

# ミュータンスレンサ球菌の歯面定着の生物化学的メカニズム

井上 昌一

鹿児島大学歯学部予防歯科学講座

はじめに

主要な齲蝕原因菌であるミュータンスレンサ球菌 (mutans streptococci: 現在7菌種8血清型があるが, “*Streptococcus mutans*” と総称されることがある) は, スクロース (あるいは砂糖) との関わりにおいて, 他の口腔微生物にはみられない特徴的な様態を示す<sup>1-3)</sup>。

すなわち, 構成酵素として保有するグルコシルトランスフェラーゼ (以下GTaseと略す) の作用によってスクロースから菌体外に特異な水溶性および非水溶性のグルカン (グルコース重合体) を合成する。何れも, 自身あるいはその他の口腔細菌の菌体を凝集する活性を有し, それらの歯面への付着 (cell-to-surface adherence) と歯垢への参入と蓄積 (cell-to-cell adherence) を助ける。また, 非水溶性のグルカンは, きわめて粘着性に富み, 細菌細胞の歯面への強固な付着を促す。さらには, 歯面に定着した種々の細菌が糖質代謝の結果排泄した有機酸が唾液中へ拡散するのを妨げるバリアーとしても働き, 歯垢内の酸の蓄積を促進する。このように, ヒトの歯垢マトリックスの構成成分の一つとして存在する<sup>4, 5)</sup>, mutans streptococci が合成するグルカンは, 歯垢の形成と歯質の溶解に密接に関与しており, 現在, この齲蝕原因菌の主要なビルレンス因子は, 菌体外多糖類, ことに粘着性の非水溶性グルカンの合成能に求められている。

本稿では, mutans streptococci の齲蝕原性の発現に深く関わっている粘着性グルカンの合成能, 化学構造, 微細形態および生合成のシステムについて, ヒトの口腔において多勢を占める *Streptococcus mutans* と非水溶性グルカン合成能が高い *Streptococcus sobrinus* の場合を中心に述べる。

## I. Mutans Streptococciの産生するグルカン

Mutans streptococci は, スクロース培地で培養すると菌体外水溶性と菌体結合性アルカリ可溶性のグルカン (ESG, CA-ISG) を, またグルコース培養して得

られた菌体外GTaseをスクロースと反応させると水溶性と非水溶性のグルカン (SG, ISG) を合成する。

### 1. グルカン合成能と一般性状

Mutans streptococci の各菌種はグルカンの合成に明瞭な違いがある<sup>6-10)</sup> (表1)。スクロース寒天平板培地上でのコロニーの形態的特徴が端的に示すように, 菌体外GTaseが合成したグルカン (SGとISGが混在) は, *S. mutans* (*c, e, f*型菌) と *S. rattus* (*b*型菌) では反応液が一様に混濁するのに対して, *S. sobrinus* (*d, g*型菌) と *S. cricetus* (*a*型菌) では顆粒状に凝集して管底に沈殿する傾向にある。これに対応して, 前者に比べて, 後者では水に不溶性の画分 (CA-ISGおよびISG) の合成量の割合が高く, 斜めに保った試験管のガラス壁に強固に粘着するグルカン (主にISG) の量も極めて多い。

生物化学的性状<sup>10-13)</sup>においても (表2), *S. sobrinus* の産生するISGは, *S. mutans* のものに比べて, 高分子量画分を多く含み, 固有粘度が高く, エンド- $\alpha$ -1, 3グルカナーゼ (ムタナーゼ) 感受性は高く, “*S. mutans*” 菌体凝集活性は低い。一方, SGの性状の多くは, 両菌種間にそれほど明瞭な違いがないが, *S. sobrinus* のSGはエンド- $\alpha$ -1, 6グルカナーゼ (デキストラナーゼ) 感受性および “*S. mutans*” 菌体凝集価が低い傾向がある。*S. cricetus* が産生するグルカンは殆どの性状が *S. sobrinus* のものに, *S. rattus* のグルカンは *S. mutans* のものに類似するが, ときにこれを外れる場合がある。

また, グルカナーゼ感受性<sup>9, 14-17)</sup> (表2) や化学結合分析<sup>10)</sup> (表3) の結果が示すように, 水に可溶性のグルカン (ESG, SG) は,  $\alpha$ -1, 6グルコシド結合を主体に,  $\alpha$ -1, 3結合を含み, 水に不溶性のもの (CA-ISG, ISG) は, 主に  $\alpha$ -1, 3結合から構成されている。何れもかなりの  $\alpha$ -1, 3, 6分枝を含む。ESGとSGで分岐度が高い傾向にある。

表1 Mutans Streptococciの各菌種のグルカン合成能

菌種 血清型	菌 株	グルカン合成量 (比)		菌体外GTaseによって合成された	
		スクロース培養時の CA-ISG/ESG <sup>*1</sup>	菌体外GTaseによる ISG/SG <sup>*2</sup>	壁付着グルカン量 <sup>*2</sup> (mg/ml)	全グルカン液の 肉眼像 <sup>*2</sup>
<i>S. mutans</i>					
<i>c</i>	OMZ 70	0.83	0.47	0.01	均一混濁
	Ingbritt	0.44	0.27	—	〃
<i>e</i>	B 14	0.33	0.21	0.04	均一混濁
	LM 7	0.67	0.43	—	〃
<i>f</i>	OMZ 175	0.36	0.17	0.02	均一混濁
	MT 3940	1.00	0.08	—	〃
<i>S. rattus</i>					
<i>b</i>	BHT	1.50	0.39	0.02	均一混濁
	FA-1	1.10	0.08	—	〃
<i>S. sobrinus</i>					
<i>d</i>	OMZ 176	2.50	1.10	5.11	顆粒状
	P 1	—	2.80	—	〃
<i>g</i>	AHT	5.50	2.00	5.97	顆粒状
	6715	5.10	1.50	—	〃
	K1-R	9.20	3.10	—	〃
<i>S. cricetus</i>					
<i>a</i>	HS-6	3.50	2.00	4.86	顆粒状
	HS-1	1.20	5.90	—	〃

\*<sup>1</sup>: スクロース培養時の合成: CA-ISG (菌体結合性・アルカリ可溶性画分), ESG (菌体外水溶性画分)<sup>8, 9)</sup>

