ヒト腸内細菌の産生する蓚酸分解酵素の部分精製

帝京大学医学部附属市原病院泌尿器科

伊 藤 晴 夫

PARTIAL PURIFICATION OF OXALATE DEGRADING ENZYME PRODUCED
BY HUMAN INTESTINAL BACTERIA

Haruo Ito

Department of Urology, Teikyo University School of Medicine, Ichihara Hospital

It is unclear whether the oxalate in foods degrades or not in the intestinal tract. We isolated oxalic acid decarboxylase from anaerobic bacteria present in human feces which was grown in the culture medium containing oxalic acid as the sole carbon source. The enzyme was partially purified by 80% ammonium chloride precipitation, DEAE-cellulose chromatography and molecular sieve chromatography. The amino acid composition was found to be relatively rich in glycine and alanine, but to have low basic, hydrophobic and aromatic amino acid residues compared with average proteins.

Key words: urolithiasis, intestinal bacteria, oxalate decarboxylase

要旨: 食物に含まれる蓚酸が腸管内で分解されるかどうかは不明である。そこで、ヒト糞便より蓚酸分解菌を分離し、この菌体より蓚酸分解酵素を分離・精製することを試みた。成年男子糞便を炭素源が蓚酸である液体培地で嫌気性条件下に長期継代することにより蓚酸分解菌を選択することができた。この菌の産生する oxalate decarboxylase を硫酸分画, DEAE セルロースクロマトグラフィー, 分子篩クロマトグラフィーなどで分離・精製した。この酵素のアミノ酸組成の特徴はグリシンとアラニンを比較的多く含み、塩基性アミノ酸、疎水性アミノ酸および芳香族アミノ酸が少ないことであった。

キーワード: 尿路結石, 腸内細菌, 蓚酸脱炭酸酵素

結 言

腸性高蓚酸尿症では腸管よりの蓚酸の吸収が亢進しているが、その原因の一部は腸内の蓚酸分解菌の増殖が抑制されているためとされる¹⁾²⁾。また、特発性の腎結石患者でも、蓚酸の腸管よりの吸収がその程度は軽い、亢進していると言われる³⁾⁴⁾。尿中蓚酸の軽度の上昇は尿中蓚酸カルシウムの過飽和状態に対して著明な影響を与えるので⁵⁾⁶⁾、腸管よりの蓚酸の吸収が軽度でも上昇することは重要な意味をもつ可能性がある。最近、ヒト腸内に蓚酸を分解する菌が存在することが報告された⁷⁾。このことが、腸内における蓚酸の分解・吸収ひいては蓚酸の尿中排泄量にどの程度の影響を与えているかは不明である。そこで、まず、ヒト糞便より得られた蓚酸分解菌より蓚酸分解酵素を抽出分離することを試みた。

材料と方法

蓚酸分解菌の分離

Barber 液体培地⁸⁾に成人男子糞便を約 5~10%加え、37℃, 嫌気下に培養した。この培地の炭素源は蓚酸であり、長期継代することにより蓚酸分解菌を選択した。継代は培養物を新培地に 5~10%添加して行った。

蓚酸の検出

培養上清中の蓚酸は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で測定した。使用条件は下記のごとくであった。

カラム: Shodex Ionpak KC811 (30cm)

カラム温度: 40℃

移動相: 0.1% phosphoric acid

流速: 1.0ml/min

検出: 220nm の紫外外部吸収

クロマトグラフィー

DEAE セルロースクロマトグラフィーは 2×15cm のカラムを使用した。0.05M リン酸緩衝液, pH 7.0中

の NaCl を 0~0.3M まで linear gradient にして溶出した。1 フラクションは 2ml である。CM セルロースクロマトグラフィーも DEAE セルロースクロマトグラフィーと同じ条件で行った。

分子篩クロマトグラフィーは Sephacryl S-200 を使用した。カラムは 2×110cm で、溶出液は 0.05M リン酸緩衝液、pH 7.0 である。蛋白の溶出は 230nm の吸収によりモニターした。

分光測光法

紫外外部吸収曲線は得られた分画を 0.05M リン酸緩衝液、pH 7.0 に溶解し Beckman DU-40 Spectrophotometer で 220nm~320nm まで測定した。

