

[原著] 松本歯学 16:276~284, 1990

key words: 口腔細菌 - 口腔 *P. acnes* - 産生酵素 - ノイラミニダーゼ

口腔 *Propionibacterium acnes* のノイラミニダーゼの 精製とその性状

志村隆二, 柴田幸永, 藤村節夫, 中村 武

松本歯科大学 口腔細菌学教室 (主任 中村 武 教授)

Purification and Characterization of Neuraminidase from Oral *Propionibacterium acnes*

RYUJI SHIMURA, YUKINAGA SHIBATA, SETSUO FUJIMURA
and TAKESHI NAKAMURA

Department of Oral Microbiology, Matsumoto Dental College
(Chief: Prof. T. Nakamura)

Summary

We found that an oral strain of *Propionibacterium acnes* (EXC-1) produced neuraminidase in the culture supernatant. It was purified from the culture medium to homogeneity by a sequential procedure, including ammonium sulfate precipitation, ion exchange chromatography, gel filtration, and hydrophobic chromatography.

The purified sample showed a single protein band on SDS-PAGE. The enzyme was purified 2,400-fold with a recovery of 27.7%. The molecular weight was estimated to be 75,000. The optimum pH for the activity was 5.0.

This enzyme was heat labile; the activity was lost by heating at 55°C for 10 min. Ca^{2+} at 1mM increased the activity about twofold, and inhibition of the activity was observed by treatment with EDTA.

結 言

Propionibacterium acnes は、ヒトの皮膚・粘膜の常在菌¹⁾で成人の dental plaque や gingival crevice から $10^8 \sim 10^9$ /g レベルの菌数が検出される²⁾。一方、本菌は、歯周疾患患者の病巣局所からしばしば高率に検出されること^{3,4)}、また、dental plaque を用いての実験感染症病巣における本菌

の増量や黒色色素産生 *Bacteroides* および *Bacteroides heparinolyticus* との純培養菌、3 菌種の組み合わせで混合感染症を成立せしめる⁵⁾。今日、歯周病原菌としてとくに嫌気性グラム陰性桿菌種が注目されている⁶⁾が混合感染症である歯周病の発症ないし進行・悪化に *P. acnes* もこれらグラム陰性桿菌種と共に密接に関連するものと考えられる。

P. acnes の歯周疾患に対する直接の病原的因子として歯周組織破壊に関する産生酵素が挙げられ

る^{7,8)}。本菌はゲラチン^{1,9,10)}やアゾコール^{3,9)}を分解するプロテアーゼ、ヒアルロニダーゼ^{11,12)}、フォスフォリパーゼC¹³⁾およびリパーゼ活性^{14,15)}などを有し口腔細菌中でも極めて産生酵素の多様な菌種である。すでにわれわれは、リパーゼを除く本菌のこれらの酵素を精製し、その性状を明らかにしている^{10,12,13)}。

一方、宿主の細胞膜表面に存在するシアル酸含有複合糖質である glycoprotein や oligosaccharides は、免疫現象や感染における colonization processes などに関連して注目されてきた^{16,17)}。ノイラミニダーゼ(シアリダーゼ)は、これらシアロラクトースおよびシアル酸を含む糖蛋白ないし糖脂質末端のシアル酸を遊離させる酵素である。これらの背景から近年、口腔領域におけるノイラミニダーゼの役割が指摘されるようになった^{18,19)}。すなわち、本酵素は、transferrin に対する proteolysis を促進させる²⁰⁾こと、また、歯周病原菌の colonization 機構における検討からは、*Actinomyces* 種が本酵素処理血球に対して凝集する^{21,22)}こと、また、Okuda ら¹⁹⁾は、ヒトの血球や上皮細胞をノイラミニダーゼ処理すると黒色素産生 *Bacteroides* の血球凝集能や上皮細胞への付着能が上昇することなどを示している。

われわれは、口腔内嫌気性菌のノイラミニダーゼ活性を検討^{23,24)}し、*P. acnes* に強いノイラミニダーゼ活性を認めた。本研究は、*P. acnes* のノイラミニダーゼを精製し、その性状について調べたものである。

材料と方法

1. 供試菌株と培養

歯肉溝材料による実験混合感染症膿汁から分離した *P. acnes* (EXC-1)⁵⁾ を供試し、これを0.2% yeast extract 加 BHI broth (3.5%, Difco) を用いて、37°C、3日間 anaerobic glove box (N₂:CO₂:H₂=85:5:10) で嫌気培養した。