\*<sup>2</sup>: 菌体外GTaseによる合成: ISG (非水溶性画分), SG (水溶性画分)<sup>10)</sup>

表2 菌体外GTaseによって合成された水溶性および非水溶性グルカンの物理化学的性状\*

菌種 血清型	菌 株	非水溶性グルカン (ISG)					水溶性グルカン (SG)				
		グルカナーゼ感受性**		固有感度 ( $\eta$ )	分子量分布 (Mw>30万) (%)	“ <i>S. mutans</i> ” 菌体凝集力 (相対度)	グルカナーゼ感受性**		固有感度 ( $\eta$ )	分子量分布 (Mw>30万) (%)	“ <i>S. mutans</i> ” 菌体凝集力 (相対度)
		エンド-1, 6- グルカナーゼ	エンド-1, 3- グルカナーゼ				エンド-1, 6- グルカナーゼ	エンド-1, 3- グルカナーゼ			
<i>S. mutans</i>											
<i>c</i>	OMZ 70	高	低	1.42	67.6	強	高	非	0.27	22.6	強
	<i>e</i>	B 14	高	低	1.38	60.2	強	高	非	0.50	34.7
<i>f</i>	OMZ 175	高	低	1.42	49.4	強	高	非	0.85	49.9	強
<i>S. rattus</i>											
<i>b</i>	BHT	高	低	2.33	82.1	強	高	非	0.54	66.5	強
<i>S. sobrinus</i>											
<i>d</i>	OMZ 176	低	高	2.12	85.7	弱	低	非	0.08	3.6	弱
<i>g</i>	AHT	低	高	3.88	96.2	弱	低	非	1.10	30.5	弱
<i>S. cricetus</i>											
<i>a</i>	HS-1	低	低	1.93	77.6	強	高	非	0.70	22.2	弱

\*: Yakushiji, Inoue & Koga<sup>10)</sup>

\*\* : ISGあるいはSGのそれぞれにおける相対度

SGには、各グルコシド結合含量の構成にも各菌種間に明確な差はない。一方、ISGの $\alpha$ -1, 3結合含量は*S. sobrinus*のほか*S. mutans* (特に*c*型菌) や*S. rattus*のものでも高い。一般に、*S. mutans*と*S. rattus*のISGは $\alpha$ -1, 6結合含量も高く、*S. cricetus*のものは他になく

$\alpha$ -1, 3, 6分岐に富む。また、 $\alpha$ -1, 6に対する $\alpha$ -1, 3結合残基量の比率は、*S. sobrinus*のISGは総じて高く、*S. mutans*など他の3菌種のものでは全て低い。

表3 菌体外粗GTaseによって合成されたグルカンのグルコシド結合分析\*

菌種血清型	菌株	O-methyl-D-glucose (モル%)									
		非水溶性グルカン (ISG)					水溶性グルカン (SG)				
		2,4,6-トリ-	2,3,4-トリ-	2,4-ジ-	2,3,4,6-テトラ-	2,4,6-/2,3,4-比	2,4,6-トリ-	2,3,4-トリ-	2,4-ジ-	2,3,4,6-テトラ-	2,4,6-/2,3,4-比
<i>S. mutans</i>											
<i>c</i>	OMZ70	57	31	5	8	1.82	3	63	13	20	0.05
	Ingbritt	46	36	6	12	1.27	6	58	17	20	0.10
<i>e</i>	B14	27	47	15	11	0.58	5	57	16	22	0.08
	P4	26	41	11	22	0.63	11	54	18	17	0.20
<i>f</i>	OMZ175	35	41	9	14	0.85	17	53	12	19	0.32
	MT3940	60	26	6	7	2.32	19	49	10	23	0.38
<i>S. rattus</i>											
<i>b</i>	BHT	41	40	9	10	1.05	10	58	15	18	0.17
	FA1	56	34	2	8	1.63	1	63	16	21	0.01
<i>S. sobrinus</i>											
<i>d</i>	OMZ176	61	15	12	12	4.03	4	76	7	13	0.05
	P1	48	16	16	20	2.98	17	48	16	19	0.36
<i>g</i>	AHT	55	15	14	16	3.55	9	58	15	19	0.15
	6715	66	15	8	11	4.53	15	34	18	33	0.43
<i>S. cricetus</i>											
<i>a</i>	HS1	41	15	22	23	2.83	1	51	22	26	0.02
	FIL	26	24	20	30	1.06	2	60	15	22	0.04

\*: Yakushiji, Inoue & Koga<sup>10)</sup>

表4 *S. sobrinus* AHT (*g*型) 株のGTaseによってデキストラナーゼあるいは低分子デキストランの存在下に合成されたISGの性状\*

ISG合成時の添加物	合成量 (相対度) %	付着量 (相対度) %	スミス分解 (グルコース) mol %	固有粘度 $\eta$	分子量分布 (Mw>30万) (%)	" <i>S. mutans</i> " 菌体凝集価 希釈倍数
なし	100	100	55-66	1.3-2.5	72-91	16-64
Dextranase (180 mU/ml)	40	8	87-91	0.4-0.7	16-20	- 1
Dextran T20 (13.4 mg/ml)	25	9	47-56	0.3-0.5	43-54	512-

\*: Koga & Inoue<sup>27)</sup>, Sato *et al.*<sup>28)</sup>

## 2. グルカンの化学構造

Mutans streptococciの産生するグルカンの二次構造は、*S. sobrinus*, ことにOMZ 176株のSGとISGについて<sup>18, 19)</sup>, 詳細な検討がなされている。

### 1) 水溶性グルカン

*S. sobrinus*など各菌種のスクロース培養菌あるいは菌体外GTaseによって合成された水溶性グルカン (ESGとSG)<sup>6, 17)</sup>あるいは代表菌株の精製GTase-Sが合成する水溶性のisozyme-SG<sup>18-21)</sup> (表5参照)は、主に $\alpha$ -1, 6グルコシド結合からなり (約50%~), エンド型デキストラナーゼに分解されるがエキソ型デキストラナーゼの作用は受けない (表2, 3)。これらを基に, *S. sobrinus* OMZ 176 (*d*型) 株などのmutans streptococciのSGは,  $\alpha$ -1, 6結合直鎖を主鎖とし, そのかなりの

