



Title	Bacteroides Ioescheii ATCC 15930株の產生するノイラミニダーゼの精製とその諸性質
Author(s)	竹下, 哲生
Citation	大阪大学, 1989, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/36960">https://hdl.handle.net/11094/36960</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏名・(本籍)	竹下哲生
学位の種類	歯学博士
学位記番号	第 8890 号
学位授与の日付	平成元年11月9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	<i>Bacteroides loescheii</i> ATCC 15930株の產生するノイラミニダーゼの精製とその諸性質
論文審査委員	(主査) 教授 常光 旭 (副査) 教授 鈴木不二男 助教授 恵比須繁之 講師 高田春比古

### 論文内容の要旨

ノイラミニダーゼ (EC 3.2.1.18) は、シアロ糖複合体から  $\alpha$ -ケトシド結合した糖鎖末端のシアル酸残基を加水分解する酵素である。本酵素は、口腔内において歯垢や、唾液、歯肉溝浸出液などから見いだされており、その由来として幾つかの口腔連鎖球菌があげられ、これまで *Streptococcus mitis* や *Streptococcus sanguis* の菌培養上清から本酵素が分離されている。唾液や歯垢さらに歯周ポケット内において、ノイラミニダーゼは細菌細胞間の相互認識、唾液による菌凝集現象、細菌の唾液あるいは血清成分を介した歯面や歯周組織への定着、さらに赤血球凝集機構などに関与している。しかし、口腔内嫌気性菌の產生するノイラミニダーゼについては、*Bacteroides* 属の数株から本酵素活性を見いだしているが、本酵素の分離・精製はなされておらず、その基質特異性はよく知られていない。

著者は、まず口腔やその周辺部から分離された嫌気性菌11種35株について、ノイラミニダーゼ產生能をスクリーニングした。供試した嫌気性菌35株について、培養上清は硫安濃縮し、菌体は超音波で破碎した。得られた標品は、フェツインと *N*-アセチルノイラミンラクトース (NANA-ラクトース) を基質として反応させ、遊離したシアル酸量を Uchida ら (1977) の方法で測定した。ヒト歯肉溝から分離された菌株のうち、*Bacteroides loescheii* ATCC 15930株の培養上清に強いノイラミニダーゼ活性が認められたので、本酵素の分離・精製を行った。まず、培養上清を限外ろ過により分子量5万以上の画分に濃縮した後、DEAE-Sephadexを用いた陰イオン交換クロマトグラフィ、Fast protein, polypeptide, polynucleotide, liquid chromatography (FPLC) を用いた Mono P カラムによる等電点分画、High performance liquid chromatography (HPLC) を用いた Shim-pack Diol-300カラムによるゲルろ過を組み合わせて精製した。精製標品の分子量は、HPLCを用いた G4000 SW カラム

によるゲルろ過法で測定した結果、約87,000と推定された。本酵素の等電点は5.1で、至適pHは4.8であった。また、0.2M以上の酢酸ナトリウム塩濃度で酵素活性は抑制され、50°C、10分以上の熱処理で、酵素活性は殆ど消失した。二価金属イオンが本酵素活性に及ぼす影響を調べた結果、 $Hg^{2+}$ が強く酵素活性を阻害した。精製酵素の基質特異性を調べるための基質として、フェツイン、NANA-ラクトース、ウシ顎下腺ムチン、 $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質、トランスフェリン、コロミン酸ナトリウム、ウシ脳ガングリオンドは市販のものを用い、ブタ顎下腺ムチンはブタ顎下腺組織から DeSlegui and Plonska (1969) の方法で精製し、NANA-ラクトースはペーパークロマトグラフィでNANA $\alpha$  (2→3)-ラクトースとNANA $\alpha$  (2→6)-ラクトースとに分離したものを用いた。その結果、精製酵素はNANA-糖鎖には強い加水分解作用を示したが、N-グリコリルノイタミン酸-糖鎖には殆ど作用しなかった。結合様式に対する加水分解作用は、NANA $\alpha$  (2→3) 糖鎖に対して最も強く、NANA $\alpha$  (2→6) やNANA $\alpha$  (2→8) 糖鎖に対しては弱い加水分解作用を示した。

次に、嫌気性菌と正常赤血球との凝集反応に及ぼす本酵素の影響を調べるために、ヒトO型赤血球を精製酵素で処理して、マイクロタイタープレートを用いた連続2倍希釈法で赤血球凝集活性を測定した。その結果、*B. loescheii* ATCC15930株と*Bacteroides levii*の2株では凝集活性がみられなかつたが、*Bacteroides gingivalis*の4株と*Bacteroides denticola*の1株および*Bacteroides intermedius*の2株では、アシアロ赤血球（血球表面の糖タンパク質よりシアル酸を取り除いた赤血球）にすると赤血球凝集能が増大した。次いで、分光光度計による赤血球凝集活性測定法により、*B. gingivalis* 381株の赤血球凝集能に及ぼす種々の因子について追究した。*B. gingivalis* 381株菌体の赤血球凝集活性は、正常赤血球、アシアロ赤血球いずれも、供試した糖やアミノ酸では阻害を受けなかつた。また、サルミン（鮭由来のプロタミン）、ヘパリン-フィブロネクチン結合阻害因子、アンジオテンシンI、IIおよびIIIのようなアルギニンを含むペプチドでは正常赤血球ならびにアシアロ赤血球に対して、程度に差はあるが、凝集の阻害がみられたが、サルミンは双方の赤血球に対し低濃度で凝集を特異的に阻害した。さらに、赤血球凝集能に及ぼす二価金属イオンの影響を調べたところ、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$ 、 $Mn^{2+}$ はいずれも凝集能を増大しなかつた。

次いで、正常赤血球表面よりシアル酸を精製酵素で除去した際、赤血球表面の荷電状態の変化を調べるために、正常赤血球およびアシアロ赤血球表面のゼータ電位を測定した。その結果、正常赤血球のゼータ電位は $-18.3 \pm 3.10$  mVであったが、アシアロ赤血球のゼータ電位は $-4.4 \pm 1.16$  mVと著明に変動した。さらに、酵素量を変化させて、赤血球表面より段階的にシアル酸を除去したところ、赤血球からの遊離シアル酸量が増大するにつれて、赤血球表面のゼータ電位は0値に近づき、かつ、*B. gingivalis* 381株菌体の赤血球凝集活性は増大する傾向を示した。

以上の結果より、本菌とアシアロ赤血球との凝集能が、正常赤血球と比べて増大する現象には、赤血球表面のゼータ電位の低下が密接に関与していることが明らかになった。

## 論文の審査結果の要旨

本研究はヒト歯肉溝から分離された *Bacteroides loescheii* ATCC15930株の產生するノイラミニダーゼを分離・精製し、その諸性質を調べたものである。

その結果、1) 精製標品はNANA $\alpha$  (2→3) 糖鎖に対して強い加水分解作用を示すこと、2) 赤血球を本酵素で処理しNANAを除去すれば、*Bacteroides gingivalis* 381株と赤血球との凝集能は増大すること、3) この凝集能の増大する現象には、赤血球表面のゼータ電位の低下が密接に関与していることが明らかになった。

この論文は *B. gingivalis* の歯周ポケット内での動態を支配するさまざまな要因を界面化学的な面より解析する上で、重要な手掛か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。