

博士(歯学) 野田 守

学位論文題名

*Mycoplasma fermentans* からの  
酸性ホスファクターゼの精製ならびに性状

学位論文内容の要旨

**【緒言】** マイコプラズマは細胞壁のない自己増殖可能な最小の微生物で、ヒトでは主に口腔ならびに泌尿・生殖器に分布している。

*M. fermentans* は、通常、ヒト泌尿・生殖器より分離されるが、近年、PCR法で、約20%の頻度でヒト血液および咽頭ぬぐい液から検出されている。本マイコプラズマは、現在、細胞内侵入性マイコプラズマとして、また、HIVのコファクターとして、AIDSの進行に何らかの病因論的役割を果たしているのではないかと注目されている。

*M. fermentans* は、ヒト由来マイコプラズマの中で強い酸性ホスファターゼ(以後、ACP)活性を示す。ACPは細菌から哺乳類細胞に至るまで広く分布しているが、生理的あるいは病因論的意義は不明な点が多い。哺乳類細胞では、ある種のACPはプロテインチロシンホスファターゼ(以後、PTPase)活性を示す。PTPaseは、プロテインチロシンキナーゼの逆反応を触媒し、哺乳類細胞の細胞内情報伝達系で重要な役割を果たしている。一方、細菌では、*Yersinia* が産生するPTPaseが宿主細胞の細胞内情報伝達系を混乱させ、病原因子となることが報告されている。

本研究は、*M. fermentans* のACPの生理的ならびに病因論的意義を明らかにするために、本酵素を精製し、その性状を検討した。

**【材料と方法】** 1. ACPの精製：*M. fermentans* IID 812を10%馬血清、1%グルコースおよび1%イースト・エキストラクトを含むPPL0培地で培養した。*M. fermentans* のACPは膜結合性であることが予備実験で明ら

かにされたので、トリトンX-100処理で可溶化し、この画分から、イオン交換ならびにアフィニティーカラムクロマトグラフィーによって精製した。なお、各精製段階での活性測定は、*p*-ニトロフェニルリン酸を基質とした。

2. 活性測定：以下の基質を用いて脱リン酸化活性を測定した。

1) *p*-ニトロフェニルリン酸(以後、PNPP)：PNPPを基質としたときは、遊離*p*-ニトロフェノールを400 nmの吸光度で比色定量し、活性を測定した。

2) PNPP以外のリン酸化合物：チロシンリン酸、セリンリン酸、スレオニンリン酸、グルコース1-リン酸、コリンリン酸およびアデノシン5'-三リン酸を基質としたときは、遊離PiをFiske-Subbarow法で定量し、活性を測定した。

3) ペプチドならびに蛋白質：ペプチドとしてガストリンの誘導体であるRaytide、蛋白質としてリゾチームを用い、チロシン残基をチロシンキナーゼと $\gamma$ -[ $^{32}$ P]-ATPで放射能ラベルし基質とした。酵素標品を作用させ、遊離 $^{32}$ PiをMatrin-Doty法により抽出し、液体シンチレーションカウンターで定量し、活性を測定した。

3. 性状：精製標品の至適pH、pH安定性、金属イオンの影響および基質特異性を調べた。

4. 細胞膜におけるACPの局在性：*M. fermentans*細胞をトリプシン処理して経時的にPNPP脱リン酸化活性を測定し、細胞膜におけるACPの局在性を調べた。

5. ヒト由来マイコプラズマにおけるPTPase様活性：ヒト由来マイコプラズマにおけるPTPase様活性を比較した。

【結果および考察】 1. 精製：*M. fermentans*のACPは細胞膜に存在しトリトンX-100処理で可溶化され、イオン交換(DEAE-SephacelおよびCM-Sephadex)ならびにアフィニティー(Con A-Sephadex)カラムクロマトグラフィーで精製された。精製標品の比活性は、細胞破碎液の約82倍で、回収率は18%であった。また、SDS-PAGEで分子量が31.2 kDaの蛋白質であった。

2. 性状：精製標品のPNPP脱リン酸化活性の至適pHは5、安定領域は6~7であった。PNPP脱リン酸化活性は $\text{Cu}^{2+}$ 、

$\text{Co}^{2+}$ ならびに  $\text{Mg}^{2+}$ で増強された。本酵素は、PNPP以外のリン酸化合物で、チロシンリン酸を特異的に脱リン酸化した。チロシンリン酸は、PTPaseの基質として用いられるリン酸化アミノ酸で、本酵素がPTPase様の活性を示すことが考えられた。しかしながら、PTPaseはペプチドあるいは蛋白質中のリン酸化チロシン残基を脱リン酸化する酵素である。そこで、ペプチドならびに蛋白質の基質を調製し、本酵素を作用させたところ、両基質を脱リン酸化した。以上の結果から、本酵素は酸性領域でPTPase様活性を示すことが明らかとなつた。

