

〔原 著〕

*Porphyromonas gingivalis*の自己融解酵素変異株の性状

鎌口 有秀, 宮川 博史, 中澤 太

北海道医療大学歯学部口腔細菌学教室

Characterization of an autolysin mutant of *Porphyromonas gingivalis*

Arihide Kamaguchi, Hiroshi Miyakawa and Futoshi Nakazawa

Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido

Abstract

The results of a BLAST search for autolysin indicated that one ORF was indentified as an autolysin which had 39% homology (58/147 amino acids) with the N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase like protein of *Clostridium tetani*. This autolysin mutant of *Porphyromonas gingivalis* was constructed by alleic exchange. The growth curve of the autolysin mutant was the same as that of parent strain. However, the morphology of the autolysin mutant altered into chain forms at the early log-phase.

These results indicate that this autolysin may play an important role in cell division in *P. gingivalis*.

Key words : *Porphyromonas gingivalis*, autolysin, autolysis, growth

緒 言

*Porphyromonas gingivalis*は成人性歯周炎の主要原因細菌の1つであり、線毛、内毒素、アルギニン特異的システインプロテアーゼ (Rgp), リジン特異的システインプロテアーゼ (Kgp) など多くの病原因子が報告されている (Slots and Genco, 1984. Slots, 1982). *P. gingivalis*は発育の為のエネルギー源として糖を利用できず、代わりにタンパク質を利用する (Takahashi et al., 2000). Rgp, Kgpは病原因子として働くことに加え、外部のタンパク質をプロセシングし、プロセシングを受けたタンパク質はその後、種々のペプチダーゼにより分解され菌体内にとりこまれ、エネルギー源として利用される (Kadowaki et al., 1998. Nakayama et al., 1996. Nelson et al., 1999). 細菌の細胞壁はペプチドグリカン主成分とする厚い膜であり、増殖時にはこのペプチドグリカンの一部を切断し、そこに新しいペプチドグリカン構成成分を連結させる。この古いペプチドグリカン切断する

酵素がmurein (glycan) hydrolaseである。しかし、この酵素は過剰に働くと自己融解を起こす (Shungu and Shockman, 1979)。Kamaguchiらは先に*P. gingivalis*は*in vitro*において、増殖後、著しい自己融解を起こすこと、また、自己融解に伴い菌体外に多く遊離されるタンパク質の中に*P. gingivalis*の主要な病原因子であるRgp等が存在することを報告した。これらの結果から、*P. gingivalis*は自己融解後もそのRgpによって成人性歯周炎の進行に重大な影響を及ぼしていることが示唆された (Kamaguchi et al., 2004)。*P. gingivalis*の自己融解の機構を明らかにすることは本菌の生理作用の解明のみならず、病原性の解明にもつながる重要な課題である。しかし、*P. gingivalis*の自己融解の開始シグナルとなる因子および、関与する酵素については明らかにされていない。そこで、*P. gingivalis*の主要な自己融解酵素を解明する目的で、*P. gingivalis*と他の細菌の自己融解酵素とのホモロジーの高い遺伝子を検索し、ついで*P. gingivalis*の自己融解酵素の変異株を作成し、その性状を検

受付：平成17年3月31日

討した。

方 法

供試菌株と培養方法

P. gingivalis ATCC 33277株 (American Type Culture Collectionより購入), B4株 (自己融解酵素変異株: 今回作製), KDP112 (*rgpA*, *rgpB* 変異株), KDP129株 (*kgp* 変異株), KDP136株 (*rgpA*, *rgpB*, *kgp* 変異株) (これら3株は長崎大学, 中山浩次先生より分与) をイーストエキストラクト, ヘミン, メナジオン添加 tryptic soy broth (TYHM培地) で嫌氣的に培養した。 *Escherichia coli* JM109 (タカラバイオ株式会社より購入), DH5 α (タカラバイオ株式会社より購入), pKD355 (中山浩次先生より分与) はLuria-Bertani (LB) 液体培地または寒天平板培地に好氣的に培養した。 LB培地は必要時にはアンピシリン (100 μ g/ml) またはエリスロマイシン (300 μ g/ml) を添加した。

