

Porphyromonas gingivalis の
プロリルトリペプチジルペプチダーゼの産生, 単離および性状

松尾 和子

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座
(主指導教員: 長谷川 博雅 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士 (歯学) 学位申請論文

Formation, isolation and characterization of a prolyl tripeptidyl peptidase of
Porphyromonas gingivalis

KAZUKO MATSUO

*Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University
(Chief Academic Advisor : Professor Hiromasa Hasegawa)*

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

【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。ペプチダーゼは, この過程に働く酵素であると思われるので, プロリルトリペプチジルペプチダーゼ (以下 PTP) について, その産生性, 精製および性状について検討した。

【方法】

P. gingivalis ATCC 33277株の培養は, 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で行った。3日培養の菌体の超音波処

理と100,000g遠心で, 無細胞抽出液, エンベロープ, 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の精製を試みた。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50mM Tris-HCl buffer, pH8.2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pH5.7の位置に認められた。

【結果】

増殖と、PTPの産生を経日的に追跡すると、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。精製標品はSDS-PAGEで単一のバンドを形成したので、PTPは純粋に精製され、その分子量は45kDa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、pH6.5以下、pH9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℃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℃、5分加熱では完全失活した。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、0.16mM、0.14mMであり、Vmax/Kmは7.13および4.21と算定された。このPTP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】

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。