Candida albicans が産生する collagen 分解活性 を有する酵素の性質

萩原義郷 上西秀則 黒木明三
末原利秀 末原靖之 河崎邦夫
林幸男 森智昌* 富岡徳也*

福岡歯科大学口腔細菌学講座（主任：萩原義郷教授）

* 福岡歯科大学口腔外科学第一講座（主任：富岡徳也教授）

〔受付：昭和60年6月20日〕

Isolation and characteristics of collagenolytic proteinase produced by *Candida albicans*

Yoshisato Hagihara, Hidenori Kaminishi, Meizo Kuroki,
Toshihide Suehara, Yasuyuki Suehara, Kunio Kawasaki,
Sachio Hayashi, Tomoyoshi Mori* and Tokuya Tomioka*

Department of Oral Microbiology, Fukuoka Dental College
(Director: Prof. Yoshisato Hagihara)

First Department of Oral Surgery*, Fukuoka Dental College
700 Ta, Sawara-Ku, Fukuoka 814-01
(Director: Prof. Tokuya Tomioka)

〔Accepted for publication June 20, 1985〕

Key words: *Candida albicans* / dental caries / collagen / collagenolytic enzyme

Abstract: Characteristics of the collagenolytic enzyme produced by the pathogen yeast *Candida albicans* ATCC 1002 were investigated. An enzyme capable of degrading dentine was isolated from the supernate when *C. albicans* was cultivated in a Yeast Carbon Base containing demineralized dentine.

The enzyme was purified by DEAE-Sephacel chromatography at pH 6.7. The enzyme was shown to be a single substance by means of 7.5 % polyacrylamide disc gel electrophoresis.

The molecular weight was found to be 46,000 by 10 % SDS polyacrylamide gel electrophoresis, the isoelectric point was at pH 4.2.

The optimum pH for collagen degradation lay between 3.5 and 4.0. The enzyme was heat labile and underwent alkaline denaturation in buffer over pH 7.0.

It was observed that the demineralized dentine was degraded by the enzyme at pH 4.0, and a hydroxyproline was detected in the hydrolysate. The enzyme also degraded Azocoll used as a substrate.

緒言

口腔に常在する病原真菌 *Candida albicans* (以下 *C. albicans*) は舌炎、口角炎、鰐口瘡など種々

の口腔感染症の原因微生物であり、また、近年、義歯性口内炎との関連性について論議されている¹⁾。

これらの疾患において *C. albicans* が病原性を発現するための重要な因子の一つとして、acid

proteinase が注目され Remold ら²⁾ は酵素産性能と病原性発現との関係について述べ、さらに、Macdonald ら³⁾ は全身感染の際の診断の一方法として、酵素に対する抗体を証明する試みについて報告した。

一方、本菌は、ヘテロ型乳酸発酵能を有することから、う蝕に何らかの形で関与しているであろうとされ、また、象牙質う蝕病巣からの検出頻度が高いことから⁴⁻⁶⁾、特に象牙質う蝕と本菌の関わり合いが多く多くの研究者により調べられてきたが、いまだに、存在意義すら不明のままにされてきている。

著者ら^{7,8)}はすでに、*C. albicans* が燐酸塩、カルシウム塩、マグネシウム塩などを含む、きわめて簡単な組成の培地で増殖できるという特殊な性質を有することを見出し、報告してきた。そこで、このような性質から、*C. albicans* が歯質を利用して増殖できないかという想定のもとに、特に脱灰した象牙質の collagen (安定で、水に不溶性) を唯一の窒素源として培養を行った結果、菌は明らかに増殖し、collagen 分解活性を示す proteinase を産性している事を見出した。この事実はこれまでに全く知られておらず、著者らが今回初めて明らかにするものであり、*C. albicans* という蝕の関係を説明する重要な証拠になり得るであろうし、このような proteinase は *C. albicans* の病原性発揮の際の因子ともなり得るものと思われる。

以下、酵素の分離と得られた酵素の性質について報告する。

材料および方法

使用菌株：教室保存 *Candida albicans* 1002株を使用した。

培地：菌株の継代には0.2% yeast extract 加 Sabouraud 寒天培地を、また必要に応じて、寒天を除く同じ組成の液体培地を用いた。酵素産生用基礎培地としては Yeast Carbon Base (YCB, Difco) 11.7g を蒸留水1,000ml に溶解し、これに glucose を1%加えて濾過滅菌した。

