Mycoplasma salivarium の細胞膜に存在する arginine に特異的な aminopeptidase および carboxypeptidase の精製ならびに性状

柴 田 健 一 郎

長崎大学歯学部口腔細菌学講座 (指導: 渡邊継男教授)

(受付: 昭和62年1月12日)

Purification and characterization of arginine-specific aminopeptidase and carboxypeptidase associated with cell membranes of *Mycoplasma salivarium*

Ken-ichiro Shibata

Department of Oral Bacteriology, Nagasaki University School of Dentistry,
7-1 Sakamoto-machi, Nagasaki 852

(Director: Prof. Tsuguo Watanabe)

[Accepted for publication: January 12, 1987]

Key words: Purification / aminopeptidase / carboxypeptidase / *Mycoplasma salivarium*

Abstract: Aminopeptidase (AP) and carboxypeptidase (CP) were found to be associated with cell membranes of *Mycoplasma salivarium*. AP was solubilized in a water-soluble form by papain digestion of the membrane fraction treated with Triton X-100, and purified by column chromatography on DEAE-Sephadex A-50, L-leucylglycine-AH-Sepharose 4B and Sepharose CL-6B. CP was solubilized from the membrane fraction by Triton X-100, and purified by 4 steps of column chromatography, at steps 1 and 4 on DEAE-Sephacel and at steps 2 and 3 on arginine-Sepharose 4B.

The purified AP (APM) had a molecular weight of 397-kilodalton (397K) estimated by gel filtration, and gave two bands of activity by analytical disc-polyacrylamide gel electrophoresis (disc-PAGE); a dense and diffuse band and a less dense and narrow one, accounting for 90 % and 5 % of the stained proteins in the gel, respectively. APM revealed two bands of molecular weights corresponding to 50K and 46K in an apparent molar ratio of 1:1 by sodium dodecyl sulfate (SDS)-PAGE. The purified CP (CPM) gave one band of activity by analytical disc-PAGE performed in the presence of 0.5 % (w/v) Triton X-100, and several minor bands and one major band accounting for 84 % of the stained proteins in the gel and having a molecular weight of 87K by SDS-PAGE.

APM catalyzed selectively the cleavage of N-terminal arginine and leucine residues of peptides and had a pH optimum at 8.5. CPM catalyzed selectively the cleavage of the C-terminal arginine residue of peptides and had a pH optimum at about 6.5. Both enzymes were remarkably inhibited by EDTA and o-phenanthroline.

序 論

Mycoplasma は細胞壁を持たず、細胞膜のみに包まれた自己増殖可能な最小の微生物で、自然界

に広く分布し、ヒトの口腔からも検出され、その主なものは *Mycoplasma salivarium* と *Mycoplasma orale* である。*M. salivarium* は主に歯垢ならびに歯肉溝に常在し^{1,2)}、口腔からの検出頻度¹⁾ならびに菌数²⁾は歯周疾患の進行に伴い、有意に増加しており、健康者に比べて歯周疾患患者

においてこの微生物に対して有意に高い抗体応答がみとめられる³⁾。また、この mycoplasma は lipase 活性⁴⁾, phosphatase 活性⁵⁾, protease 活性⁶⁾, 溶血性⁷⁾などのように組織傷害性に作用すると思われる種々の活性を示す。このような理由から、*M. salivarium* は歯周疾患と何らかのかかわりを持っているのではないかと考えられている。

最近、Nakamura ら⁸⁾ は capnocytophaga が関係した歯周疾患において aminopeptidase (AP) が一つの重要な因子であるとし、その理由として、AP が bradykinin の生成、collagen fragment の消化などにかかわり得ることをあげている。AP は数種の mycoplasma ならびに ureaplasma においてもみいだされている⁹⁾。我々は、*M. salivarium* ならびに他のヒト由来 mycoplasma に L-arginine および L-leucine に特異的な AP が存在することを報告した^{10,11)}。L-Arginine に特異性を示す AP は arginine aminopeptidase と呼ばれ、kallidin を bradykinin に変換する¹²⁾。Bradykinin は炎症の chemical mediator で、血管の透過性を亢進し、lymphocyte の蓄積ならびに痛みを誘発する。

一方、我々は L-arginine に特異的な carboxypeptidase (CP) が *M. salivarium* の細胞膜に存在することを最近みいだした¹³⁾。CP は、arginine dihydrolase 経路により L-arginine から ATP を産生する非発酵性 mycoplasma のみに存在している。Arginine dihydrolase 経路は下記の三段階の反応からなり、

