

Title	唾液糖タンパクを分解するStreptococcus sanguis ATCC 10557株由来の α -L-フコシダーゼの精製とその性質
Author(s)	栗石, 聰
Citation	
Issue Date	
Text Version	ETD
URL	http://hdl.handle.net/11094/32008
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名・(本籍)	櫻石 聰
学位の種類	歯学博士
学位記番号	第 4 1 4 3 号
学位授与の日付	昭和 53 年 2 月 16 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
学位論文題目	唾液糖タンパクを分解する <i>Streptococcus sanguis</i> ATCC 10557 株由来の α -L-フコシダーゼの精製とその性質
論文審査委員	(主査) 教授 常光 旭 (副査) 教授 小谷 尚三 教授 鈴木不二男 助教授 猪木 令三 講師 竹村 金造

論文内容の要旨

α -L-フコシダーゼは、非還元末端にL-フコースをもつオリゴ糖や糖タンパクおよび糖脂質などの複合糖質の非還元末端の α -フコシド結合を加水分解する酵素である。本酵素については、糖タンパクの構造解析、ABH式やLewis血液型物質の免疫化学、さらに複合糖質代謝の遺伝的異常症などの研究と関連して、微生物、植物、軟体動物のほか、哺乳動物の肝臓、腎臓、脳、副睾丸、胎盤、血清、尿中のものに関して詳しい報告がある。特に近年になって、*Aspergillus niger*、*Clostridium perfringens* および *Bacillus fulminans* (*B. cereus* の変種) などから抽出された α -L-フコシダーゼが、合成基質であるp-ニトロフェニル- α -L-フコシドには作用せず、天然基質のFuc α 1 \rightarrow 2Gal結合にのみ作用することから、これら真菌あるいは細菌由来の酵素は、その基質特異性が高いことが明らかになった。

一方、歯垢には唾液糖タンパクの重要な構成成分であるL-フコースおよびシアル酸がほとんど検出されない。このことから、唾液の糖タンパクの糖側鎖を加水分解する口腔細菌由来のグリコシダーゼの存在、ならびにこの酵素による上記オリゴ糖側鎖の修飾が、歯垢の基質形成にさまざまな影響を与えている可能性が注目されている。しかし口腔レンサ球菌由来のグリコシダーゼの研究としては、シアリダーゼ(ノイラミニダーゼ)に関して若干の知見が得られているが、フコシダーゼについては、*Streptococcus mutans* および *S. sanguis* に本酵素活性の存在を報じたPinterら(1969)や、*S. mitis* についてのNordとWadström(1972)の報告があるのみである。しかも、これらの研究はいずれも基質としてp-ニトロフェニル- α -L-フコシドのみを用いており、したがって前述の*A. niger*等の α -L-フコシダーゼについての所見を勘案すると、これらの酵素が果してヒト唾液糖タンパクに作用

するかどうかは不明である。

この研究で著者は、まず *S. mutans*, *S. mitis*, *S. salivarius* および *S. sanguis* の4菌種、計24株の口腔レンサ球菌の Trypticase soy ブロース培養上清について、 α -L-フコシダーゼ活性を *p*-ニトロフェニル- α -L-フコシドならびにシアル酸除去ブタ顎下腺ムチンの両者を基質として測定した。その結果、前者に α -L-フコシダーゼ活性を有するものは認められず、一方後者に対しては *S. sanguis* ATCC 10557 株 (Coykendall らによると *S. miteor*) が強い酵素活性を示すことが見出された。そこで本菌株の培養上清よりこの α -L-フコシダーゼの分離・精製を試み、その性質の一端を明らかにすると共に、唾液糖タンパクに対する作用を追求した。

α -L-フコシダーゼ活性は、天然基質を用いる場合には遊離した L-フコースを Bhattacharyya らの Conway unit 法により、また *p*-ニトロフェニル- α -L-フコシドを基質とする場合には遊離したアグリコン、*p*-ニトロフェノールを比色定量することにより測定した。