供試プラスミドと抽出方法

pGEM (T easy vector, Promega Corporation), pGEM-K1 (*P. gingivalis* 自己融解酵素遺伝子含有, 今回作製), pGEM-K2 (自己融解酵素遺伝子に *Bam* HI リンカー挿入, 今回作製), pGEM-K5 (*Bam* HI リンカー含有自己融解酵素遺伝子に *ermF-ermAM* cassette を挿入, 今回作製), pKD355 (*ermF-ermAM* cassette 含有)。各プラスミドをそれぞれの宿主菌にて培養後, Alkaline Lysis Method (Sambrook and Russell, 2001) にて抽出した。

*P. gingivalis*の自己融解酵素遺伝子の検索

*P. gingivalis*の他の細菌の自己融解酵素遺伝子とのホモロジー検索にNCBIのEntrezとTIGR (The Institute for Genomic Research) の *P. gingivalis* W83のゲノム・データベースを使用した。

染色体 DNAの抽出

P. gingivalis からの染色体DNAはSmithらの方法 (Smith et al., 1989) に従った。

*P. gingivalis*の自己融解酵素変異株の作製方法

*P. gingivalis*の自己融解酵素遺伝子と示唆される部位をpGEM T-easyベクターにライゲーションし, pGEM K1を得た。これに *Bam* HI リンカーを挿入しpGEM K2とした。pGEM K2にpKD355より得た *ermF-ermAM* cassette を挿入しpGEM K5を得た。pGEM K5を *P. gingivalis* ATCC 33277にエレクトロポレーションにて挿入し, エ

リスロマイシン含有GAM寒天培地に塗抹, 培養後, 得られたコロニーを自己融解酵素変異株とした (Fig. 1)。

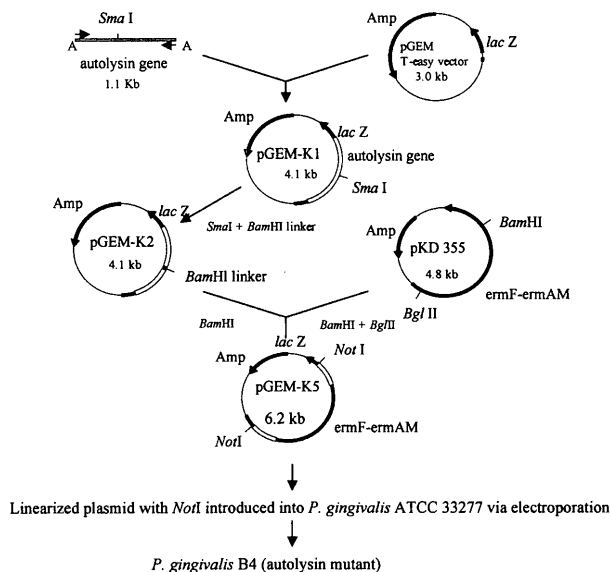


Fig. 1 Construction of a site specific mutant by allelic exchange. The pGEM-K5 containing autolysin gene interrupted by an *ermF-ermAM* cassette. The plasmid was linearized with *Not*I and introduced into *P. gingivalis* ATCC 33277 by electroporation. *P. gingivalis* was incubated on GAM agar containing erythromycin (10 μ g/ml) for 7 days at 37°C.

