

# う蝕原性レンサ球菌の産生する菌体遊離型 Glucosyltransferase の活性評価とその活性に及ぼす農産物抽出物の影響

法村奈保子・山下純隆  
(生産環境研究所)

*Streptococcus mutans* MT8148をファーメンターで培養し、調製した粗菌体遊離型 Glucosyltransferase (CF-GTase) は、精製酵素と同様の酵素化学的特性を有した。調製した粗 CF-GTase 液を用いて、各種農産物抽出物の CF-GTase 活性抑制効果について検討したが、CF-GTase の活性を抑制したのは、イチジクのみであった。イチジクの品種の中では、'イスキア・ブラック' と '蓬莱柿' が不溶性グルカンの生成を抑制した。'イスキア・ブラック' を 2000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  添加すると、無添加の場合に比べて不溶性グルカンの生成が 30% 以下に抑制された。また、イチジクに特徴的な成分であるペクチン及び  $\alpha$ -D-ガラクトuron酸は活性抑制効果を示し、イチジク抽出物の CF-GTase 活性抑制効果とペクチン含量との間に相関が認められた。

[キーワード: *Streptococcus mutans* MT8148, 菌体遊離型 Glucosyltransferase, イチジク, 'イスキア・ブラック', '蓬莱柿', ペクチン]

Characterization of Cell-free Glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*, and Effects of Extracts from Some Edible Plants on Cell-free Glucosyltransferase. NORIMURA Naoko and Sumitaka YAMASHITA (Fukuoka Agricultural Research Center, Chikushino, Fukuoka 818-8549, Japan) *Bull. Fukuoka Agric. Rec. Cent.* 18:96-100 (1999)

Crude cell-free glucosyltransferase (CF-GTase) which was obtained from incubating *Streptococcus mutans* MT8148 with a fermenter had a characterization similar to a purified enzyme. The effects of extracts of some edible plants on the crude CF-GTase were examined. It was found that the extracts of fig inhibited the activity of CF-GTase. The highest effect on the inhibition of water-insoluble glucan synthesis was shown in the extract of 'ISCHIA BLACK' and 'HOURAISHI', fig cultivars. The extract of 'ISCHIA BLACK' reduced water-insoluble glucan production down to 30% at concentrations of 2000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , compared with the control. The activity of CF-GTase was inhibited by pectins and  $\alpha$ -D-galacturonic acid, which were the main components of the figs. The inhibitory effects of extracts from figs and the content of pectin showed a significant correlation.

[Key Words: *Streptococcus mutans* MT8148, cell-free glucosyltransferase, fig, 'ISCHIA BLACK', 'HOURAISHI', pectin]

## 緒 言

う蝕(虫歯)は、う蝕原性レンサ球菌(*Streptococcus mutans*)と基質(スクロースまたは低分子デキストラン)及び宿主(歯)が揃うと発症する細菌性疾患であり、その発症のメカニズムは次の通りである<sup>4,6,12)</sup>。う蝕原性レンサ球菌にスクロース等の糖質が供給されると、口腔内でう蝕原性レンサ球菌が増殖し、Glucosyltransferase(以下GTase)を産生する。このGTaseは、スクロースを利用して付着性のある不溶性グルカンを生成し、他の菌体等を巻き込んで歯の表面に歯垢を形成する。さらに、う蝕原性レンサ球菌は、糖質を利用して酸発酵を行い、その結果生成した有機酸により歯の硬組織(エナメル質)が溶解され、う蝕が始まる。

筆者らは、う蝕予防を目的に、農産物抽出物によるう蝕原性レンサ球菌の増殖抑制効果について、既に報告した<sup>2)</sup>。本報では、う蝕原性レンサ球菌がGTaseを産生し、その後、不溶性グルカンを生成する過程における農産物抽出物の影響について明らかにする。

GTaseの活性抑制効果については、茶<sup>9,14,16,17)</sup>やリンゴ<sup>19)</sup>のポリフェノールで報告されているが、これらは、GTase

のうちの菌体結合型(cell-associated)GTase(以下CA-GTase)に関するものであり、菌体遊離型(cell-free)GTase(以下CF-GTase)に関するものはほとんど研究事例がない。

そこで筆者らは、農産物抽出物のう蝕予防効果を明らかにするために、粗CF-GTaseの酵素化学的性質について精製酵素と比較を行い、各種農産物抽出物が、う蝕発症の第二段階であるう蝕原性レンサ球菌(*S. mutans* MT8148)の産生するCF-GTaseの活性に及ぼす影響を明らかにした。

