原 著

ヒト耳下腺唾液の Lysozyme の精製とアミノ酸組成

常 光 旭 岩 本 義 史 渡 辺 達 夫
山 崎 敏 朗 中 村 亮

概要：ヒトの唾液中にはリゾチームが含まれ口腔の感染防禦に役立っていることはすでに知られている。近時卵白リゾチームが溶菌作用以外に抗炎症作用等の薬理作用などをもっていることが明らかにされ歯科領域においても卵白リゾチーム製剤が歯周病の治療に応用されつつある。しかしながら唾液リゾチームと卵白リゾチームとの蛋白性状等の差異については Petit ら (1963), Balekjian ら (1969) の報告を除いては十分に検討されていない。本研究は大量のヒト耳下腺唾液からリゾチームを単一に精製し精製標品について卵白リゾチームとの異同を明らかにすると共に先人の唾液リゾチームの報告との比較検討を行なった。耳下腺唾液 8 l からリゾチームを cellulose column chromatography, ゲル濾過ならびに Amberlite によるイオン交換法により 525 倍に精製した。精製標品は超遠心分析ならびに電気泳動により単一であることを確認した。この耳下腺唾液リゾチームは $S_{20,w}=1.8$ の沈降定数を持ち、ニワトリ卵白リゾチームより 3.5 倍高い比活性をもつことがわかった。アミノ酸分析の結果、18種類のアミノ酸より構成され卵白リゾチームと同様であったが、tyrosine, serine ならびに glutamic acid の含量が異なり特に tyrosine は卵白リゾチームの 2 倍の含量を示した。活性アミノ酸である tryptophan 含量は Balekjian らが唾液リゾチームで得た 1 分子あたり 2 個に対し 5 個と大きな違いがみられた。耳下腺唾液のリゾチームの分子量はアミノ酸組成から 14,300 と推定された。

Purification and Amino Acid Analysis of Lysozyme from Human Parotid Saliva

By

Akira TSUNEMITSU, Yoshifumi IWAMOTO, Tatsuo WATANABE,
Toshiro YAMAZAKI and Ryo NAKAMURA

Concerning the purification and amino acid composition of human saliva, Petit and Jollès (1963) first purified lysozyme from human whole saliva and reported that its amino acid composition was somewhat different from that of hen egg-white lysozyme. More recently, Balekjian, Hoerman and Berzinskas (1969) has demonstrated that the parotid lysozyme has a composition which varies especially with respect to tyrosine, cystine and glutamic acid content. This communication was designed to confirm the amino acid composition and molecular weight of lysozyme from human parotid saliva.

About eight liters of human parotid saliva were collected from healthy adults with the device according to the method of Keene. Parotid lysozyme was purified to 525-fold by the

広島大学歯学部予防歯科学教室 (主任：常光 旭教授)

Department of Preventive Dentistry, Hiroshima University School of Dentistry (Director: Prof. Akira Tsunemitsu)

昭和45年4月17日受付

procedures involving ammonium sulfate fractionation, DEAE-cellulose and CM-cellulose column chromatography, Sephadex G-75 gel filtration and adsorption on Amberlite CG-50 resin. The homogeneity of the purified sample was determined by both ultracentrifugation and disc electrophoresis. It had a specific activity 3.5 times greater than that of hen egg-white lysozyme and an amino acid composition which varied especially in regard to tyrosine, serine and glutamic acid content. The molecular weight was estimated to be around 14,300.

結 言

1922年 Fleming¹⁾がリゾチムを発見して以来この酵素蛋白の精製、結晶化、分子量とアミノ酸組成、活性基や抗原決定基などの解明が主としてニワトリの卵白リゾチムについてなされてきた²⁾⁻¹⁰⁾。一方 Jollès⁶⁾は種々の動物組織のリゾチムの特性について追究し、異なる origin から得られたリゾチムは類似した生物学的活性をもっているが、クロマトグラフィーにおける様態やアミノ酸組成などが異っていると報告している。唾液中のリゾチムに関して、尾笹¹¹⁾はヒト顎下腺舌下腺混合唾液からリゾチムの分離精製を行い、クロマトグラフィーにおける様態が卵白リゾチムと異っていることを明らかにした。Petit and Jollès¹²⁾はヒト混合唾液より高度にリゾチムを精製し推定分子量 14,000 と発表しているが、これらの精製標品は純唾液から得られたものではなく、また精製標品の単一性についても明らかにされていない。純唾液からのリゾチムの精製についてはごく最近 Balekjian ら¹³⁾によつて報告され、分子量が 15,000~17,000 で卵白リゾチムにくらべて 3 倍の比活性をもっているという。