*P. gingivalis*の発育曲線の測定方法

試験管 (12mm X100mm) にTYHM液体培地またはTYHM液体培地中のヘミンまたはメナジオンを減量した各培地10mlに一夜培養した各菌を0.5ml接種し, 嫌気培養培養後, 経時的に分光光度計 (U-1800 Spectrophotometer, 日立製作所) にてOD_{600nm}の濁度を測定した。

結 果

自己融解酵素変異株の作製

多くの他の細菌の自己融解酵素のアミノ酸配列と *P. gingivalis* 全アミノ酸配列とのホモロジー検索の結果, *Clostridium tetani* のN-acetylmuramoyl-L-alanine amidase-likeタンパクと39% (58/147 アミノ酸) のホモロジーがあることがわかった。 *P. gingivalis* のこの自己融解酵素遺伝子に対するプライマーペア (Auto F: CGCTCCG AATCTCCCTGACGG, Auto R: TTCGAGGCCGACACTC CGCGC) を作製し, このプライマーペアと *P. gingivalis* 染色体DNAをテンプレートとして, 1,094bpのPCR産物を得た。このPCR産物を用いallelic exchangeにより得られた変異株をB4株とした。B4株から抽出した染色体DNAをテンプレートとしてAuto FとAuto Rを用いてPCRを行ったところ3.2Kbpに1本のバンドが検出されたことより, 自己融解酵素遺伝子はダブルクロスオーバー変換により組換えが生じていることを確認した (Fig. 2)。

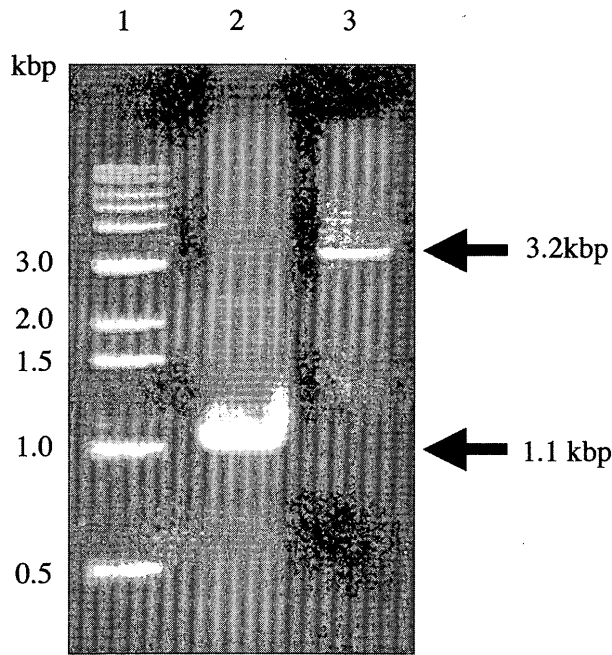


Fig.2 Agarose gel electrophoresis pattern of PCR product from *P. gingivalis* ATCC 33277 and B4. *P. gingivalis* ATCC 33277 and B4 were analyzed by PCR using the autolysin gene primer pairs (Auto F and Auto R). Lane1, Mw marker; lane 2, *P. gingivalis* ATCC 33277; Lane 3, *P. gingivalis* B4.

P. gingivalis ATCC33277株とB4株の発育曲線の比較

親株と変異株の発育曲線をTYHM培地を用いて比較したところ、B4株も親株と同様に自己融解し、この遺伝子の変異では自己融解は阻止されることがわかった (Fig. 3)。しかし、対数増殖期の両菌をグラム染色しその形態を比較すると親株はグラム陰性の短桿菌がみられるのに対して、B4株は連鎖した菌が多くみられた (Fig. 4)。

ヘミンとメナジオン制限下での発育曲線

P. gingivalis の発育必須因子であるヘミンとメナジオン

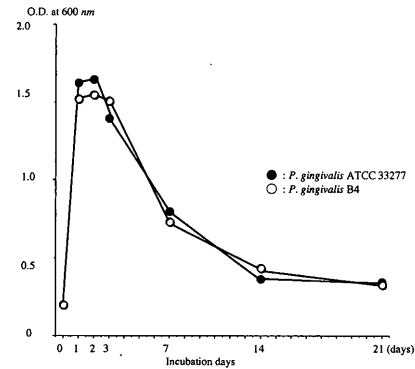


Fig. 3 Growth curve of *P. gingivalis* ATCC 33277 and B4. Overnight cultured cell suspensions of *P. gingivalis* (0.5ml) were inoculated into 10 ml of 3 % tryptic soy broth supplemented with 0.5 % yeast extract, 5 μ g / ml hemin and 1 μ g / ml menadione, and incubated anaerobically at 37°C for the appropriate number of days. The OD at 600 nm is shown along the y-axis.

