

氏 名 ^{すわべ} 須和部 ^{きょう} 京 ^{すけ} 介
 学位の種類 博士 (歯学)
 学位授与番号 岩医大院歯博第282号
 学位授与の日付 平成24年3月9日
 学位論文題目 Identification of an L-methionine γ -lyase involved in the production of hydrogen sulfide from L-cysteine in *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586.
 – *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586 における L-cysteine から硫化水素産生に關与する L-methionine γ -lyase の同定 –

論文内容の要旨

I 研究目的

歯周病原細菌の一つである *Fusobacterium nucleatum* はグラム陰性の偏性嫌気性菌であり、非常に高い硫化水素産生能をもつ。硫化水素は口臭の原因であるとともに宿主に為害作用を示すため、歯周病の発症や進行との関連が示唆されている。これまで、*F. nucleatum* の *fn0625*, *fn1055*, *fn1220* によってコードされる3つの硫化水素産生酵素について明らかにしてきたが、同菌の超音波破碎上清に含まれる 130 kDa 程度の大きさを示す硫化水素産生酵素については明らかになっていない。本研究では、同菌の第4の硫化水素産生に關わる遺伝子 *fn1419* をクローニングし、その精製酵素の酵素学的性質を決定した。

II 研究方法

F. nucleatum ATCC 25586 株の超音波破碎上清を二次元電気泳動を用いて展開し、ゲル中でタンパク質をリフォルディングさせた後、活性染色を用いて酵素活性を持つタンパク質を検出した。検出されたバンドを切り出し、トリプシン処理した後、MALDI-TOF MS を用いて質量分析した。同定された遺伝子を大腸菌を用いた His タグタンパク質として発現させ、組換え酵素を精製し、その分子量を SDS-PAGE とゲル濾過クロマトグラフィーを用いて決定した。精製酵素はシステインを基質として酵素活性を測定し、同酵素の硫化水素産生能を検討した。また、大腸菌を用いて、*Porphyromonas gingivalis* W83 及び *Treponema denticola* ATCC 35405 の相同タンパク質を GST 融合タンパク質として発現させ、組換え酵素を精製した。それぞれの精製酵素の硫化水素産生能は SDS-PAGE にて活性染色を用いて検出した。それぞれの精製酵素における熱及び SDS に対する抵抗性を SDS-PAGE にて検討した。また、*F. nucleatum* の4つの硫化水素産生酵素の溶液中での SDS 存在下における酵素活性の影響を検討した。更に、同菌の4つの硫化水素産生酵素に關わる遺伝子の発現量を Real-time PCR 法を用いて比較検討し、同菌の4つの硫化水素産生酵素の硫化水素産生の貢献指数を計算し検討した。

III 研究成果

二次元電気泳動で展開し、活性染色した後にゲルから切り出し、トリプシン処理したタンパク質は MALDI-TOF MS の質量分析により、Fn1419 に相当し、メチオニンからメチルメルカプタンを産生する酵素と一致した。同酵素を SDS-PAGE にて展開し、CBB 染色を行うと Fn1419 の分子量は 43.3 kDa の大きさを示し、溶液中での酵素はゲル濾過クロマトグラフィーから推測された分子量 (154.1 kDa) から4量体を形成していると考えられた。また、SDS-PAGE を活性染色したものでは、43.3 kDa と 130 kDa の位置に硫化水素産生を示すバンドが確認でき、同酵素がシステインを基質に硫化水素を産生することが明らかとなり、超音波破碎上清に含まれる 130 kDa の未知のタンパク質の移動度と一致した。システインを基質に酵素活性を測定すると Fn1419 は Fn0625 と同様に α , β -elimination によりピルビン酸とアンモニア、硫化水素を産生し、同酵素の硫化水素産生能は同菌の硫化水素産生酵素の中で3番目の強さであった。また、*P. gingivalis* W83 及び *T. denticola* ATCC 35405 由来の酵素は溶液中にて、それぞれ2量体と4量体を形成していると予想され、Fn1419 とその相同タンパクの3つの酵素にて酵素活性を比較すると Fn1419 の硫化水素産生能は最も弱かった。熱による酵素の構造への影響を比較するために、*F. nucleatum* の4つの硫化水素産生酵素と Fn1419 の *P. gingivalis* 及び *T. denticola* の相同タンパクの6種類の酵素 SDS-PAGE にて展開したところ、サンプルを 100°C で熱処理したものではゲル上でほぼモノマーの状態を示した。サンプルを熱処理しないものでは Fn1419 と *P. gingivalis* W83 及び *T. denticola* ATCC 35405 の相同タン

