でアルカリ還元処理の前後におけるアミノ酸の増減を測定した。

次に、この物質の糖-peptide の結合に関与している糖の種類を決定するために、試料 6 ml (中性糖含量で 30 mg) に NaOH (最終濃度 0.3 M) と NaBD₄ (最終濃度 0.4 M) を加え、全量を 10 ml として 37°C, 18時間アルカリ還元処理を施した。次いで 1 N CH₃COOH を加えて (pH 5.0) 反応を停止させ、十分に透析して脱塩した。この透析内液を濃縮後、1 N HCl 10ml を加え 100°C 4時間水解した。この水解液を N-アセチル化した後、Yamaguchi・らの方法⁷⁾ にならって OH⁻ 型の Dowex 1 のカラムにかけ、溶出してくる糖アルコールを TMS 誘導体として g.l.c. -m.s. で分析した。

結 果

Eubacterium sp. S-1 株が菌体外に産生する不溶性多糖は trypsin や pronase による消化物の遠心上清にエタノールを加えても極くわずかの沈澱物しか認められず、これらの蛋白消化酵素では可溶化できないことが判った。しかし papain

図 I papain で可溶化された不溶性多糖の Sepharose 6B のカラム gel 濾過



カラム 2.4×110 cm, 溶出液 0.15M NaCl (0.02% NaN₃を含む), フラクション10 ml

による消化物の遠心上清にエタノールを加えたところ、大量の沈澱物が認められ、この不溶性多糖は papain により可溶化されることが判明した。

次に、papain により可溶化されたこの物質を Sepharose 6B のカラムで gel 濾過を行った結果 (図 I), void volume より僅かに遅れて溶出してくる分画 I と、それよりかなり遅れて溶出してくる分画 II の 2 つに分れることが明らかとなった。なお、分画 III は papain 由来の物質である。

この分画 I と分画 II を電気泳動にかけた結果 (図 II), 両分画とも pH 4.9 および pH 2.4 という条件で単一のスポットとして、陽極側へ移動する酸性物質であることが判明した。

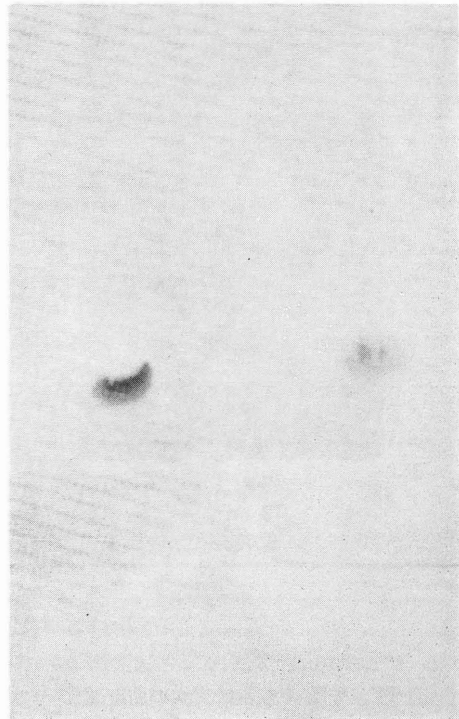
次に、分画 I と分画 II の粘性を調べるために両分画の中性糖濃度を同一 (30 μg/ml) として、0.05M PBS, (pH 7.0) における粘度を Ostwald's

図 II Sepharose 6B のカラム gel 濾過で得られた分画 I と分画 II の電気泳動



分画 II 分画 I

0.05M acetate buffer, pH 4.9



分画 II 分画 I

0.05M sodium citrate-HCl buffer, pH 2.4

cellulose-acetate (Separax, 6×11 cm), 28V/cm の定電圧で90分 電気泳動, 染色は 0.5% alcian blue

viscometer No. 3を用いて測定した結果(表 I), 比粘度は水を1.0とすると, 分画 I は 8.2, 分画 II は 2.0 であった。このように分画 I は分画 II と比べて遙かに粘性の高い分画であることが判明した。

次に, 分画 I と分画 II の純度を調べる目的で超遠心を行ってみた(図 III)。分画 I (濃度0.65% 0.05M PBS, pH 7.0) は一相性のほぼ均一な物質として行動したが, 分画 II (濃度0.31% 0.05M PBS, pH 7.0) は二相性のパターンを示し, 均一な物質とは認められなかったので, 今回は分画 I に関して得られた成績だけを報告する。

次に, 分画 I の S-value を求めるため, 種々の濃度 (0.04%, 0.07%, 0.12%, 0.22%) における沈降定数を測定した(図 IV)。しかし, 分画 I の沈降定数は濃度依存性が大きく, 又両者の間に直線関係が得られなかったので, 正確な S-

表 I Sepharose 6B のカラム gel 濾過で得られた分画 I と分画 II の相対粘度

Fraction	Concentration of mucous material (%)	Viscosity (sec)	*Relative viscosity
I	0.17	205	8.2
II	0.04	50	2.0
H ₂ O		25	1.0