2. 培養試料の調整

P. acnes の培養液を遠心(15,000 g, 15分, 4°C)によって集菌した。菌体は、0.05 M トリス塩酸緩衝液(pH7.2)で2回洗浄した。洗浄菌体を同緩衝液で懸濁後、超音波処理(9 KHz, 15分, 4°C)によって破壊した。この試料の超遠心(100,000 g, 40分, 4°C)上清および培養液の遠心上清試料に

ついてノイラミニダーゼ活性を測定した。

3. 酵素活性の測定法

2'- (4-methylumbelliferyl) - α -D-N-acetylneuraminic acid (Sigma, MUA) をノイラミニダーゼ活性の基質とした。ノイラミニダーゼ活性は、Poteir ら²⁵⁾の方法に準じた。すなわち、1.0 mM MUA 0.2 ml, 0.1 M 酢酸緩衝液(pH4.6) 0.2 ml, 酵素試料0.1 ml および 1 mM CaCl₂の0.1 ml 添加して、37°C, 20分間インキュベーションした。反応終了後、0.06 M NaCl と 0.083 N NaCO₃ を含む 0.133 M グリシン緩衝液(pH10.7) 2 ml を加えて反応を停止させた。活性は、MUA より遊離した 4-methylumbelliferone を励起波長365 nm, 蛍光波長450 nm の条件下の分光蛍光光度計(日立, 650-10)で測定した。活性単位は、上記反応系で酵素 1 ml 当り 1 分間に遊離する 1 μ M の 4-methylumbelliferone を 1 単位(U)とした。

4. 蛋白質の定量

蛋白質の定量は、標準蛋白質に bovine serum albumin (Sigma) を用いクーマシーブルーG 法²⁶⁾によって測定した。

5. ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

精製した酵素の濃縮試料に SDS および 2-メルカプトエタノールをそれぞれ 1% になるように添加し、100°C, 1 分間処理した。この試料を Laemmli²⁷⁾の方法に準じて SDS-PAGE (10%ゲル)を行った。なお、標準蛋白質として phosphor-ylase b, bovine serum albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase および soybean trypsin inhibitor (Sigma) を使用した。泳動ゲルは、電気泳動用銀染色キット(関東化学)を用いて銀染色した。

6. 酵素の精製

培養液の遠心上清を酵素の精製の出発試料とした。精製は、4°Cの条件下で行い、また、使用した緩衝液のすべてに 5 mM CaCl₂ および 5 mM 2-メルカプトエタノールを添加した。まず、培養遠心上清に80%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、80%硫酸画分を得た。この沈画分を 0.05 M トリス塩酸緩衝液(pH7.2)に溶解して、同緩衝液に対して24時間透析した。この透析内液の超遠心(100,000 g, 40分)上清試料を0.05 M ト

リス塩酸緩衝液 (pH7.2) で平衡化した Q-Sepharose Fast Flow カラム (2.6×18 cm, Pharmacia) に添加した。カラムを同緩衝液で洗浄後、NaCl (0~0.5 M) の直線濃度勾配によって溶出した。この活性画分を集め濃縮後、透析した試料を 0.15 M NaCl を含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH7.2) で平衡化した Sephacryl S-300 (2.4×90 cm, Pharmacia) でゲル濾過した。この活性画分を集め、さらにヒドロフォービッククロマトグラフィーによって精製した。すなわち、活性画分を 1.0 M NaCl を含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH7.2) で平衡化した Phenyl-Sepharose CL-4B (1.6×12.5 cm, Pharmacia) に添加して洗浄後、0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH7.2)、ついで 10% エチレングリコールを含む同緩衝液、50% エチレングリコールを含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH7.2) で溶出した。なお、精製試料のエチレングリコールは、Sephadex G-25 (2.5×10 cm, Pharmacia) を用いてゲル濾過によって除去した。

結 果

1. 培養試料のノイラミナーゼ活性

P. acnes のノイラミナーゼ活性は、菌体の超音波処理した遠心上清試料には認められず、培養遠心上清にのみ認められた。

2. 酵素の精製

培養上清中のノイラミナーゼ活性のほとんどが 80% 硫酸飽和で塩析・回収することができた。本酵素は、Q-Sepharose Fast Flow カラムに吸着し、0.05~0.15 M NaCl 濃度で溶出した (Fig. 1)。

この活性画分の Sephacryl S-300 によるゲル濾過の溶出パターンは、Fig. 2 に示した。活性は、大きな蛋白ピークの前溶出画分に認められた。さらに、この活性画分を Phenyl-Sepharose CL-4B に添加するとノイラミナーゼ活性は、0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH7.2) の溶出画分にわずかに認められたが、ほとんどの活性が 50% エチレングリコールを含む 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH7.2) で溶出した (Fig. 3)。この活性画分を集め、Sephadex G-25 によるゲル濾過によってエチレングリコールを除去した濃縮試料について SDS-PAGE によって純度検定すると Fig. 4 に示す如く単一のバンドを示した。この PAGE 所見から本