本研究は累計 200 人の成人より耳下腺唾液を無菌的に集め、その精製を行ない、分子量とアミノ酸組成を明らかにするとともに先人のリゾチムに関する報告と比較検討してみた。

実験材料ならびに方法

唾液採取

耳下腺唾液採取は Keene¹⁴⁾の方法を改良して行なつた。健康な成人より食後 4~5 時間経過後よく洗口させ、1 名につき 40~50ml を氷冷しつつ採取

した。採取唾液は所要量に達するまで凍結し、保存した。

酵素活性の測定

リゾチム活性の測定は Smolelis ら¹⁰⁾の方法に準じて濁度法で行ない、基質には *Micrococcus lysodeikticus* 凍結乾燥末 (生化学工業・東京) を用いた。反応混合液は 10mg/ml の菌液 0.08ml と一定量の唾液試料を $1/15$ M phosphate buffer (pH 6.2) で全量 6.0ml とし、直ちに 450m μ における吸光度を測定した。ついで 25°C, 20 分間振盪培養を行なつた後再び吸光度を測定した。酵素活性は 1 分間に 0.001 の吸光度を減少させる酵素量を 1 unit と規定した。また specific activity は試料蛋白 1 mg 当りの unit 数で表わした。

蛋白の定量

Lowry ら¹⁵⁾の方法に従い、標準液として bovine albumin crystal (Sigma Chemical Co.) を用いた。

超遠心分析

精製された耳下腺唾液リゾチムについて Hitachi Model UCA-1 型分析用超遠心機を用いて、超遠心分析を行なつた。試料として 0.5% の蛋白濃度のものを用い、22°C, 54,300 rpm の rotor speed で分析した。

ディスク電気泳動

Reisfeld ら¹⁶⁾、ならびに Neidle ら¹⁷⁾の方法に準じてポリアクリルアミドゲルを支持体とするディスク電気泳動を行なつた。ゲルは 7×0.5cm のガラス管で cationic system で調製し、50 μ g の試料蛋白を apply した。泳動は 3mA/tube, 4°C で 50 分間行なつた。蛋白の染色は 1% の Amido Black 10B を含む 7% の酢酸溶液中で 1 時間反応させた後 10% 酢酸溶液で back ground を脱染色した。

吸収スペクトル

精製された耳下腺唾液リゾチームの紫外外部吸収を Hitachi Model 124 型分光光度計により調べた。

アミノ酸分析

耳下腺唾液リゾチームのアミノ酸分析は Spackman ら¹⁸⁾の方法に準拠した。試料を110°C, 24時間, 6 N の HCl で加水分解した後 Spinco Model MS 型自動アミノ酸分析計によつて分析を行なつた。tryptophan と tyrosine 含量は Goodwin ら¹⁹⁾の式にならない, 0.1 N NaOH 溶液中でリゾチームの280m μ ならびに294.4m μ における吸光度を測定し, その吸光度の比から算定した。

なお, 電気泳動, 吸収スペクトルならびにアミノ酸分析の実験においては卵白リゾチーム (3x crystallized, Sigma Chem. Co.) についても全く同様に平行して操作を行ない, 比較検討した。

実験結果

耳下腺唾液リゾチームの精製

1. 硫酸分画——8 l の耳下腺唾液について 30~70%飽和で硫酸分画を行ない, 得られた画分を 0.01M の Tris-HCl buffer (pH 7.8) に溶解し, 同一 buffer で一昼夜透析した。

なお, 以下にのべる精製操作は全て4°Cで行な

つた。

2. DEAE-cellulose column chromatography——上記透析試料を0.01M Tris-HCl buffer (pH 7.8) で平衡化した DEAE-cellulose column に吸着せしめ, 同じ buffer でよく洗滌した。リゾチーム活性は非吸着性画分にみられたのでこの活性画分をさらに硫酸で濃縮後 pH 5.4 の 0.005M phosphate buffer で透析した。