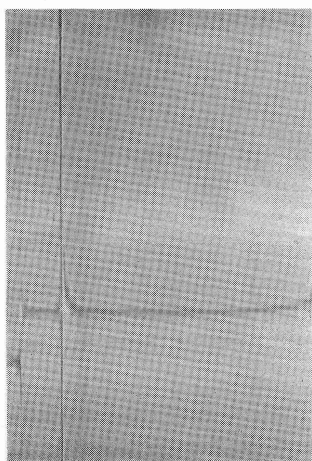
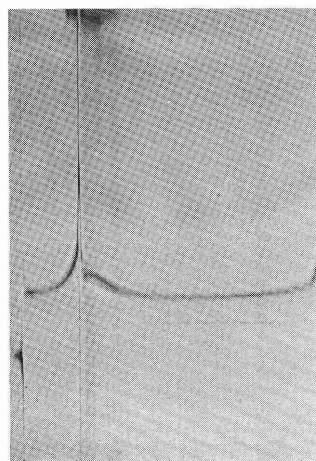
* Ostwald's viscometer (No. 3), at 25°.

(中性糖濃度は分画 I, 分画 II とも 30 μg/ml)

value の算出はできなかった。

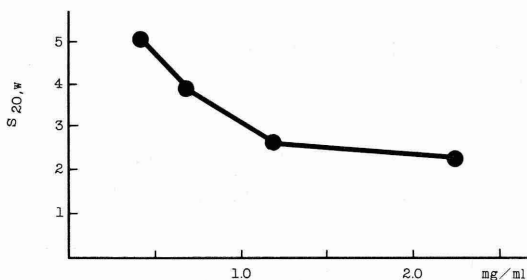
次に, 分画 I の糖の組成を調べてみた。まず中性糖の組成を決定するため, 分画 I の水解液の中性糖分画を g.l.c. で分析した結果, inositol に対する相対保持時間 (R. R. T.) が 0.81 を示す唯一のピークが出現し, glucose の R. R. T. (0.81)

図 III 分画 I と分画 II の超遠心のパターン

分画 I
72 min.
0.65%分画 II
90 min.
0.31%

0.05 M PBS, pH 7.0
60,000 r. p. m., 6 °C で測定
Beckman Model E Ultracentrifuge

図 IV 分画 I の沈降定数の濃度変化



0.05 M PBS, pH 7.0
60,000 r. p. m., 5.2 °C ~ 6.0 °C で測定
Beckman Model E Ultracentrifuge

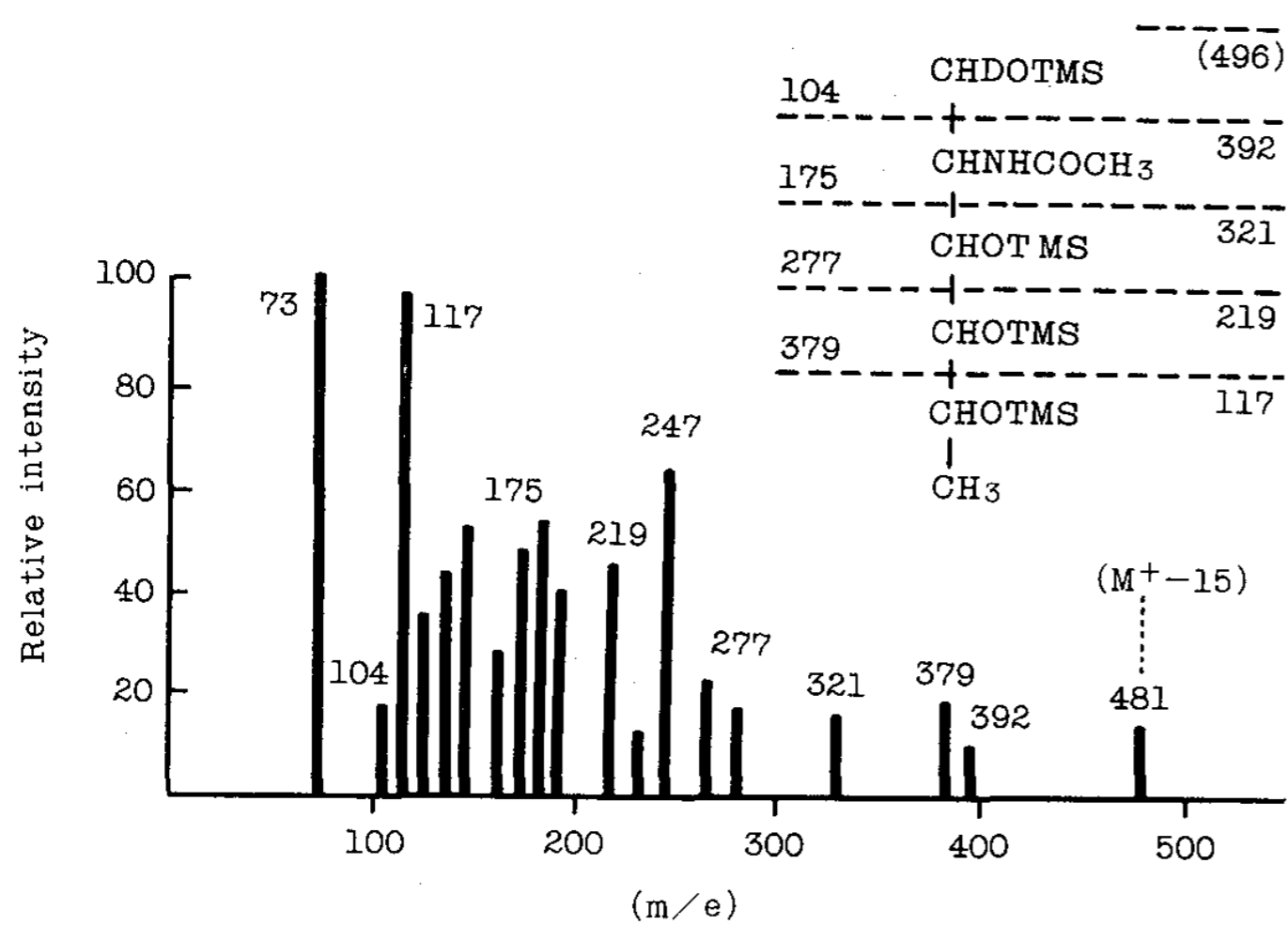
と一致した。またペーパークロマトでも単一のスポットを示し、glucose の Rf 値 (0.32) と一致した。この結果、分画 I の中性糖は glucose だけから成ることが判明した。