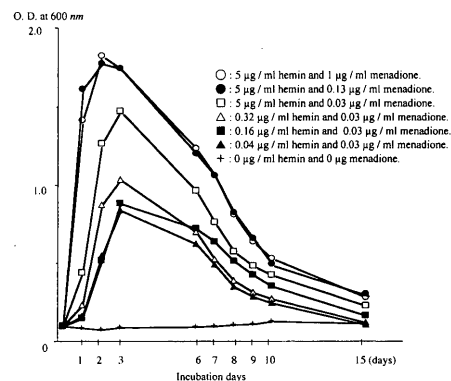
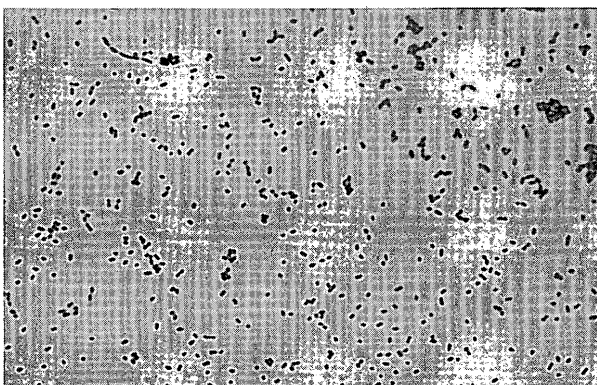


Fig. 5 Effect of hemin and menadione limitation of growth of *P. gingivalis* ATCC 33277. *P. gingivalis* ATCC 33277 was grown anaerobically at 37°C 24 hr in 3 % tryptic soy broth supplemented with 0.5 % yeast extract, 5 μ g / ml hemin, and 1 μ g / ml menadione. After incubation, cells were harvested by centrifugation at 5,000 g for 20 min and washed with the same volume of 3 % tryptic soy broth supplemented with 0.5 % yeast extract. The cell suspension (0.5 ml) was inoculated into each media, which consisted of 3 % tryptic soy broth, 0.5 % yeast extract, and various amounts of hemin and menadione. Concentration of hemin and menadione were indicated in the Figure. The OD at 600 nm is shown along the y-axis.

(A)



(B)

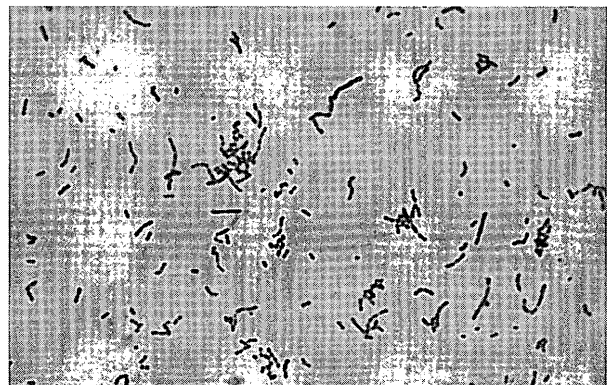


Fig. 4 Microscopic examination of Gram stained *P. gingivalis* ATCC 33277 and the autolysin mutant (B4). *P. gingivalis* ATCC 33277 (A) and B4 (B) were cultured in TYHM broth at 37°C for 10 hr. Each culture was washed with PBS twice and subjected to Gram staining.