酵素は、高純度に精製されたものとみられた。

ノイラミナーゼの各精製段階による成績は、Table 1 に要約した。出発試料の培養上清に対して最終的 Phenyl-Sepharose CL-4B によるクロマトグラフィーによって比活性は、約 2,400 倍に上昇し、回収率は 27.7% であった。

3. 分子量

分子量は、SDS-PAGE 法によって約 75,000 と算定された (Fig. 5)。

4. 至適作用 pH

至適 pH は、各 pH における酵素活性の測定によって判定した。なお、pH4.0~5.5 は、酢酸緩衝液、pH5.5~7.5 は、トリスマレイト緩衝液、pH7.5~9.0 は、トリス塩酸緩衝液を用い、反応混液中の各緩衝液が 0.33 M になるように添加した。本酵素の活性は、pH5.0 で最大ピークとして認められ、pH8.0 以上のアルカリ性では全く活性がみられなかった。この成績から本酵素の作用至適 pH は、5.0 とみられた (Fig. 6)。

5. 熱抵抗性

熱抵抗性は、精製酵素を 30~70°C、10 分間処理した後、各試料の活性を測定して判定した。本酵素活性は、40°C でやや活性の低下を来とし、50°C で 50% の活性が消失、55°C、10 分間処理で完全に失活する易熱性を示した (Fig. 7)。

6. 金属イオンおよび EDTA の影響

本酵素の各 2 価の金属イオン (1 mM) および EDTA (1 mM) による活性の影響は、Table 2 に示した。なお、精製試料中の CaCl₂ を除去するため、供試酵素試料を 0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH7.2) で 24 時間、透析して供試した。供試 2 価金属イオン中 Mn²⁺ では活性に影響はなく、Mg²⁺、Fe²⁺、Co²⁺、Zn²⁺ および EDTA で 15~60% の阻害を受け、Hg²⁺、Cu²⁺ で完全に活性が阻害された。しかし、Ca²⁺ によって活性が約 2 倍に促進された。

考 察

成人歯肉溝材料による実験感染症膿汁から分離された *P. acnes* (EXC-1) にノイラミナーゼ活性を認め、この酵素を各種クロマトグラフィーによって高純度に精製した。

