

〔原著〕 松本歯学 14 : 176~184, 1988

key words: *S. milleri* — ヒアルロニダーゼ — 精製

## *Streptococcus milleri* のヒアルロ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 Hyaluronidase from *Streptococcus milleri*

RYUJI SHIMURA, YUKINAGA SHIBATA, SETSUO FUJIMURA  
and TAKESHI NAKAMURA

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

### Summary

Screening tests of gingival crevice dental plaque conducted to detect the bacterial strains responsible for degradation of acid-mucopolysaccharides provided an adequate strain for the production of hyaluronidase. This strain was identified as *Streptococcus milleri*, based on its various biological properties.

The enzyme produced in the culture supernatant of anaerobic culture was purified to homogeneity by sequential procedures including ammonium sulfate precipitation, ion-exchange chromatography, and gel filtration. The specific activity increased 15,000 fold and the recovery of the enzyme activity was 21.3%.

The molecular weight was 100,000 and its isoelectric point was 9.3. The optimum pH for the activity was 6.0. Heating of the enzyme at 60°C for 5 minutes resulted in complete inactivation. The enzyme activity was inhibited strongly by  $Zn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$ , and  $Cu^{2+}$ , while  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ , and EDTA had no effect. The enzyme was active against hyaluronic acid, however, chondroitin sulfate, chondroitin sulfate A, B, and C were not degraded by this enzyme. In the enzymatic products of hyaluronic acid, unsaturated disaccharides were detected by the methods of gel filtration and paper chromatography.

### 結 言

歯周病に対する細菌の病原的因子の一つに産生酵素が挙げられる。細菌酵素は、歯周組織に直接障害をもたらすものと考えられ、歯周細菌の蛋白分解酵素<sup>1-3)</sup>や酸性ムコ多糖体分解酵素<sup>4-6)</sup>などが

注目されている。われわれは、これまで歯周病巣よりしばしば高率に分離される *Bacteroides heparinolyticus*<sup>7,8)</sup> および *Propionibacterium acnes*<sup>7,9)</sup> に広範な酸性ムコ多糖体分解能を有すること、また近年、*B. oralis* にもヒアルロニダーゼ活性を認め<sup>10)</sup>、これら分解酵素をそれぞれ精製し、その性状を明らかにしている<sup>10-13)</sup>。歯周細菌の酸性ムコ多糖体分解能を酸性ムコ多糖体を含む Smith ら<sup>14)</sup>

(1988年6月30日受理)

の基質加平板を用いて幅広く検討したところ、レンサ球菌種にも強いヒアルロニダーゼ活性を認めた。本研究は、ヒアルロニダーゼ産生レンサ球菌株の生物学的性状を調べ菌種の同定を行い、このレンサ球菌のヒアルロニダーゼを精製し、その性状について検討したものである。

## 材料と方法

1. ヒアルロニダーゼ産生菌の検索と菌種の同定  
ヒアルロニダーゼ活性産生菌の検索は、Smith<sup>14)</sup>の方法に準じて行った。すなわち、ヒアルロン酸 (0.4 mg/ml, Sigma) 加 brain heart infusion (BHI, Difco) broth に 0.4% bovine albumin, 1.3% noble agar (Difco) を添加し、平板を作製した。歯肉溝材料を希釈してこの基質加平板に塗抹し、37°C、3日間嫌気(N<sub>2</sub>: 85, H<sub>2</sub>: 10, CO<sub>2</sub>: 15) 培養した。本培養集落をレプリカ法によって GAM(日本製薬)平板に移した後、培養平板に 2N acetic acid を添付し、lytic zone を発現した集落から分解性菌を判定した。

ヒアルロン酸分解性の分離菌株のうちグラム染色性、形態配列、mitis-salivarius agar (MS 培地, Difco) での発育性状からレンサ球菌種と考えられる 5 菌株についてレンサ球菌種を指標とした通常の検索法により生物学的性状を調べ菌種の同定を行った。

### 2. 供試菌株と培養

強いヒアルロニダーゼ活性を示した A-6 株を供試し、0.2% yeast extract 加 BHI broth (Difco) にて 37°C、3日間嫌気培養した。この培養液を遠心 (15,000 G, 4°C, 15分) し、菌体と培養上清を得た。

### 3. 培養試料の調整

菌体は、0.05 M トリス塩酸緩衝液 (pH 7.2) にて 2 回遠心洗浄した。洗浄菌体を同緩衝液に懸濁し、超音波処理 (180 W, 15分) した。この超音波処理試料を超遠心 (100,000 G, 4°C, 40分) してその上清および培養上清試料について、それぞれヒアルロニダーゼ活性を測定した。