次に、分画 I のアミノ糖の組成を決定するため、試料水解液のアミノ糖分画を g. l. c. で分析した結果、R. R. T. が 0.98 と 1.08 を示す 2 つのピークが検出された。R. R. T. が 1.08 を示すものは glucosamine の R. R. T. (1.08) と一致し、

glucosamine と判明したが、R. R. T. が 0.98 を示すものは glucosamine や galactosamine など既値のアミノ糖よりも R. R. T. が小さいアミノ糖であった。このアミノ糖はアミノ酸分析計において glucosamine の elution volume を 1 とした場合、1.45 に相当するもので、既に近藤・ら⁴⁾がこの菌の水溶性多糖から検出した未知のアミノ糖と同一のものであった。そこでこの未知のアミノ糖の構造を調べるために、これを N-アセチル化した後、NaBD₄ で還元して糖アルコールに変え、その TMS 誘導体を g. l. c. -m. s. で分析した。その結果 (図 V)、最高イオンとして m/e 481, その他 primary fragment として、m/e 104, 117, 175, 219, 277, 321, 379 および 392 が得られた。このことから、この R. R. T. 0.98 のアミノ糖は C-2 位にアミノ基をもち、C-6 が methyl 基になった 2-amino-2,6-dideoxy-hexose であることがわかった。

次に分画 I に含まれる上述の中性糖とアミノ糖並びにアミノ酸の定量結果をまとめてみると (表 II), glucose 1000 μg に対して、glucosamine が 400 μg, 2-amino-2,6-dideoxy-hexose が

図 V R. R. T. 0.98 のアミノ糖*の質量分析



*N-アセチル化後, NaBD₄ で還元
その TMS 誘導体

表 II 分画 I の化学的組成

Component	Weight (μg)
Glucose	1,000
Glucosamine	400
2-Amino-2,6-dideoxy-hexose	450
Amino acids	30

glucose: phenol-H₂SO₄ 法による定量値 glucosamine, 2-amino-2,6-dideoxy-hexose およびアミノ酸: アミノ酸自動分析による定量値

450 μg, アミノ酸の総計が 30 μg という結果になり, glucose, glucosamine, 2-amino-2,6-dideoxy-hexose の モル比が 1.0:0.4:0.5 であることが判明した。

上記の如く, papain によって可溶されたこの物質 (分画 I) には微量ではあるがアミノ酸が含まれていた。そこで, この物質の糖-peptide 結合様式を調べる目的でこの物質にアルカリ還元処理を施し, その前後における構成アミノ酸の増減を測定してみた。その結果 (表 III), ハイドロオキシアミノ酸である serine と threonine が減少するのに対して, alanine が増加し, また新たに α-amino butyric acid が出現してくることが認められた。これは糖-peptide 間の結合がアルカリによって β-脱離反応が起こり, 同時に存在する NaBH₄ によって還元され, serine が