グルコース残基 (約半数あるいはそれ以下) から短い $\alpha$ -1, 3結合側鎖が分岐していると推定されている (図1-A)。

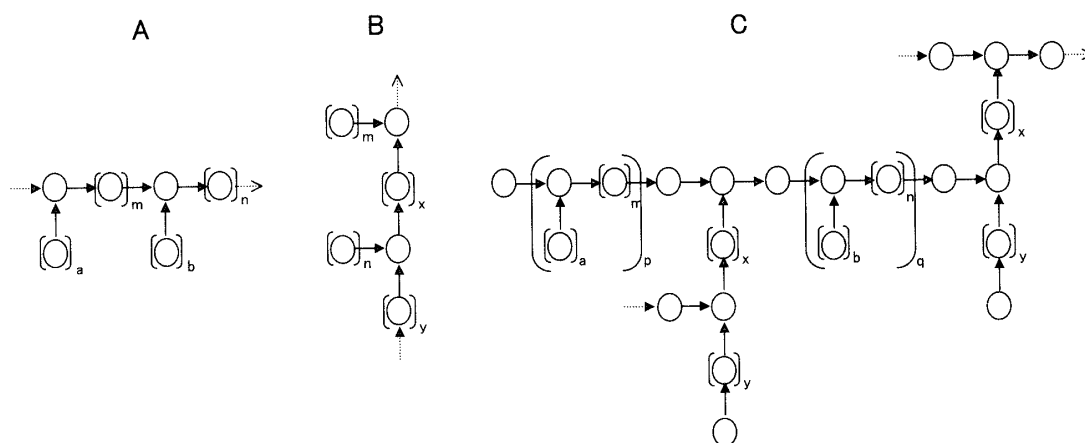
### 2) 非水溶性グルカン

一方, OMZ 176株の菌体外GTaseによって合成されたISGは,  $\alpha$ -1, 3結合グルコース残基 (61モル%)を主体にして $\alpha$ -1, 6結合残基 (15%)を含む分枝型グルカンである ( $\alpha$ -1, 3, 6分枝結合と $\alpha$ -1, 末端は各12%;表3)。その緩和スミス分解後にも残る (約6割強) 水になお不溶の部分は, エンド型ムタナーゼによく分解され, ほとんどが $\alpha$ -1, 3グルコシド結合 (95%) からなることから, 分枝にあずからない $\alpha$ -1, 3結合グルコース残基は比較的長い直鎖を形成して存在する。エンド型デキストラナーゼ存在下に合成させ

表5 *S. sobrinus* OMZ176 (*d*型) 株のGTase標品によって合成された非水溶性および水溶性グルカンのグルコシド結合分析

グルカン標品	(用いた酵素標品の標記号) (量比)	O-メチル-D-グルコース (モル%)				
		2,4,6-トリ-	2,3,4-トリ-	2,4-ジ-	2,3,4,6-テトラ-	2,4,6-/2,3,4-比
粗GTaseが合成した非水溶性グルカン						
ISG* <sup>1</sup>	(crude GTase)	51	21	14	15	2.43
ISG* <sup>2</sup>	(CEF)	57	18	10	15	3.17
ISG* <sup>3</sup>	(crude GTase)	61	15	12	12	4.07
GTase-Sが合成した水溶性グルカン						
isozyme-SG* <sup>2</sup>	(GTF-S)	0	31	32	37	<0.01
isozyme-SG* <sup>3</sup>	(GTase-S)	28	56	5	12	0.50
GTase-Iが合成した非水溶性グルカン						
isozyme-ISG* <sup>2</sup>	(GTF-I)	88	7	1	4	12.7
isozyme-ISG* <sup>3</sup>	(GTase-I)	90	4	2	4	22.5
Dextranaseで修飾した非水溶性グルカン						
dextranase-modified ISG* <sup>1</sup>		95	2	2	2	47.5
GTase-SとGTase-Iが協同して合成した非水溶性グルカン						
isozyme-SG/-ISG* <sup>4</sup>	S/I : 0.6	73	19	4	4	3.93
isozyme-SG/-ISG* <sup>4</sup>	S/I : 1.5	66	27	2	6	2.47
isozyme-SG* <sup>4</sup>	S/I : ∞	29	55	5	11	0.53
isozyme-ISG* <sup>4</sup>	S/I : 0	92	2	2	4	57.8

\*<sup>1</sup>: Ebisu *et al.*<sup>18)</sup> \*<sup>2</sup>: Hare, Svensson & Walker<sup>19)</sup> \*<sup>3</sup>: Koga *et al.*<sup>21)</sup> \*<sup>4</sup>: Inoue & Yakushiji<sup>30)</sup>

図1 *Mutans streptococci*の産生する水溶液および非水溶性グルカンの推定化学構造

- A: 水溶性グルカン (SG) の基本構造  
 B: 非水溶性グルカン (ISG) の櫛状構造 (Ebisuら<sup>18)</sup> より改変)  
*S. sobrinus* OMZ176 (*d*型) 株では  $x+y=7$ ,  $m+n=3$ ,  $m=0\sim3$   
 C: 非水溶性グルカン (ISG) の樹状構造 (Hareら<sup>19)</sup> より改変)  
*S. sobrinus* (*d*, *g*型) 菌では  $x+y \geq p+q$ ,  $m, n=1$   
 ↑:  $\alpha$ -1, 3 グルコシド結合      →:  $\alpha$ -1, 6 グルコシド結合

た水に不溶のISG画分あるいは単離されたGTase-Iが合成するisozyme-ISGはいずれも、 $\alpha$ -1, 3結合よりなること (87~95%; 表4, 5参照) もこれを支持する。さらに、エキソ型およびエンド型デキストラナーゼによってほとんど分解されないこと、僅かに生じた少量

の分解産物に $\alpha$ -1, 6結合に加えて $\alpha$ -1, 3結合が存在することから、 $\alpha$ -1, 6結合鎖が3位の炭素から枝分れしていると思われる。

これらの成績から、*S. sobrinus* OMZ 176株の産生するISGは、 $\alpha$ -1, 3結合したグルコース残基の直鎖を骨

格（主鎖）とし、その一部のグルコース残基の6位の炭素から比較的短い $\alpha$ -1, 6結合した側鎖が高度に分枝する「櫛状構造」<sup>18)</sup>、あるいは、長めの $\alpha$ -1, 3結合直鎖と比較的短い $\alpha$ -1, 6結合直鎖が、 $\alpha$ -1, 3, 6分岐を介して次々に枝別れしている「樹状構造」<sup>19)</sup>をとるものと想定されている（図1-B, -C）。

この菌株のISGについて導かれた二次構造（図1-C）を基に、メチル化分析の成績<sup>10)</sup>（表3）から推定すると、*S. sobrinus*のISGは $\alpha$ -1, 3結合鎖が $\alpha$ -1, 6結合鎖に比べて比較的長く（ $x+y/p+q$ 比=3.0~4.5）、*S. mutans*のものでは両鎖の長さの差は縮まり（*c*型菌で1.3~1.8）、しばしばほぼ同じか短い（*e*, *f*型菌で0.6~0.9）。*S. cricetus*と*S. rattus*のもの（1.1~1.6）は一部の場合（2.7）を除き*S. mutans*（*c*型菌）に近い。