## 試験方法

### 1 供試菌株

本試験には、大阪大学歯学部口腔細菌学講座より分譲を受けた*Streptococcus mutans* MT8148 (serotype C)を用いた。

### 2 粗CF-GTase液の調製

*S. mutans* MT8148の培養は、深堀ら<sup>2)</sup>の方法で行い、粗CF-GTase液の調製は、HAMADAら<sup>20)</sup>の方法に従った。すなわち、ファーメンター(37℃、攪拌速度50rpm、へ

ッドスペースを炭酸ガスで置換)で8時間培養した *S.mutans* MT8148 の培養液から菌体を除去し、培養液の上清に50%飽和になるように硫酸アンモニウムを加えて一晚塩析を行った。この後、遠心分離した沈渣をリン酸緩衝液に溶解後、同緩衝液に対して透析(画分分子量12,000~14,000のセルロースチューブ)を行い粗酵素液を調製した。

### 3 CF-GTase 活性の測定

粗CF-GTase液1.5ml、2.5%スクロース溶液2.5ml、50mMリン酸緩衝液(pH6.5)6.0mlをねじ口遠心沈澱管に入れ、37℃で2時間反応させた後、メタノールを24.0ml添加して反応を停止した。その後、5℃で4時間放置し、10,000prm、10分間遠心分離した沈渣を蒸留水で洗浄し、再び遠心分離を行った。沈渣を71.4%エタノールで洗浄後、蒸留水を加えて超音波処理(日本精機製作所、MODEL US-300)を行い、得られた不溶性グルカンをフェノール-硫酸法<sup>1)</sup>でグルコースとして定量した。酵素活性は、HAMADAら<sup>5)</sup>の方法に従い、1分間にスクロースから1μmolのグルコースを生成する酵素単位を1unit(U)として算出した。調製した粗CF-GTase液は、-80℃に凍結保存して用いた。

### 4 粗CF-GTase液の酵素化学的諸性質の測定

1) CF-GTase活性に及ぼすpHの影響: 緩衝液は、pH3.0~5.0ではMcIlvain氏緩衝液、pH5.5~8.0では50mMリン酸緩衝液、pH8.5~9.0ではSφrensen緩衝液を用いた。CF-GTaseのpH別活性は、それぞれの緩衝液を用いて、前述した方法により37℃で2時間反応させ、pH安定性は、各pH下に15℃で24時間保持した後、前述の方法で酵素活性を測定した。

2) CF-GTase活性に及ぼす温度の影響: CF-GTaseの温度別活性は、pH6.5の50mMリン酸緩衝液を用いて、25~60℃の温度域で2時間反応させた。また、熱安定性も同様の緩衝液で30~60℃に30分間保ち、その後、スクロース溶液を添加して、前述の方法で酵素活性を測定した。

3) CF-GTaseの基質特異性: 基質は、スクロース他10種の2.5%溶液を供試したが、一級のラクトース以外、すべて特級または生化学用を用いた。

4) CF-GTase活性に及ぼす金属塩類の影響: 塩化マンガン及び塩化第二鉄・六水和物は一級を、その他の試薬は特級を用い、金属イオン濃度が10<sup>-3</sup>Mになるように添加し、前述の方法で酵素活性を測定した。

5) CF-GTaseの酵素反応における基質濃度と反応速度との関係: CF-GTaseのスクロースに対するMichaelis定数(Km値)をLineweaver-Burkの作図法で求めた。

### 5 供試農産物抽出物の調製

農産物は、ハウレンソウ‘ベガサス’、ナバナ(京築在来種)、ネギ‘JT69’、ブロッコリー‘みよ緑28号’、ナス‘筑陽’、ニンジン‘黒田五寸’、イチジク‘蓬莱柿’、‘榊井ドーフィン’、‘イスキア・ブラック’、‘イスキア・ホワイト’、‘ネグロラルゴ’、カキ‘富有’及び、茶(玉露)を用いた。試料は、各農産物の凍結乾燥物をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に浸漬し、ろ過及び遠心分離した上清を水に対して透析した。さらに、透析内液を凍結