基質：EDTA で脱灰したヒト歯象牙質を用いた。基質の作製方法は以下の通りである。すなわち、外科的に抜去したう蝕のない新鮮な歯牙を

集め、注水下に、機械的にエナメル質、セメント質および歯髄組織を除去して、象牙質を得、これを X-Press (Biotec) 及び乳鉢を用いて100メッシュのフィルターを通過するまで粉碎した。この粉末化した象牙質を3% EDTA (1N NaOH で pH 7.0に調整) で攪拌しながら4°C で7日間脱灰した。その間、脱灰液を毎日交換した。脱灰後は、同様に攪拌しながら、蒸留水を1日2回交換し、4°C で7日間水洗して EDTA および可溶性物質を除いた。水洗終了後は、凍結乾燥を行い、デシケータ中に室温で保存した。基質は EOG 滅菌を行い (1 Kg/cm², 50°C), 基礎培地に 0.2% に無菌的に添加した。

培養：脱灰象牙質を含む基礎培地 1,000ml に対し、10⁷/ml に調整した菌液を1ml 接種し、37°C 16日間培養した。

酵素の分離：培養液を2,000g 30分遠心して沈渣を除き、上清を Amicon PM10X で濃縮し、DEAE-Sephacel で酵素を分離した。溶出は citrate buffer (pH 6.7) の20mM から500mM 濃度の linear gradient を用い、流速は1時間あたり30 ml とし、3 ml ずつ分取して、280nm 吸収分画を集めた。

Disc gel 電気泳動：分離した酵素の単一性を確認するため、Davis ら⁹⁾ の方法に従って行った。

分子量の測定：Weber ら¹⁰⁾ の方法に従い、SDS-polyacrylamide gel 電気泳動を行い分子量を求めた。

等電点の測定：Vesterberg ら¹¹⁾ の方法にしたがって polyacrylamide gel 電気泳動を行い、等電点を求めた。

蛋白質の測定：Lowry¹²⁾ の方法に従った。

酵素による基質の分解：1・Azocoll の分解。Azocoll¹³⁾ (Sigma) は、0.1M acetate buffer pH 4.0に2 mg/ml になるように調整したものを作製し、その2 ml と酵素液50μl を混合し、37°C 18時間反応させた。反応終了後は2,000g 20分遠心して未反応の Azocoll を除き、上清を日立分光光度計 200-20を用い、540nm の吸収を測定した。

2・脱灰象牙質の分解・EDTA 脱灰した象牙質 collagen を0.1M acetate buffer pH 4.0に加え、5 mg/ml になるように調整したものを基質液と

し、その1 ml に対し、酵素液50 μ l (25 μ g protein/ml) を加え、37°C で反応させた。反応物は経時的にその一部を取り出し、等量の20% TCA を加え、反応を停止させて、これを145,000g 3時間超遠心を行い、上清すなわち TCA 可溶画分に含まれる hydroxyproline 量を Prockop¹⁴⁾ の方法に従って定量した。

collagen 分解酵素の対照として、市販の collagenase (EC 3.4.24.3, Sigma) を用いた。

至適温度：基質液と酵素液の混合物を、30°C から70°C まで、種々の温度に調整した incubator で18時間反応させた。対照として100°C 10分間加熱した酵素液を Azocoll 基質液に加え、それぞれの温度で反応させた。

温度安定性：酵素液50 μ l を40°C から70°C まで、種々の温度に調整した incubator で30分加熱後 Azocoll 基質液2 ml を加え、37°C 18時間反応させた。対照として、37°C の加熱を行ったものを用いた。

至適 pH：acetate buffer pH 4.0 (50mM) で透析した酵素液50 μ l を Azocoll 2mg/ml を含む各種 pH buffer (pH 3.0~5.0: 0.1M acetate buffer, pH 6.0~7.0: 0.1M phosphate buffer pH 8.0: 0.1M Tris-HCl buffer) 2ml と混合し37°C 18時間反応させた。対照として、100°C 10分間加熱した酵素液50 μ l を各々の pH の基質液に加え、同様に反応させた。比活性の対照として、pH 4.0で反応させたものを100%とした。

pH 安定性：2 mM CaCl₂ で透析した酵素液50 μ l と各種 pH buffer (50mM) 50 μ l を混合し、37°C で2時間反応させた。反応終了後、各々に Azocoll 2mg/ml を含む0.2M acetate buffer pH 4.0 2ml を加え、37°C で反応させた

結 果

酵素の分離およびその性状：象牙質 collagen を窒素源として培養を行った時の増殖曲線を Fig. 1 に示す。この培養上清中に含まれる collagen および Azocoll に対する分解活性を有する物質は DEAE Sephacel ion exchange chromatography により citrate buffer 濃度が0.1M から0.2M のところで溶出された280nm 吸収画分に見出

Fig. 1 Growth of *C. albicans* in the Yeast Carbon Base containing the dentine collagen as a nitrogen source.