## II. グルカンの微細形態

スクロース培養すると、*mutans streptococci*の菌体は試験管壁や培養液に浸漬したエナメル小片の表面に付着する。走査型電子顕微鏡下に観察すると、増殖菌体が、自身が産生したグルカンと思われる水糊状の夾膜様物質に埋没したり、交錯する太さ不定の帯状・糸状物の網目によって互いに連結されて付着しているのがみられる<sup>16)</sup>。また、グルカンは、大小の回転楕円体様の粒状物が数珠様に連なる様相（beaded fiber）を呈するという。

### 1. “globular, fibrillar, amorphous particle” グルカン

透過型電子顕微鏡下に観察すると、スクロース培養した*S. sobrinus*や*S. mutans*の産生するグルカンには、形態の異なる3種の構造物がみられる<sup>14, 22, 23)</sup>。1つは一般に均一無構造の“globular（球状）”の形態を示すもの、第2は幅約2nmの“原繊維”が2本平行しているかのように観察される“fibrillar（繊維状）”のもの、第3は高度に濃染性の“amorphous particle（不定形の微小粒状）”のものである。

このうち、“globular”グルカンはデキストラナーゼにより分解され、またガラス壁付着能を失った突然変異株の産生するグルカンはこの形態の水溶性のもののみであった<sup>25, 26)</sup>ことから、“globular”グルカンは主に $\alpha$ -1, 6結合からなり、一方“fibrillar”グルカンは $\alpha$ -1, 3結合が主体の非水溶性のものであると推定されている。

### 2. 2種類の繊維状グルカン

グルコース培養した*S. sobrinus* AHTの菌体細胞（菌

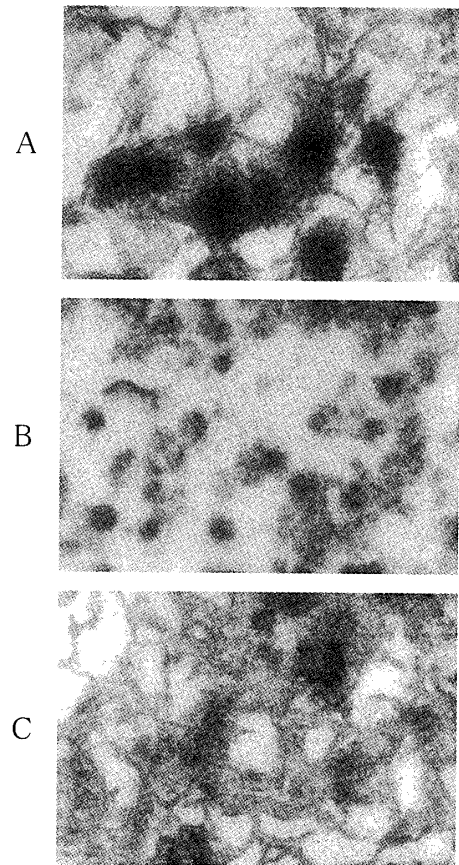


図2 *S. sobrinus* AHT (*g*型) 株の菌体外粗GTaseによって合成された非水溶性および水溶性グルカンの微細形態<sup>25)</sup>

- A：全グルカン。2種類の繊維状グルカンが存在する。1つは周囲に短い突出繊維をもつ、常に平行している2本鎖状繊維、他は1本鎖細繊維である。（図3-A, -B参照）
- B：水溶性グルカン画分（SG）。Aに認められたのと基本的に同じ1本鎖細繊維のみからなる。多くは互いに交叉して細かい網目構造を形成している。星芒様の濃染部分は、エタノール沈殿操作に伴い、この繊維が密に集合した塊と思われる。（図5-B参照）
- C：非水溶性グルカン画分（ISG）。Aに示したのと同じ形態の特徴をもつ2種類の繊維状グルカンが存在する。粘着性ISG。  
ルテニウム・レッド染色 ×2万倍

体結合性GTaseを有する）あるいは菌体外GTaseをスクロースと反応させると、“globular”と“fibrillar”なものに相当する2種類の繊維状構造物が、透過型電子顕微鏡下に観察される<sup>24, 25)</sup>（図2-A, 図3）。（なお、“amorphous particle”<sup>14, 23)</sup>に相当すると思われる構造物は特定できていない）。

1つは、ISGに固有のもので、濃染性の2本の“骨格繊維”が平行して走る像を示し、その周囲からは綿毛様の短い繊維が突出している（図2-C, 3-A, -B）。

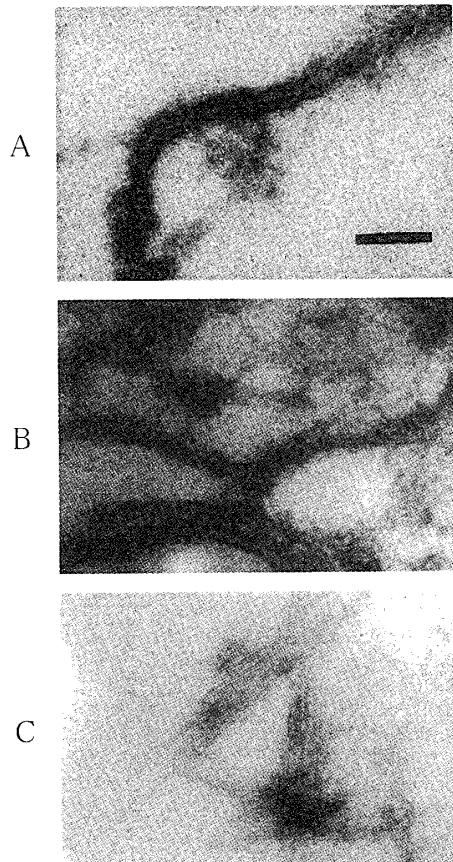


図3 *S. sobrinus* AHT (*g*型) 株の菌体結合性GTaseによって合成されたグルカンの強拡大図<sup>24)</sup>

- A: 2本鎖状繊維の強拡大。常に平行して走る2本の原繊維からなり、原繊維の周囲から短い綿毛様繊維が突出している。原繊維の幅は約4nm, 2本鎖全体の厚みは12nm。スケール: 0.05  $\mu$ m
- B: 2本鎖状繊維とは離れて1本鎖細繊維のみが個別に存在している。2本鎖状繊維の周辺突出繊維あるいは1本鎖細繊維が菌体表層“fuzzy coat”と結合していることにも注目。
- C: デキストラナーゼ存在下に合成されたグルカン。2本鎖状繊維は周囲の綿毛様突出繊維を失い、骨格繊維(幅は約2.5nm)のみが認められる。1本鎖細繊維とその網目構造物は存在しない。(図5-A参照) ルテニウム・レッド染色