Von Nicolai ら²⁰⁾ は、ヒトの normal skin や acnelesions から分離した *P. acnes* のノイラミ

ダーゼ活性を調べ、38菌株中32菌株に活性を認め、その殆んどの菌株の活性が培養遠心上清と菌体の両者に存在し、6菌株のみが培養遠心上清に認め

られたと報告している。skin由来のこれら少数菌株と同様に本研究で供試した口腔由来の *P. acnes* (EXC-1)のノイラミダーゼ活性は、菌体の超

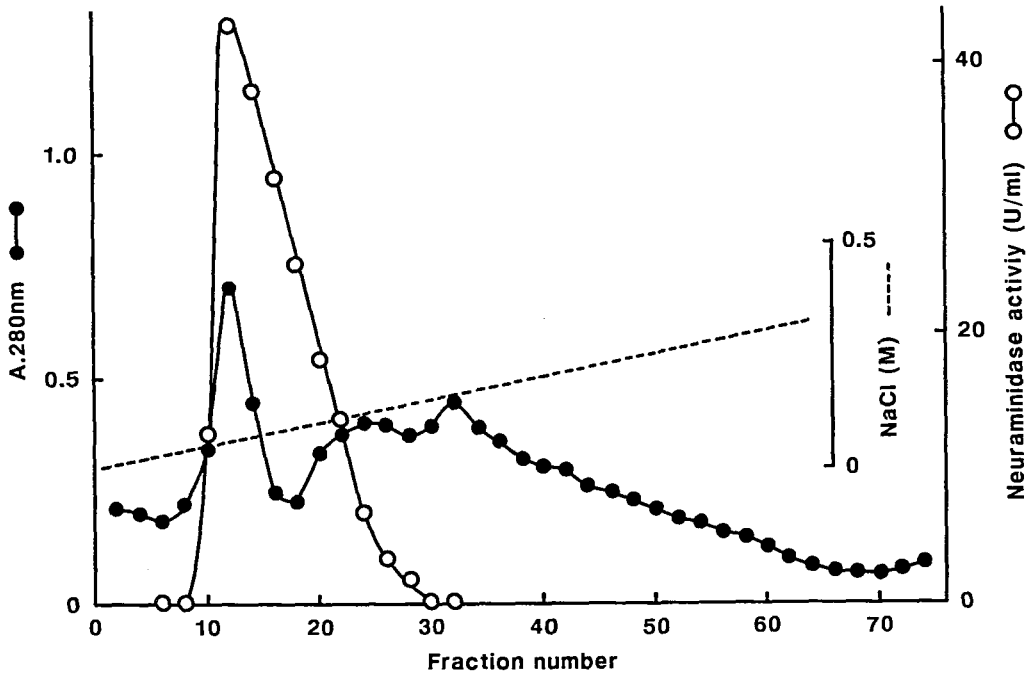


Fig. 1. Chromatography of neuraminidase on Q-Sepharose Fast Flow column

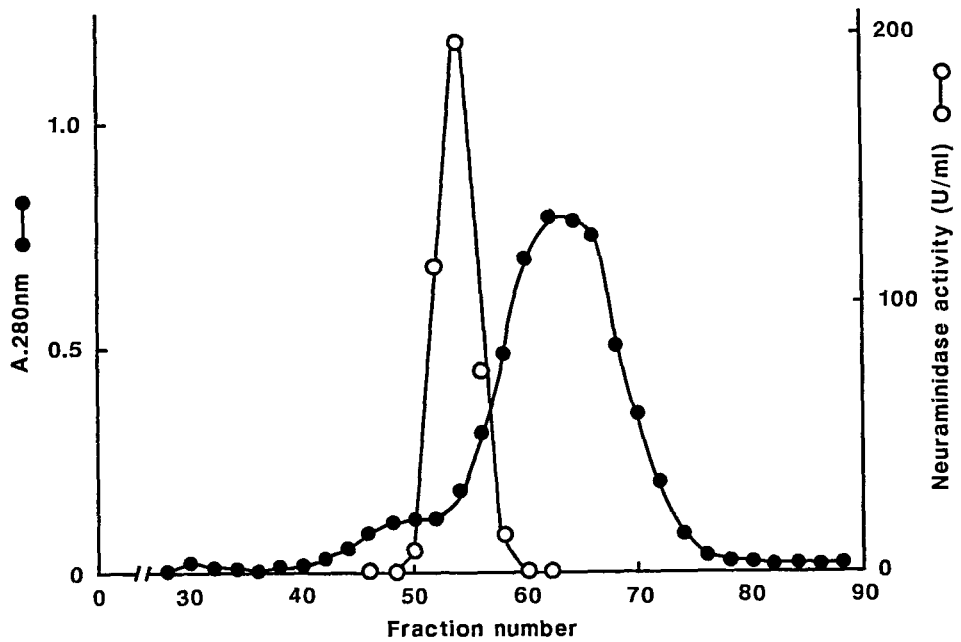


Fig. 2. Gel filtration of neuraminidase on Sephacryl S-300 column

音波処理試料には認められず、培養遠心上清のみに認められることから本酵素は、菌体外産生性と考えられた。

細菌ノイラミナーゼは、細菌種によって分子量、作用至適 pH などに大きな差異がある。すなわち、分子量は、約30,000~150,000、作用至適 pH は、3.5~7.0と幅広い²⁹⁻³¹⁾。本酵素の分子量は、SDS-PAGE 法による算定から75,000、作用至適 pH は、5.0であった。Von Nicolai ら²⁸⁾は、ヒト

の normal skin から分離した *P. acnes* のノイラミナーゼの分子量は、ゲル濾過法によって33,000、作用至適 pH は、5.0付近と報告している。skin 由来の *P. acnes* 菌株と本酵素の作用至適 pH は、ほぼ一致しているが、本菌のノイラミナーゼの分子量は、やや大きく、これら *P. acnes* のノイラミナーゼと異なるものであった。これらの知見から *P. acnes* のノイラミナーゼは、由来や菌株によって異なり、酵素の多様性を示唆する。