Fig. 2 Disc gel electrophoresis on 7.5% polyacrylamide gels of enzyme isolated from the culture supernate by the DEAE-Sephacel column chromatography.

され、Disc gel 電気泳動を行った結果、単一物質として集められている事が確認された (Fig. 2)。また、SDS-polyacrylamide gel 電気泳動の結果、分子量は46,000と推定され、等電点電気泳動の結果、pI 値は4.2である事がわかった。

Fig. 3 Effect of temperature on the enzyme activity. The experiment was carried out by the Azocoll assay. Reaction mixture was incubated at various temperature for 18 h. The relative activity was expressed as a percentage against the control. (cont.: 37°C)

Fig. 4 Effect of pH on the enzyme activity. The reaction mixture was prepared with each pH of buffer as described in the text. The experiment was carried out by the Azocoll assay for 18 h at 37°C. The relative activity was expressed as a percentage against the control. (cont.: pH 4.0)

Fig. 5 Hydrolysis of Azocoll by the Candida enzyme. The reaction mixture contained 50 μl of enzyme solution, 1.95 ml of a 0.1 M acetate buffer (pH 4.0) and 4mg of Azocoll. The mixture was incubated at 37°C for 18h successively, the mixture was centrifuged for 10min at 2,000g and the absorbance at 540nm of the supernate was measured. Concentration of protein in the enzyme was determined by the method of Lowry et al. using a BSA as a standard.

至適温度 および 温度安定性：酵素の活性は 45°C で最も高かった (Fig. 3)。また、55°C 以上の加熱により、酵素は急速に失活し、70°C の加熱で完全に失活した。

至適 pH および pH 安定性：酵素の活性は pH 3.5 から pH 4.0 の間で最も高く (Fig. 4)、pH 4.5 以上の pH における活性の発現は低く、pH 6.0 では 0% であった。一方、酵素活性を安定に保つ至適 pH は 6.0 であり、7.0 以上の pH では、37°C 2 時間の放置で急速に失活することがわかった。

Azocoll および collagen の分解：Azocoll は酵素の作用を受け、結合されている azo 色素が遊離され、反応物の上清は透明な赤色を呈する。実験結果は Fig. 5 に示すように、Candida から得られた酵素の量と、それによって分解される Azocoll 量は比例した。また象牙質 collagen に酵素を作用させ、更に 10% TCA (終濃度) 処理した後、遠心 (145,000g, 3 時間) 上清に検出される hydroxyproline は経時的に増加していくことがわかった。

Fig. 6 Hydrolysis of dentine collagen by the *Candida* enzyme and *Clostridium* collagenase. The reaction mixture contained 1ml of buffer solution (0.1 M acetate buffer pH 4.0 is for the *Candida* enzyme and 0.1M Tris-HCl buffer pH 7.5 is for the *Clostridium* collagenase), 50 μ l of enzyme solution (● : *Candida* enzyme 25 μ g protein/ml, ■ : *Clostridium* collagenase 25 μ g protein/ml) and 5mg of dentine collagen. After incubation of specified intervals at 37°C, an equal volume of 20% TCA was added to stop the reaction.

Successively, the mixture was ultra-centrifuged for 3 h at 145,000 g and the amount of hydroxyproline in the supernate was determined by the method of Prockop et al. Dentine collagen was washed to remove the soluble materials with the each buffer by the repeated centrifugation at 4°C for 18h before the experiment. Heated (100°C, 10min) enzyme was used as a reference assay (dotted line).