L-arginine から ATP ならびに ammonia を産生する。Ammonia は組織傷害性を有することから、mycoplasma の病原因子の一つと考えられる。したがって、この経路に L-arginine を供給するものと推定される CP について調べることは、本菌の歯周疾患とのかかわりを解明する上でも、また mycoplasma 自身の代謝機構を知る上でも意義のあることと思われる。

本研究の目的は、これら AP および CP の両酵素を mycoplasma 菌体より精製し、その諸性状を明らかにすることである。

材料ならびに方法

1. 試薬

界面活性剤としては sodium dodecyl sulfate (SDS), Triton X-100 (共に和光純薬), CHAP-SO (Bio-Rad 社) および sodium deoxycholate (DOC) (半井化学) を用いた。AP の基質としては L-alanine, L-arginine, glycine, L-lysine (いずれも Sigma 社), L-proline, L-phenylalanine (共に Vega 社) および L-leucine (peptide 研) の p-nitroanilide 誘導体を用いた。CP の基質としては N-benzoylglycyl-L-arginine (Bz-Gly-Arg), Bz-Gly-Lys, Bz-Gly-His-Leu, pyroglutamyl-L-alanine (Pyr-Ala), carbobenzoxy-glycyl-L-phenylalanine (Z-Gly-Phe) (いずれも peptide 研) および N-acetyl-L-alanyl-L-alanyl-L-alanine (Ac-Ala₃) (Sigma 社) を用いた。

2. 供試菌株

Mycoplasma salivarium ATCC 23064 を用いた。

3. 培地

1% (v/v) PPLO serum fraction (Difco), 1% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) L-arginine-HCl, 0.002% (w/v) phenol red, 0.05% (w/v) thallium acetate および penicillin G (1000U/ml) を含む PPLO broth (Difco) (SF 培地) を用いた。

4. 細胞膜画分の調製

供試菌株を SF 培地で培養し、対数増殖期の終末期に培養液を 15,000×g で30分間遠心して菌体を集め、0.25 M NaCl で3回洗浄した。洗浄菌体をあらかじめ glycerol (最終濃度: 2 M) で処理したのち、すばやく100倍量の蒸留水に浮遊させるという Rottem ら¹⁴⁾ の osmotic shock 法で細胞膜画分を調製し、得られた細胞膜画分の純度を知る目的で、細胞内画分に局在することが既にわかっている arginine deiminase の活性¹⁵⁾の混在を調べた。なお、この方法では細胞膜画分の収率が低かった (全菌体蛋白量の10%) ので、細胞膜

Fig. 1 Solubilization of aminopeptidase by papain digestion of the membrane fraction of *M. salinarum*. The membrane fraction (50 mg protein) was treated with Triton X-100 (250 mg) at 37°C for 15 min and then centrifuged at $40,000\times g$ for 1 h. The sediments (16 mg of protein) were treated with papain (0.8 mg) for 1 h at 37°C, rapidly cooled in ice-cold water and centrifuged at $40,000\times g$ for 1 h. Before use, papain was preincubated in the presence (●) or absence (▲) of 5 mM L-cysteine at room temperature for 3 min. The supernatant and the sediment were examined for LAP activity as described in the text. The solubilization (—) and the remaining activity (·····) are expressed as $(A/(A+B))\times 100$ and $((A+B)/C)\times 100$, respectively, where A, B, and C represent total activity of the supernatant, the sediment, and the membrane fraction before solubilization.

からの酵素の可溶化ならびに精製には洗浄菌体の懸濁液を超音波で処理し、 $40,000\times g$ の沈渣を細胞膜画分（全菌体蛋白量の約50%^{16,17)}）として用いた。

5. AP 活性測定法

3.0 ml の 0.1 M borate buffer (0.15 M NaCl を含有, pH 8.0; 以後 BBS) に適当に希釈した酵素標品（全菌体懸濁液の場合を含む）および 20 mM $MnCl_2$ をそれぞれ 0.2 ml ずつ加え、あらかじめ 37°C で 20 分間反応させた。これに 0.1 M の基質溶液を加え、37°C で一定時間反応させたのちに、40% (w/v) trichloroacetic acid 0.1 ml を加え、反応を停止させた。室温に約 30 分間放置したのち、 $1,800\times g$ で 30 分間遠心し、その上清の

405 nm における吸光度を測定した。この条件下で 1 分間に $1\mu mol$ の p-nitroaniline を遊離させる酵素量を 1 単位とした。ただし、p-nitroaniline 量はこの反応条件下における吸光係数を求め、その値 ($7620 M^{-1} cm^{-1}$) をもとに算出した。なお、以下では、L-leucine-p-nitroanilide および L-arginine-p-nitroanilide を基質として測定した活性をそれぞれ LAP 活性および AAP 活性とした。