ンを減量することにより、低発育状態における自己融解について観察した。ヘミンを5 µg/mlから0.32, 0.16, 0.04, 0 µg/mlと減量し、メナジオンを1 µg/mlから0.13, 0.03, 0 µg/mlと減量した組み合わせを作成し、発育曲線をみたところ、対数増殖期の濁度が1.8から1.45, 1.05, 0.9, 0.85と低下し、また、定常期に達する時間が24時間遅れた。しかし、いずれの培地においても自己融解は観察された (Fig. 5)。

考 察

細菌の自己融解はpeptidoglycan hydrolaseにより起こる。この酵素にはmuramidase, glucosaminidase, N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase (amidase) と endopeptidaseが含まれる (Smith et al., 2000)。Peptidoglycan hydrolaseは細菌の溶解以外に、抗生物質誘導細菌溶解、細菌の生育、細胞壁の転換、ペプチドグリカンの成熟、細胞の分裂、コンピテント状態、タンパク質分泌、病原性などにも関与するとされている (Smith et al., 2000)。近年、細菌の自己融解は真核細胞でのアポトーシスと同様に細菌のプログラム細胞死である可能性が示唆されている (Lewis, 2000)。自己融解による欠損細胞の除去は周囲の細胞への栄養の供給の可能性に加え、ダメージをうけたDNAを除去することによる集団での変異率を下げることに寄与していることが示唆されている (Lewis, 2000)。*P. gingivalis* は *in vitro* では定常期にはいるとすぐ、著しい濁度の低下が観察される (Kamaguchi et al., 2004)。この自己融解がどのような酵素によって生じるかを明らかにする目的で、他の細菌の自己融解酵素とホモロジー検索を行った結果、*Clostridium tetani* のN-acetylmuramoyl-L-alanine amidase-likeタンパク質と39%のホモロジーがあるOpen reading frame (ORF) が検出された。このORFのアミノ酸配列はその他に*Bacillus subtilis* の自己融解酵素中の1つのyubBと32%、*Enterococcus faecalis* のN-acetylmuramoyl-L-alanine amidaseと31%、*Enterococcus faecalis* の自己融解酵素とも26%のホモロジーがあった。この*P. gingivalis* のORFをgene-directed mutagenesisにより作製した変異株 (B4株) の発育曲線は親株と大きな変化はなかったが、対数増殖期の初期の菌体は親株に比較して連鎖することが観察された。*P. gingivalis* にいくつか存在すると示唆される自己融解酵素のうち、この自己融解酵素は対数増殖期における細胞の分裂に関与することが示唆された。*Lactococcus lactis* のacmB (peptidoglycan hydrolase) 産生は対数増殖期で増加後速やかに低下する。これはこの酵素の転写が細胞発育により制御されていることによると報告されている

(Huard et al., 2003)。*P. gingivalis* のこの自己融解酵素も増殖過程において、産生量に差異がある可能性も考えられた。*L. lactis* のacmBの産生を制御している具体的なものは明らかにされていないが、プロトン・モーター・フォースが制御している可能性が指摘されている (Huard et al., 2003)。

最近、*P. gingivalis* において自己融解酵素の遺伝子が少なくとも3つ存在する可能性がデータベース上で示唆された (Nelson et al., 2003)。それらの殆どが自己融解の遺伝子として可能性は示唆されているが、その遺伝子産物の性状は不明確である。今回我々が検討した自己融解酵素のDNAおよびアミノ酸シーケンスをそれらと比較した結果、新しく自己融解酵素としての可能性は示唆されたが、性状が未知の自己融解酵素の中の1つと一致した (data not shown)。このことから、今回の実験は*P. gingivalis* の新しい自己融解酵素の性状の一端を変異株を用いて明らかにできたものと思われる。2つ目の自己融解酵素の1つはHayashiら (Hayashi et al., 2002) により報告されたN-acetylmuramoyl-L-alanine amidaseと一致しており、その遺伝子はamiとされている。今回の自己融解酵素遺伝子はDNAおよびアミノ酸のシーケンスにおいてamiとホモロジーはなかったことより、異なる自己融解酵素であることがわかった (data not shown)。Hayashiらもami変異株を作製し、その性状について報告しているが、変異株の発育曲線については述べられていない。ami変異株はvesicleを親株より多く放出することに加え長い連鎖と異常に長い桿菌になるとしている (Hayashi et al., 2002)。今回の自己融解酵素変異株は連鎖するが、異常に長い桿菌はみられず、またvesicle産生量にも変化はみられなかった (data not shown)。自己融解酵素としてデータベース上で可能性が示唆された3つ目の自己融解酵素については物質としての詳細な性状については検討されていない。*Bacillus subtilis* は35のpeptidoglycan hydrolase遺伝子が存在し、11のファミリーに分けられている (Smith et al., 2000)。このことから、*P. gingivalis* も複数の自己融解酵素の存在が考えられ、その中の1つを変異させても他の自己融解酵素が働き自己融解は変化しなかったことが推察された。