た (Fig. 6)。

考 察

collagen は不溶性のきわめて安定な蛋白質でこれを分解する微生物種は少なく、これまでに細菌では *Clostridium histolyticum*^{15,16)}, *Pseudomonas aeruginosa*¹⁷⁾, *Mycobacterium tuberculosis*¹⁶⁾ などが、また真菌では *Aspergillus oryzae*¹⁸⁾, *Trichophyton schoenleinii*¹⁹⁾ などが報告されて

きたが、*C. albicans* についての報告はみられない。今回新たに口腔常在微生物であり、また病原真菌として重要な *C. albicans* が象牙質 collagen を窒素源とした合成培地中で培養したとき、菌体外に collagen 分解活性を有する proteinase を産生し、collagen を分解してこれを利用し、増殖することを明らかにした。*C. albicans* が産出する酵素の至適 pH は 3.5~4.0 であり、*Cl. histolyticum* 7.0~8.5, *A. oryzae* 9.0~10, *P. aeruginosa* 7.1, *T. schoenleinii* 6.5 等と比較すると大きく酸性側に位置していることが特徴である。また分子量が 46,000, 等電点が 4.2 という性質もこれまでに報告されている collagenase とは異なっており、新たな種類の collagen 分解活性を有する proteinase であることがうかがえる。

collagenase 活性を特異的に調べる方法はいくつか上げられるが、未変性 collagen に酵素を作用させ、基質が小 peptide に分解され分解物中に collagen のアミノ酸組成で特徴ある hydroxyproline が含まれている事を証明する方法がある。*C. albicans* が産生する酵素の collagen 分解活性をこの方法で調べたが、明らかに象牙質から得た不溶性 collagen を分解する成績を得た。しかし、基質としての象牙質 collagen はその取り方、あるいは酵素との反応環境が pH 4.0 である点を考慮すると、collagen に若干の変性を生じているかもしれない。また、Azocoll 分解に関して、今回、*Candida* から得た酵素は *Cl. histolyticum* collagenase (EC 3.4.24.3) との単位蛋白量あたりの比活性では、約 30% を示した。データとして示さなかったが、合成基質である Z-GIY-Pro-Leu-pro は分解しなかった。この事については、Nordwig ら¹⁸⁾ が用いたような他の種類の合成基質について、今後検討を行う必要がある。う蝕象牙質から *C. albicans* が高頻度に検出されるという報告⁴⁻⁶⁾ はこれまで多くあり、*C. albicans* という蝕との関係について論議されてきたが著者らが今回示した成績は、まだ不明な点が多いとされている象牙質う蝕の解明の一助になるものと思われる。

C. albicans が菌体外に産生する proteinase として、これまでに、BSA 誘導による acid prote-

inase が報告されているが^{1-3,20)}，collagenase 活性についてはふれられておらず，また，酵素の分子量，アルカリ変性 pH，等電点において，著者らが象牙質 collagen を基質として得たものと異なっている。

坪井ら²¹⁾は *Candida* が産生する皮膚角質溶解性蛋白分解酵素は誘導性であると述べ，また Norwig¹⁸⁾ は *Aspergillus* が産生する collagenase も誘導性であり，特にオートクレーブにより熱変性した collagen を基質とした時，酵素は産生されないと述べている。今回著者らが得た酵素も誘導により産生されたものと思われ，オートクレーブ滅菌した象牙質 collagen を使用した場合，あるいは通常用いられる glucose-pepton 培地で菌を培養した場合には酵素の産生は認められなかった。

結 論

象牙質 collagen を基質として培養した *C. albicans* が菌体外に産生する collagen 分解活性を有する proteinase を分離し，その性状および酵素活性について実験を行い，以下の成績を得た。

抄録：Candida albicans を EDTA で脱灰して得た象牙質 collagen を唯一の窒素源として加えた合成培地中で培養した時，菌は明らかに増殖し，また菌体外に collagen 分解活性を有する proteinase を産生していることを見出した。

Collagenase を産生する微生物種は数少なく，これまでに Candida が同様な活性を示す酵素を産生するという報告はない。

これまでに報告されているいくつかの collagenase の活性至適 pH が中性ないし弱アルカリ性であるのに対し，Candida が産生する酵素のそれは3.5～4.0と，きわめて酸性側に位置していることが特徴である。

また，この酵素によって象牙質 collagen が分解されるという成績が得られたことから Candida と象牙質う蝕との関連性を強く示唆するものと思われる。

文 献

- 1) Samaranayake, L. P., Hughes, A. and Macfalan, T. W.: The proteolytic potential of *Candida albicans* in human saliva supplemented with glucose. J Med Microbiol 17: 13-22, 1984.
- 2) Remold, H., Fasold, H. and Staib, F.: Purification and characterization of a proteolytic enzymes from *Candida albicans*. Biochim Biophys Acta 167: 399-406, 1968.
- 3) Macdonald, F. and Odds, F. C.: Inducible