6. CP 活性測定法

0.1 M sodium acetate buffer (pH 6.0) 0.2 ml と 5 mM Bz-Gly-Arg 0.2 ml との混液に、適当に希釈した酵素標品（全菌体懸濁液の場合を含む）0.1 ml を加え、37°C で一定時間反応後、20% (w/v) trichloroacetic acid 0.5 ml を加えることにより反応を停止させた。ついで、沈殿物が生じた場合には遠心 ($1,800\times g$, 10 分間) によりこれを除去し、その上清液 0.5 ml に含まれる arginine 量を Tsunasawa ら¹⁸⁾ の ninhydrin 比色定量法により測定した。活性の 1 単位は 1 分間に $1\mu mol$ の L-arginine を遊離させる酵素量とした。

7. 精製法

1) AP の精製

細胞膜画分を Triton X-100 で処理することにより、AP は殆ど可溶化されないが、AP 以外の蛋白質が優先的に可溶化されることに着目し、細胞膜画分をあらかじめ Triton X-100 で、次に papain で処理することにより AP を可溶化する方法を予備実験で確立した。

細胞膜画分（蛋白量 1.1 g）をあらかじめ 5 倍量 (w/w) の Triton X-100 で 37°C で 15 分間処理したのち、 $40,000\times g$ で 1 時間遠心し、上清 (TX100 sup) と沈渣 (TX100 sed) に分画した。TX100 sed（蛋白量 418 mg）を BBS に懸濁させ、重量比 (w/w) として 1/20、液量比 (v/v) として 1/50 の papain（あらかじめ 5 mM の L-cysteine で約 3 分間室温で処理しておく）を加え、37°C で 1 時間処理した。この混液を $40,000\times g$ で 1 時間遠心し、上清 (PAP sup) (Fig. 1 に示したように、約 70% の AP が水溶性の状態 で存在していた) を、あらかじめ 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0; 以後 50 mM TB) で平衡化した DEAE-Sephadex A50 (2.6×9.0 cm), L-leucylglycine-AH-Sepha-

Table 1 Localization of AP, CP, and arginine deiminase in *M. salivarium* cells

Fractions	Specific activity (units/mg protein)			
	AP		CP	Arginine deiminase ^a
	LAP	AAP		
Membrane fraction	0.027	0.035	5.71	0.16
Cytoplasmic fraction	0.001	0.002	0.10	1.62
Culture supernatant	0.000	0.000	0.00	NT ^b

^a Arginine deiminase activity was measured by the method of Schimke et al¹⁵⁾. One unit of the activity was defined as the amount of the enzyme producing 1 μ mol of L-citrulline from L-arginine per min at 37°C.

^b Not tested.

rose 4B (0.8×2.0 cm) ついで Sepharose CL-6B (1.5×86 cm) column に順次適用し, AP を精製した。なお, L-leucylglycine-AH-Sepharose 4B は, Basha ら¹⁹⁾ の方法に準拠して L-leucylglycine と AH-Sepharose 4B とを結合させて調製した。

2) CP の精製

予備実験において, AP の精製の際に生じた TX100sup に強い CP 活性がみとめられた。そこで, TX100 sup (蛋白量 27.7 mg) を出発材料とし, DEAE-Sephacel (2.6×9.0 cm) による ion-exchange chromatography を, ついで arginine-Sepharose 4B (0.8×3.0cm) で affinity chromatography を 2 回行なった。これらの column chromatography には buffer として 0.5%(w/v) Triton X-100 を含む 5 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5 ; 以後 5 mM TB-Triton) を用いた。

8. 分子量の測定法

Andrews の方法²⁰⁾を参考にして, 0.5 M NaCl を含む 50 mM TB (pH 8.0) であらかじめ平衡化した Sepharose CL-6B (1.5×86 cm) に酵素標品を添加し, 同じ buffer で溶出することにより分子量の測定を行なった。標準蛋白質として, Pharmacia 社製の aldolase (158-kilodalton : 158K), catalase (232K), ferritin (440K) および thyroglobulin (669K) を用いた。

9. 電気泳動

酵素標品の純度検定のために disc-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) を Ornstein²¹⁾ および Davis²²⁾ の方法で, また SDS-PAGE を