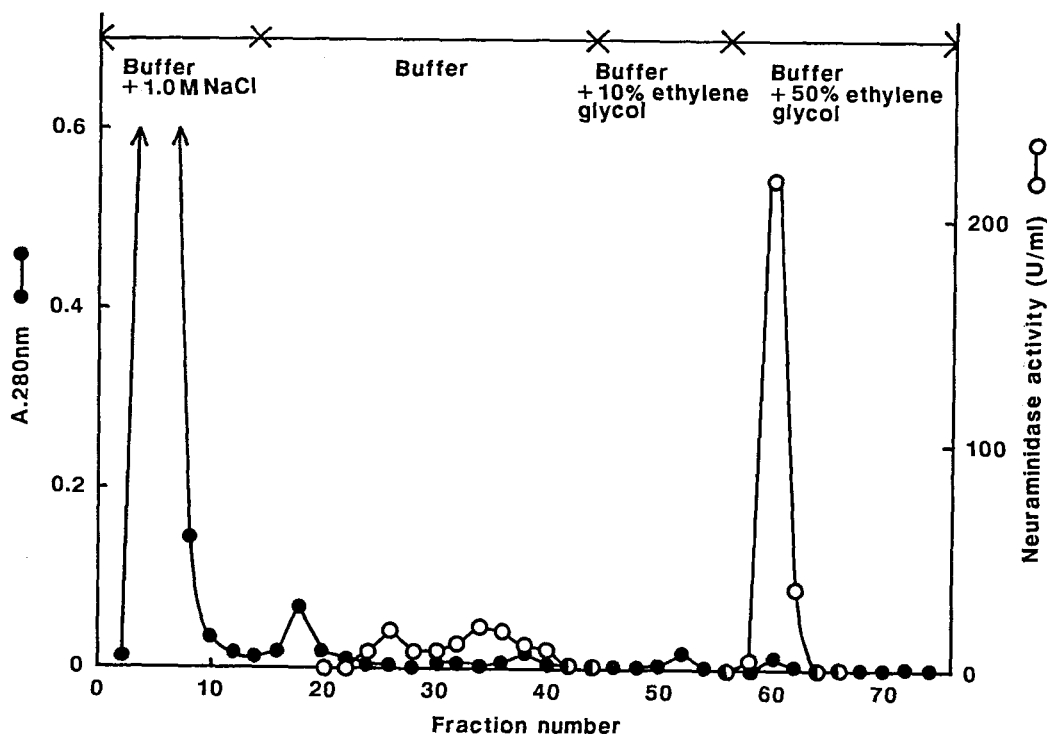


Fig. 3. Chromatography of neuraminidase on Phenyl-Sepharose CL-4B column

Table 1. Purification of neuraminidase

Step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Culture supernatant	600	240.2	6,279	26.1	1.0	100
Ammonium sulfate (80% saturation)	118	74.6	4,798	64.3	2.5	76.4
Q-Sepharose Fast Flow	208	19.9	4,534	228	8.7	72.2
Sephacryl S-300	45	6.47	4,172	645	24.7	66.4
Phenyl-Sepharose CL-4B	42	0.028	1,740	62,143	2,381	27.7

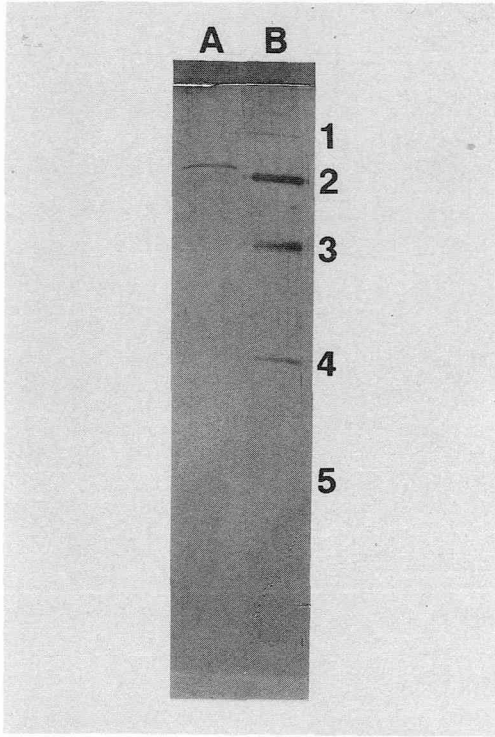


Fig. 4. SDS-PAGE of purified neuraminidase: A, *P. acnes* neuraminidase; B, standard proteins (1, phosphorylase b; 2, bovine serum albumin; 3, ovalbumin; 4, carbonic anhydrase; 5, soybean trypsin inhibitor)

本菌のノイラミニダーゼ活性は、 Ca^{2+} 添加によって著明な活性の上昇が認められ、EDTAで強く阻害された。このことから本菌のノイラミニダーゼは、 Ca^{2+} 依存性と考えられる。 Ca^{2+} 依存性ノイラミニダーゼは、広く *Vibrio cholerae*, *Streptococcus* や *Corynebacterium*^{32~34)} などでも報告されており、本菌酵素もこれらの性状と近似するものであった。

細菌の宿主細胞への定着は、細菌感染の基本的なステップである。従って、口腔領域においては歯牙や歯周局所における口腔細菌の定着機序が重要な課題となっている。歯周局所に対する歯周病原菌の付着因子や定着に関連して多くの検討がなされている^{35,36)}。近年、黒色色素産生 *Bacteroides*¹⁹⁾ や *Actinomyces viscosus*^{21,22)} などノイラミニダーゼ依存性の細胞付着能が示され、本酵素の定着機構における役割が指摘されている。一方、Beighton ら³⁷⁾ は、dental plaque の accumulation に関する glycoprotein を介しての口腔 streptococci の付着性機構に sialic acid rich な transferrin の receptor 的役割も示している。また、Homer and Beighton²⁰⁾ は、この transferrin が口腔 streptococci のノイラミニダーゼの作用によって口腔細菌の transferrin に対する proteolysis を示し、これら glycoprotein の proteolysis における細菌ノイラミニダーゼの役割を報告