1本の繊維の幅は約4nm, 2本鎖全体の厚みは12nmである。2本の骨格繊維は、ほぼ等間隔で平行配列しており交叉による差はないことから、1本の糖鎖が周密なラセン状をなしており、見掛け上は2本鎖様を示すものと推察される。“fibrillar”グルカンと基本的に同じ形態である。

他の1つは、淡染性の1本鎖の細繊維(幅は約2nm)で、通常は互いに交叉して細かな網目状の構造を示す(図3-B)。また、この細繊維とその網目構造物は隣在の2本鎖状繊維とからみ合い、粗な網状の凝集塊を

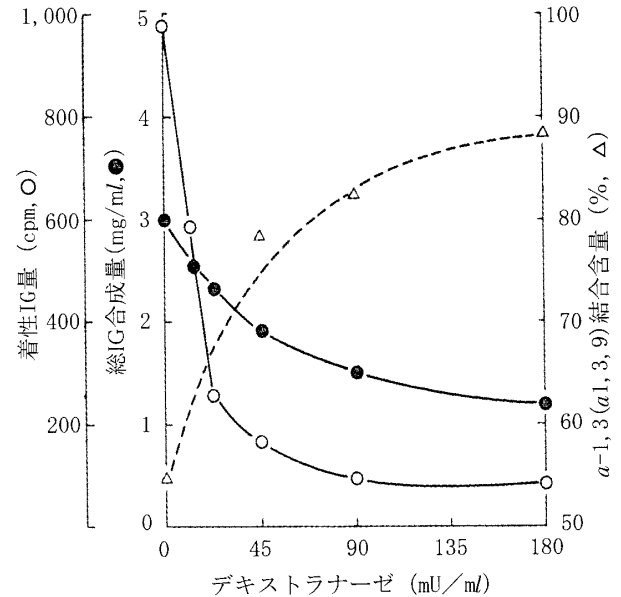


図4 エンド型デキストラナーゼの共存下における *S. sobrinus* AHT (*g*型) 株の菌体外GTaseによる粘着性非水溶性グルカンの合成抑制<sup>27)</sup>  
5%スクロース, 0.1Mリン酸緩衝液pH6.0, 37°C 18時間

形成している。“globular”グルカンに相当する。

一方、SGは、ISGにみられるのと同じ形態の1本鎖細繊維のみからなる(図2-B)。互いにかみ合って微細な網目を形成しており、ときに密集してルテニウムレッド濃染性の星芒状の塊を形成している。水溶性グルカンのみを合成するGTase-Sが合成したisozyme-SGも、同じ形態の1本鎖細繊維のみからなる(図5参照)。

ところで、ISGには、2本鎖状繊維構造が多量に局在する部位と1本鎖細繊維構造が支配的である部位とがみられ、必ずしも全視野にわたって均質な構造物が均等に分布していない<sup>25)</sup>(図2-B)。事実、粗GTaseによって合成されたISG画分からさらに水に可溶性の副画分が得られることがあり、またCA-ISGは分子量の異なるいくつかの副画分に分けられる<sup>8, 26)</sup>。したがって、mutans streptococciの合成する非水溶性グルカン画分は、 $\alpha$ -1, 3結合で連なるグルコース残基の直鎖から $\alpha$ -1, 6結合の分岐鎖をもつ(2本鎖状繊維を示す)ものと、 $\alpha$ -1, 6結合で連なる直鎖から $\alpha$ -1, 3結合の分岐鎖をもつ(1本鎖細繊維状を示す)ものとの、化学構造の異なる2種類の分子が混在するものと考えられる。

### 3. 繊維状グルカン成分の機能

菌体外GTaseにより合成されるISGのガラス壁への

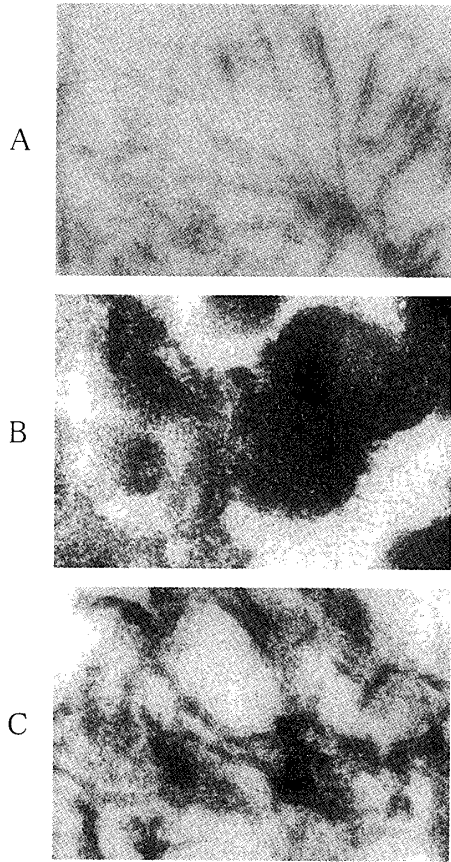


図5 *S. sobrinus* OMZ176 (*d*型) 株のGTase-IおよびGTase-Sによって合成されたグルカンの微細形態<sup>30)</sup>  
 A: GTase-Iによって合成されたisozyme-ISG。周囲に突出物のない2本鎖を示す骨格繊維のみからなる。非水溶性、粘着性を欠く。(図3-C参照)  
 B: GTase-Sによって合成されたisozyme-SG。きわめて密な集合塊を形成していて鮮明ではないが、1本鎖繊維のみからなる。(図2-B参照)  
 C: GTase-IおよびGTase-Sの相互作用によって合成された粘着性非水溶性グルカン。2本鎖状繊維は短い周辺突出小繊維を回復し、1本鎖繊維と絡み合っている。(図2-A, -C参照)  
 アルカリ・ピスマス染色 ×5万倍

