

【199】

氏名	大石 憲一
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第 1866号
学位授与の日付	平成11年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	Capnocytophaga granulosa の産生するアミノペプチダーゼの精製とその性質
論文審査委員	教授 福井一博 教授 渡邊達夫 教授 村山洋二

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

*Capnocytophaga granulosa* ATCC 51502 (*C. granulosa*) は Yamamoto ら (1994) により分離同定されたグラム陰性桿菌で、定常期において菌体内顆粒が見られる点、および微好气的条件下での増殖が見られる点で、他の *Capnocytophaga* 属細菌とは区別される。本菌の懸濁液は、アミノペプチダーゼ活性を有することが認められているが、酵素の詳細は明らかにされていない。

本研究ではこの点を明らかにするために、*C. granulosa* 由来のアミノペプチダーゼを精製し、酵素学的性状の検討を行うことを目的とした。

### 【材料および方法】

#### I. 試験菌株

*Capnocytophaga granulosa* ATCC 51502 標準菌株を使用した。

#### II. 菌の培養

供試菌を GAM 培地(日水製薬)に播種、37℃、48 時間培養した。遠心分離(12,000 × g, 10 分, 4℃)を行い、得られた上清を粗酵素標品とした。上清はただちに 60% 硫酸濃縮を行い、所要量に達するまで 4℃ で保存した。

#### III. 酵素活性測定

基質として L-arginine-β-naphthylamide (L-Arg-βNA) を用い、酵素反応で遊離した β-naphthylamine を UV-1200 型分光光度計(島津製作所)で 525nm の吸光度で測定した(Suido *et al.*, 1986)。

#### IV. 蛋白定量

Hartree の方法(1972)、あるいは蛍光法(Böhlen *et al.*, 1973)で定量した。標準蛋白にはウシ血清アルブミン(Sigma)を用いた。

#### V. 酵素精製

培養上清 62.7L について 60% 飽和硫酸分画を行い、遠心分離で得られた沈渣を 20mM リン酸緩衝液(pH 7.0)に溶解、同一緩衝液で 18 時間透析を行った。限外濃縮後、CM-Sepharose® Fast Flow (5×14.5cm, Amersham Pharmacia Biotech) に添加した。溶出は 10mM リン酸緩衝液(pH 7.0)および同緩衝液に 0.1 M, 0.2 M の NaCl を含む溶液を用いて、ステップワイズ法で行った。プールした活性画分を限外濃縮し、Superdex® 200 prep grade (1.6×54 cm, Amersham Pharmacia Biotech) でゲル濾過を行い、精製した。

#### VI. 分子量測定

Andrews (1965) の方法に従い、ゲル濾過法で算出した。また、Laemmli の方法に従って SDS-PAGE を行い、分子量を算出した。

## VII. 等電点電気泳動

IEF PAGE mini pH3-10 (テフコ) を用いて行った。ゲルの染色は、銀染色および酵素活性染色を行った。

## VIII. アミノ酸分析

Simpton らの方法に従い、塩酸加水分解した酵素蛋白をアミノ酸自動分析装置 (HITACHI) で分析した。

### 【結果】

#### I. 酵素精製

酵素は精製過程を通じて約 16 万倍に精製され、回収率は 12% であった。

#### II. 精製酵素の一般的性状

##### 1. 精製酵素の均一性

SDS-PAGE で単一のバンドが得られた。

##### 2. 分子量測定

ゲル濾過法で約 270kDa, SDS-PAGE で約 86kDa と推測された。

##### 3. 等電点電気泳動

銀染色で、pI8.8 付近に 3 本, pI7.5 付近に 1 本のバンドを認めた。また活性染色で、pI8.8 付近と pI7.5 付近にバンドを認めた。

##### 4. 至適 pH

L-Arg-β NA を基質とした時の至適 pH は 6.5 であった。

##### 5. 耐熱性

50℃, 10 分の熱処理により完全に失活した。

##### 6. 基質特異性

基質親和性は L-Arg-β NA ( $K_m=0.046\text{mM}$ ), L-Lys-β NA ( $K_m=0.054\text{mM}$ ) が高く, 最大反応速度は L-Leu-β NA, L-Lys-β NA が高かった。

##### 7. 酵素阻害剤および金属イオンの影響

0.1mM EDTA により 86% 失活したが, 他の阻害剤に対しては影響を受けなかった。また, 0.1 mM  $\text{Ag}^+$ ,  $\text{Hg}^{2+}$  によって活性が完全に阻害され,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$  によって約 30% 活性が上昇した。

##### 8. アミノ酸分析

グルタミン酸, リジン, ロイシン, アラニン, アスパラギン酸がやや多いアミノ酸組成であった。

### 【考察】

精製酵素は金属要求性の exo-型酵素であり, その性状は今まで報告されている *Capnocytophaga* 属由来の酵素と異なる性質であることが示された。基質特異性, 金属要求性, アミノ酸組成, exo-型酵素といった点で, Aminopeptidase B に類似していたが,  $\text{Zn}^{2+}$  に阻害されない等で性状がやや異なっていた。

分子量の推定で, ゲル濾過法で約 270kDa, SDS-PAGE で約 86kDa となったことから, サブユニットの形態をとることが考えられた。また, 等電点電気泳動の結果より, 等電点の異なるサブユニットからなることが示唆された。これは酵素蛋白の修飾によるものかもしれない。

### 【結論】

*C. granulosa* 培養上清よりアミノペプチダーゼを精製し, 以下の知見を得た。

1. 精製酵素は, L-Arg-β NA, L-Lys-β NA に特異的な金属要求性 exo-型酵素であることが示された。
2. 酵素の至適 pH は 6.5 で, 50℃, 10 分で失活する易熱性酵素であった。
3. 酵素は約 86kDa の, 等電点の異なるサブユニットからなることが考えられた。

## 論文審査結果の要旨

唾液中の蛋白にはリン酸カルシウム析出阻止能があるが、細菌性プロテアーゼを唾液に作用させるとその阻止能が失われることから、歯石形成には細菌性プロテアーゼが関与していることが指摘されている。*Capnocytophaga* 属細菌は歯石保有者の歯肉縁上歯垢に高度に検出され、また、アミノペプチダーゼ活性を持つことから、歯石形成の促進に関与している可能性が考えられる。*Capnocytophaga granulosa* は、歯石研究のなかで歯垢から分離された菌であり、アミノペプチダーゼ活性を持つ。しかし、その酵素学的性状については明らかにされていない。本研究は *C. granulosa* 由来のアミノペプチダーゼを精製し、その性状の検討を行ったものである。

イオン交換およびゲル濾過クロマトグラフィーを用いて、菌培養上清から酵素を約16万倍に精製した。精製酵素を SDS-PAGE によって均一性を確認した。ゲル濾過法およびSDS-PAGE法で算出された分子量は、それぞれ約270kDaおよび約86kDaであった。精製酵素の等電点電気泳動で4つのバンドを検出した。これらの結果から、本酵素は等電点の異なる2種類のサブユニットからなる3量体であることを示唆した。その他の性質として、至適 pHは6.5, 50°C, 10分の熱処理で失活する易熱性酵素で、基質特異性の解析からL-Arg-βNA, L-Lys-βNAに特異的なexo-型酵素であり、Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>などで活性化される金属要求性酵素であることを示した。

本論文は、*C. granulosa* のアミノペプチダーゼの性状を明らかにしたものである。審査委員一同はこれを学位論文として価値のあるものと認めた。