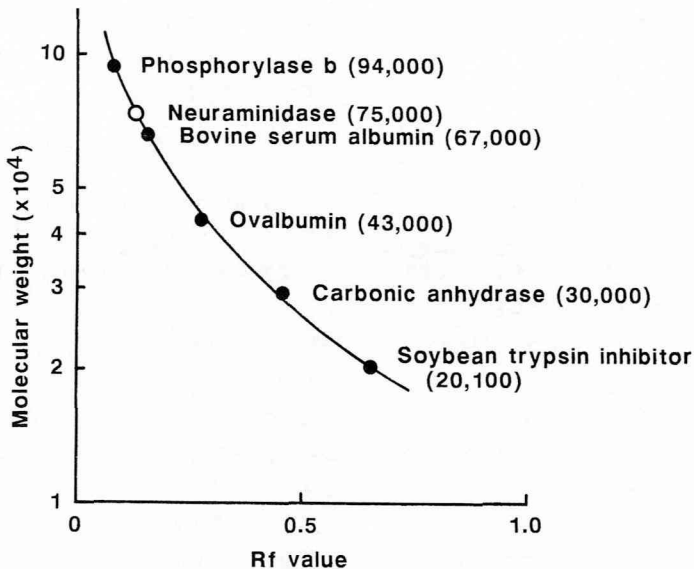


Fig. 5. Estimation of molecular weight of neuraminidase by SDS-PAGE

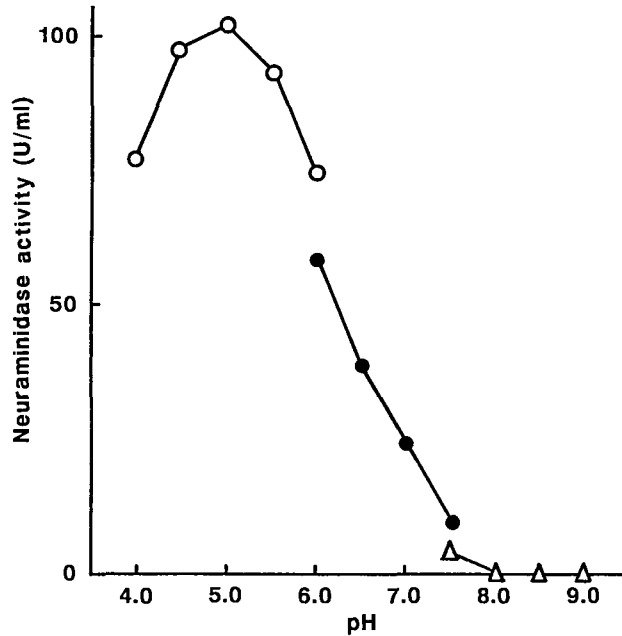


Fig. 6. Effect of pH on neuraminidase activity: ○—○, acetate buffer; ●—●, Tris-maleate buffer; △—△, Tris-HCl buffer

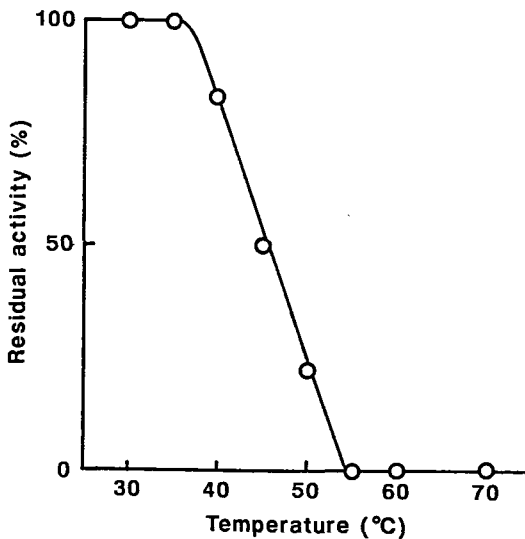


Fig. 7. Heat stability of neuraminidase

している。従って、口腔 *P. acnes* のノイラミニダーゼもこれら定着機構や glycoprotein の proteolysis に深く関連するものと考えられる。