付着(表1参照)は、ムタナーゼ<sup>12)</sup>あるいはデキストラナーゼ<sup>27)</sup>の共存によって抑制される。*S. sobrinus* AHT株のGTaseによるISGのガラス壁付着量は、エンド型デキストラナーゼが低濃度存在しても著しく低下する<sup>27)</sup>(図4)。ISGの合成自体も添加量に応じて抑制されるが、その程度はグルカン付着量ほどには著しくない。この時の合成ISGは、固有粘度が低く低分子化しており、水に不溶性のままであるが軽く振盪すると容易に均一に分散する。“*S. mutans*”菌体凝集能もほとんどない<sup>27, 28)</sup>(表4)。この付着性を欠くISGは、直線的に平行する2本鎖状の骨格繊維のみから構成され、周辺の突出細繊維を失って輪郭が明瞭になり、均一な幅約2.5nmを示す<sup>24)</sup>(図3-C)。1本鎖細繊維とその網

目構造は認められない。したがって、構成グルコース残基のほとんど(94%以上<sup>18)</sup>)は $\alpha$ -1, 3結合していると考えられる。

同様に、低分子のdextran T20などを相当量共存させても、ISGの合成と付着が抑制される。生成産物は、低粘度、低分子であり、2本鎖状繊維のみからなる<sup>28)</sup>(表4)。

### III. 粘着性グルカンの生合成

これらの特徴的な化学構造と形態をもつmutans streptococciの粘着性グルカンの合成機序について、幾つかの菌株の菌体外GTaseを用いて酵素学的検討がなされてきた<sup>19, 21)</sup>。

#### 1. GTase-IとGTase-Sの分離と性状

筆者らは、*S. sobrinus* AHTあるいはOMZ 176株の菌体外GTase標品から、それぞれにSGおよびISGのみを合成する2つの酵素画分(GTase-SおよびGTase-I)を分離精製した<sup>21)</sup>。

GTase-Sは、スクロースから水溶性グルカン(SG)のみを合成した。一方GTase-Iは、短時間ではほとんどグルカンを生成しないが、きわめて長時間反応させると有意の量の非水溶性グルカン(ISG)を合成した。また、GTase-Sとは異なり、その活性は、水溶性dextran T10などの添加により著しく増強され、高いプライマー依存性を示した<sup>21, 29)</sup>。

GTase-Sが合成したSGは、主に $\alpha$ -1, 6結合グルコース残基(56%)からなるが、相当量の $\alpha$ -1, 3結合と $\alpha$ -1, 3, 6分岐を含んでいる<sup>21, 30)</sup>(表5)。また、粗GTaseが合成したSG画分(図2-B)と同様、1本鎖細繊維と、それらが網目状を形成する像を示す(図5-B)。一方、GTase-Iがprimer dextran非添加の下に長時間の後に合成したISGは、大部分(90%)が $\alpha$ -1, 3結合グルコース残基からなり、ほとんど分岐のない $\alpha$ -1, 3結合直鎖を構成していた。この非水溶性産物は、エンド型デキストラナーゼの共存下に粗GTaseによって合成された非粘着性IG(図3-C)に酷似して、水に容易に分散し、ガラス壁への付着性を全く欠いており<sup>29)</sup>、2本鎖状の骨格繊維のみからなる<sup>31)</sup>(図5-A)。

#### 2. 粘着性IGの再構成

プライマーの添加によるGTase-IによるISG合成の増強の程度は、dextran T10の増量とともに増大し、ピークに達したのち低下する<sup>27)</sup>(図6-A)。しかし、この時に合成されたISGは、たとえ合成量が最大の時にも

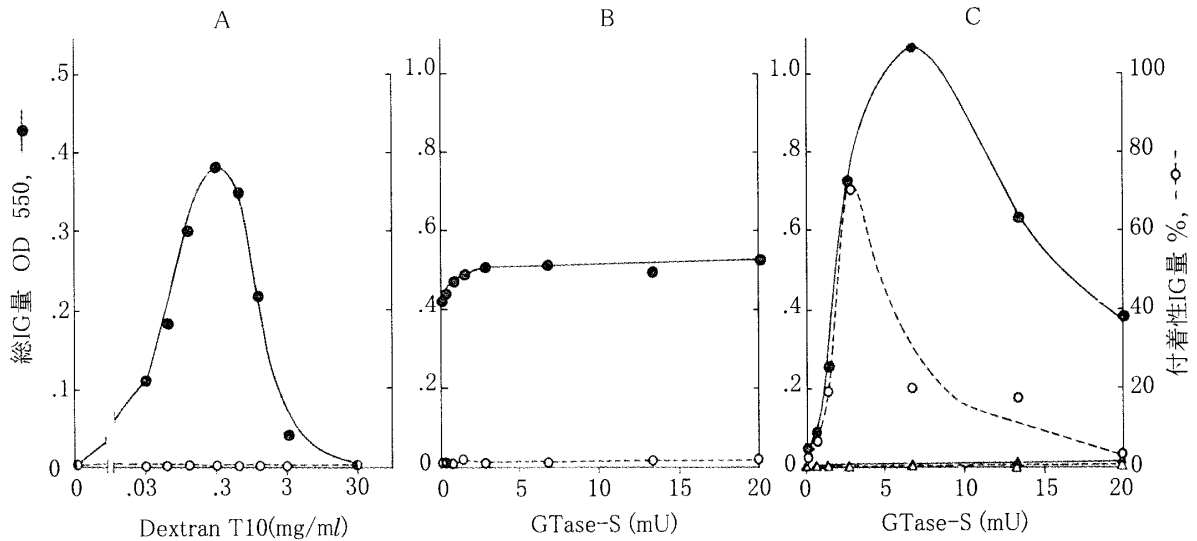


図6 *S. sobrinus* OMZ 176 (*d*型) 株由来のGTase-IとGTase-Sの協同作用による粘着性ISGの合成<sup>29)</sup>  
 A : GTase-I 5mU Dextran T10 ~30mg  
 B : GTase-S ~20mU ISG 0.6mg  
 C : GTase-I 5mU (○, ●), 0mU (△, ▲)  
 GTase-S ~20mU

水に容易に分散し、ガラス壁への付着性がない。また、あらかじめ調製しておいたISG標品をGTase-SによるSG合成時に共存させても、ISG分子はガラス壁に全く付着しない(図6-B)。