Laemmli の方法²³⁾に従って行なった。

10. 蛋白量は, bovine serum albumin (Sigma 社) を標準蛋白質として, Lowry ら²⁴⁾ の方法に準じて測定した。なお, 非イオン性の界面活性剤が含まれている sample に Folin Ciocalteu 試薬を添加すると混濁し, 沈殿物を生ずる。このため, 測定の際には sample をできるだけ希釈して, sample に含まれる界面活性剤の濃度を下げようにつとめ, 沈殿物が生じた場合には遠心によりこれを除去したのちに, 上清の吸光度を測定した。

結 果

1. 酵素の精製

1) 局在性

細胞膜画分が細胞質画分と培養上清に比べてはるかに高い AP および CP 活性を示したことから, これらの酵素は細胞膜画分に存在していることがわかった (Table 1)。なお, 本実験で得られた細胞膜画分では, 細胞質画分の marker 酵素としての arginine deiminase 活性が非常に低かったため, 細胞質画分の混入がかなり避けられたものと思われる。

2) AP の精製

50 mM NaCl を含む 50 mM TB (pH 8.0) であらかじめ平衡化した DEAE-Sephadex A-50 column に, PAPsup (104 mg protein) を添加し, 洗浄したのち, NaCl の濃度勾配 (0.05-1.00 M) により溶出した。AP は 0.4 M 付近に溶出されたが, LAP 活性と AAP 活性とは分離されなかつ

Fig. 2 Affinity chromatography of AP fraction on an L-leucylglycine-AH-Sepharose 4 B. AP fraction (19mg protein) from a DEAE-Sephadex A-50 column was dialysed against 50 mM TB (pH 8.0) and then applied to an L-leucylglycine-AH-Sepharose 4 B, column (0.8×2.0 cm). Adsorbed protein was eluted by increasing NaCl concentrations from 0.05 to 1.0 M. Each fraction volume and flow rate were 1.5 ml and 33 ml/h, respectively. Symbols: —, absorbance at 280 nm; Δ , LAP activity; and $\bullet$, AAP activity.

た。そこで、これらを分別する目的で、L-leucine に特異的な AP は L-leucylglycine に作用するが、L-arginine に特異的な AP は作用しないという報告^{25,26)}があるので、活性画分 (19 mg protein) を 50 mM TB (pH 8.0) に対して透析したのちに、L-leucylglycine-AH-Sepharose 4B column に添加し、affinity chromatography を行なった。その結果、AP は素通り画分にはなく、NaCl の濃度勾配により 0.4 M 付近に溶出されたが、AAP 活性と LAP 活性とは分別されなかった (Fig. 2)。最後に、この活性画分 (4.8 mg protein) を濃縮したのち、0.5 M NaCl を含む 50 mM TB (pH 8.0) で平衡化した Sepharose CL-6B column に添加し、gel filtration を行ない、蛋白量にして 1.4 mg の酵素標品 (APM) を得た。

APM の純度検定のために、disc-PAGE (5% gel) を行なったところ、太くて濃い band と細くて薄い band の 2 本が形成され、ともに LAP 活性を示し (Fig. 4), densitometry で、それぞれ APM の 90% と 5% を占めていることがわかった。APM の SDS-PAGE (10% gel) を行なったところ、分子量が 50K と 46K の 2 本の band がみ

Fig. 3 Determination of the molecular weight of APM. The standard proteins used for calibration were aldolase (158K) (A), catalase (232K) (B), ferritin (440K), and thyroglobulin (669K) (D). A calibration curve was constructed as a regression line.

Fig. 4 Analytical disc-PAGE of APM. Analytical disc-PAGE of APM was performed with 5% polyacrylamide gels. Some gels were stained with Coomassie blue. The other gels were sliced into 2-mm thick sections and each section was assayed for LAP activity.

とめられ、それらのみかけのモル比は densitometry で 1 : 1 であることがわかった (Fig. 5)。したがって、gel filtration で得られた分子量が 397K (Fig. 3) であることから、APM は $\alpha_4\beta_4$ の subunit 構造からなることが示唆された。

3) CP の精製

5 mM TB-Triton (pH 7.5) であらかじめ平衡化した DEAE-Sepharcel column に TX 100 sup (27.7 mg protein) を添加し、洗浄したのちに、NaCl の濃度勾配 (0–1.0 M) により溶出した。

Fig. 5 SDS-PAGE of whole cell proteins and APM. Electrophoresis of standard proteins (lane A), APM (lane B) and whole cell proteins (lane C) was performed with 10% polyacrylamide gels (Fig. 5(I)). The low-molecular-weight standards for SDS-PAGE (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden) were used. Lane B was scanned at 620 nm by using a densitometer (Model PAN-FV; Jookoo Co., Tokyo) (Fig. 5(II)).