P. gingivalis において何が自己融解酵素の発現を制御しているか不明であるが、外部の栄養状態が自己融解酵素の発現を制御する可能性が報告されている (Centry et al., 1993)。*E. coli* において、アミノ酸が枯渇すると、発育が遅くなりGuanosin-5'-diphosphate-3'-diphosphate (ppGpp) 合成が活性化され、主な自己融解酵素の活性

が阻害される (Betgner et al., 1990). これは、発育が遅いと抗生物質誘導の自己融解に耐性になる機構とされている (Rodionov and Ishiguro, 1995). *P. gingivalis* においてヘミンおよびメナジオン量を変化させた低発育状態でも自己融解は観察された. このことより, *P. gingivalis* は発育状態に関わらず自己融解を生じることがわかった. この現象は *E. coli* におけるアミノ酸枯渇により自己融解が阻害される機構とは異なるものと思われた. *Staphylococcus aureus* において自己融解は *LytS-R*, *IrgA-B*, *LytS-LytR*, *ArlR-ArlS* と *Sar* タンパク質ファミリーの 2 成分系により制御されている (Brunskill and Bayles, 1996. Fournier and Hooper, 2000. Fujimoto and Bayles, 1998. Groicher et al., 2000). さらに, *LytS-R*, *IrgA-B* と *ArlR-S* はこれらのタンパク質をコードする遺伝子のプロモーターに結合する *RAT* によって制御される (Ingavale et al., 2003). *P. gingivalis* においても何らかの外的因子を 2 成分系が感知し, 自己融解の制御に関与していることも推察される. *Pseudomonas aeruginosa* においてはクオラムセンシングに関与するオートインジューサー 1 が自己融解に関与することが, トランスポゾン挿入変異により示された (D'Argenio et al., 2002). *P. gingivalis* においてもオートインジューサー 2 (AI-2) によりクオラムセンシングを行うことが報告されていることから (Burgess et al., 2002. Chung et al., 2001. 鎌口他, 2004), AI-2 産生に関与する *luxS* 変異株と親株との自己融解を比較検討したが, 差異は認められなかった (data not shown).

Kamaguchi らは *P. gingivalis* の産生する *Rgp* と *Kgp* は非常に安定であり, *P. gingivalis* の自己融解後も菌体外に活性を保ったまま遊離され, 成人性歯周炎との重要な関連性を指摘した (Kamaguchi et al., 2004). 菌体外に遊離された *Rgp*, *Kgp* と自己融解の関係をみるため *Rgp*, *Kgp* の遺伝子である *rgpA*, *rgpB*, *kgp* の変異株の発育曲線を検討した. その結果, 親株は著しい濁度の低下が見られるのに対して, *rgpA*, *rgpB*, *kgp* の変異株は OD_{600nm} での濁度が 0.9 付近で停止した (data not shown). このことより, *P. gingivalis* の自己融解による濁度の低下のうち, 後半の濁度の低下は *Rgp*, *Kgp* による自己消化が関与している可能性が示唆された. しかし, *S. aureus* におけるトリトン X-100 とペニシリン誘導自己融解においては自己融解酵素の前駆体がプロセッシングをうけることが必要であるとされている (Groicher et al., 1993) ことより, *P. gingivalis* においても *Rgp* や *Kgp* によりプロセッシングを受ける必要がある酵素が存在する可能性も否定できない.