1. 培養上清を DEAE-Sephacel に吸着させ，citrate buffer (pH 6.7) の linear gradient で溶出させた結果，酵素は，buffer 濃度が0.1～0.2M の間で溶出される分画に見出された。

2. 酵素は，Disc 電気泳動により，単一物質であることが確認され，その分子量は46,000であり，等電点は4.2であった。

3. Azocoll を基質として酵素の性質を調べた結果，至適 pH は3.5～4.0であり，また至適温度は45°C であった。一方，pH 7.0以上の環境，あるいは，55°C 以上の加熱は酵素の活性を著しく低下させた。

4. 得られた酵素は，Azocoll を分解して色素を遊離させ，また，象牙質 collagen を分解し，その分解産物中には hydroxyproline が証明された。

謝辞：本研究を進めるにあたり御教示いただいた本学化学研究室黒水健二助教授に深く感謝いたします。

尚，本論文の一部は第57回日本細菌学会総会（1984年7月 札幌）のシンポジウムにおいて発表した（日本細菌学会雑誌，39巻，p, 263）

proteinase of *Candida albicans* in diagnostic serology and in the pathogenesis of systemic candidosis. J Med Microbiol 13: 423-435, 1980.

- 4) 成田令博：口腔内における真菌の動態とその意義。口科誌 20: 246-251, 1971.
- 5) 小林やす子：酵母様真菌の口腔内分布。愛院大歯誌 11: 24-33, 1974.
- 6) Fosdic, L. S. and Wessinger, G. D.: Carbohydrate degradation by mouth organisms II-Yeast. J Am Dent Assoc 27: 203-212, 1940.

- 7) 萩原義郷, 上西秀則, 宇佐川志郎, 坂田美千代, 浜田多美子, 山中俊彦, 中島幸一, 松下亀久 : *Candida albicans* の増殖に関する研究 1. 無機塩水中における *Candida albicans* の増殖. 福歯大誌 4 : 411-420, 1977.
- 8) 上西秀則, 宇佐川志郎, 福岡隆俊, 佐喜真盛雄, 山中俊彦, 中島幸一, 萩原義郷 : *Candida albicans* の増殖に関する研究 2. 菌垢から分離した *Candida albicans* FD-1株の無機イオン培地における形態. 福歯大誌 5 : 319-325, 1978.
- 9) Davis, B. J. : Disc electrophoresis-II. Method and application to human serum proteins. Ann NY Acad Sci 121 : 404-427, 1964.
- 10) Weber, K. and Osborn, M. : The reliability of molecular weight determination by sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J Biol Chem 244 : 4406-4412, 1969.
- 11) Vesterberg, O. : Isoelectric focusing of proteins, (Jacob, W. B. ed.), Methods in enzymology. vol. 22, p. 389-412, Academic press Inc., New York, 1971.
- 12) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193 : 265-275, 1951.
- 13) Moore, G. L. : Use of azo-dye bound collagen to measure reaction velocities of proteolytic enzymes. Anal Biochem 32 : 122-127, 1969.
- 14) Prockop, D. J. and Udenfriend, S. : A specific method for the analysis of hydroxyproline in tissues and urine. Anal Biochem 1 : 228-239, 1960.
- 15) Seifter, S., Gallop, P. M., Klein, L. and Meilam, E. : Studies on collagenase II. Properties of purified collagenase and its inhibition. J Biol Chem 234 : 285-293, 1959.
- 16) Walter, A. : Collagenase, (Hans Ulrich Bergmeyer ed.) Methods of enzymatic analysis. 2nd ed. vol. 2. p. 1058-1063, Academic Press Inc., New York. 1960.
- 17) Schoellmann, G. and Fisher, E. Jr. : A collagenase form *Pseudomonas aeruginosa*. Biochim Biophys Acta 122 : 557-559, 1966.
- 18) Nordwigh, A. and Lahn, W. F. : A collagenolytic enzymes from *Aspergillus oryzae*. Purification and properties. Eur J Biochem 3 : 519-529, 1968.
- 19) Rippon, J. W. : Extracellular collagenase from *Trichophyton schoenleinii*. J Bacteriol 95 : 43-46, 1968.
- 20) Ruchel, R., Tegeler, R. and Trost, M. : A comparison of secretory proteinase from different strains of *Candida albicans*. Sabouraudia 20 : 233-244, 1982.
- 21) 坪井良治, 栗田依幸, 松田和子, 根木 信, 小川秀興 : *Candida albicans* に対する protease inhibitor の抗真菌作用について. 真菌誌 25 : 387-390, 1984.