### 4. 酵素活性の測定法

ヒアルロニダーゼ活性の測定は Linker<sup>15)</sup>の方法に準じた。すなわち、ヒアルロン酸 (2 mg/ml) 0.2 ml, 0.5 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) 0.2 ml, 酵素試料および精製水各 0.1 ml を加えて (全量、

0.5 ml) 37°C, 30 分間インキュベートした後、3% 過塩素酸液 (2.5 ml) を加えて反応を停止させた。この反応混液を 10 分間静止後遠心し、その上清について基質ヒアルロン酸によって生じる不飽和糖を 232 nm 吸光度で測定した。なお、活性単位は上記反応系で試料 1 ml 当り 0.1 の吸光度を上昇させる活性を 1 単位 (U) とした。

### 5. 酵素の精製

培養遠心上清 (2 l) を酵素精製の出発試料とした。まず、上清試料に 80% 飽和になるように硫酸アンモニウムを添加して、沈査画分を得た。この画分を 0.05 M リン酸緩衝液 (pH 6.0) に溶解し、同緩衝液に対して 24 時間透析した。この試料を超遠心 (100,000 G, 4°C, 40分) し、上清試料を同緩衝液で平衡化した CM-32 (Whatman) カラム (2.6×38 cm) に吸着させ、食塩 (0~1.0 M) による直線濃度勾配によって溶出した。なお、溶出画分は 10 ml/tube とし、各画分について 280 nm 吸光度およびヒアルロニダーゼ活性を測定した。

CM-32 カラムから溶出した活性画分を集めてエバポレーターによって濃縮後、0.15 M 食塩を含む上記緩衝液にて透析した。この試料を同緩衝液で平衡化した Sephacryl S-300 (Pharmacia) カラム (2.4×90 cm) を用いてゲル濾過を行った。なお、ゲル濾過の各溶出画分は 5 ml/tube とした。

### 6. ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE)

Sephacryl S-300 カラムで溶出した活性画分の濃縮試料にドデシル硫酸ナトリウム (SDS) を 1% に添加して、100°C, 1 分間処理した。この試料を Laemmli<sup>16)</sup>の方法に準じて SDS-PAGE (0.1%, 10%) を行った。また、分子量マーカー (Pharmacia) についても同様に泳動した。なお、泳動ゲルは、銀染色法 (電気泳動用銀染色キット、関東化学) によって染色した。

### 7. 酵素の性状

#### 1) 分子量

分子量は、精製試料の SDS-PAGE によって算定した。なお、標準蛋白質として phosphorylase b, bovine serum albumin, ovalbumin, carbonic anhydrase, trypsin inhibitor および  $\alpha$ -lactalbumin (Pharmacia) を使用した。

#### 2) 等電点

等電点は、Vesterberg<sup>17)</sup>の方法に準じてカラ

ム等電点電気泳動法によって測定した。すなわち、精製試料を1%グリシン液に対して24時間透析後、この試料を110 mlのカラム(LKB)にpH 5~8とpH 9~11の2種類のアンフォライト(LKB)を1:4に混合したものを1%濃度になるように加え、600 Vの定電圧で44時間泳動した。各画分は3 ml/tubeとした。

### 3) 作用至適 pH

pH 4.0~6.0は、0.5 M 酢酸緩衝液、pH 6.0~7.5は、0.5 M リン酸緩衝液、pH 7.5~9.0は、0.5 M トリス塩酸緩衝液を用いて各pHにおける活性を測定した。

### 4) 熱抵抗性

精製酵素を40~80℃まで6段階の各温度でそれぞれ5分間処理した後、各試料のヒアルロニダーゼの活性を測定して判定した。

### 5) 金属イオンおよびEDTAの影響

CaCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, FeSO<sub>4</sub>, CoCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, ZnCl<sub>2</sub>, HgCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>およびEDTAの各化合物を反応系に1.0 mMになるように加え、活性を測定して判定した。

### 6) 基質特異性

酸性ムコ多糖体基質としてヒアルロン酸、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン硫酸A、BおよびC (Sigma)を用い、精製酵素(6.0 U)と30分間反応させ、各基質からの232 nm吸光度によって判定した。

### 8. ヒアルロン酸分解産物の検索

精製酵素によるヒアルロン酸からの分解産物は、Sephadex G-25によるゲル濾過およびペーパークロマトグラフィーによって調べた。0.2 M リン酸緩衝液(pH 6.0)に溶解したヒアルロン酸(5 mg/ml) 2 mlと精製酵素試料(420 U) 2 mlを37℃で24時間作用させた。脱塩のためこの反応混液を濃縮し、10 mM 酢酸で平衡化したSephadex G-25 (Pharmacia) カラム(1.6×90 cm)でゲル濾過した。なお、溶出画分は3 ml/tubeとし各画分の232 nm吸光度を測定した。この232 nm吸光度のピーク画分を濃縮してペーパークロマトグラフィーに供した。ペーパークロマトグラフィーは、試料を東洋濾紙No. 50 Aにスポットし、n-ブタノール：酢酸：精製水(10:3:7 v/v)を溶媒とした下降法によって展開した。糖の検出はアルカリ性硝酸銀試薬<sup>18)</sup>による呈色反応で行っ