Fig. 6 Affinity chromatography of CP fraction on an arginine-Sepharose 4B. CP fraction (16.8 mg protein) from a DEAE-Sepharose column was dialysed against 5 mM TB-Triton (pH 7.5) and then applied to an arginine-Sepharose 4B column (0.8×3.0 cm). Adsorbed protein was eluted by increasing NaCl concentrations from 0 to 0.5 M. Each fraction volume and flow rate were 3.0 ml and 38 ml/h, respectively. Symbols: O, protein measured by the method of Lowry et al.²⁴⁾; and ●, CP activity.

CP は0.3 M 付近に溶出された。活性画分 (16.8 mg protein) を 5 mM TB-Triton (pH 7.5) に対して透析したのち、CP が L-arginine に特異性をもつことを利用し、arginine-Sepharose 4B column に適用し、NaCl の濃度勾配 (0-0.5 M) で溶出したところ、CP は 0.2 M 付近に溶出された (Fig. 6)。活性画分 (7.9 mg protein) を透析したのち、もう一度同じ affinity column に適用し、得られた標品 (3.0 mg protein) から Triton X-100を除くために、5 mM TB (pH 7.5) で平衡化した DEAE-Sepharose column に適用した。しかし、CP は NaCl の塩濃度勾配だけでは溶出されなかった。そこで、Triton X-100とは異なり、紫外外部に吸収のない界面活性剤である CHAPSO を 5 mM TB (pH 7.5) に加えて溶出し、蛋白量にして 0.6 mg の酵素標品 (CPM) を得た。

精製の各段階の酵素標品の disc-PAGE (6 % gel) を 0.5% (w/v) Triton X-100 の存在下で行なった。その結果、CPM は単一の band となり、その band に活性がみられた (Fig. 7)。次に、こ

Fig. 7 Analytical disc-PAGE of CP fraction. Analytical disc-PAGE of TX100sup (A) and PC fraction from 1st DEAE-Sephacel (B), 1st arginine-Sepharose 4B (C), 2nd arginine-Sepharose 4B (D) and 2nd DEAE-Sephacel columns (E) was performed with 6% polyacrylamide gels containing 0.5% (w/v) Triton X-100. The unstained gel of CPM was sliced into 2-mm thick sections and each section was assayed for CP activity.

これらの標品の SDS-PAGE (10% gel) を行なったところ、精製段階が進むにつれて、87K の蛋白質が濃縮され、この蛋白質が CP であることがわかった (Fig. 8)。Densitometry により、87K の蛋白質は CPM の84%を占め、TX100sup に含まれる蛋白質の約9.5%であった。

2. 酵素化学的性状

1) 基質特異性

APM は L-leucine および L-arginine の p-nitroanilide 誘導体に同程度に強く、そして L-lysine の誘導体には弱く作用した (Table 2)。

CPM は、用いた基質のなかで Bz-Gly-Arg にとくに強く、そして Ac-Ala₃ および Pyr-Ala にわずかに作用したが、Bz-Gly-Lys, Bz-Gly-His-Leu ならびに Z-Gly-Phe には作用しなかった (Table 3)。

2) 至適 pH

APM ならびに CPM の pH 依存性を、それぞれ L-leucine-p-nitroanilide ならびに Bz-Gly-

Arg を基質とし、Britton-Robinson の広域 buffer (40 mM, pH 3-11) を用いて調べた。その結果、APM ならびに CPM は pH がそれぞれ8.5および約6.5の時に最大活性を示した (Fig. 9)。

3) 化学薬品の影響

APM あるいは CPM と種々の化学薬品 (最終濃度、1 mM) とを、あらかじめ37°C で15分間反応させた後、両活性を測定した。両酵素はともに o-phenanthroline および EDTA で強く阻害され、金属酵素であることがわかった (Table 4)。APM はそのほかに bestatin および L-cysteine により、そして CPM は NiCl₂ により阻害された、しかしながら、APM は MgCl₂ で2倍、そして MnCl₂ で9倍活性化されたが、CPM はこれらにより活性化されることはなかった。

考 察

AP は Triton X-100のような非イオン性の界面活性剤では殆ど可溶化されず、イオン性の DOC

Fig. 8 SDS-PAGE of CP fraction. SDS-PAGE of TX100sup (lane A) and CP fraction from 1st DEAE-Sepacel (lane B), 1st arginine-Sepharose 4B (lane C), 2nd arginine-Sepharose 4B (lane D) and 2nd DEAE-Sepacel columns (lane E) was performed with 10% polyacrylamide gels. The low-molecular-weight standards (Pharmacia) were used. Lane A and E were scanned at 620 nm by using a densitometer (Jookoo Co.).