表 III 分画 I のアルカリ還元処理前後におけるアミノ酸組成

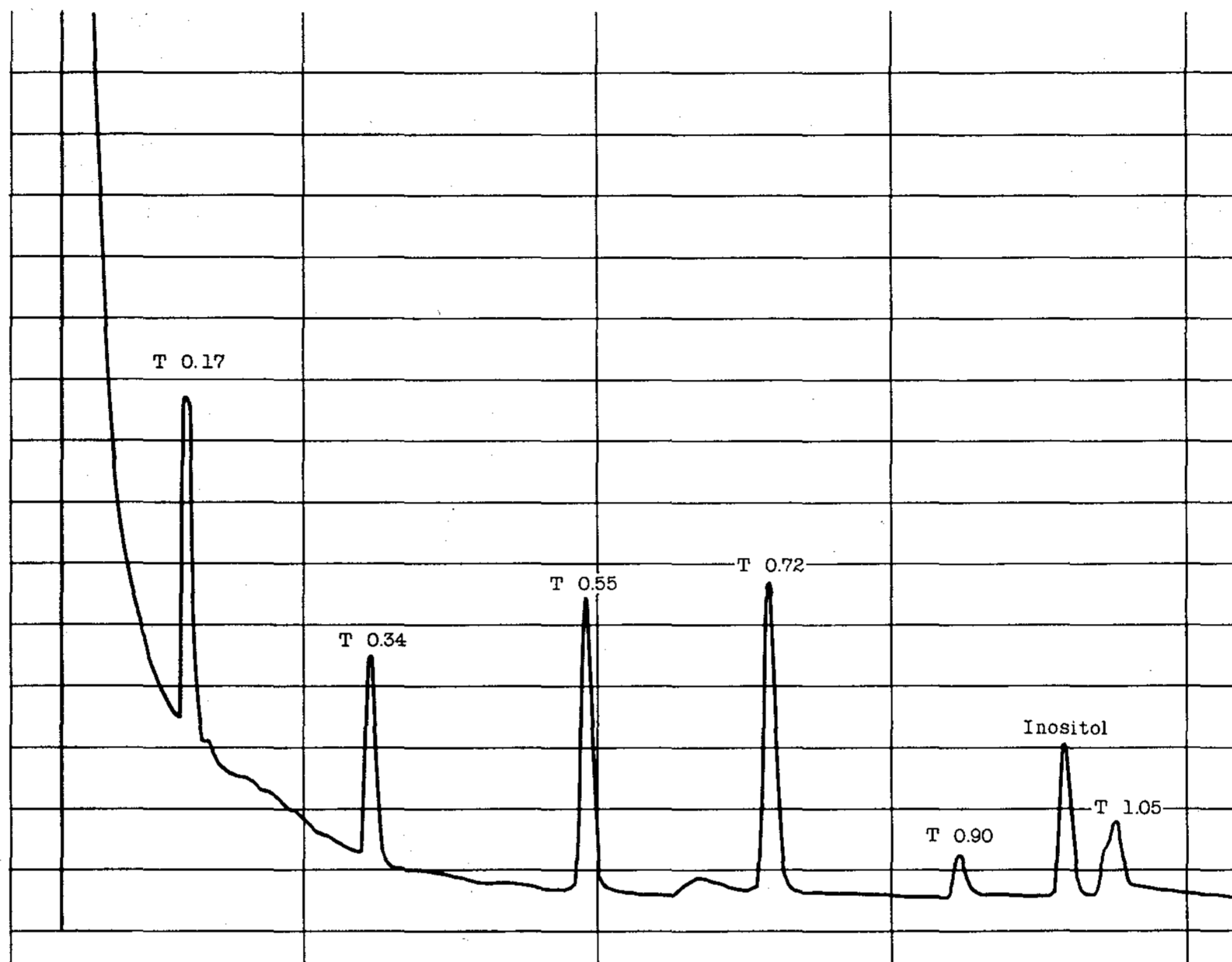
Amino acid	Before treatment (moles/100 moles amino acids)	After treatment (moles/100 moles amino acids)
Asp	13.9	13.7
Glu	10.4	9.9
Pro	6.8	6.4
Gly	13.3	17.3
Cys	1.8	1.8
Val	6.0	6.3
Ile	5.1	5.0
Leu	8.3	7.9
Tyr	3.7	3.9
Ser	12.8	4.9
Thr	7.2	2.9
Ala	10.6	18.3
α-amino butyric acid		1.6

alanine に変わり, また threonine が α-amino butyric acid に変わった事を示すものである。このことから, この物質の糖-peptide 結合に関与するアミノ酸は serine と threonine であることが証明された。

次に, この2種類のアミノ酸 (serine と threonine) の水酸基とアルカリに不安定な O-glycoside 結合をしている糖の種類を決定するために, 還元剤として NaBD₄ を用い, アルカリ還元処理を行った。この処理によって糖-peptide 結合は切断され, アミノ酸に結合していた糖は還元末端糖として遊離するので, この糖だけが共存する NaBD₄ により, C-1 に deuterium の導入された alditol (1-d) に変わる筈であり, 一方, アミノ酸との結合に関与していなかった糖は水解により, 遊離の aldose となる筈である。この aldose と alditol を分離するために Yamaguchi・ら⁷⁾の方法を用いた。

Yamaguchi・ら⁷⁾はカルボニル基を持つ aldose は OH⁻型の強塩基性の樹脂のカラムに吸着するが, カルボニル基を持たない alditol はこの樹脂に吸着しないことを利用して両者を分離することを報告している。

図 VI 分画 I のアルカリ還元処理後における alditol (1-d) の検出



分画 I → NaOH-NaBD₄ 処理 → Dowex 1 (OH⁻) → 素通り分画 → TMS 化 → g. l. c.