た。なお、ヒアルロン酸由来の不飽和二糖(生化学工業)および市販の*Streptomyces hyalurolyticus*由来のヒアルロニダーゼ(生化学工業)を上記の方法に準じて反応させて得られた不飽和四糖および六糖を標準オリゴ糖とした。

## 結 果

### 1. ヒアルロニダーゼ産生レンサ球菌の生物学的性状

ヒアルロニダーゼ活性を有する分離レンサ球菌5菌株の生物学的性状は、Table 1に示した。5菌株ともエスクリンを加水分解し、アルギニンからアンモニア、グルコースからアセトインを産生した。H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の産生はみられなかった。シュクロースからグルカンおよびレバンの合成能はみられなかった。炭水化物分解能は、いずれもグルコース、シュクロース、ラクトース、トレハロース、サリシンを分解したがマンニット、ソルビット、ラフィノース、イヌリンを分解しなかった。

ヒアルロニダーゼ活性を有するこれら供試5菌株の生物学的性状は均一であり、いずれも*Streptococcus milleri*と同定された。

### 2. 培養試料のヒアルロニダーゼ活性

培養液の遠心上清試料中のみ活性が認められ、菌体の超音波処理試料には全く活性が認められなかった。

### 3. 酵素の精製

培養上清中のヒアルロニダーゼ活性は、80% 硫酸飽和でほとんどが回収できた。本活性は、CM-32カラムに吸着し、0.25~0.50 Mの食塩濃度で溶出した(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、後溶出の大きな蛋白質ピークの前に溶出し、わずかな280 nm吸収ピーク(画分No. 44)と一致して認められた。

各精製段階における成績はTable 2に要約した。培養上清に対してSephacryl S-300のゲル濾過によって比活性は15,500倍に上昇し、回収率は21.3%であった。

### 4. 精製酵素のPAGE所見

Sephacryl S-300によるゲル濾過で得た活性画分(No. 42~No. 46)の濃縮試料のSDS-PAGE所見はFig. 3に示した。精製試料は分子量マーカー、94,000よりわずかに上の泳動位置に単一バ

Table 1. Biological properties of hyaluronidase-producing *Streptococcus* strains

Characteristic	Isolates				
	A-1	A-3	A-5S	A-6	A-7
Gram stain	+	+	+	+	+
Morphology	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci	Cocci
Arrangement	Chain	Chain	Chain	Chain	Chain
Growth on MS agar	+	+	+	+	+
Colony morphology (BHI agar)	Rough	Rough	Smooth	Rough	Rough
Hydrolysis of esculin	+	+	+	+	+
Production of ammonia from arginine	+	+	+	+	+
Production of acetoin	+	+	+	+	+
Production of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	-	-	-	-	-
Synthesis of glucan	-	-	-	-	-
Synthesis of fructan	-	-	-	-	-
Acid from glucose	+	+	+	+	+
Acid from sucrose	+	+	+	+	+
Acid from lactose	+	+	+	+	+
Acid from trehalose	+	+	+	+	+
Acid from salicin	+	+	+	+	+
Acid from mannitol	-	-	-	-	-
Acid from sorbitol	-	-	-	-	-
Acid from raffinose	-	-	-	-	-
Acid from inulin	-	-	-	-	-

Table 2. Purification of hyaluronidase

Step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Culture supernatant	2,000	28,600	113,600	4.0	1.0	100
Ammonium sulfate (80% saturation)	143	2,371	61,147	25.8	6.5	53.8
CM-32	90	53.5	41,148	796	192	36.2
Sephacryl S-300	35	0.39	24,186	62,016	15,500	21.3