乾燥し、検定時にはPBSに溶解して試料とした<sup>2)</sup>。

### 6 農産物抽出物がCF-GTase活性に及ぼす影響の測定

粗CF-GTase液1.5ml、2.5%スクロース溶液2.5ml、農産物抽出物を溶解した50mMリン酸緩衝液(pH6.5)6.0mlをねじ口試験管に入れ、前述の方法でCF-GTase活性を測定した。対照として、GTase活性抑制効果が既に報告されている茶抽出ポリフェノールであるサンフェノン((株)太陽化学)<sup>17)</sup>を用いた。

### 7 農産物抽出物中の成分分析

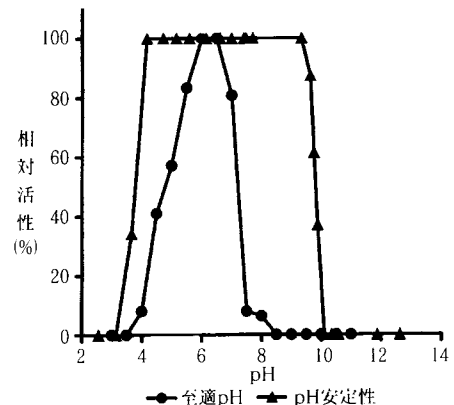
ペクチン含量はジメチルフェノール法<sup>18)</sup>、ポリフェノール含量はFolin-Denis法<sup>10)</sup>を用いて測定した。

## 結果及び考察

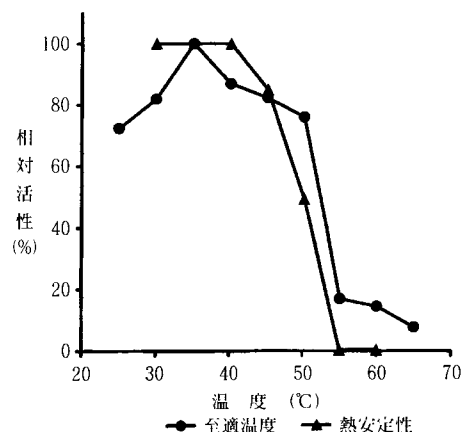
### 1 粗CF-GTase液の酵素化学的諸性質

精製したCF-GTaseの酵素化学的諸性質については、一部HAMADAら<sup>5)</sup>が報告しているが、実際の口腔内では、種々のCF-GTaseが遊離していると考えられる。従って、口腔内でのCF-GTase活性抑制効果を考察するうえで、培養液から調製した粗CF-GTase液の酵素化学的諸性質について検討を行った。

1) CF-GTase活性に及ぼすpHの影響: pHによる影響を第1図に示す。調製した粗CF-GTase液の作用至適pHは6.0~6.5にあったが、*S.mutans*由来の精製CF-GTaseの至適pHは5.5~6.5であり<sup>5)</sup>、本粗酵素とほぼ



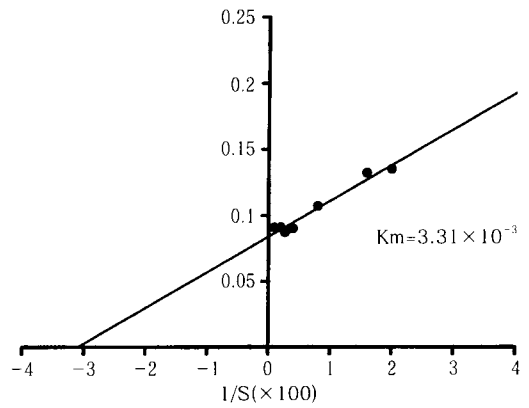
第1図 pHがCF-GTaseの活性に及ぼす影響



第2図 温度がCF-GTaseの活性に及ぼす影響

第1表 CF-GTaseの基質特異性

基 質	相対活性 (%)
スクロース	100
グルコース	0
フラクトース	0
ラクトース	0
イソマルトース	0
トレハロース	0
ラフィノース	0
ラーケストース	0
ニストース	0
バラチノース	0
キシリトール	0



第3図 CF-GTaseのLineweaver-Burkプロット

1) V: 反応速度 S: 基質濃度

第2表 金属塩類がCF-GTaseの活性に及ぼす影響

金 属 塩 類	相対活性 (%)
None	100
KCl	120
NaCl	110
CaCl <sub>2</sub>	109
FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	96
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	90
MnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	36

10<sup>-3</sup>Mであり<sup>5)</sup>、本粗酵素液の方がスクロースに対する親和性が高かった。

以上のように、既に報告されている精製CF-GTaseとほぼ同じ酵素化学的性質を有する、タンパク質0.65mg/ml、酵素活性0.21U/mlの粗CF-GTase液を試験に供試した。