S. sanguis ATCC 10557 株の培養上清より α -L-フコシダーゼを、硫酸分画、DEAE-Sephadex A-50 カラムクロマトグラフィおよび Sephadex G-200 ゲル濾過などによって濃縮・精製し、ディスク電気泳動法による分析で単一のバンドを与える精製酵素を得た。この標品をシアル酸除去ブタ顎下腺ムチンに作用させると L-フコースを遊離することが、分解産物のガスクロマトグラフィによる分析により確認された。精製酵素の分子量はゲル濾過法により約12万と推定され、また等電点は5.0で、至適 pH は5.5であった。

精製酵素の基質特異性を調べると、*p*-ニトロフェニル- α -L-フコシドや4-メチルウンベリフェリル- α -L-フコシドには作用しないが、非還元末端部に Fuc α 1 \rightarrow 2 Gal 結合をもち、H型血液型物質としての特異性を示すブタ顎下腺ムチンとそのペプチド鎖ならびに糖側鎖を修飾した物質、および種々のH型物質 (群馬大・医・古川 研教授より供与されたもの) に α -L-フコシダーゼ作用を呈した。また分泌型ヒト耳下腺唾液より分離した糖タンパクに作用して、L-フコースを遊離した。精製酵素のフコシド結合に対する基質特異性についてさらに検討するため、トリチウムでラベルしたラクトーN-フコペンタイトール I, II, III (神戸大・医・木幡 陽教授より恵与されたもの) を基質として精製酵素を働かせ、得られた分解産物をペーパークロマトグラフィで展開し、放射能を指標として定性分析を行なった。その結果、供試した精製酵素は Fuc α 1 \rightarrow 2 Gal 結合をもつラクトーN-フコペンタイトール I のみに作用することが明らかになった。また精製酵素の供試基質の血液型活性に及ぼす作用を血球凝集阻止反応を指標として調べたところ、血液型物質ならびにヒト混合唾液のH型血液型活性が精製フコシダーゼの作用により減少することが示された。また Le^b 型活性の減少と同時に Le^a 型活性を増加させるが、Le^a 型活性には無影響なことが判明した。

以上この研究では、供試した24株の口腔レンサ球菌のうち、 α -L-フコシダーゼ活性を示す *S. sanguis* ATCC 10557 株の培養上清から、この活性を担う酵素タンパクを濃縮・分離し、かつ酵素学的特性を調べ、次の諸点を明らかにした。(1)分子量は約12万と推定された。(2)ラクトーN-フコペンタイトール I (非還元末端部に Fuc α 1 \rightarrow 2 Gal 結合をもつ) を分解するが、ラクトーN-フコペンタイトール II (Fuc α 1 \rightarrow 4 GlcNAc 結合) および III (Fuc α 1 \rightarrow 3 GlcNAc 結合) には作用せず、天然

基質の Fuc α 1 \rightarrow 2 Gal 結合に強い作用特異性を示した。(3)本酵素により血液型物質の H 型活性の破壊, Le^b 型活性の Le^a 型活性への転換が認められることから, この酵素が Fuc α 1 \rightarrow 2 Gal 結合に作用することが確認された。(4)本酵素はさらに分泌型ヒト耳下腺唾液糖タンパクにも作用して, L-フコースを遊離し, さらにヒト混合唾液の H 型や Le^b 型血液型活性を破壊することが示された。

論文の審査結果の要旨

本研究は *Streptococcus sanguis* ATCC 10557 株由来の α -L-フコシダーゼの分離・精製に初めて成功し, その酵素タンパクとしての特性を明らかにしたものである。また, 作用の面ではこの酵素はフコース α 1 \rightarrow 2 ガラクトース結合に作用することが確認され, ヒト唾液の H 型や Le^b 型血液型活性を破壊することが示された。

この論文は口腔内の生理および病理過程に重要なかわりあいをもつ唾液糖タンパクの動態を支配する要因を解析する上で, 貴重な手掛りを与えるものであり, 歯学博士の学位に十分値するものと認める。