P. gingivalis の自己融解がバイオフィーム中においても *in vitro* で観察されるように生じるかどうかは不明であるが, ヘミン, メナジオン制限下で, 発育が悪くても自己融解は観察されたことより, 栄養状態が悪いと想定されるバイオフィーム中においても生じるものと考えられた. また, バイオフィーム中における自己融解の重要性として, *P. aeruginosa* においてはバイオフィーム形成に細菌由来の DNA が必要であるとされている (Whichurch et al., 2002). この様に, *P. gingivalis* の自己融解は口腔内でのバイオフィーム形成, 菌の発育および病原性等多面的に関与している可能性が考えられる.

結 語

P. gingivalis の自己融解酵素を明らかにする為に, 他の細菌の自己融解酵素とホモロジー検索を行い, *C. tetani* の N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase-like タンパク質と高いホモロジーをもつ遺伝子を見いだした. この遺伝子の変異株を作製し, 親株との発育曲線を検討したが, 両菌株間に差異はみられなかった.

これは, 複数存在すると考えられる自己融解酵素のうち, 1 つの自己融解酵素の変異のみでは, 自己融解現象には明らかな差異は認められない可能性も示唆された. しかし, 両菌株間の発育時の形態を比較した結果, 変異株は対数増殖期の初期に菌体がレンサする傾向がみられたことより, 少なくとも, この遺伝子産物は一般的な自己融解酵素の性状の 1 つである, 菌の分裂に関与する性状を保持している可能性が示唆された.

文 献

- Betzner AS, Ferreira LC, Holtje JV and Keck W. Control of the activity of the soluble lytic transglycosylase by the stringent response in *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 55: 161-164, 1990.
- Brunskill EW and Bayles KW. Identification of *LytSR*-regulated genes from *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 178: 5810-5812, 1996.
- Burgess NA, Kirke DF, Williams P, Winzer K, Hardie KR, Meyers NL, Aduse-Opoku, Curtis MA and Camara M. LuxS-dependent quorum sensing in *Porphyromonas gingivalis* modulates protease and haemagglutinin activities but is not essential for virulence. Microbiology 148: 763-772, 2002.
- Chung WO, Park Y, Lamont RJ, McNabe R, Barbieri B and Demuth DR. Signaling system in *Porphyromonas gingivalis* based on a LuxS protein. J Bacteriol 183: 3903-3909, 2001.
- D'Argenio DA, Calfee MW, Rainey PB and Pesci EC. Autolysis and autoaggregation in *Pseudomonas aeruginosa* colony morphology mutant. J Bacteriol 184: 6481-6489, 2002.
- Fournier B and Hooper DC. A new two-component regulatory system involved in adhesion, autolysis, and extracellular proteolytic activity