2 農産物抽出物がCF-GTaseの活性に及ぼす影響

各種農産物抽出物の高分子画分が粗CF-GTaseの活性に及ぼす影響について第4図に示す。

野菜及び果実の抽出物の中で、CF-GTaseの活性を抑制したのは、イチジク（'蓬莱柿'）だけであった。その抑制率は茶抽出ポリフェノールであるサンフェノンより低かったが、イチジク抽出物を2000μg/ml添加すると、無添加の場合の80%程度に活性を抑制した。一方、ハウレンソウ、ナバナ、ネギの抽出物は、添加量が増加するほどCF-GTase活性を促進した。これらの葉茎菜類は、他の作物に比べてカルシウムを多く含んでおり、これらの抽出物の高分子画分に結合しているカルシウムが、第2表に示すようにCF-GTase活性を賦活させたものと考えられる。

3 CF-GTaseの活性に及ぼすイチジクの品種間差

CF-GTase活性抑制効果を示したイチジクの品種間差について第5図に示す。'イスキア・ブラック'で最も強い活性抑制効果が認められ、2000μg/ml添加すると無添加の場合の30%以下に活性を抑制した。その他、'蓬莱柿'でも効果が認められたが、そのほかの品種では認められなかった。

本試験は、農産物抽出物中の高分子成分のCF-GTase

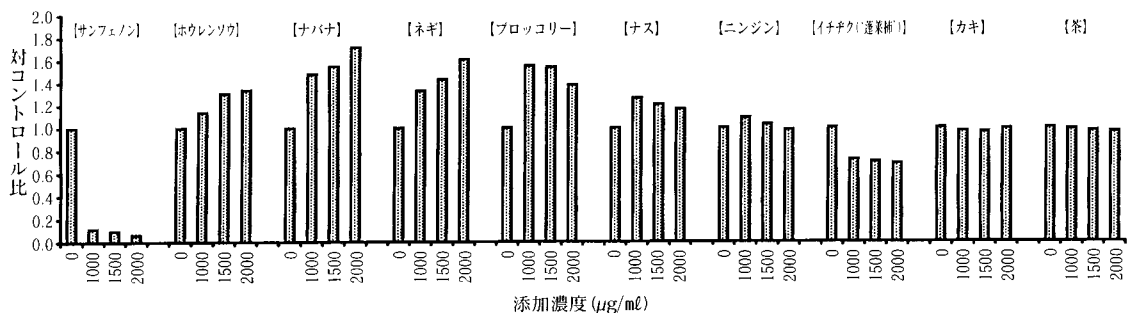
一致していた。また、pH4.2~9.3の範囲では活性の低下は見られず、安定的であった。

2) CF-GTase活性に及ぼす温度の影響：温度による影響を第2図に示す。作用至適温度は35℃付近にあり、40℃以下では安定であるが、それを越えると活性は低下し、55℃で完全に失活した。

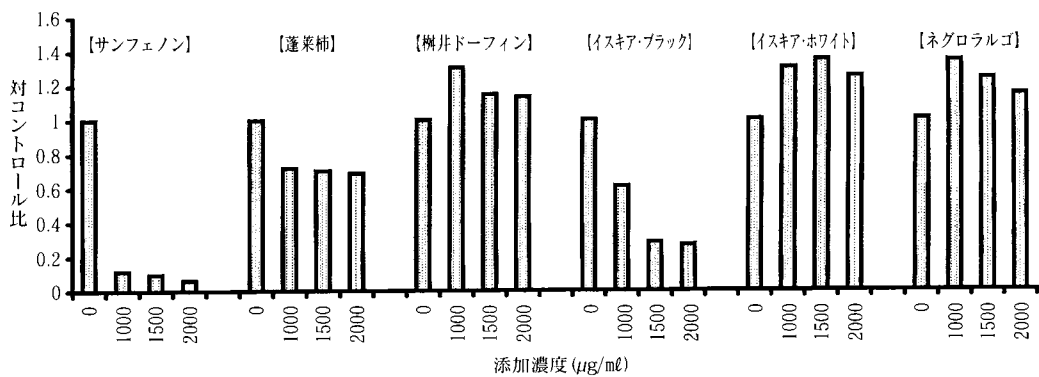
3) CF-GTaseの基質特異性：第1表に基質特異性を示す。本粗酵素液は基質特異性が極めて高く、スクロース以外の糖には作用しなかった。