Table 2 Substrate specificity of APM

Substrates (amino acid-p-nitroanilide derivatives)	Relative rate (%) of hydrolysis
L-Leucine	100
L-Arginine	103
L-Lysine	21
L-Alanine	3
L-Phenylalanine	3
Glycine	1
L-Proline	0

Table 3 Substrate specificity of CPM

Substrates	Relative rate (%) of hydrolysis
Pyr-Ala	3
Ac-Ala ₃	4
Z-Gly-Phe	0
Bz-Gly-Arg	100
Bz-Gly-Lys	0
Bz-Gly-His-Leu	0

および SDS 処理で約 30% から 95% 可溶化される。しかしながら、イオン性の界面活性剤の存在下では精製法に限られてしまい、予備実験において、AP を高度に精製することができなかった。そこで、Triton X-100により AP 以外の蛋白質が優先的に可溶化されることに着目し、細胞膜画分をあらかじめ Triton X-100で、次に papain で処理することによりはじめて AP が水溶性の蛋白質として可溶化されることを予備実験でみだし

た。このことから、AP は CP に比べてより強固に細胞膜に結合し、細胞膜に埋もれた膜蛋白質であるのに対して、CP は AP に比べてより表在性の膜蛋白質のように思われる。

CP は発酵性 mycoplasma¹⁹⁾ ならびに ureaplasma (未発表 data) ではみられず、非発酵性 mycoplasma のみにみられ、その至適 pH は arginine dihydrolase 経路の初発酵素である arginine deiminase のそれと一致していた。非発酵性 mycoplasma は L-arginine から arginine dihy-

Table 4 Effect of various chemicals on APM and CPM

Chemicals added	Concentration (mM)	Remaining activity (%)		
		AAP		CPM
		APM	LAP	
Phenylmethyl sulfonyl fluoride	1.0	82	75	89
2-Mercaptoethanol	1.0	89	NT ^a	103
Iodoacetic acid	1.0	106	NT ^a	98
Bestatin	0.7	14	20	85
o-Phenanthroline	1.0	10	11	1
EDTA-2Na	1.0	34	37	3
L-Cysteine	1.0	7	4	96
6-Amino-n-caproic acid	1.0	NT ^a	NT ^a	85
MgCl ₂	1.0	188	198	99
MnCl ₂	1.0	868	943	93
CaCl ₂	1.0	95	NT ^a	107
ZnCl ₂	1.0	NT ^a	NT ^a	101
NiCl ₂	1.0	NT ^a	NT ^a	68
None	/	100	100	100

^a Not tested.

Fig. 9 Effect of pH on AP and CP activities. The buffer used was 40 mM Britton-Robinson buffer. Maximum activity was taken as 100%. Symbols: ▲, LAP activity; and ●, CP activity.

drolase 経路により energy を得ている¹⁵⁾ことから, CP は L-arginine を mycoplasma に供給するために, あるいは細胞内に取り込むために存在しているのかもしれない。

Arginine aminopeptidase (EC 3. 4. 11. 6)²⁶⁾ は特異的に L-arginine および L-lysine に, そし

て leucine aminopeptidase (EC 3. 4. 11. 1)²⁵⁾ はそれら以外の amino acid を認識することが知られている。APM は L-arginine および L-leucine をともに同程度に強く認識した (Table 2)。このように, arginine および leucine に同程度に強く作用する AP は今までに報告されていないので, APM は新しい型の AP であると思われる。この推測の妥当性は以下にのべる 事実によっても支持されるものと思われる。すなわち, leucine aminopeptidase および arginine aminopeptidase の分子量はそれぞれ300K²⁵⁾ および95K²⁶⁾ で, これらをあわせると395K となり, APM の397K と非常に近い値になる。したがって, APM は leucine aminopeptidase ならびに arginine aminopeptidase を合わせた酵素のように思われる。更に, leucine aminopeptidase は MnCl₂ および MgCl₂ で活性化され²⁷⁾, arginine aminopeptidase は活性化されない²⁸⁾ ことが明らかにされているが, APM の AAP 活性はこれらにより顕著に活性化された (Table 4) ことも, APM が新しい型の AP であることを支持しているように思われる。