- of *Staphylococcus aureus*. J Bacteriol 182 : 3955–3964, 2000.
- Fujimoto DF and Bayles KW. Opposing roles of the *Staphylococcus aureus* virulence regulators, Agr and Sar, in triton X-100 and penicillin-induced autolysis. J Bacteriol 180 : 3724–3726, 1998.
- Gentry DR, Hernandez VJ, Nguyen LH, Jensen DB and Cashel M. Synthesis of the stationary-phase sigma factor σ is positively regulated by ppGpp. J Bacteriol 175 : 7982–7989, 1993.
- Groicher KH, Firek BA, Fujimoto DF and Bayles KW. The *Staphylococcus aureus* IrgAB operon modulates murein hydrolase activity and penicillin tolerance. J Bacteriol 182 : 1794–1801, 2000.
- Hayashi J, Hamada N and Kuramitsu HK. The autolysis of *Porphyromonas gingivalis* is involved in outer membrane vesicle release. FEMS Microbiol Lett 216 : 217–222, 2002.
- Huard C, Miranda G, Wessner F, Boltin A, Hansen J, Foster SJ and Chapot-Chartier MP. Characterization of AcmB, an N-acetylglucosaminidase autolysin from *Lactococcus lactis*. Microbiology 149 : 695–705, 2003.
- Ingavale SS, Wamel WV and Cheung AL. Characterization of RAT, and autolysis regulator in *Staphylococcus aureus*. Mol Microbiol 48 : 1451–1466, 2003.
- Kadowaki T, Nakayama K, Yoshimura F, Okamoto K, Abe N and Yamamoto K. Arg-gingipain acts as a major processing enzyme for various cell surface proteins in *Porphyromonas gingivalis*. J Biol Chem 273 : 29072–29076, 1998.
- Kamaguchi A, Nakano M, Shoji M, Nakamura R, Sagane Y, Okamoto M, Watanabe T, Ohya T, Ohta M and Nakayama K. Autolysis of *Porphyromonas gingivalis* is accompanied by an increase in several periodontal pathogenic factors in the supernatant. Microbiol Immunol 48 : 541–545, 2004.
- 鎌口有秀, 中村麗子, 大山徹, 渡部俊弘, 岡本公彰, 馬場久衛. *Porphyromonas gingivalis*のRgp (arginine specific cysteine proteinase)発現に対するquorum sensingの影響. 東日本歯学雑誌 22 : 137–148, 2003.
- Lewis K. Programmed Death in Bacteria. Microbiology and Molecular Biology Reviews 64 : 503–514, 2000.
- Nakayama K, Yoshimura F, Kadowaki T and Yamamoto K. Involvement of arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain) in fibrinolytic activity of *Porphyromonas gingivalis*. J Bacteriol 178 : 2818–2824, 1996.
- Nelson D, Potempa J, Kordula T and Travis J. Purification and characterization of a novel cysteine protease (periodontain) from *Porphyromonas gingivalis*. Evidence for a role in the inactivation of human α_1 -proteinase inhibitor. J Biol Chem 274 : 12245–12251, 1999.
- Nelson KE, Fleischmann R, Deboy RT, Paulsen IT, Fouts DE, Eisen JA, Daugherty SC, Dodson RJ, Durkin AS, Gwinn M, Haft DH, Kolonay JF, Nelson WC, Mason T, Tallon L, Gray J, Granger D, Tettelin H, Dong H, Galvin JL, Duncan MJ, Dewhirst FE and Fraser CM. Complete genome sequence of the oral pathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis* strain W83. J Bacteriol 185 : 5591–5601, 2003.
- Rodionov DG and Ishiguro EE. Direct correlation between overproduction of guanosine 3', 5-bispyrophosphate (ppGpp) and penicillin tolerance in *Escherichia coli*. J Bacteriol 177 : 4224–4229, 1995.
- Sambrook J, Russell DW, editors. Molecular Cloning A Laboratory Manual. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press : 2001.
- Shungu DL and Shockman. Morphological and physiological of autolytic-defective *Streptococcus faecium* strains. J Bacteriol 138 : 598–608, 1979.
- Slots J and Genco RJ. 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, 1984.
- Slots J. Importance of black-pigmented *Bacteroides* in human periodontal disease. In Genco RJ, Mergenhagen SE, editors. Host-parasite interactions in periodontal diseases : American Society for Microbiology, 1982, p27–45.
- Smith GLF, Socransky SS and Smith CM. Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms. Oral Microbiol Immunol 4 : 47–51, 1989.
- Smith TJ, Blackman SA and Foster SJ. Autolysins of *Bacillus subtilis* : multiple enzymes with multiple functions. Microbiology 146 : 249–262, 2000.
- Takahashi N, Sato T and Yamada T. Metabolic pathways for cytotoxic end product formation from glutamate- and aspartate-containing peptides by *Porphyromonas gingivalis*. J Bacteriol 182 : 4704–4710, 2000.
- Whitchurch CB, Tolker-Nielsen T, Ragas PC and Mattick JS. Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. Science 295 : 1487, 2002.