4) CF-GTaseの活性に及ぼす金属塩類の影響：金属塩類の影響について第2表に示す。本粗酵素液は、K<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup>で賦活され、Mn<sup>2+</sup>で強い阻害が認められた。KOBAYASHIら<sup>13)</sup>は、*Leuconostoc mesenteroides*が産生する数種のCF-GTaseで、Ca<sup>2+</sup>やMg<sup>2+</sup>などにより賦活と阻害の両方の効果が認められ、Mn<sup>2+</sup>はいずれの酵素も強く阻害することを報告しているが、Mn<sup>2+</sup>で強い阻害を受ける点は本粗酵素液も同様であった。

5) CF-GTaseの酵素反応における基質濃度と反応速度との関係：第3図に基質濃度と反応速度との関係を示す。粗酵素液のスクロースに対するKm値は3.31 × 10<sup>-3</sup>Mが得られた。精製したCF-GTaseのKm値は、9.1 ×



第4図 農産物抽出物がCF-GTaseの活性に及ぼす影響



第5図 イチジクの品質とCF-GTaseの活性

第3表 イチジク抽出物中のポリフェノール及びペクチン含量

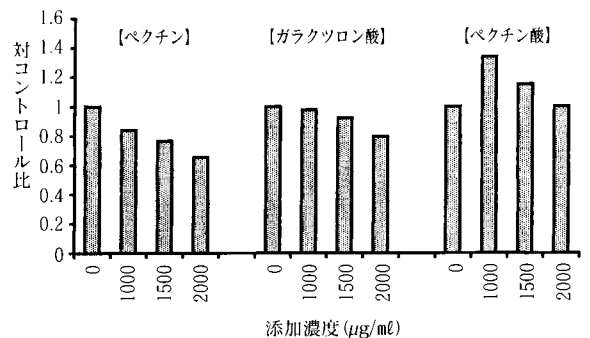
品 種	ポリフェノール含量	ペクチン含量
	(mg%)	(mg/g)
蓬 菜 柿	0.20±0.001	156.06±3.29
榎井ドーフィン	0.51±0.044	45.97±5.46
イスキア・ブラック	0.37±0.007	361.24±7.25
イスキア・ホワイト	0.46±0.013	252.75±2.79
ネグロラルゴ	0.34±0.001	8.48±0.29

活性抑制効果を検討する目的で、抽出物中のポリフェノールなどの低分子成分を透析により取り除いたが、第3表に示したようにポリフェノールが残存していた。農産物中のポリフェノールは、GTaseの活性抑制効果を示すことが既に報告されている<sup>9,14,16,17,19)</sup>。そのため、抽出物中に残存するポリフェノールが、CF-GTaseの活性抑制に影響を及ぼしていることが考えられた。そこで、抽出物のCF-GTase活性抑制効果と第3表に示した全ポリフェノール含量との関係を検討したが、相関は認められなかった ( $R^2 = 0.012$ )。

試験に供試した野菜及び果実の中でイチジクだけに効果が認められ、さらにイチジクの品種間でもその効果に差が見られたことから、イチジクに特徴的で、且つ品種により含量が異なる内容成分が関与していることが考えられる。イチジクに特徴的な内容成分としては、食物繊維があげられるが、供試したイチジク抽出物は、PBSに可溶性水溶性の成分が抽出されており、さらに透析を行った高分子画分であるため、抽出物中には、ペクチンが含まれることが充分考えられる。

そこで、抽出物中のペクチン含量を測定し、その結果を第3表に示した。ペクチン含量は、品種によりかなり違いがあり、その値が最も高かったのは‘イスキア・ブラック’であった。

また、市販のペクチン及びその関連物質がCF-GTaseの活性に及ぼす影響について検討を行った結果を第6図に示した。ペクチン（和光、化学用（レモン製））及び $\alpha$ -D-ガラクトロン酸（和光、一級）は、添加量が増すと活性抑制率も増加し、2000 $\mu$ g/ml添加すると、無添加の場合に比べてそれぞれ65%と70%に活性を抑制した。一方、ペクチン酸（和光、化学用）ではその効果は認められなかった。



第6図 ペクチン類がCF-GTaseの活性に及ぼす影響

以上の結果より、CF-GTaseの活性抑制にペクチンが関与していることが考えられたので、イチジク抽出物のCF-GTase活性抑制効果とペクチン含量との関係を検討した。その相関係数は $R^2 = 0.856$ で、相関が認められ、ペクチンがCF-GTaseの活性抑制に関与していることが示唆された。

