

氏名	松尾 和子
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	第194号
学位授与の日付	2015年2月5日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(博士課程修了)
学位論文題目	Formation, isolation and characterization of a prolyl tripeptidyl peptidase of <i>Porphyromonas gingivalis</i> ( <i>Porphyromonas gingivalis</i> のプロリルトリペプチジルペプチターゼの産生, 分離および性状)
指導教員	(主) 教授 長谷川 博雅 (副) 教授 黒岩 昭弘 (副) 准教授 中野 敬介
論文審査委員	主査 教授 平岡 行博 副査 教授 吉成 伸夫 副査 教授 小林 泰浩

## 学位論文の内容の要旨

### 【背景と目的】

*Porphyromonas gingivalis* は慢性歯周炎患者の歯周ポケットに高率に検出される偏性嫌気性グラム陰性菌で、本疾患の有力な原因菌とされており、プロテアーゼ活性が強い。*P. gingivalis* は、糖および遊離のアミノ酸を利用できないので、このプロテアーゼの作用によって生じたタンパク断片をさらに小さなペプチドに加水分解し、窒素源やエネルギー源として利用すると考えられる。プロリルトリペプチジルペプチターゼ(以下 PTP) は、この過程に働く酵素であると思われる。そこで、*P. gingivalis* の4株を材料とし、PTP の産生性、精製および性状について検討した。

### 【材料と方法】

*P. gingivalis* ATCC 33277 が PTP の産生性で他株に勝っており、これを材料とした。嫌気条件下でヘミンとメナジオンを加えたトリプチケース培地を用いて3日間嫌気培養して集菌し、超音波処理と100,000G遠心で粗抽出液画分、ベジクル、および培養上清を調製し、各画分の PTP 活性を H-Ala-Ala-Pro-pNA を基質として測定すると、ほとんどが無細胞抽出液に認められた。3日培養菌の無細胞抽出液を出発材料として、次の処方により PTP の精製を試みている。始めに無細胞抽出液に硫酸を75%飽和に加え、5時間攪拌後、生じた沈殿を50 mM Tris-HCl buffer, pH 8.2 に溶解、透析し、同緩衝液に

平衡化した Q-セファロースでクロマトグラフィーを行い、活性画分を、濃縮、透析後、セファクリル S-300 でゲル濾過を行った。この活性画分をフェニルセファロース CL-4B で疎水性クロマトグラフィーを行い、最終的に、等電点電気泳動を行ったところ、PTP 活性のピークは pH 5.7 の位置に認められた。

### 【結果】

- (1) 増殖と、PTP の産生を経目的に追跡すると、増殖は 2 日で、PTP 産生は 3 日で最大に達することが分かった。
- (2) 精製標品は SDS-PAGE で単一のバンドを形成したので、PTP は純粹に精製され、その分子量は 45 kDa であることが判明した。至適 pH は 7.0 から 9.0 までと広がったが、pH 6.5 以下、pH 9 以上では急速に活性が減少した。熱安定性テストにおいて、50°C で加熱すると急速に失活し、5 分加熱で残存活性は 29% であり、60°C、5 分加熱では完全失活した。
- (3) 基質特異性試験では H-Ala-Ala-Pro-pNA の他に H-Ala-Phe-Pro-pNA も分解し、その活性比は 100 : 83 であった。また、この両基質に対する Km 値はそれぞれ、0.16 mM、0.14 mM であり、Vmax/Km は 7.13 および 4.21 と算定された。
- (4) 本酵素は、セリン酵素阻害剤により活性が阻害されるが、システインプロテアーゼ阻害剤や金属キレーターによる阻害は認められなかった。

### 【考察と結論】

本研究で扱った *P. gingivalis* の PTP は、セリン酵素に分類されるプロリン特異的エキソペプチダーゼである。この酵素は菌の栄養素の摂取上有用と考えられ、その生存に寄与し、延いては病原因子の一つになる可能性がある。

## 学位論文審査の結果の要旨

本研究は、*P. gingivalis* の細胞内ペプチダーゼであり、プロリン含有ペプチドの分解に大きく寄与していると考えられている。*P. gingivalis* の PTP は既報にあるものの、株名が記載されていない点で大きな不備があり、論文を無価値にしている。本研究は、PTP の生理的意義を考察するため再度 *P. gingivalis* から酵素を精製し、方法を確立して精製標品を得、化学的性質を明らかにすることを目的として実施された。

申請者は、研究を遂行するにあたって予備的実験から始め、仕事を積み重ねた努力は

大いに評価できる。結論に至る仮説の立て方と研究手法は適切であり、また得られた結果は妥当であると評価した。本研究から得られた知見は *P. gingivalis* の歯周病惹起の解析において非常に高い貢献をしたと評価できる。さらに、本酵素の特異的な阻害剤が新たな歯周病治療薬となる可能性もあり、今後の成果に期待を抱かせる点で重要性の高い論文である。

本論文の査読から、本申請者は本研究に用いた細菌学、生化学上の多岐にわたる知識と技術を習得しており、博士課程修了者としての博識と技能を得ていると判断された。

なお、本論文は、松本歯学 (2014) 40:1-12 に掲載されている。

## 最終試験の結果の要旨

申請者の学位申請論文

“Formation, isolation and characterization of a prolyl tripeptidyl peptidase of *Porphyromonas gingivalis*” を中心に、この研究に関する基礎知識、論文の内容に関わる事柄について、口頭質問による試験を行った。質問事項は、次のとおりである。

1. PTP に着目した理由を述べよ。
2. PTP の産生を検討した *P. gingivalis* 4 株の性質について説明せよ。
3. 抗体の作製などにより、この研究の発展性について考えを述べよ。
4. PTP と *P. gingivalis* の病原性の関連について述べよ。
5. PTP の菌体内における役割は何か。

以上の質問が出されたが、本申請者は論文の内容およびそれに関連する歯科医学上の諸問題に対し的確に回答した。

本審査会委員合議の結果、申請者は博士（歯学）として十分な学力および知識を有する者と認め、全員一致して最終試験を合格と判定した。