本菌は、*Bacteroides* の 2 菌種との組み合わせで実験混合感染症を成立させる感染能を有し⁵⁾、また、本研究で明らかになったノイラミニダーゼの

ほかに歯周組織破壊に関連する多様な酵素属性を有する^{1,3,8-12)}。*P. acnes* は、歯垢や歯肉溝の常在菌²⁾であり、歯周局所においてその多様な諸酵素と共にノイラミニダーゼが他の歯周病原菌種の局所への定着や proteolysis 機構にも密接に関与している可能性が強い。現在、*P. acnes* の精製ノイラミニダーゼを用い、歯周病原菌の付着や glyco-protein などの proteolysis における本酵素の役割について検討中である。

結 論

口腔 *Propionibacterium acnes* (EXC-1) のノイラミニダーゼ活性を調べ、本酵素を硫酸塩析、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過およびハイドロフォービッククロマトグラフィーによって精製し、その性状を調べた。

本菌のノイラミニダーゼ活性は、菌体外産生性であった。精製酵素は、SDS-PAGE で単一バンドを示し高純度であった。培養上清試料に対して各種クロマトグラフィーによって比活性が2,400倍に上昇し、回収率は、27.7%であった。本酵素の分子量は、75,000、作用至適 pH は、5.0であった。酵素活性は、55°C、10分間処理で失活し、易熱性

Table 2. Effects of divalent ions and EDTA on neuraminidase activity

Ions	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None	—	100
Ca ²⁺	1.0	236
Mg ²⁺	1.0	54.5
Fe ²⁺	1.0	86.4
Co ²⁺	1.0	86.4
Mn ²⁺	1.0	100
Zn ²⁺	1.0	36.4
Hg ²⁺	1.0	0
Cu ²⁺	1.0	0
EDTA	1.0	31.8

であった。また、本酵素の活性は、EDTA で強く阻害され、2 価金属イオン (1 mM) 中 Ca²⁺ で約 2 倍に促進された。

文 献

- Marples, R. R. and McGinley, K. J. (1974) *Corynebacterium acnes* and other anaerobic diphtheroids from human skin. J. Med. Microbiol. 7: 349-357.
- Sabiston, C. B., Jr. and Grigsby, W. R. (1972) Anaerobic bacteria from the advanced periodontal lesion. J. Periodontol. 43: 199-201.
- 岩田一雄 (1966) 歯槽膿漏症局所の嫌気性菌について。歯科学報, 66: 234-252.
- Beveridge, T. J. and Goldner, M. (1973) Statistical relationship between the presence of human subgingival anaerobic diphtheroids and periodontal disease. J. Dent. Res. 52: 451-453.
- Takazoe, I. and Nakamura, T. (1971) Experimental mixed infection by human gingival crevice material. Bull. Tokyo Dent. Coll. 12: 85-93.
- Slots, J. and Genco, R. J. (1984) Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. J. Dent. Res. 63: 412-421.
- 中村 武, 杉中芳幸, 小幡直樹, 青木宣夫 (1975) 混合感染能を有する口腔内嫌気性菌の酸性ムコ多糖体と脂質分解酵素に関する研究. 松本歯学, 1: 11-21.
- 中村 武, 藤村節夫 (1984) *Propionibacterium acnes* の歯周組織破壊性酵素. 日本歯科評論, 503: 137-145.
- 小幡哲夫 (1966) 口腔内嫌気性 *Corynebacterium* について. 歯科学報, 66: 949-968.
- 柴田幸永, 志村隆二, 藤村節夫, 中村 武 (1990) *Propionibacterium acnes* のセラチナーゼの精製とその性状, 歯科基礎, 32 (補冊): 98.
- Ingham, E., Holland, K. T., Gowland, G. and Cunliffe, W. J. (1979) Purification and partial characterization of hyaluronate lyase (EC 4.2.2.1) from *Propionibacterium acnes*. J. Gen. Microbiol. 115: 411-418.
- Nakamura, T., Taniguchi, H., Takeuchi, K., Kiuchi, N. and Fujimura, S. (1982) Purification and properties of hyaluronidase (EC 4.2.2.1) from an oral strain of *Propionibacterium acnes*. Matsumoto Shigaku, 8: 221-230.
- Nakamura, T., Taniguchi, H., Takeuchi, K., Fujimura, S. and Pulverer, G. (1984) Phospholipase C of an oral strain of *Propionibacterium acnes* purification and partial characterization. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. orig. A 257: 20-26.
- Hassing, G. S. (1971) Partial purification and some properties of lipase from *Corynebacterium acnes*. Biochem. Biophys. Acta. 242: 381-391.
- Ingham, E., Holland, K. T., Gowland, G. and Cunliffe, W. J. (1981) Partial purification and