3. CM-cellulose column chromatography——次いで0.005M phosphate buffer (pH 5.4) で平衡化した CM-cellulose column (5 $\times$ 30cm) に step 2 で得られた活性画分を apply した。吸着された蛋白の展開は始め0.005M phosphate buffer (pH 5.4) に含まれる NaCl の濃度を0.1, 0.3M と変えて stepwise で行ない, 最終的には0.6M の NaCl を含む $1/15$ M phosphate buffer (pH 6.2) で溶出した。

その結果を図1に示した。リゾチーム活性は $1/15$ M phosphate buffer (pH 6.2) で0.6M NaCl 画分に溶出されこの step で約30倍に精製された。なお, 各分画について peroxidase 活性^{20) 21)}を測定したところ, リゾチーム活性と平行して存在していることがわかつた。

4. Sephadex G-75 gel filtration——上記活性画分を濃縮して, $1/15$ M の phosphate buffer (pH 6.0) で平衡化した Sephadex G-75 column

Fig. 1 CM-cellulose column chromatography of parotid lysozyme.

Fig. 2 Sephadex G-75 column filtration of parotid lysozyme.

表 1 Purification of Parotid Lysozyme

Step	Total Protein (mg)	Total Activity (10^4 units)	Specific Activity (units/mg)	Recovery (%)	Purification	Equivalent to Hen Egg-White Lysozyme (mg)
Crude	24,700	65.6	26.5	100	1	0.007
Ammonium sulfate fractionation	11,100	65.0	55.7	99	2.1	0.014
Column chromatography on DEAE-cellulose	6,670	63.6	95.4	96	3.6	0.024
Column chromatography on CM-cellulose	136	34.0	2,500	52	94.2	0.619
Gel filtration on Sephadex G-75	52.2	23.0	4,400	35	169	1.110
Adsorption on Amberlite CG-50 resin	11.5	16.0	13,914	25	525	3.450

(1×46 cm) に apply した。流速は20分間に1ml となるように調節し、3ml 毎に採集したところ、図2に示した如く、リゾチーム活性は peroxidase 活性と完全に分離された。

5. Amberlite CG-50 による吸着——pH 6.5 の0.2M phosphate buffer で Amberlite CG-50 resin を平衡化したのち、活性画分を batchwise に吸着せしめた。リゾチーム活性は 0.8M phosphate buffer (pH 6.5) で溶出された。

以上の精製操作により 耳下腺唾液リゾチームは 525 倍に精製され、精製標品は卵白 リゾチームの 3.5 倍の比活性を示すことが明らかとなった (表 1)。

酵素の均一性

精製標品の均一性を超遠心法およびディスク電気泳動法で確かめた。図3は超遠心を行なった時

の沈降状態を60分後に写真撮影したもので単一の対称的な沈降パターンがみられ、超遠心的に均一であることが明らかにされた。沈降定数は標準状態で1.8S と計算された。

他方、精製標品の電気泳動の結果は図4に示す如く、単一の band として検出され電気泳動的にも single であることが証明された。なお、耳下腺唾液リゾチームは卵白リゾチームとよく似た泳動様態を示した。

紫外部吸収

本酵素の紫外部吸収像は図5に示したように、 $282\text{m}\mu$ に最大吸収がみられ、卵白リゾチームと同様の吸収スペクトルが得られた。 $280\text{m}\mu$ と $260\text{m}\mu$ との吸光比は 1.89 であり、本精製標品にはスクレオチドや核酸が含まれていないことがわかった²²⁾。なお Soret band における吸収は全くみら

Fig. 3 Ultracentrifugation pattern of the purified parotid lysozyme.

Fig. 4 Electrophoretic patterns of parotid and hen egg-white lysozyme.

れなかつた²⁰⁾。

アミノ酸分析

耳下腺唾液リゾチームのアミノ酸組成を表2に示した。各アミノ酸残基数は分子量当りの alanine, leucine ならびに phenylalanine の残基数をそれぞれ12, 8, 2と仮定し他のアミノ酸残基の整数値を算定した。唾液リゾチームと平行して同時に分析した卵白リゾチームについては Canfield⁴⁾の報告と同じ成績が得られた。耳下腺唾液リゾチームのアミノ酸組成は卵白リゾチームのそれと近

Fig. 5 Absorption spectra of the purified parotid lysozyme (—) and hen egg-white lysozyme (---).