パク質においてモノマーだけではなく高次構造を示す高分子の位置にもバンドが存在し、L-methionine γ -lyase は熱に対しては分解される可能性が高いことが示唆された。また、ゲル中での SDS の構造への影響を比較するために、6 種類の酵素を SDS-PAGE にて展開したところ、ゲル上でリフォールディングし、活性染色したものは CBB 染色で現れたバンドと同程度の移動度で活性を示したが、リフォールディングせずに活性染色したものでは 3 種類の L-methionine γ -lyase が高分子の位置で活性を示し、L-methionine γ -lyase はゲル上において SDS に対し抵抗性があると予想された。溶液中での *F. nucleatum* の 4 つの硫化水素産生酵素の SDS に対する抵抗性を調べたところ、いずれの酵素においても 0.5% SDS 存在下では酵素活性が 15% 程度に抑制され、2% SDS 存在下では酵素活性を失った。Real-time PCR 法より *F. nucleatum* の 4 つの硫化水素産生酵素に関わる遺伝子の発現量を比較すると Fn1419 は 2 番目の発現量を有していた。また、同菌の 4 つの硫化水素産生酵素の Real-time PCR での発現量の相対値に酵素活性の k_{cat} 値を掛け合わせたものを硫化水素産生の貢献指数として計算したところ、Fn1419 の相対的貢献度は硫化水素産生能全体の 1.94% であることが示唆された。

IV 考察及び結論

F. nucleatum ATCC 25586 株の硫化水素産生酵素は 4 種類となり、超音波破碎上清に含まれる 130 kDa 程度の大きさを示す硫化水素産生酵素は Fn1419 (L-methionine γ -lyase: MegL) に該当し、同酵素は本研究によって硫化水素産生能を有することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 准教授 八重柏 隆 (口腔機能保存学講座 歯周・歯内治療学分野)

副査 教授 加藤 裕久 (薬理学講座 病態制御学分野)

副査 教授 木村 重信 (微生物学講座 分子微生物学分野)

歯周病原性細菌の一つである *Fusobacterium nucleatum* は、高い硫化水素産生能をもつことが知られている。産生された揮発性硫化物は口臭の原因となるとともに、宿主に為害作用を示すことから歯周病の発症・進行に関連することが示唆されている。これまで *F. nucleatum* の硫化水素産生酵素としては Fn1220, Fn0625, Fn1055 の 3 種が報告されているが、そのうち 2 酵素 (Fn0625, Fn1055) は申請者らの研究グループが明らかにしたものである。特に Fn1055 については申請者が主体となってその同定、性状解析が行われている。しかしその過程で、*F. nucleatum* にはさらに別の硫化水素産生酵素が存在する可能性が明らかになった。そこで本研究で申請者は、分子量約 130 kDa と推定される *F. nucleatum* の新たな硫化水素産生酵素の解明を行った。

F. nucleatum ATCC 25586 株の超音波破碎上清より二次元電気泳動を用いて展開し、ゲル中でタンパク質をリフォールディングさせた後、活性染色法により酵素活性をもつタンパク質バンドを検出した。それを MALDI-TOF MS を用いて解析した結果、新たな硫化水素産生酵素はこれまでメチオニンからメチルメルカプタンを合成する酵素 (L-methionine γ -lyase) として報告されている Fn1419 と一致することが明らかとなった。また SDS-PAGE およびゲル濾過クロマトグラフィー解析を行い、Fn1419 の分子量は 43 kDa で、溶液中では 4 量体を形成していることが示されている。さらに大腸菌を用いた組換え酵素として精製し、システインを基質とした場合の酵素活性を検討した結果、*F. nucleatum* の硫化水素産生酵素群中、Fn1419 の酵素活性は 3 番目に強いこと、また、Real-time PCR による遺伝子解析から発現量としては 2 番目に高いことなどが、本研究で新たに解析されている。

これらの結果は、新たな *F. nucleatum* の硫化水素産生酵素の存在を示すとともに、本菌の硫化水素産生機構の詳細を明らかにするもので、歯周病原性細菌の一つである本菌の病原機序の解明にも繋がるものと期待されることから、学位に値するものと評価した。

試験・試問の結果の要旨

本研究の目的、概要について説明がなされ、研究結果および関連事項についての試問を行った結果、的確な解答が得られた。歯周病学に関する知識も十分認められ、また、今後の研究にも意欲を示すとともに幅広い経験と知識を有し後輩への指導能力も備えていることから、学位に値する十分な学識と研究能力を有するものと判定した。