そこで、粘着性ISGの再構成を試すため、GTase-IとGTase-Sとの量比を変えてISGの合成量と管壁付着量を追ってみると、GTase-Sの増量とともにISGの合成量は急激に高まり、GTase-Iに対するGTase-Sの割合が1.5近辺で最大となり、その後速やかに低下した。この時合成されたISGはガラス壁への付着能を獲得したが、付着量はGTase-S/GTase-I比が0.6の時に最大であり、総ISG合成量のそれとは一致しない(図6-C)。生じた粘着性ISGは、 $\alpha$ -1, 3結合を70%強、 $\alpha$ -1, 6結合を約20%含んでいる<sup>22, 30)</sup>(表5)。また、粗GTaseが合成する粘着性ISGの形態的特徴(図2参照)を備えており、周囲に短い突出繊維をもつ2本鎖状繊維と1本鎖細繊維とが複雑に混在している<sup>32)</sup>(図5-C)。

ところで、GTase-IとGTase-Sの協同作用による粘着性IG合成は、プライマー変量時のGTase-IによるISG合成に酷似の山型のプロフィールを示す<sup>29, 31)</sup>(図6-C, -A)。GTase-Sの活性はプライマー非依存性であること<sup>21, 29)</sup>を考えると、*mutans streptococci*の菌体外GTaseによる粘着性ISGの合成には、GTase-Sによる $\alpha$ -1, 6結合に富むSGの合成が先行して、GTase-IによるISGの合成を促す、つまり自己プライマー効果<sup>31, 33)</sup>が働いているものと考えられる。ISGの合成反応には通常lagが認められている<sup>28, 34)</sup>。

以上のことから、GTase-Iによる $\alpha$ -1, 3結合よりな

るISGの迅速な合成は、GTase-Sによる $\alpha$ -1, 6結合を主とするSGの合成がプライムすること、そうして合成されたISGが粘着性、付着性を得るには、GTase-SとGTase-Iが適切な割合で作用する必要があること、また、その*de novo*の合成が必須であることがわかる。

#### IV. おわりに

以上、主に*S. sobrinus*と*S. mutans*の場合を中心に齶蝕原性レンサ球菌による粘着性グルカンの合成能、化学構造と微細形態、合成機序について述べた。

*mutans streptococci*の各菌種は、非水溶性および水溶性のグルカン (ISGとSG)、特に前者の合成能に違いはあるが、何れにも共通して形態と構造が異なる2種類のグルカンを産生する。1つは、約4nm幅の骨格繊維が平行して2本鎖状の像を呈する、 $\alpha$ -1, 3結合直鎖を主鎖とし、周囲に短い $\alpha$ -1, 6結合側鎖をもつ。他は、約2nm幅の1本鎖の細繊維のもので、 $\alpha$ -1, 6結合主鎖と $\alpha$ -1, 3結合側鎖よりなる。それぞれISGおよびSGを特徴づけるものであるが、いわゆる粘着性グルカンには、常にこれら2種類の構造物が混在している。 $\alpha$ -1, 3結合鎖がISGの水不溶性を担っており、 $\alpha$ -1, 6結合鎖がISGの固相表面への粘着能およびISGとSGの“*S. mutans*”菌体凝集能を発揮する。

因に、ヒトの歯垢の菌体間マトリックスの基本成分として、*mutans streptococci*などの口腔細菌が産生する多糖類が歯垢重量の約10%を占めている<sup>5, 35)</sup>。また、歯垢マトリックスには、多糖類染色に染まる“fibrillar”構造物とそのフェルト様集塊<sup>1)</sup>あるいは些か細めと粗



い太めの2種の繊維状構造物<sup>36)</sup>など、mutans streptococciが産生する1本鎖繊維状あるいは2本鎖繊維状のグルカンに形態が酷似のものの存在が観察されている。

mutans streptococciの菌面への強固な付着には、次のような粘着性ISGの合成機序が働いている。すなわち、その合成には、 $\alpha$ -1, 3および $\alpha$ -1, 6グルコシド結合の形成を触媒する2種類の酵素が関与する。後者による $\alpha$ -1, 6鎖の合成が先行して、前者による $\alpha$ -1, 3鎖の迅速な合成を誘導する。また、合成ISGが粘着性を発揮するには、適切な $\alpha$ -1, 3/ $\alpha$ -1, 6結合比率をもっている必要があること、そのようなISGの*de novo*の合成が菌面の*in situ*において生じることが必須である。さらに、ISG合成に伴って進行するSG合成と相俟って、粘着性グルカン産物には、両者をそれぞれに特徴づける2種類の繊維状グルカンが共存している。この結論は、 $\alpha$ -1, 3グルカナーゼ(ムタナーゼ)のみならず $\alpha$ -1, 6グルカナーゼ(デキストラナーゼ)の口腔内投与も菌垢形成の抑制に有効であるという、ヒトやゲツ菌類での*in vivo*研究の成績<sup>37)</sup>をよく支持する。

## 文 献

- Guggenheim, B.: Extracellular polysaccharides and microbial plaque. *Int. Dent. J.* 20: 657-678, 1970.
- Gibbons, R.J. & van Houte, J.: Bacterial adherence in oral microbial ecology. *Ann. Rev. Microbiol.* 29: 19-44, 1975.
- Hamada, S. & Slade, H.D.: Mechanisms of adherence of *Streptococcus mutans* to smooth surfaces *in vitro*. E.H. Beachey (ed.): *Bacterial Adherence*, pp.106-135, Chapman and Hall, London, 1980.
- Schroeder, H.E. & de Boever, J.: The structure of microbial dental plaque. W.D. McHugh (ed.): *Dental plaque*, 49-74, E. & S. Livingstone, Edinburgh, 1970.
- Hotz, P., Guggenheim, B. & Schmit, R.: Carbohydrates in pooled dental plaque. *Caries Res.* 6: 103-121, 1972.
- Ellwood, D.C., Baird, J.K., Hunter, J.R. & Longyear, V.M.C.: Variations in surface polymers of *Streptococcus mutans*. *J. Dent. Res.*, 55C: 42-49, 1976.
- Trautner, K., Felgenhauer, B. & Rieder, H.: Extracellular polysaccharide synthesized by the oral bacterium *Streptococcus mutans* of serotype a to e *in vitro*. *Arch. Oral Biol.*, 26: 1005-1013, 1981.
- Inoue, M. & Koga, T.: Fractionation and properties of glucans produced by *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 25: 922-931, 1979.
- Inoue, M., Shibata, H., & Morioka, T.: Serotype specificity for some biochemical characteristics of *Streptococcus mutans*. *Microbios*, 33: 7-14, 1982.
- Yakushiji, T., Inoue, M. & Koga, T.: Interserotype comparison of polysaccharides produced by extracellular enzymes of *Streptococcus mutans*. *Carbohydr. Res.*, 127: 253-266, 1984.
- Newbrun, E.: Extracellular polysaccharides synthesized by glucosyltransferases of oral streptococci. Composition and susceptibility to hydrolysis. *Caries Res.*, 6: 132-147, 1972.
- Takehara, T. & Inoue, M.: Inhibitory effects of endo- $\alpha$ -1, 3-glucanase on glucan film formation and glucan synthesis by the glucosyltransferase of the oral bacterium *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.*, 26: 217-222, 1981.
- Takehara, T., Inoue, M., Morioka, T. & Yokogawa, K.: Purification and properties of endo- $\alpha$ -1, 3-glucanase from a *Streptomyces chartreusis* strain. *J. Bacteriol.*, 145: 729-735, 1981.
- Guggenheim, B. & Schroeder, H.E.: Biochemical and morphological aspects of extracellular polysaccharides produced by cariogenic streptococci. *Helv. Odontol. Acta*, 11: 131-152, 1967.
- Guggenheim, B.: Enzymatic hydrolysis and structure of water-insoluble glucan produced by glucosyltransferases from a strain of *Streptococcus mutans*. *Helv. Odont. Acta*, 14: 89-198, 1970.
- Hamada, S., Mizuno, J., Murayama, Y., Ooshima, T., Masuda, N. & Sobue, S.: Effect of dextranase on the extracellular polysaccharide synthesis of *Streptococcus mutans*: chemical and scanning electron microscope studies. *Infect. Immun.*, 12: 1415-1425, 1975.
- Koga, T. & Inoue, M.: Cellular adherence, glucosyltransferase adsorption, and glucan synthesis of *Streptococcus mutans* AHT mutants. *Infect. Immun.*, 19: 402-410, 1978.
- Ebisu, S., Misaki, A., Kato, K. & 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.