似していたが, tyrosine, serine, glutamic acid 残基数に違いがみられ, 特に特徴的なのは tyrosine で卵白リゾチームの2倍の含量を示した。分析から得られたアミノ酸総数は126個で, アミノ酸組成から分子量は約14,300と算定された。

考 察

唾液中からのリゾチームの精製においては Petit ら¹²⁾ならびに Balekjian ら¹³⁾は最初に唾液試料の熱処理を行なっている。本実験では同じ唾液から易熱性の peroxidase^{20) 21)}ならびに acid phosphatase²³⁾の精製を別に研究目的としていたため熱処理は行なわなかつた。精製方法で Petit ら¹²⁾ならびに Balekjian ら¹³⁾の方法と異っているが, 8l の耳下腺唾液から525倍に精製され, 超遠心的ならびに電気泳動的に単一な蛋白であることが証明された。超遠心分析から算定された沈降定数1.8Sは Alderton³⁾が卵白リゾチームで得た値1.9Sに近似しており, またディスク電気泳動においても卵白リゾチームとよく似た泳動様態を示した。

一方, アミノ酸分析の結果アミノ酸組成は卵白リゾチームのものと類似しているが, tyrosine, serine ならびに glutamic acid 含量に差異がみられ, 特に tyrosine は卵白リゾチームの2倍の含量

表 2 Amino Acid Composition of Parotid Lysozyme

Amino Acids	Amino Acid	Amino Acid Residue	Residues per Molecule	
	Grams per 100g Protein		Parotid Lysozyme	Hen Egg-White Lysozyme
Lysine	5.48	4.80	6	6
Histidine	1.16	1.02	1	1
Arginine	15.01	13.46	13	11
Tryptophan	3.71	3.38	5	6
Aspartic acid	15.82	13.68	18	21
Threonine	5.57	4.73	7	7
Serine	3.86	3.20	6	10
Glutamic acid	8.16	7.16	8	5
Proline	2.47	2.08	3	2
Glycine	5.09	3.87	10	12
Alanine	7.24	5.78	12	12
Half-cystine	6.56	6.08	6	8
Valine	6.52	5.52	8	6
Methionine	1.58	1.38	2	2
Isoleucine	4.21	3.63	5	6
Leucine	6.60	5.68	8	8
Tyrosine	6.80	6.12	6	3
Phenylalanine	2.40	2.14	2	3

であつた。また、half-cystine が卵白の 8 に対し、唾液の方は 6 と少く、S-S 結合が卵白リゾチームの 4 個に対して少くとも 1 つは高次構造上の差異があることが示唆される。

単位蛋白当りの酵素活性は、唾液リゾチームは結晶卵白リゾチームにくらべて 3.5 倍高いことが明らかにされたが、このことは上記アミノ酸組成の差異による蛋白構造の違いによるものか、あるいは活性アミノ酸基の違いによるものかは明らかでない。

唾液リゾチームのアミノ酸組成については、Petit ら¹²⁾ならびに Balekjian ら¹³⁾の報告とよく似た結果が得られたが、tryptophan 含量については Balekjian ら¹³⁾の報告している 1 分子当り 2 個に対し 5 個と大きな違いがみられた。Balekjian ら¹³⁾は加水分解により tryptophan の定量を行なっているが、本実験ではアルカリ溶液中において tyrosine との吸光度の比から tryptophan 含量を算定した。なお、Balekjian らも卵白リゾチームについて同時にアミノ酸分析を行なっているが tryptophan 含量が Canfield⁴⁾の報告している 1 モ

ル当り 6 個に対し 3 個と低い値を発表している。

リゾチームの活性基に関して、tryptophan 残基が活性アミノ酸の 1 つであることが卵白リゾチームについて知られているが、唾液リゾチームの活性発現に関与するアミノ酸については現在追究中である。

総 括

8 l のヒト耳下腺唾液よりリゾチームを 525 倍に精製し、その精製標品が超遠心的、電気泳動的に均一蛋白であることを明らかにした。精製耳下腺唾液リゾチームは 1.8 S の沈降定数を持ち、卵白リゾチームの 3.5 倍の比活性を示した。アミノ酸分析の結果耳下腺唾液リゾチームは 18 種類のアミノ酸より構成され、tyrosine, serine ならびに glutamic acid 含量が卵白リゾチームと異なることが判明した。アミノ酸組成から耳下腺唾液リゾチームの分子量は 14,300 と推定された。