CPM はC末端が L-arginine の peptide に強く作用し, L-lysine, L-alanine, L-phenylalanine

および L-leucine の peptide にはほとんど作用しなかった。L-arginine に特異性をもつ CP として, carboxypeptidase N (EC 3. 4. 12. 7)²⁹⁾ および carboxypeptidase B (EC 3. 4. 12. 3)³⁰⁾ があり, とともに C 末端の L-arginine だけでなく L-lysine にも作用することがわかっている。したがって, CPM は carboxypeptidase N および carboxypeptidase B とは異なる新しい型の CP であると思われる。

Carboxypeptidase N および carboxypeptidase B は bradykinin および C3a, C5a などの anaphylatoxin から C 末端の L-arginine を解離して, それらを不活化するが^{29,31)}, C5a の白血球に対する活性 (走化性活性, lysosomal enzyme の放出など) を修飾することはない。したがって, 同じような特異性をもつ CPM もこれらの peptide の活性に対して 同様に作用するものと思われる。また, APM も L-arginine に特異的であることから, kallidin (L-lysyl-bradykinin) を brady-

kinin に変換するだけでなく¹²⁾, N 末端が L-arginine である bradykinin を不活化することがあるかもしれない。さらに carboxypeptidase B および leucine aminopeptidase は tuftsin (Thr-Lys-Pro-Arg) のもつ好中球の食作用亢進活性を消失させることが報告されている³²⁾ ので, CPM および APM にも同様の活性があるものと思われる。

Mycoplasma は大きさが非常に小さく, 形態を保持するための細胞壁を持たないために, 多形性で, しかも非常に柔軟性に富んでいるので, 損傷のある組織などに容易に侵入できるものと考えられる。

このような理由から, *M. salivarium* は局所的炎症反応において何らかの役割を果たしているものと推測される。

謝辞: 稿を終るにあたり, 御懇篤な御校閲を賜った土田信夫教授 (東京医科歯科大学歯学部口腔細菌学講座) に深甚の謝意を表します。

抄録: *Mycoplasma salivarium* の aminopeptidase (AP) および carboxypeptidase (CP) はともに細胞膜画分に局在していた。CP は Triton X-100 で, そして AP はその不溶性画分の papain 処理でそれぞれ可溶化され, 常法により精製された。精製された AP (APM) は分子量が 397-kilodalton (397K) で, disc-polyacrylamide gel electrophoresis (disc-PAGE) でともに活性のある太い band (APM の 90% に相当) と細い band (APM の 5% に相当) をそれぞれ 1 本ずつ形成し, SDS-PAGE では 50K と 46K の subunit (1 : 1, みかけの molar ratio) からなることが示唆された。精製された CP (CPM) は Triton X-100 (0.5%, w/v) 存在下での disc-PAGE で単一の band を, そして SDS-PAGE では 1 本の太い band (分子量, 87K; CPM の 84% に相当) と数本の細い band を形成した。APM は N 末端の L-arginine および L-leucine に同程度に強く, そして L-lysine にも弱く作用したが, CPM は C 末端の L-arginine のみに強く作用した。APM および CPM はともに金属酵素であった。

文 献

- 1) Engel, L. D. and Kenny, G. E. *Mycoplasma salivarium* in human gingival sulci. J. Periodont. Res. 5 : 163-171, 1970.
- 2) Watanabe, T., Matsuura, M. and Seto, K. : Enumeration, isolation and species identification of mycoplasmas in saliva sampled from the normal and pathological human oral cavity and antibody response to an oral mycoplasma (*Mycoplasma salivarium*). J. Clin. Microbiol. 23 : 1034-1038, 1986.
- 3) Kumagai, K., Iwabuchi, T., Hinuma, Y., Yuri, K. and Ishida, N. : Incidence, species, and significance of *Mycoplasma* species in the mouth. J. Infect. Dis. 123 : 16-21, 1971.
- 4) Ichimaru, H. and Nakamura, M. : The components of *Mycoplasma salivarium* and its growth medium that are responsible for film formation. J. Gen. Microbiol. 112 : 389-392, 1979.
- 5) Shibata, K., Totsuka, M. and Watanabe, T. : Phosphatase activity as a criterion for differentiation of oral mycoplasmas. J. Clin. Microbiol. 23 : 970-972, 1986.
- 6) Watanabe, T. : Proteolytic activity of *Mycoplasma salivarium* and *Mycoplasma orale* 1. Med. Microbiol. Immunol. 161 : 127-132, 1975.