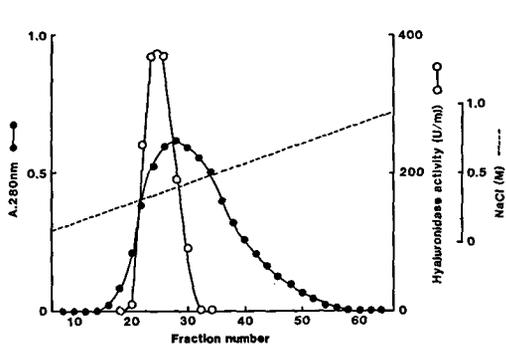


Fig. 1. Chromatography of hyaluronidase on CM-32 column

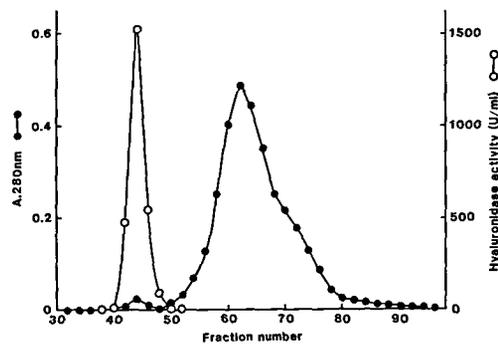


Fig. 2. Gel filtration on Sephacryl S-300 of hyaluronidase

ンドとして認められた。この成績から *S. milleri* のヒアルロニダーゼが高純度に精製されたものとみられる。

### 5. 酵素の性状

#### 1) 分子量

SDS-PAGEにより分子量は約 100,000 と算定された (Fig. 4)。

#### 2) 等電点

等電点電気泳動法の成績は、Fig. 5 に示した、ヒアルロニダーゼ活性は、pH 9.3 で最大活性を示し、本酵素の等電点は 9.3 と推定された。

#### 3) 作用至適 pH

pH 6.0 で最大活性を示し、pH 5.0 以下ではほとんど活性を示さなかった (Fig. 6)。本酵素の作用至適 pH は 6.0 とみられる。

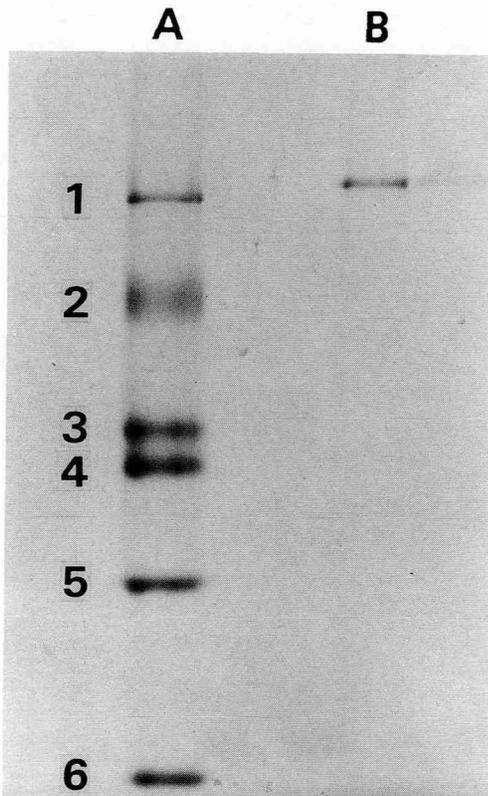


Fig. 3. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the purified hyaluronidase: A, standard proteins (1, phosphorylase b; 2, bovine serum albumin; 3, ovalbumin; 4, carbonic anhydrase; 5, trypsin inhibitor; 6,  $\alpha$ -lactalbumin); B, *S. milleri* hyaluronidase

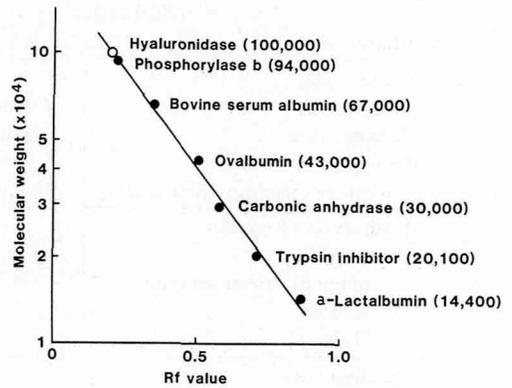


Fig. 4. Estimation of molecular weight of hyaluronidase by SDS-PAGE

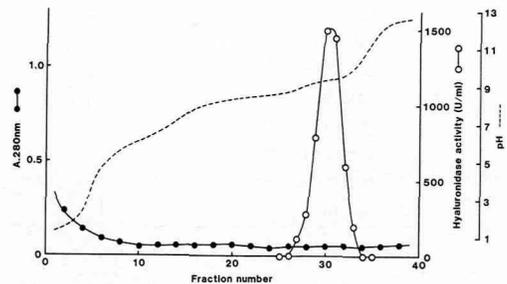


Fig. 5. Isoelectric focusing of hyaluronidase

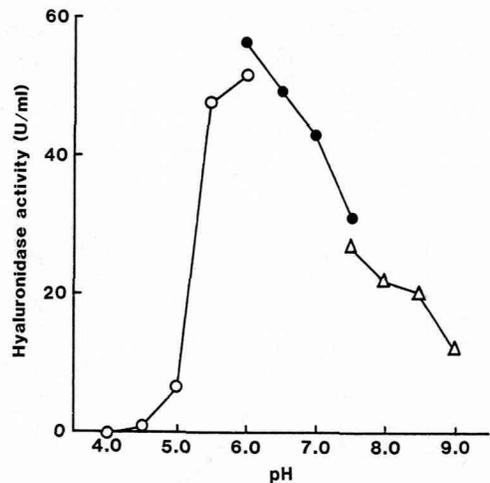


Fig. 6. Effect of pH on hyaluronidase activity:

- , acetate buffer;
- , phosphate buffer;
- △—△, Tris-HCl buffer

4) 熱抵抗性

45°C, 5分処理まで活性の低下が認められなかった。50°Cでやや活性の低下がみられ、60°C, 5分処理によって完全に失活した (Fig. 7)。

5) 金属イオンおよび EDTA の影響

活性は Zn<sup>2+</sup>, Hg<sup>2+</sup>で強く阻害され、Cu<sup>2+</sup>で完全に阻害された。しかしながら、Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>および EDTA による活性の影響はほとんど認められなかった (Table 3)。

6) 基質特異性

精製酵素は基質ヒアルロン酸に対してのみ 232 nm 吸光度の上昇を示し、その他の酸性ムコ多糖体からは 232 nm 吸光度の上昇は全く認められなかった (Table 4)。

6. 分解産物の同定

1) Sephadex G-25 カラムクロマトグラフィー

市販の *Streptomyces hyalurolyticus* 由来のヒアルロナーゼおよび精製酵素によるヒアルロン酸分解産物の Sephadex G-25 カラムクロマトグラフィーの溶出パターンは Fig. 8 に示した。市販ヒアルロナーゼによる基質分解産物は2つのピーク (I, II) として認められた。この酵素による

基質分解産物が明示されている事実に基づき、ピーク I を不飽和六糖, II を不飽和四糖と同定した。一方、精製酵素によるヒアルロン酸からの分解産物は不飽和四糖 (ピーク II) より後溶出の一つの大きなピーク (III) として認められた。

2) ペーパークロマトグラフィー

精製酵素による分解産物(ピーク III), ヒアルロン酸由来不飽和二糖, 市販酵素による分解産物の不飽和四糖および六糖のペーパークロマトグラフィーの結果は Fig. 9 に示した。精製酵素を作用させて得た主要分解産物 (ピーク III) は不飽和二糖の Rf 値と一致して検出された。

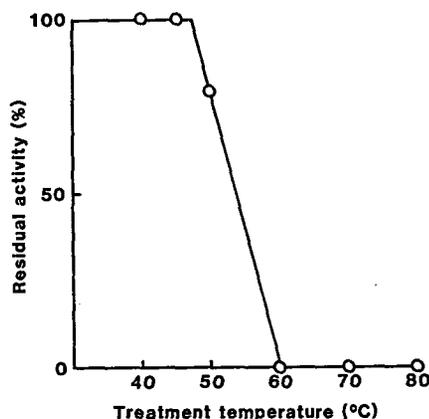


Fig. 7. Heat stability of hyaluronidase

Table 3. Effects of divalent ions and EDTA on hyaluronidase activity

Ions	Concentration (mM)	Relative activity (%)
None	—	100
Ca <sup>2+</sup>	1.0	126
Mg <sup>2+</sup>	1.0	129
Fe <sup>2+</sup>	1.0	132
Co <sup>2+</sup>	1.0	126
Mn <sup>2+</sup>	1.0	115
Zn <sup>2+</sup>	1.0	18
Hg <sup>2+</sup>	1.0	8
Cu <sup>2+</sup>	1.0	0
EDTA	1.0	88

Table 4. Degradation of acid-mucopolysaccharides by hyaluronidase

Mucopolysaccharides	Activity (ΔA <sub>232</sub> )
Hyaluronic acid	0.584
Chondroitin sulfate	0.003
Chondroitin sulfate A	0.007
B	0.023
C	0.016

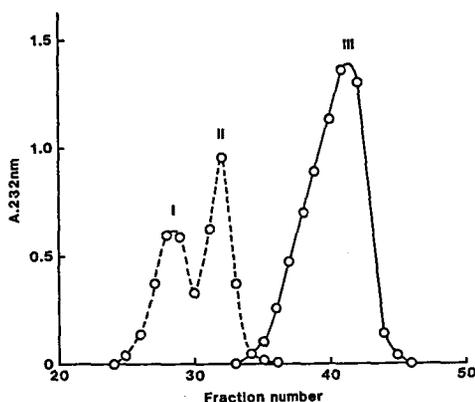


Fig. 8. Gel filtration of degradation products of hyaluronic acid on Sephadex G-25: ○—○, *S. milleri* hyaluronidase; ○---○, *Streptomyces hyalurolyticus* hyaluronidase