そこで、アルカリ還元処理を施した試料を水解 (1 N HCl 100°C 4時間) して、OH⁻ 型の Dowex 1 のカラムにかけ、その素通り分画を N-アセチル化した後、TMS 誘導体に変え、g. l. c.-m. s. で分析した。結果は図 VI に示す如く 6 つのピークが検出された。またこれらの質量分析の結果を表 IV に示した。

まず、R. R. T. 0.17 のピークからは最高イオンとして m/e 293 (M⁺-15) と、その他 primary fragment として、m/e 103 および 205 のイオンが得られることから、deuterium では還元されていない glycerol であると同定された。これは本菌の細胞壁に存在する glycerol teichoic acid に由来する夾雑物であると思われる。

次の R. R. T. 0.34 のピークからは図 VII に示す如く、最高イオンとして m/e 396 (M⁺-15)、その他 primary fragment として m/e 103, 104, 205, 206, 307 および 308 のイオンが検出された。これらのうち m/e 104, 206 および 308 は deuterium 効果を示すイオンである。このことから、このピークは C-1 に deuterium の導

入された tetrose であることが判明した。

また、R. R. T. 0.55, R. R. T. 0.72, R. R. T. 1.05 の各ピークからは m/e 204 (TMSOCH=CHOSMT)⁺ のイオンが非常に高い強度で検出された。このイオンはリング構造の糖に特徴的なものであって、鎖状構造の alditol からは検出されないイオンである。従って、これらのピークはカラムから溶出された未知の aldose であることが判った。カラムに吸着されないこれら微量の aldose は分画 I に含まれる夾雑物と思われるがその起源と種類については不明である。

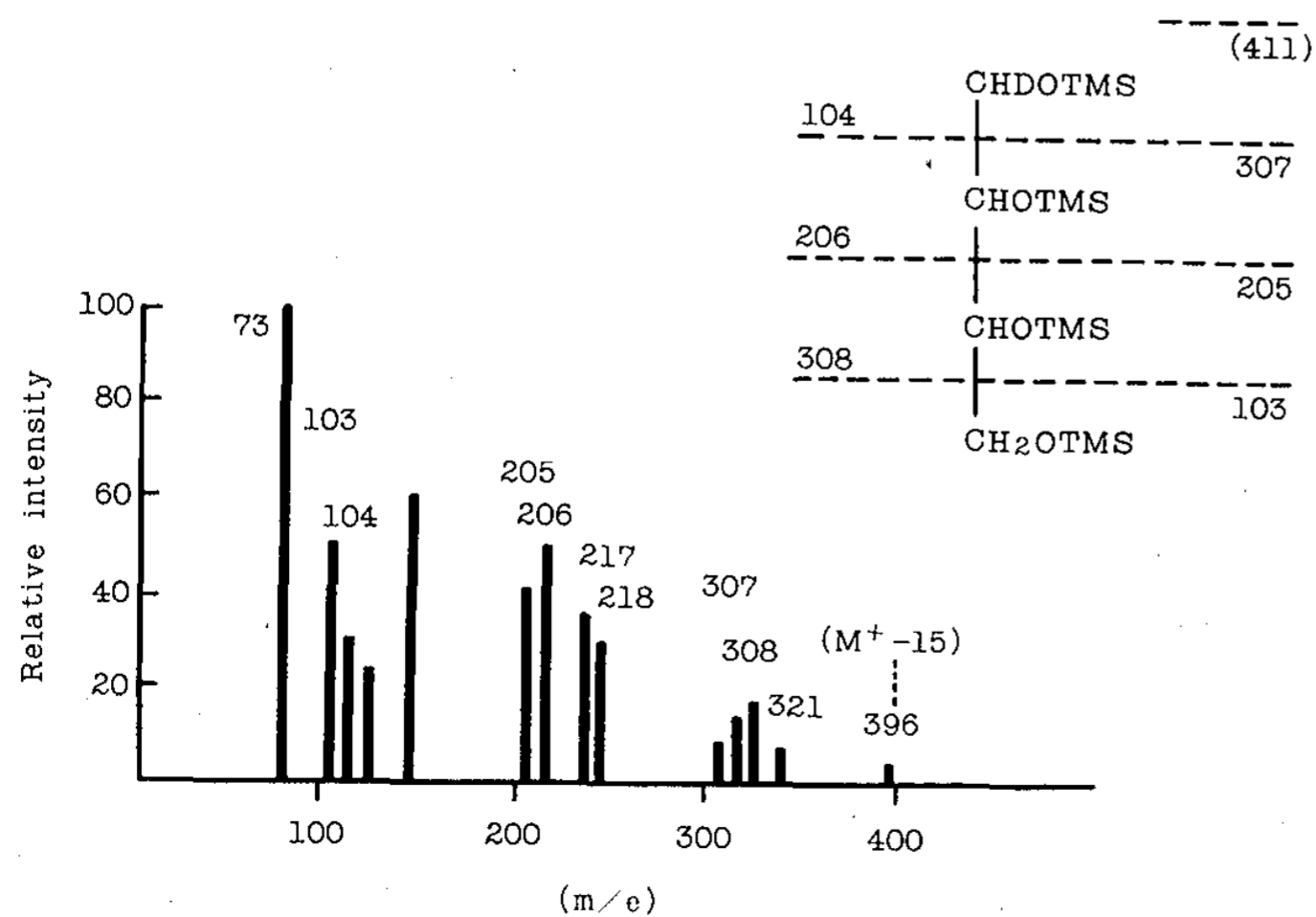
また、R. R. T. 0.90 のピークからは m/e 173 (TMSOCH-CHNHCOCH₃)⁺ のイオンが高い強度で検出された。このことから、これはアミノ糖であり、また最高イオンとして m/e 406 (M⁺-15) が得られることから、構成糖の一つ 2-amino-2, 6-dideoxy-hexose であると同定された。

