

Streptococcus anginosus のプロリルトリペプチジルペプチダーゼの 産生と酵素学的特性

木曾有紀子

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 健康増進口腔科学講座

Production and enzymatic properties of a prolyl tripeptidyl
peptidase of *Streptococcus anginosus*

AKIKO KISO

Department of Oral Health Promotion, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University

Kiso A, Onozawa S, Miyashita M, Kikuchi Y, Ueda O, Hirai K,
Shibata Y and Fujimura S (2012) *Matsumoto Shigaku* 38 : 1-11.

【目的】

Streptococcus anginosus は、通性嫌気性グラム陽性の口腔内常在菌で以前は *S. milleri* に分類されていた菌種である。歯垢や歯肉溝に存在し、日和見感染原因菌として口腔内や深部臓器において化膿性疾患を引き起こすが、齶蝕病巣や感染根管からも分離される。また歯周病や上部消化器癌との関連性も疑われており、近年その臨床的意義は高まってきている。

S. anginosus のペプチダーゼ産生性を、アミノペプチダーゼやジペプチジルペプチダーゼ、トリペプチジルペプチダーゼ、プロテアーゼの基質を用いて調べ、その酵素について分離・精製及び性状について検討を加えることにした。

【材料と方法】

用いた菌株は *S. anginosus* NCTC 10713株であり、嫌気条件下で2日間培養を行った。4,000 gにて遠心分離し、集めた菌体を超音波処理し、さらに100,000 gにて超遠心を行い調製した粗抽出液を酵素精製の出発材料とした。酵素活性の測定方法は、アミノ酸のC末端にp-ニトロアニリ

ンを結合した発色合成基質にペプチダーゼが作用し放出されるp-ニトロアニリンを分光光度計の410 nmで測定することにより定量した。また、精製した酵素について酵素阻害剤を含む種々の群特異性試薬の影響についても調べた。

【結果および考察】

S. anginosus が産生するH-Ala-Ala-Pro-pNA分解酵素prolyl tripeptidyl peptidase (PTPと略す)は粗抽出液からのみ検出されたことから、PTPは細胞質に存在する酵素であるといえる。

PTPの精製は、硫酸アンモニウム沈殿、Q-Sepharoseによるイオン交換クロマトグラフィー、Phenyl Sepharose CL-4Bによる疎水性クロマトグラフィー、Sephacryl S-300でのゲル濾過、等電点電気泳動の組み合わせにより行った。また、精製した酵素の純度の検定はSDS-PAGEにより行った。

ゲル濾過では分子量66 kDaのところにPTPは溶出し、その等電点は4.9であった。SDS-PAGEでは精製標品は66 kDaの位置に単一バンドとし

て形成され、PTPは高度に精製されたことが示された。さらに、ゲル濾過から推定された分子量と考え合わせると、PTPはモノマーであることがうかがわれる。PTPの精製について粗抽出液の比活性を基準とすると精製度は326.5倍上がり、その回収率は2.4%であった。

種々の群特異性試薬の影響を調べたところ、セリン酵素阻害剤やメタロ酵素阻害剤で活性が強く抑制されていることから、PTPは金属イオンを

必要とするセリン酵素であると推測できる。

PTPはP1位にプロリン残基をもつトリペプチドにのみ活性を示しH-Ala-Ala-Pro-pNAのほかH-Ala-Phe-Pro-pNAも分解した。それぞれの V_{max}/K_m は2.85と0.66であり、活性比は100:28であった。しかし、P1位にプロリン残基をもたないトリペプチドやアミノペプチダーゼ、ジペプチジルペプチダーゼ及びN末端がブロックされた基質には活性を示さなかった。