

氏 名 (本籍) 高 橋 昌 子

学 位 の 種 類 歯 学 博 士

学 位 記 番 号 歯 博 第 1 8 号

学位授与年月日 昭 和 5 7 年 3 月 2 5 日

学位授与の要件 学位親則第 5 条第 1 項該当

研 究 科 専 攻 東北大学大学院歯学研究科
(博士課程) 歯学基礎系専攻

学位論文題目 Purification of Pyruvate Formate-lyase
from *Streptococcus mutans* and its
Regulatory Properties.
(*Streptococcus mutans* の pyruvate
formate-lyase の精製とその性質)

(主 査)

論文審査委員 教授 山 田 正 教授 山 本 肇
教授 熊 谷 勝 男

論文内容要旨

Streptococcus mutans を glucose 過剰条件で培養したとき乳酸が主産生物となるが、glucose 制限条件のときや、glucose のかわりに galactose や mannitol にすると、乳酸よりもむしろギ酸、酢酸、エタノールのような揮発性産物を産生する。このような発酵様式の変化には、乳酸産生を触媒する乳酸脱水素酵素とともに、揮発性産物産生系の第一段階を触媒する pyruvate formate-lyase (PFL) が重要にかかわっていると推定されているが、PFL は空気に触れると直ちに失活してしまうので、その性質についての報告はほとんどない。

PFL は次の反応を触媒し、生成した acetyl-CoA は酢酸やエタノール産生の基質となる。

$\text{pyruvate} + \text{CoA} \longrightarrow \text{formate} + \text{acetyl-CoA}$ *S. mutans* JC 2 株の PFL を、嫌気箱内で Reactive Blue 2-Agarose affinity クロマトを用いて、disc 及び SDS 電気泳動上均一な酵素標品として精製した。PFL は空気に触れると直ちに失活するので、精製や活性測定には嫌気箱及び嫌気キューベットを使用し、すべて厳密な嫌気条件下 (N_2 80%, CO_2 10%, H_2 10%) で行なった。

このようにして精製した PFL の分子量は 17万~18万 であり、2つのサブユニットから成るダイマーであると思われる。

粗酵素及び精製した酵素の活性は嫌氣的に保存しても不安定であったが、粗酵素は *E. Coli* の PFL と同様に S-adenosyl methionine と oxamate とともに incubate することによりその活性を回復できた。さらに還元型フェレドキシンやメチルビオロゲンを添加すると回復の程度が著しく強くなった。しかし、精製した酵素の場合はまったく回復しなかった。*S. mutans* にフェレドキシンが存在することはすでに報告されており、フェレドキシンは菌体内で PFL の再活性化に関与していると思われる。

S. mutans の PFL は解糖系の中間体であるグリセルアルデヒド3リン酸 (GAL 3P) やジヒドロキシアセトンリン酸 (DHAP) により、強く阻害された。この阻害は、阻害剤と酵素を前もって incubate しておくことにより強くなり、incubate しないときには阻害が経時的に強くなる傾向を示した。GAL 3P や DHAP の PFL に対する阻害効果は、反応系中の酵素量に大きく影響され、酵素濃度が高くなるほど阻害は小さくなった。このような特殊な阻害様式から、GAL 3Pや DHAP は slow tight-binding inhibitor であると思われる。

大量の酵素が triose phosphate の阻害効果を打ち消すことから、このような阻害様式が実際の生菌内において PFL の誘導の効果と triose phosphate の菌体内レベルの変動の効果をよりいっそう拡大すると推定される。

以上のことから、GAL 3P, DHAP の阻害作用やフェレドキシン関与の PFL の再活性化、そしてこの酵素量の生体内における変動が複雑に作用しあって、PFL の活性を微妙に調節しているものと思われる。

審 査 結 果 要 旨

エナメル質表面に接する歯垢深部はきわめて嫌氣的でほとんど無酸素状態である。このような環境で行なわれる歯垢微生物の糖代謝は空気中で行なわれるものとはかなり異なっていることは確かである。また、この部分で糖を代謝してつくられる酸は直ちにエナメル質に作用してそれを溶解するのでう蝕の初発に重要な意味を持っている。本論文で扱っている *Streptococcus mutans* の酵素 Pyruvate formate-lyase は極めて酸素感受性が高く、気相のちがいに最も敏感に反応する。本酵素はまた、どのような酸をつくるかを決定する重要な Key enzyme であり、この酵素の性質を知ることはいわゆる強い歯垢微生物 *S. mutans* が実際の歯垢深部でどのような代謝を行うかを知る大きな手がかりとなり、その意義はきわめて大きい。しかし、本酵素の強い酸素感受性のため大気中での実験は不可能であり、*S. mutans* の本酵素については粗抽出液を用いて行った簡単な報告があるのみであった。

本論文ではすべての実験を嫌気グローブボックスの中で行うという、極めて困難な状況のもとで *S. mutans* から本酵素を完全に純化精製することに成功し、その特異な性質を明らかにした。

この酵素は数秒間空気に曝すだけで完全に失活し、嫌気条件下でもかなり不安定であった。しかし、活性メチオニン、オキサミン酸さらに還元力の強い蛋白質フェレドキシンの存在下で効率良く再活性化することができた。

本酵素は解糖中間体 D-Glyceraldehyde 3-phosphate 又は Dihydroxyacetone phosphate により著しい阻害を受けたが、その阻害の程度は酵素濃度に依存するという珍しいものであった。それ故、ガラクトース、糖アルコールで生育し、その酵素の合成が促進されると、これら中間体による阻害効果は弱まり、このような酵素誘導の効果は増進される。このことは *S. mutans* がどのような種類の酸をつくるかということに大きな影響を与えることがわかった。

以上のような本酵素の特異な性状は in vivo の菌体の代謝に大きく影響し、*S. mutans* の生菌をわずか2分間空気に曝しただけで菌体中の本酵素は失活し、糖アルコールの代謝は 1/10 以下に低下する。このことは歯垢微生物の糖代謝の研究や各種糖アルコールなど代用甘味料のう蝕誘発性の検定に際し、気相条件に万全の注意を払わねばならないことを強く示し、嫌氣的な深部歯垢での糖代謝の特異性を浮き彫りにした。

以上のように本論文は *S. mutans* の酸産生に重要な Key enzyme である Pyruvate formate-lyase の性質をはじめて明らかにし、in vivo の歯垢中での *S. mutans* の挙動を知る上で重要な情報を提供し、歯学の進歩に貢献すること大であるので歯学博士の学位授与に値するものと認める。