以上の結果から、serine, threonine の水酸基とアルカリに不安定な O-glycoside 結合している糖は tetrose, すなわち, erythrose か threose の何れかであることが証明された。

表 IV 図 VI で得られた各ピークの質量分析

R. R. T. 0.17		R. R. T. 0.72	
m/e	Relative intensity (%)	m/e	Relative intensity (%)
73	100.0	73	100.0
103	34.8	103	10.2
117	38.0	129	21.0
147	55.0	147	30.8
205	6.6	204	66.2
218	12.9	217	21.2
293	2.0	305	21.2
		317	5.8
		333	22.0
R. R. T. 0.34		R. R. T. 0.90	
m/e	Relative intensity (%)	m/e	Relative intensity (%)
73	100.0	73	100.0
103	51.9	103	8.1
104	25.7	129	44.0
117	24.7	131	87.4
205	41.6	144	11.9
206	49.4	173	90.3
217	35.3	186	21.2
218	25.4	204	12.1
307	13.2	301	7.8
308	18.0	332	7.5
321	3.7	347	0.5
396	0.2	406	0.5
R. R. T. 0.55		R. R. T. 1.05	
m/e	Relative intensity (%)	m/e	Relative intensity (%)
73	100.0	73	40.8
103	6.9	103	18.9
117	35.1	117	11.2
147	35.0	130	14.3
161	48.1	147	12.2
204	68.1	204	100.0
244	6.6	217	18.4
		305	1.7
		319	3.1

図 VII 図 VI における R. R. T. 0.34 のピークの質量分析



考 察

以上の如く Eubacterium sp. S-1 株が細胞表層に産生する不溶性多糖は一種の proteoglycan であることが証明された。

この株が産生する不溶性多糖と既に Kondo・ら³⁾が報告している水溶性多糖の糖組成を比較してみると、アミノ糖の組成は同一であったが、中性糖の組成には違いが認められた。即ち、不溶性多糖に含まれる中性糖は glucose だけであるが、水溶性多糖には glucose と mannose が 3:1 の比率で含まれていた。このことは、この菌

の不溶性多糖が水溶性多糖に変わる場合、それに mannose の附加されることが一つの要件になっていることを示唆する事実であるかも知れない。

またこの実験で示された如く、この不溶性多糖が pronase によって可溶化されず、それよりも消化作用の劣る papain によって可溶化されるのは反応系に加えられた cystein-HCl と EDTA が唯単にこの酵素の activator として働いているだけでなく、菌体の細胞壁表層に結合しているこの物質の -S-S- 結合を切断したり、あるいはこれが取込んでいるかもしれない Ca を除去することによってその構造を開裂させ、蛋白消化酵素の作用を受け易くしているものと考えられる。

次に、この物質は pH 2.4 という酸性条件において陽極側へ移動する酸性物質であることが明らかになったが、この物質に陰性荷電を与えている酸性物質の本態についてはまだ明らかにされていない。ただ、この物質にはウロン酸、シアル酸、硫酸基やリン酸基が証明されないことから、その酸性物質は恐らく、カルボン酸であろうと推定している。

次に、この物質の糖鎖部分の組成についてであるが表 II に示した如く、3種類の構成糖 (glucose, glucosamine, 2-amino-2,6-dideoxyhexose) とまだその本態の明らかにされていない酸性物質が含まれており、これを加えると4種類の構成成分から成ることが明らかになった。