## 謝 辞

本試験を実施するにあたり、快く菌体を分譲していただいた大阪大学歯学部口腔細菌学講座の浜田茂幸教授に心より感謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMIKTON, J.K., and SMITH, R.F. (1956) Anal. Chem. **28**(3): 350 - 356.
- 2) 深堀奈保子, 山下純隆, 久保田朗 (1998) う蝕原性レンサ球菌の増殖抑制効果検定法の改良と農産物抽出物の増殖抑制効果. 福岡農総試研報 **17**: 106 - 109.
- 3) 浜田茂幸 (1974) 細菌学からみたウ蝕予防. 日本歯科評論 **378**: 32 - 39.
- 4) 浜田茂幸 (1981) *Streptococcus mutans* の生態学的及び病因学的研究. 日本細菌学雑誌 **36**: 557 - 564.
- 5) HAMADA, S., HORIKOSHI, T., MINAMI, T., OKAHASHI, N., and KOGA, T. (1989) Purification and Characteri-

- zation of Cell-associated Glucosyltransferase Synthesizing Water-insoluble Glucan from Serotype C *Streptococcus mutans*. J.Gen.Microbiol. **135** : 335 - 344.
- 6) 浜田茂幸, 占賀敏比古 (1981) う蝕の細菌学と生化学. 化学と生物 **19** : 695 - 705.
  - 7) HAMADA,S., and TORII,M.(1978) Effect of Sucrose in Culture Media on the Location of Glucosyltransferase of *Streptococcus mutans* and Cell Adherence to Glass Surfaces. Infect.Immun.**20** (3) : 592 - 599.
  - 8) HAMADA,S., TORII,M., KOTANI,S., and TSUCHITANI,Y (1981) Adherence of *Streptococcus sanguis* Clinical Isolates to Smooth Surfaces and Interaction of the Isolates with *Streptococcus mutans* Glucosyltransferase. Infect.Immun.**32**(1) : 364 - 372.
  - 9) HATTORI,M., KUSUMOTO,I.T., NAMBA,T., ISHIGAMI,T., and HARA,Y. (1990) Effect of Tea Polyphenols on Glucan Synthesis by Glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. Chem.Pharm.Bull. **38**(3) : 717 - 720.
  - 10) 片山脩(1975)栄養診断のための栽培植物分析測定法 (作物分析法委員会編), 東京: 養賢堂, PP.422 - 423.
  - 11) 小林恒夫(1982)酵素ハンドブック (丸尾文治, 田宮信雄監修), 東京: 朝倉書店, pp. 264 - 265.
  - 12) KEYES,P.H.(1962)Recent advances in dental caries research. Int.Dent.J.**12** : 443 - 446.
  - 13) KOBAYASHI,M., and MATSUDA,K.(1976) Purification and Properties of the Extracellular Dextranucrase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1299. J.Biochem.**79** : 1301 - 1308.
  - 14) NAKAHARA,K., KAWABATA,S., ONO,H., OGURA,K., TANAKA,T., OOSHIMA,T., and HAMADA,S.(1993) Inhibitory Effect of Oolong Tea Polyphenols on Glucosyltransferases of Mutans Streptococci. ALLP.ENVIRON.MICROBIOL. **59**(4) : 968 - 973
  - 15) 中谷延二, 山田恭正 (1996) 食品中の生体機能調節物質研究法 (川岸舜朗編著), 東京: 学会出版センター, PP.59 - 60.
  - 16) OOSHIMA,T., MINAMI,T., AONO,W., IZUMITANI,A., SOBUE,S., FUJIWARA,T., KAWABATA,S., and HAMADA,S.(1993) Oolong Tea Polyphenols Inhibit Experimental Dental Caries in SPF Rats Infected with Mutans Streptococci. Caries Res. **27** : 124 - 129.
  - 17) SAKANAKA,S., KIM,M., and YAMAMOTO,T (1990) Inhibitory Effects of Green Tea Polyphenols on Glucan Synthesis and Cellular Adherence of Cariogenic Streptococci. Agric. Biol. Chem. **54** (11) : 2925 - 2929.
  - 18) SCOTT,R.W.(1979) Colorimetric Determination of Hexuronic Acids in Plant Material. Anal. Chem. **51**(7) : 936 - 941.
  - 19) 田辺正行 (1994) リンゴポリフェノールの機能性. 食品流通技術 **23**(8) : 10 - 14.