## 考 察

基質加 BHI 平板を用いて歯肉溝細菌のヒアルロン酸分解能を幅広く検索したところ、MS 培地に発育するレンサ球菌株にも強い活性が検出された。分解活性を有する分離菌株は、いずれも均一な生物学的性状を示し、*S. milleri* と同定された。この *S. milleri* に加えてすでに *P. acnes*, *B. heparinolyticus* および *B. oralis* のヒアルロニダーゼが明らかとなっている<sup>7,8,10-12</sup>)ことから歯肉溝細菌の酸性ムコ多糖体分解性菌種が多様であることを示唆する。

これまでヒアルロニダーゼ産生のレンサ球菌として A, B, C および G 群に属する病原性レンサ球菌が示されている。一方、Nord<sup>19)</sup>は歯垢細菌中のヒアルロニダーゼ活性を調べ、*S. mitis* が産生すること、また、Schultz-Haudt<sup>20)</sup>も *S. mitis* およ

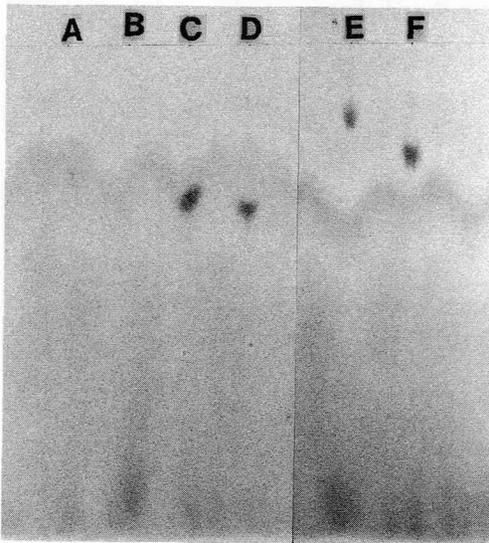


Fig. 9. Paper chromatograms of degradation products in hyaluronic acid by *S. milleri* hyaluronidase and *Streptomyces hyalurolyticus* hyaluronidase: A, *S. milleri* hyaluronidase; B, hyaluronic acid; C, unsaturated disaccharide; D, *S. milleri* hyaluronidase: peak III of Sephadex G-25; E, unsaturated hexasaccharide, *Streptomyces hyalurolyticus* hyaluronidase: peak I of Sephadex G-25; F, unsaturated tetrasaccharide, *Streptomyces hyalurolyticus* hyaluronidase: peak II of Sephadex G-25

び *S. salivarius* にヒアルロニダーゼ活性を認めている。さらに、Kilpper-Balz<sup>21)</sup>や Ruoff and Ferraro<sup>22)</sup>は近年、臨床材料からしばしば分離され、その病原性が注目されるレンサ球菌として *S. milleri* のヒアルロニダーゼ活性を示している。

Kilpper-Balz<sup>21)</sup>は通常 *S. milleri* の biotype でラクトース非分解株がヒアルロニダーゼを産生しているが、Ruoff and Ferraro<sup>22)</sup>は患者からの分離菌株中でラクトース分離株にもヒアルロニダーゼ活性を認めている。本研究で分離された歯肉溝からのヒアルロニダーゼ産生の *S. milleri* 株はいずれもラクトース分解菌株であった。しかし、分離菌株も少なくヒアルロニダーゼ産生は口腔 *S. milleri* に共通する属性か否か、また、biotype との関連性が不明である。

口腔常在菌叢における *S. milleri* の部位別生態は舌や唾液に比較して、歯垢とりわけ歯肉溝細菌叢で優勢なレンサ球菌種である<sup>23,24)</sup>。本菌のヒアルロニダーゼも他菌種の産生酵素と軌を一にし歯周組織破壊に関与する可能性が強い。また、*S. milleri* のヒアルロニダーゼ活性は菌体の超音波処理試料に殆んど認められず培養上清中に著明であることから多くの細菌ヒアルロニダーゼ同様に菌体外産生性であると考えられる。

Nord<sup>19)</sup>は *S. mitis* のヒアルロニダーゼを精製してその酵素の分子量はゲル濾過法によって 150,000、等電点、5.0、作用至適 pH が 5.1~5.3 であると報告している。*S. milleri* のヒアルロニダーゼの分子量は、SDS-PAGE によって 100,000、等電点、9.3、作用至適 pH が 6.0 で *S. mitis* のこれら酵素とはかなり異なる性状であった。また、同属の *S. equisimilis*<sup>25)</sup>や *S. pyogenes*<sup>26)</sup> のヒアルロニダーゼともこれら性状における類似性が認められなかった。