現在まで発見されている動物由来の proteoglycan はいずれも2糖単位の反覆構造から成る多糖である。たとえば、コンドロイチン4硫酸、コンドロイチン6硫酸、ヘパリンの場合には hexosamine (-4-sulfate ないしは -6-sulfate) と hexuronic acid の反覆単位で構成されており、またケラタン硫酸では hexosamine-4-sulfate と galactose の反覆単位によって構成されている。S-1 株の産生する不溶性多糖の糖鎖部分の結合様式については、現在まだ明らかにされていないけれども、これまでに、少なくとも3種類の糖で構成される糖鎖を持つ proteoglycan の報告はなく、恐らく、この物質は新しいタイプの proteoglycan であろうと思われる。

次に、糖蛋白における糖-peptide の結合様式に関して Tanaka・ら⁸⁾ がヒツジの顎下腺ムチンでアルカリに不安定な O-glycoside 結合の存在を明らかにして以来、この結合様式は多くの proteoglycan の結合部位に見いだされて来た。即ち、コンドロイチン4硫酸⁹⁾¹⁰⁾¹¹⁾¹²⁾、デルマタン硫酸¹³⁾、ヘパリン¹⁴⁾¹⁵⁾の場合、何れも serine の水酸基を介して xylose が O-glycoside 結合しており、また軟骨のケラタン硫酸¹⁶⁾では N-acetylglucosamine が serine および threonine と O-glycoside 結合していることが明らかにされている。即ち、上記のオキシアミノ酸の水酸基に結合している糖は炭素数5つの xylose、あるいは炭素数6つの N-acetylglucosamine である。これに対して S-1 株の産生する proteoglycan の場合には炭素数4つの tetrose が serine と threonine の水酸基とアルカリに不安定な O-glycoside 結合していることが明らかにされた。この様に、tetrose が proteoglycan の糖-peptide 結合に関与しているという報告はこれが最初であり、また自然界に tetrose が存在するというのも非常に珍しいことである。

また、これまで細菌が産生するムコ多糖としては、Bacillus subtilis の細胞壁に存在する teichuronic acid¹⁷⁾¹⁸⁾ (D-galactosamine と D-glucuronic acid から成る)、Escherichia coli の培養上清から分離された colominic acid¹⁹⁾ (N-acetylneuraminic acid のポリマー)、それから Streptococcus²⁰⁾ や Pasteurella²¹⁾ によって産生される hyaluronic acid (N-acetylglucosamine と D-glucuronic acid から成る) が知られている。しかし、teichuronic acid や colominic acid の場合、蛋白の存在は報告されておらず、従って、これらのムコ多糖が蛋白と結合した proteoglycan として存在しているかどうかについては現在まだ明らかにされていない。また細菌性の hyaluronic acid についてもその糖鎖が peptide と結合しているという報告はない。この報告は Eubacterium sp. S-1 株の産生する不溶性多糖が proteoglycan であることを証明し、またその糖-peptide の結合様式を明らか

にしたものであって、細菌性の proteoglycan としては最初の報告である。

次に、この物質の分子量についてであるが、表 III に示した如く、中性糖含量で 10 mg の出発材料にアルカリ還元処理を施し、 β -脱離反応で減少した serine と threonine の含量を測定すると、その総量は $11.0 \mu\text{g}$ ($0.12 \mu\text{M}$) であった。この場合、この減少した serine と threonine には全て糖鎖が結合していたと考えられるので、これらのオキシアミノ酸 1 ケにどれだけの糖が結合しているかを上記の結果から計算してみると、減少したオキシアミノ酸 1 モルに対して、glucose が 460 モル、glucosamine が 180 モル、2-amino-2,6-dideoxy-hexose が 230 モル結合していることになる。これらが全て直鎖構造をとっていると仮定すると 1 ケのオキシアミノ酸に結合している糖鎖の分子量は約 160,000 となり、この物質の分子量は非常に大きいものであると推定される。

最後に、この菌は *Streptococcus mutans* が sucrose を基質として不溶性の glucan を合成するのとは異なり、glucose あるいは maltose を基質とした場合においても、その細胞表層に不溶性の proteoglycan を産生する特徴を持っている。現在、この proteoglycan が歯垢中でどんな役割を果しているかについては判明していないが、この菌はその proteoglycan の持つ酸性基によって直接エナメル質表面の Ca^{2+} と結合するか、あるいはその粘性によって歯表面に粘着するものと考えられる。

またコンドロイチン 4 硫酸が Ca^{2+} と良く結合する能力を持ち、石灰化する際に大きな役割を果すと考えられている²²⁾様に、この proteoglycan もその酸性基によって Ca^{2+} と結合し、歯垢の石灰化になんらかの役割を果しているものと推定される。

結 論

歯垢中から分離された *Eubacterium* sp. S-1 株が glucose を基質として、細胞外に大量の粘性不溶性多糖を合成し、これが papain によって可溶化される酸性の proteoglycan であるこ