3. 細胞膜におけるACPの局在性：*M. fermentans* 細胞を低濃度(0.01%あるいは0.05%)のトリプシンで処理すると、PNPP脱リン酸化活性は無処理の細胞より高い値を示し、高濃度(0.5%および1.0%)のトリプシン処理では、低い値となつた。これは、本酵素がトリプシン感受性蛋白質で一部覆われて細胞膜表層に存在しているため、低濃度トリプシン処理で本酵素を覆う蛋白質がトリプシンで消化されて活性が増大したのに対し、高濃度のトリプシン処理ではACP自身も消化されたためと考えられた。

4. ヒト由来マイコプラズマのチロシンリン酸ならびにRaytide脱リン酸化活性：ヒト由来マイコプラズマで、チロシンリン酸ならびにRaytide脱リン酸化活性を調べたところ、*M. fermentans*の他に*M. fermentans incognitus*、*M. buccale*ならびに*M. faecium*で強い脱リン酸活性を認めた。

以上のように、本研究では、*M. fermentans*のACPがPTPase様の活性を示し、*M. fermentans*細胞の表層に存在することが明らかにされた。*M. fermentans*は細胞内侵入性であり、本マイコプラズマのACPが*Yersinia*の病原因子であるPTPaseと類似した活性を示すことから、本酵素もまた宿主細胞の細胞内情報伝達系に何らかの影響を及ぼすことが推測された。

ヒト由来マイコプラズマでは、*M. fermentans*、*M. buccale*ならびに*M. faecium*といった口腔あるいは口腔咽頭から検出されるマイコプラズマで強いPTPase様の活性を認めた。これらは、これまで歯学微生物学の領域で注目されたことのないマイコプラズマである。本研究の

結果は、これらのマイコプラズマが口腔感染症の病因論に関わる因子である可能性を示唆している。また、ACPはこれまで細菌では、生理的ならびに病因論的意義については不明な点が多く、単に分類上の指標として用いられてきたが、細菌感染における重要な因子の一つとして、今後さらに研究する必要があると思われた。

【結論】 *M. fermentans* から ACP の精製を行い、その性状について検討し、以下の結果を得た。

1. *M. fermentans* の ACP は細胞膜表層に存在し、SDS-PAGE で分子量 31.2 kDa の蛋白質であった。
2. 精製標品の PNPP 脱リン酸化活性の至適 pH は 5、安定領域は 6~7 であった。活性は  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Co}^{2+}$  ならびに  $\text{Mg}^{2+}$  で増強された。
3. 本酵素は、PNPP 以外にチロシンリン酸、Raytide およびリゾチームを脱リン酸化し、酸性領域で PTPase 様の活性を示した。
4. ヒト由来マイコプラズマでは、*M. fermentans*、*M. buccale* ならびに *M. faecium* が強い PTPase 様活性を示した。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 下河辺 宏功  
副査 教授 渡邊 繼男  
副査 教授 久保木 芳徳

## 学位論文題名

### *Mycoplasma fermentans* からの 酸性ホスファクターゼの精製ならびに性状

審査は、主査副査全員によって、口頭にて行われた。まず、論文提出者に論文の要旨の説明を求めた結果、以下の内容について論述した。

マイコプラズマは細胞壁のない自己増殖可能な最小の微生物で、ヒトでは主に口腔ならびに泌尿・生殖器に分布している。

*M. fermentans* は、通常、ヒト泌尿・生殖器より分離されるが、近年、PCR法で、約20%の頻度でヒト血液および咽頭ぬぐい液からも検出されている。本マイコプラズマは、現在、細胞内侵入性マイコプラズマとして、また、HIVのコファクターとして、AIDSの進行に関与しているのではないかと注目されている。

*M. fermentans* は、ヒト由来マイコプラズマの中で強い酸性ホスファクターゼ(ACP)活性を示すことが知られている。また、哺乳類細胞では、ある種のACPはプロテインチロシンホスファターゼ(PTPase)活性を示す。PTPaseは、哺乳類細胞の細胞内情報伝達系で重要な役割を果たしている。細菌では、*Yersinia* が産生するPTPaseが宿主細胞の細胞内情報伝達系を混乱させ、病原因子となることが報告されている。