*S. milleri* のヒアルロニダーゼは  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  などの 2 価金属イオンの添加によって著明な活性の上昇が認められず、また、EDTA によってもほとんど活性に影響がなかった。本酵素も *P. acnes*<sup>11)</sup>, *B. heparinolyticus*<sup>12)</sup>, *B. oralis*<sup>10)</sup> などのヒアルロニダーゼ同様にこれら金属イオン依存性でないことを示唆する。

*B. heparinolyticus* や *P. acnes* でみられるように細菌ヒアルロニダーゼの多くは複数の酸性ムコ多糖体を分解する<sup>7,8,11,12)</sup>。Ruoff and Ferraro<sup>22)</sup>は

*S. milleri* の臨床分離株のヒアルロニダーゼ活性をもつ 36 株中 4 株にコンドロイチナーゼ活性を認めている。しかし、これらの分解活性は精製酵素による検討ではなく、基質加平板による分解所見に基づくもので、従って彼らが報告した *S. milleri* ヒアルロニダーゼの基質特異性は不明であるが、本 *S. milleri* の精製酵素はコンドロイチン硫酸、コンドロイチン硫酸 A, B, C に対して全く分解作用が認められずヒアルロン酸のみに作用する特異性を有していた。この基質特異性は *B. oralis*<sup>10)</sup> のヒアルロニダーゼと一致していた。

*Streptomyces hyalurolyticus* を除く多くの細菌ヒアルロニダーゼの最終分解産物は不飽和二糖であることが示されている<sup>10,11,27)</sup>。本酵素によるヒアルロン酸分解産物も Sephadex G-25 によるゲル濾過所見およびペーパークロマトグラフィーによる検討から、不飽和二糖であることが確認できた。

歯周組織傷害に歯垢ないし歯肉溝細菌の産生するヒアルロニダーゼやコンドロイチナーゼなど酸性ムコ多糖体分解酵素が密接に関連するとの報告も多い<sup>28-30)</sup>。*S. milleri* の精製ヒアルロニダーゼを用いて歯周組織に対する障害や感染における本酵素の役割を検討しなければならない。

## 結 論

歯肉溝細菌の酸性ムコ多糖体分解能を基質加平板で検索してレンサ球菌株にも強いヒアルロニダーゼ活性を認めた。分離菌株の生物学的性状からヒアルロニダーゼ産生菌は *S. milleri* と同定された。本菌のヒアルロニダーゼ活性は、培養上清に産生され、硫酸塩析、CM-32 カラムクロマトグラフィー、Sephadex S-300 のゲル濾過によって精製できた。

精製試料は、SDS-PAGE で単一のバンドを示し、比活性は 15,500 倍に上昇し、回収率は 21.3% であった。酵素の分子量は、SDS-PAGE で 100,000、等電点、9.3、作用至適 pH は 6.0 であった。本酵素活性は 60°C、5 分処理で失活し、また Zn<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>、Cu<sup>2+</sup> で強く阻害されたが、Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>、Mn<sup>2+</sup> および EDTA による影響はほとんどなかった。基質特異性はヒアルロン酸のみ分解し、コンドロイチン硫酸、コンドロイチン硫酸 A, B, C は分解しなかった。本酵素に

よるヒアルロン酸分解産物は、ゲル濾過およびペーパークロマトグラムの所見から不飽和二糖と同定された。

## 文 献

- 1) Gibbons, R. J. and MacDonald, J. B. (1961) Degradation of collagenous substrates by *Bacteroides melaninogenicus*. J. Bacteriol. 81: 614—621.
- 2) Mayrand, D., McBride, B. C., Edwards, T. and Jensen, S. (1980) Characterization of *Bacteroides asaccharolyticus* and *B. melaninogenicus* oral isolates. Can. J. Microbiol. 26: 1178—1183.
- 3) Robertson, P. B., Lantz, M., Marucha, P. T., Kornman, K. S., Trummel, C. L. and Holt, S. C. (1982) Collagenolytic activity associated with *Bacteroides* species and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. J. Period. Res. 17: 275—283.
- 4) Schultz-Haudt, S. D. and Scherp, H. W. (1955) Production of hyaluronidase and beta-glucuronidase by viridans streptococci isolated from gingival crevices. J. Dent. Res. 34: 924.
- 5) Schultz-Haudt, S. D. and Scherp, H. W. (1956) The production of chondrosulfatase by microorganisms isolated from human gingival crevices. J. Dent. Res. 35: 299—307.
- 6) 中村 武 (1969) 口腔内嫌気性 heparinase 産生菌に関する研究。十全会誌, 78: 509—530.
- 7) 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.
- 8) 谷口裕朗, 藤村節夫, 中村 武 (1982) 口腔内 *Bacteroides* sp. の産生するムコ多糖体分解酵素, 特にヘパリナーゼについて。松本歯学, 8: 15—22.
- 9) 中村 武, 杉中芳幸, 高添一郎, 奥田克爾 (1976) 口腔内 *Propionibacterium acnes* の chondroitin sulfatase に関する研究。松本歯学, 2: 140—145.
- 10) 柴田幸永, 志村隆二, 藤村節夫, 中村 武 (1988) *Bacteroides oralis* のヒアルロニダーゼの精製とその性状。松本歯学, 14: 58—65.
- 11) 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.
- 12) Taniguchi, H., Fujimura, S., Takeuchi, K. and Nakamura, T. (1983) Purification and characterization of mucopolysaccharidase from an