- 19) Hare, M.D., Svensson, S. & Walker, G.J.: Characterization of extracellular, water-insoluble  $\alpha$ -D-glucans of oral streptococci by methylation analysis, and by enzymic synthesis and degradation. *Carbohydr. Res.*, 66: 245-264, 1978.
- 20) Ceska, M., Granath, K., Norman, B. & Guggenheim, B.: Structural and enzymatic studies on glucans synthesized with glucosyltransferases of some strains of oral streptococci. *Acta Chem. Scand.*, 26: 2223-2230, 1972.
- 21) Koga, T., Sato, S., Yakushiji, T. & Inoue, M.: Separation of insoluble and soluble glucan-synthesizing glucosyltransferases of *Streptococcus mutans* OMZ176 (serotype d). *FEMS Microbiol. Lett.*, 16 : 127-130, 1983.
- 22) Nalbandian, J., Freedman, M.L., Tanzer, J.M. & Lovelace, S.M.: Ultrastructure of mutans of *Streptococcus mutans* with reference to agglutination, adhesion, and extracellular polysaccharide. *Infect. Immun.*, 10 : 1170-1179, 1974.
- 23) Johnson, M.C., Bozzola, J.J., & Shechmeister, I.L.: Morphological study of *Streptococcus mutans* and two extracellular polysaccharide mutants. *J. Bacteriol.*, 118 : 304-311, 1974.
- 24) Yakushiji, T. & Inoue, M.: Ultrastructure of glucans produced by cell-bound glucosyltransferase of the oral bacterium *Streptococcus mutans* AHT. *Arch. Oral Biol.*, 25: 297-303, 1980.
- 25) Yakushiji, T., Koga, T. & Inoue, M.: Morphology of water-insoluble and -soluble glucans of the dental plaque organism *Streptococcus mutans* AHT and their interaction with the cell surface envelope. *Arch. Oral Biol.*, 26 : 931-937, 1981.
- 26) Freedman, M., Birkhed, D. & Granath, K.: Analysis of glucans from cariogenic and mutant *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.*, 21: 17-27, 1978.
- 27) Koga, T. & Inoue, M.: Effects of dextranases on cell adherence, glucan-film formation and glucan synthesis by *Streptococcus mutans* glucosyltransferase. *Arch. Oral Biol.*, 24: 191-198, 1979.
- 28) Sato, S., Koga, T., Yakushiji, T., Nagasawa, S. & Inoue, M. Effects of exogenous soluble dextrans on insoluble glucan synthesis by *Streptococcus mutans* glucosyltransferases. *Microbios*, 34: 99-112, 1982.
- 29) Inoue, M., Koga, T., Sato, S. & Hamada, S.: Synthesis of adherent insoluble glucan by the concerted action of the two glucosyltransferase components of *Streptococcus mutans*. *FEMS Lett.*, 143 : 101-104, 1982.
- 30) Inoue, M. & Yakushiji, T.: Chemical and morphological properties of *Streptococcus mutans* glucans. S. Hamada et al. (ed.), *Molecular Microbiology and Immunobiology of Streptococcus mutans*, Elsevier Science Publishers B.V., pp. 133-143, 1986.
- 31) Koga, T., Sato, S., Inoue, M., Takeuchi, K., Furuta, T. & Hamada, S.: Role of primers in glucan synthesis by glucosyltransferases from *Streptococcus mutans* strain OMZ176. *J. Gen. Microbiol.*, 129 : 751-754, 1983.
- 32) Inoue, M., Yakushiji, T. & Takehara, T.: Ultrastructural changes produced in the oral bacterium *Streptococcus mutans* glucans by the action of endo- $\alpha$ -1, 3-glucanases. *Arch. Oral Biol.*, 27: 753-757, 1982.
- 33) Germaine, G.R., Harlander, S.K., Leung, W.L.S. & Schachtele, C.F.: *Streptococcus mutans* dextranase; Functioning of primer dextran and endogenous dextranase in water-soluble and water-insoluble glucan synthesis. *Infect. Immun.*, 16 :637-648, 1977.
- 34) Ciardi, J.E., Beaman, A.J. & Wittenberger, C.L.: Purification, resolution, and interaction of the glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* 6715. *Infect. Immun.*, 18: 237-246, 1977.
- 35) Krembel, J., Frank, R.M. & Deluzarche, A.: Fractionation of human dental plaque. *Arch. Oral Biol.*, 14: 563-565, 1969.
- 36) Frank, R.M. & Houver, G.: An ultrastructural study of human supragingival dental plaque formation. W. D. McHugh (ed.), *Dental Plaque*, pp.85-108. E. & S. Livingstone Ltd., Edinburgh, 1970.
- 37) Sherp, H.W.: Dental caries ; Prospects for prevention. *Science*, 173 : 1199-1205, 1971.