本研究におけるアミノ酸分析及び超遠心分析は大阪大学蛋白質研究所で行なつたものであり、同研究所の成田耕造教授ならびに垣内欣二博士に深く感謝致します。

文 献

- 1) Fleming, A.: On a Remarkable Bacteriolytic Element Found in Tissues and Secretions Proc. Roy. Soc. Lon. B, 93 : 306, 1922.
- 2) 天野恒久, 藤尾啓: リゾチームの抗原決定基, 蛋白質核酸酵素, 13 : 129, 1968.
- 3) Alderton, G., Ward, W. H. and Fevold, H. L.: Isolation of Lysozyme from Egg White, J. Biol. Chem., 157 : 43, 1945.
- 4) Canfield, R. E.: Peptides Derived from Tryptic Digestion of Egg White Lysozyme, J. Biol. Chem., 238 : 2691, 1963.
- 5) Canfield, R. E. and Liu, A. K.: The Disulfide Bonds of Egg White Lysozyme (Mura-midase), J. Biol. Chem., 240 : 1997, 1965.
- 6) Jollès, P.: Relationship between Chemical Structure and Biological Activity of Hen Egg-White Lysozymes and Lysozymes of Different Species, Proc. Roy. Soc. Lon. B, 167 : 350, 1967.
- 7) 浜口浩三: リゾチームの立体構造と酵素活性, 蛋白質核酸酵素, 13 : 99, 1968.
- 8) Hayashi, K., Imoto, T. and Funatsu, M.: The Enzyme-Substrate Complex in a Muramidase Catalyzed Reaction. I. Difference Spectrum of Complex, J. Biochem., 54 : 381, 1963.
- 9) Hayashi, K., Imoto, T. and Funatsu, G.: The Position of the Active Tryptophan Residue in Lysozyme, J. Biochem., 58 : 227, 1965.
- 10) Smolelis, A. N. and Hartsell, S. E.: The Determination of Lysozyme, J. Bact., 53 : 731, 1949.
- 11) 尾笹桂作: 人唾液中の感染防禦に関与する因子について, 第1編 人唾液 Lysozyme に関する研究, 阪大歯誌, 4 : 1093, 1959.
- 12) Petit, J. F. and Jollès, P.: Purification and Analysis of Human Saliva Lysozyme, Nature, 200 : 168, 1963.
- 13) Balekjian, A. Y., Hoerman, K. C. and Berzinskas, V. J.: Lysozyme of the Human Parotid Gland Secretion: Its Purification and Physicochemical Properties, Biochem. Biophys. Res. Comm., 35 : 887, 1969.
- 14) Keene, H. J.: Parotid Fluid Collection System with Vacuum-Trap Modification, J. Dent. Res., 42 : 1041, 1963.
- 15) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent, J. Biol. Chem., 193 : 265, 1951.
- 16) Reisfeld, R. A., Lewis, U. J. and Williams, D. E.: Disc Electrophoresis of Basic Proteins and Peptides on Polyacrylamide Gels, Nature, 195 : 281, 1962.
- 17) Neidle, A. and Waelsch, H.: Histones: Species and Tissue Specificity, Science, 145 : 1059, 1964.
- 18) Spackman, D. H., Stein, W. H. and Moore, S.: Automatic Recording Apparatus for Use in the Chromatography of Amino Acids, Anal. Chem., 30 : 1190, 1958.
- 19) Goodwin, T. W. and Morton, R. A.: The Spectrophotometric Determination of Tyrosine and Tryptophan in Proteins, Biochem. J., 40 : 628, 1946. from Beaven, G. H. and Holiday, E. R.: Ultraviolet Absorption Spectra of Proteins and Amino Acids, Adv. Protein Chem., 7 : 369, 1952.
- 20) Iwamoto, Y., Inoue, M., Tsunemitsu, A. and Matsumura, T.: Some Properties of the Salivary Antibacterial Factor (S. A. Factor), Arch. Oral Biol., 12 : 1009, 1967.
- 21) Iwamoto, Y., Nakamura, R., Tsunemitsu, A. and Matsumura, T.: The Heterogeneity of Human Salivary Peroxidase, Arch. Oral., Biol., 13 : 1015, 1968.
- 22) Warburg, O. and Christian, W.: Isolierung und Kristallisation des Gärungsferments Enolase, Biochem. Zeitsch., 310 Bd : 384, 1942.
- 24) Nakamura, R., Watanabe, T., Iwamoto, Y. and Tsunemitsu, A.: Purification and Properties of Acid Phosphomonoesterase from Human Parotid Saliva, J. Dent. Res., 49 : 561, 1970.