- 7) Sobeslavsky, O. and Chanock, R. M.: Peroxide formation by mycoplasmas which infect man. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **129**: 531-535, 1966.
- 8) Nakamura, M. and Slots, J.: Aminopeptidase activity of *Capnocytophaga*. *J. Periodont. Res.* **17**: 597-603, 1982.
- 9) Vinther, O. and Black, F. T.: Aminopeptidase activity of *Ureaplasma urealyticum*. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand. [B]* **82**: 917-918, 1974.
- 10) 柴田健一郎, 戸塚昌攻, 渡邊継男: ヒト系 mycoplasma の aminopeptidase 活性. 菌基礎誌 **25**: 956-960, 1983.
- 11) Watanabe, T., Shibata, K. and Totsuka, M.: Aminopeptidase and caseinolytic activities of *Mycoplasma salivarium*. *Med. Microbiol. Immunol.* **172**: 257-264, 1984.
- 12) Hopsu, V. K., Mäkinen, K. K. and Glenner, G. G.: Formation of bradykinin from Kallidin-10 by aminopeptidase B. *Nature* **212**: 1271-1272, 1966.
- 13) Shibata, K. and Watanabe, T.: Carboxypeptidase activity in human mycoplasmas. *J. Bacteriol.* **168**: 1045-1047, 1986.
- 14) Rottem, S., Stein, O. and Razin, S.: Reassembly of mycoplasma membranes disaggregated by detergents. *Arch. Biochem. Biophys.* **125**: 46-56, 1968.
- 15) Schimke, R. T., Berlin, C. M., Sweeney, E. W. and Carroll, W. R.: The generation of energy by the arginine dihydrolase pathway in *Mycoplasma hominis* 07. *J. Biol. Chem.* **241**: 2228-2236, 1966.
- 16) 柴田健一郎, 戸塚昌攻, 渡邊継男: *Mycoplasma salivarium* 細胞膜からの aminopeptidase の可溶化について. 菌基礎誌 **27**: 208-214, 1985.
- 17) Pollack, J. D., Razin, S., Pollack, M. E. and Cleverdon, R. C.: Fractionation of *Mycoplasma* cells for enzyme localization. *Life Sci.* **4**: 973-977, 1965.
- 18) Tsunasawa, S., Narita, K. and Ogata, K.: Purification and properties of acylamino acid-releasing enzyme from rat liver. *J. Biochem.* **77**: 89-102, 1975.
- 19) Basha, S. M. M., Horst, M. N., Bazer, F. W. and Roberts, R. M.: Peptidase from pig reproductive tracts: Purification and properties of aminopeptidases from uterine secretions, allantoic fluid, and amniotic fluid. *Arch. Biochem. Biophys.* **185**: 174-184, 1978.
- 20) Andrews, P.: The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range. *Biochem. J.* **96**: 595-606, 1965.
- 21) Ornstein, L.: Disc-electrophoresis-I: Background and theory, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**: 321-349, 1964.
- 22) Davis, B. J.: Disc electrophoresis II: Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**: 404-427, 1964.
- 23) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685, 1970.
- 24) 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.
- 25) Himmelhoch, S. R.: *Methods in Enzymology*. vol. 19, pp. 508-513, 1970. Academic Press, New York.
- 26) Hopsu, V. K., Mäkinen, K. K. and Glenner, G. G.: Purification of a mammalian peptidase selective for N-terminal arginine and lysine residues: Aminopeptidase B. *Arch. Biochem. Biophys.* **114**: 557-566, 1966.
- 27) Carpenter, F. H. and Vahl, J. M.: Leucine aminopeptidase (bovine lens). *J. Biol. Chem.* **248**: 294-304, 1973.
- 28) Hopsu, V. K., Mäkinen, K. K. and Glenner, G. G.: Characterization of aminopeptidase B: Substrate specificity and affector studies. *Arch. Biochem. Biophys.* **114**: 567-575, 1966.
- 29) Oshima, G., Kato, J. and Erdös, E. G.: Plasma carboxypeptidase N, subunits and characteristic. *Arch. Biochem. Biophys.* **170**: 132-138, 1975.
- 30) Folk, J. E.: *Methods in Enzymology*. vol. 19, pp. 504-508, Academic Press, New York, 1970.
- 31) Bokisch, V. A. and Müller-Eberhard, H. J.: Anaphylatoxin inactivator of human plasma: Its isolation and characterization as a carboxypeptidase. *J. Clin. Invest.* **49**: 2427-2437, 1970.
- 32) Nishioka, K., Constantopoulos, A., Satoh, P. S., Mitchell, W. M. and Najjar, V. A.: Characteristics and isolation of the phagocytosis-stimulating peptide, tuftsin. *Biochim. Biophys. Acta* **310**: 217-229, 1973.