本研究は、*M. fermentans* のACPの生理的ならびに病因論的意義を明らかにするために、本酵素を精製し、その性状を検討した。

#### 1. ACPの精製

*M. fermentans* IID 812 を10% 馬血清、1% グルコースおよび1% イースト・エキストラクトを含むPPL0培地で培養した。

*M. fermentans* のACP活性はほとんどが細胞膜に存在していたので、トリトンX-100処理で可溶化し、この画分から、イオン交換(DEAE-SephadexおよびCM-Sephadex)ならびにアフィニティー(Con A-Sephadex)カラムクロマトグラフィーで精製した。精製標品の比活性は、細胞破碎液の約82倍で、回収率は18%であった。また、SDS-PAGEで分子量が31.2 kDaの蛋白質であった。なお、各精製段階での活性は、*p*-ニトロフェニルリン酸(PNPP)を基質とし、遊離*p*-ニトロフェノールを400 nmの吸光度で比色定量して測定した。

## 2. 性状

次に、精製標品の至適pH、pH安定性、金属イオンの影響および基質特異性を調べた。精製標品のPNPP脱リン酸化活性の至適pHは5、安定領域は6~7であった。PNPP脱リン酸化活性はCu<sup>2+</sup>、Co<sup>2+</sup>ならびにMg<sup>2+</sup>で増強された。本酵素は、PNPP以外のリン酸化合物で、チロシンリン酸を特異的に脱リン酸化した。チロシンリン酸は、PTPaseの基質として用いられるリン酸化アミノ酸で、本酵素がPTPase様の活性を示すことが考えられた。しかしながら、PTPaseはペプチドあるいは蛋白質中のリン酸化チロシン残基を脱リン酸化する酵素である。そこで、ペプチドとしてガストリンの誘導体であるRaytide、蛋白質としてリゾチームを用い、これらのチロシン残基をチロシンキナーゼと $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-ATPで放射能ラベルし基質とした。酵素標品を作用させ、遊離<sup>32</sup>PiをMartin-Doty法により抽出し、液体シンチレーションカウンターで定量し、活性を測定した。その結果、本酵素は、両基質を脱リン酸化した。以上の結果から、本酵素がPTPase様活性を示すことが明らかとなった。

## 3. 細胞膜におけるACPの局在性

*M. fermentans* 細胞をトリプシン処理して経時的にPNPP脱リン酸化活性を測定し、細胞膜におけるACPの局在性を調べた。その結果、*M. fermentans* 細胞を低濃度(0.01%あるいは0.05%)のトリプシンで処理すると、PNPP脱リン酸化活性は無処理の細胞より高い値を示し、高濃度(0.5%および1.0%)のトリプシン処理では、低い値となった。これは、本酵素がトリプシン感受性蛋白質で一部覆われて細胞膜表層に存在しているため、低濃度トリプシン処理で本酵素を覆う蛋白質がトリプシンで消化されて活性が増大したのに対し、高濃度のトリプシン処理ではACP自身も消化されたためと考えられた。

## 4. ヒト由来マイコプラズマにおけるPTPase様活性

ヒト由来マイコプラズマで、チロシンリン酸ならびにRaytide脱リン酸化活性を調べたところ、*M. fermentans*の他に *M. fermentans incognitus*、*M. buccale* ならびに*M. faecium*で強い脱リン酸化活性を認めた。

以上のように、本研究では、*M. fermentans* のACPがPTPase様の活性を示し、*M. fermentans* 細胞の表層に存在することが明らかにされた。*M. fermentans* は細胞内侵入性であり、本マイコプラズマのACPが*Yersinia* の病原因子であるPTPaseと類似した活性を示すことから、本酵素もまた宿主細胞の細胞内情報伝達系に何らかの影響を及ぼすことが推測された。

ヒト由来マイコプラズマでは、*M. fermentans*、*M. buccale* ならびに*M. faecium*といった口腔あるいは口腔咽頭から検出されるマイコプラズマで強いPTPase様の活性を認めた。これらは、これまで歯学微生物学の領域で注目されたことのないマイコプラズマである。本研究の結果は、これらのマイコプラズマが口腔感染症の病因論に関わる因子である可能性を示唆している。また、ACPはこれまで細菌では、生理的ならびに病因論的意義については不明な点が多く、単に分類上の指標として用いられてきたが、細菌感染における重要な因子の一つとして、今後さらに研究する必要があると思われた。

以上の研究内容について、審査員全員で種々の質問を行った。実験方法、結果、考察、研究の将来の方向性等について、渡邊、久保木、両副査から生化学的ならびに細菌学的な立場から質問がなされたが、提出者はこれに明快かつ適切な回答を示した。その結果、本論文は、口腔感染症を考える上で、これまで注目されたことのない口腔内細菌の示す病原性の可能性について新知見をもたらしたことに対し、全審査員より高く評価された。また、提出者は本研究の今後の発展性についても具体的に提示し、歯学に広い知識を有しており、研究者としての能力を備えていると評価された。

以上の審査結果より論文提出者は博士(歯学)を授与されるに十分値すると認められた。