とを証明した。また、この proteoglycan の多糖部分は glucose, glucosamine, 2-amino-2,6-dideoxy-hexose, (1.0:0.4:0.5) で構成され、その糖-peptide の結合様式は serine および threonine の水酸基と糖鎖の還元末端に存在する tetrose がアルカリに不安定な O-glycoside 結合をしていることを明らかにした。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った近藤 亘教授に対し衷心より謝意を表し、併せて本実験を行うにあたり種々御指導、御協力を戴いた口腔細菌学教室諸兄に厚く感謝いたします。

文 献

- 1) 近藤 亘, 桶谷修三, 佐藤尚美: 人の歯垢から分離された 沃度可染性線状菌の血清学的分類. 歯基礎誌, **13**: 586-593, 1971.
- 2) 近藤 亘, 佐藤尚美, 柗木弘子, 佐藤ミチ子: 細胞外多糖質を合成する 沃度可染性線状菌について. 歯基礎誌, **14**: 454, 1972.
- 3) Kondo, W., Sato, M. and Sato, N.: The composition of extracellular polysaccharide of *Catenabacterium* strain isolated from human dental plaque. *J. Dent. Res.*, **54**: C102, 1975.
- 4) 近藤 亘, 佐藤ミチ子, 佐藤尚美: 沃度可染性線状菌の産生する細胞外粘性多糖について. 歯基礎誌, **16**: 498, 1974.
- 5) Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., and Smith, F.: Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, **28**: 350-356, 1956.
- 6) Marcus, D. M., Kabat, E. A., and Schiffman, G.: Immunochemical studies on blood groups. XXXI. destruction of blood group A activity by an enzyme from *Clostridium tertium* which deacetylates N-acetyl-galactosamine in intact blood group substances. *Biochem.*, **3**: 437-443, 1964.
- 7) Yamaguchi, H., Inamura, S. and Makino, K.: Studies on a microchemical method for the determination of the degree of

- polymerization of neutral oligo- and polysaccharides: 1, Quantitative separation of trace amounts of alditols from mixtures with a large excess of monosaccharides. *J. Biochem. (Tokyo)*, **79**: 299-303, 1976.
- 8) Tanaka, K., Bertolini, M., and Pigman, W.: Serine and threonine glycosidic linkages in bovine submaxillary mucin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **16**: 403-409, 1964.
- 9) Lindahl, U. and Roden, L.: The chondroitin 4-sulfate-protein linkage. *J. Biol. Chem.*, **241**: 2113-2119, 1966.
- 10) Roden, L. and Smith, R.: Structure of the neutral trisaccharide of the chondroitin 4-sulfate-protein linkage region. *J. Biol. Chem.*, **241**: 5949-5954, 1966.
- 11) Seno, N. and Sekizuka, E.: Quantitative β -elimination-reduction of O-glycosyl linkages in chondroitin sulfates. *Carbohydr. Res.*, **62**: 271-279, 1978.
- 12) Stern, E. L., Lindahl, B. and Roden, L.: The linkage of dermatan sulfate to protein. *J. Biol. Chem.*, **246**: 5707-5715, 1971.
- 13) Bella, A. and Danishefsky, I.: The dermatan sulfate-protein linkage region. *J. Biol. Chem.*, **243**: 2660-2664, 1968.
- 14) Lindahl, U.: The structures of xylosylserine and galactosylxylosylserine from heparin. *Biochim. Biophys. Acta.*, **130**: 361-367, 1966.
- 15) Lindahl, U.: Further characterization of the heparin-protein linkage region. *Biochim. Biophys. Acta.*, **130**: 368-382, 1966.
- 16) Bray, B. A., Lieberman, R. and Meyer, K.: Structure of human skeletal keratosulfate. *J. Biol. Chem.*, **242**: 3373-3380, 1967.
- 17) Janczura, E., Perkins, H. R., and Rogers, H. J.: Isolation of a mucopolysaccharide from cell-wall preparations of *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.*, **74**: 7P-8P, 1960.
- 18) Janczura, E., Perkins, H. R. and Rogers, H. J.: Teichuronic acid: A mucopolysaccharide present in wall preparations from vegetative cells of *Bacillus subtilis*. *Biochem. J.*, **80**: 82-93, 1961.
- 19) Bray, G. T.: Colominic acid, a polymer of N-acetyl-neuraminic acid. *J. Exp. Med.*, **107**: 507-521, 1958.
- 20) Kendall, F. E., Heidelberger, M., and Dawson, M. H.: A serologically inactive polysaccharide elaborated by mucoid strains of group A hemolytic *Streptococcus*. *J. Biol. Chem.*, **118**: 61-69, 1937.
- 21) Cifonelli, J. A., Rebers, P. A., and Heddleston, K. H.: The isolation and characterization of hyaluronic acid from *Pasteurella multocida*. *Carbohydr. Res.*, **14**: 272-276, 1970.
- 22) 桂 暢彦, 塩野正喜: ムコ多糖タンパク複合体の研究. *生化学*, **40**: 492, 1968.