- characterization of lipase (EC 3.1.1.3) from *Propionibacterium acnes*. J. Gen. Microbiol. **124**: 393-401.
- 16) 青柳高明 (1974) シアリダーゼの測定およびシアル酸の定量. 蛋白質核酸酵素(生体膜実験法 上), 189-197.
 - 17) 内貴正治 (1979) シアル酸の免疫学. 代謝, **16**: 749-759.
 - 18) Moncla, B. J. and Braham, P. (1988) Rapid detection and characterization of sialidase activity in *Bacteroides forsythus*. J. Dent. Res. **67** Special Issue: 179.
 - 19) Okuda, K., Ono, M., and Kato, T. (1989) Neuraminidase-enhanced attachment of *Bacteroides intermedius* to human erythrocytes and buccal epithelial cells. Infect. Immun. **57**: 1635-1637.
 - 20) Homer, K. A. and Beighton, D. (1990) Role of neuraminidase in the synergistic degradation of transferrin. (Divisional abstracts) J. Dent. Res. **69**: 1001.
 - 21) Costello, A. H., Cisar, J. O., Kolenbrander, P. E. and Gabriel, O. (1979) Neuraminidase-dependent hemagglutination of human erythrocytes by human strains of *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii*. Infect. Immun. **26**: 563-572.
 - 22) Ellen, R. P., Fillery, E. D., Chan, K. H. and Grove, D. A. (1980) Sialidase-enhanced lectin-like mechanism for *Actinomyces viscosus* and *Actinomyces naeslundii* hemagglutination. Infect. Immun. **27**: 335-343.
 - 23) 中村 武 (1989) 歯周病原菌の生能的生物活性と産生酵素に関する研究(課題番号: 63570883). 平成元年度科学研究費補助金(一般研究C)研究成果報告書.
 - 24) 中村 武, 志村隆二, 柴田幸永, 藤村節夫(1989) *Bacteroides gingivalis* のneuraminidaseの精製とその性状. 松本歯学, **15**: 239.
 - 25) Potier, M., Mameli, L., Bêlisle, M., Dallaire, L. and Melançon, S. B. (1979) Fluorometric assay of neuraminidase with a sodium (4-methylumbelliferyl- α -D-N-acetylneuraminatate) substrate. Anal. Biochem. **94**: 287-296.
 - 26) Read, S. M. and Northcote, D. H. (1981) Minimization of variation in the response to different proteins of the coomassie blue G dye-binding assay for protein. Anal. Biochem. **116**: 53-64.
 - 27) Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. Nature, **227**: 680-685.
 - 28) Von Nicolai, H., Höffler, U. and Zilliken, F. (1980) Isolation, purification, and properties of neuraminidase from *Propionibacterium acnes*. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt., Orig. A **247**: 84-94.
 - 29) Pinter, J. K., Hayashi, J. A. and Bahn, A. N. (1968) Extracellular streptococcal neuraminidase. J. Bacteriol. **95**: 1491-1492.
 - 30) Kunitomo, S., Aoyagi, T., Takeuchi, T. and Umezawa, H. (1974) Purification and characterization of *Streptomyces* sialidases. J. Bacteriol. **119**: 394-400.
 - 31) Teufel, M., Roggentin, P. and Schauer, R. (1989) Properties of sialidase isolated from *Actinomyces viscosus* DSM 43798. Biol. Chem. Hopper-Seyler, **370**: 435-443.
 - 32) Ada, G. L., French, E. L. and Lind, P. E. (1961) Purification and properties of neuraminidase from *Vibrio cholerae*. J. Gen. Microbiol. **24**: 409-421.
 - 33) Hayano, S. and Tanaka, A. (1967) Streptococcal sialidase. I. Isolation and properties of sialidase produced by group K streptococcus. J. Bacteriol. **93**: 1753-1757.
 - 34) Moriyama, T. and Barksdale, L. (1967) Neuraminidase of *Corynebacterium diphtheriae*. J. Bacteriol. **94**: 1565-1581.
 - 35) Okuda, K., Slots, J. and Genco, R. J. (1981) *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides asaccharolyticus* and *Bacteroides melaninogenicus* subspecies: cell surface morphology and adherence to erythrocytes and human buccal epithelial cells. Curr. Microbiol. **6**: 7-12.
 - 36) Okuda, K., Yamamoto, A., Naito, Y., Takazoe, I., Slots, J. and Genco, R. J. (1986) Purification and properties of hemagglutinin from culture supernatant of *Bacteroides gingivalis*. Infect. Immun. **54**: 659-665.
 - 37) Beighton, D., Whaley, R. A. and Homer, K. A. (1990) Transferrin binding by *S. oralis* and other oral streptococci. (Divisional abstracts) J. Dent. Res. **69**: 1000.