- oral strain of *Bacteroides* sp. Appl. Environ. Microbiol. **46**: 1252—1257.
- 13) Nakamura, T., Shibata, Y. and Fujimura, S. (1988) Purification and properties of *Bacteroides heparinolyticus* heparinase (heparin lyase, EC 4. 2. 2. 7). J. Clin. Microbiol. **26**: 1070—1071).
  - 14) Smith, R. F. and Willett, N. P. (1968) Rapid plate method for screening hyaluronidase and chondroitin sulfatase-producing microorganisms. Appl. Microbiol. **16**: 1434—1436.
  - 15) Linker, A. (1966) Bacterial mucopolysaccharidases (mucopolysaccharide lyases). Methods in Enzymol. **8**: 650—654.
  - 16) Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, **227**: 680—685.
  - 17) Vesterberg, O., Wadstrom, T., Vesterberg, K., Svensson, H. and Malmgren, B. (1967) Studies on extracellular proteins from *Staphylococcus aureus*. I. Separation and characterization of enzymes and toxins by isoelectric focusing. Biochim. Biophys. Acta, **133**: 435—445.
  - 18) 石川正幸, 原 昭二, 古谷 力, 中沢泰男(1980) 薄層クロマトグラフィー, 第5版, 156. 南山堂, 東京.
  - 19) Nord, C. E. (1971) Purification and properties of hyaluronidase from *Streptococcus mitis*. Odont. Revy. **22**: 125—136.
  - 20) Schultz-Haudt, S. D. (1957) Observations on the acid mucopolysaccharides of human gingiva. Oslo Univ. Press, Oslo.
  - 21) Kilpper-Balz, R., Williams, B. L., Luttkicken, R. and Schleifer, K. H. (1984) Relatedness of '*Streptococcus milleri*' with *Streptococcus an-ginosus* and *Streptococcus constellatus*. Syst. Appl. Microbiol. **5**: 494—500.
  - 22) Ruoff, K. L. and Ferraro, M. J. (1987) Hydrolytic enzymes of "*Streptococcus milleri*". J. Clin. Microbiol. **25**: 1645—1647.
  - 23) Gibbons, R. J. and van Houte, J. (1973) On the formation of dental plaques. J. Periodontol. **44**: 347—360.
  - 24) Gibbons, R. J. and van Houte, J. (1975) Dental caries. Annu. Rev. Med. **26**: 121—136
  - 25) Ozegowski, J. -H., Gerlach, D. und Kohler, W. (1981) Reinigung und charakterisierung von streptokokken-hyaluronatlyase. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A **249**: 310—322.
  - 26) Hill, J. (1976) Purification and properties of streptococcal hyaluronate lyase. Infect. Immun. **14**: 726—735.
  - 27) 長谷川栄一, 鈴木 旺, 瀬野信子, 平野茂博(1968) ムコ多糖の構造と機能, 化学の領域, 増刊 83: 135—152.
  - 28) Schultz-Haudt, S. D., Dewar, M. and Bibby, B. G. (1953) Effects of hyaluronidase on human gingival epithelium. Science. **117**: 653—655.
  - 29) Thonard, J. C. and Scherp, H. W. (1962) Histochemical demonstration of acid mucopolysaccharides in human gingival epithelial intercellular spaces. Arch. Oral Biol. **7**: 125—136.
  - 30) 竹内 宏, 堀 泰典, 金久純也, 上田雅俊, 谷明, 佐川寛典 (1983) 辺縁性歯周炎の免疫病理学的研究. 第7報, 歯周炎と細菌酵素(その2) 炎症歯肉における bacterial chondroitinase ABC と hyaluronidase について. 歯基礎誌, **25**: 437—442.