円二色性は JASCO-60 Circular dichroic spectrometer により測定した。得られた分画を 0.05M リン酸緩衝液、pH 7.0 に溶解した。1mm light path thickness の cylindrical cuvette を far UV region (200~250nm) に、10mm light path thickness cylindrical cuvette を near UV region (250~300nm) 測定に使用した。

蛋白定量

蛋白定量は Lowry 法⁹⁾変法で行い、phenolic reagent を使用した。10 μ g から 50 μ g の牛血清アルブミンを標準として用いた。

酵素活性の測定

蓚酸脱炭酸酵素活性は下記の反応により NAD が還元されて生ずる NADH の 340nm における吸収を測定することにより行った。

アッセイ系は次の内容を含む。

MOPS (3-[N-morpholino]propanesulfonic acid),	
0.1mM, pH 7.0	2.5ml
NAD 10 μ M	0.1ml
sodium oxalate 10 μ M	0.1ml
formate dehydrogenase (Boehringer Mannheim)	
8units	0.05ml
sample solution	0.05ml

0 分および 37℃, 30 分インキュベート後の吸光度を Perkin・Elmer Lambda 7 分光光度計で測定した。

アミノ酸分析

試料を 6N HCl 中で常法通り 24, 48 および 72 時間加水分解した。加水分解後、真空中で HCl を除去し、クエン酸緩衝液 (pH 2) に溶解し Beckman amino acid analyzer (Model 119 C) で分析した。

結 果

蓚酸分解活性は嫌気条件下における培養時のみ維持可能であった。培養により選択された菌は数種類のグラム陰性菌の混合したものであり (図 1), まだ単一菌を得るにはいたっていない。代表的な菌 (桿菌) の電顕写真を図 2 に示した。継代培養ブロスから集菌、洗浄した菌混合物は、同ブロス成分存在下で培養したときのみ活性出現した。細菌培養液を 10,000g, 20 分遠沈して得られた沈渣を 0.05M リン酸緩衝液、pH 7.0 に溶解した。50 ワットで 3 回、1 分間ずつ sonication した後、冷却遠心器で 12,000rpm, 25 分遠沈して、上清を得た。これに 80% 飽和になるように硫酸を加え、4℃で

図 1 培養により選択された菌のグラム染色。グラム陰性菌である。

図 2 代表的な菌 (桿菌) の電顕写真

一夜、攪拌した。12,000rpm, 25分遠沈し、沈渣を5mlの0.05M リン酸緩衝液, pH 7.0に溶解した。この溶液を2lの同じ緩衝液に対して透析して、硫酸を除去し、 -80°C に保存した。

図3にDEAEクロマトグラフィーの結果を示した。酵素活性は低いNaCl濃度で溶出された。この酵素が

図3 DEAEセルロースクロマトグラフィー

図4 CMセルロースクロマトグラフィー

positiveに荷電されている可能性が考えられたのでCMセルロースクロマトグラフィーを行った。ここでも酵素活性は低いNaCl濃度で溶出された(図4)。pH 7.0では蛋白の等電点に近いので陰イオンまたは陽イオン交換樹脂では十分に補足されないのではないかと考えられた。

DEAEセルロースクロマトグラフィーで最初に溶出された酵素的に活性のある分画を、分子篩クロマトグラフィーにかけた結果を図5に示した。

図5 分子篩クロマトグラフィー

図6 紫外外部吸収スペクトラム

図7 円二色性

表1 アミノ酸分析結果

	mole %
Glycine	43.47
Alanine	13.15
Glutamic acid	10.02
Aspartic acid	7.12
Serine	5.41
Proline	3.70
Arginine	3.21
Valine	2.82
Lysine	2.69
Leucine	2.39
Threonine	2.25
Isoleucine	1.34
Phenylalanine	1.12
Histidine	0.90
Tyrosine	0.41

DEAE セルロースクロマトグラフィーおよび分子篩クロマトグラフィーにより得られた分画の紫外外部吸収スペクトラムを図6に示した。280nmにおける紫外外部吸収が比較的弱いのは芳香族アミノ酸含量が少ないことをあらわしていると思われる。

円二色性の測定では far UV region に197nmの強い陰性のバンドが示された(図7)。

アミノ酸分析の結果は表1に示したごとくであり、グリシンとアラニンを比較的多く含み、塩基性、疎水性、および芳香族アミノ酸は少なかった。

考 察

シスチン結石¹⁰⁾や尿酸結石あるいはリン酸・アンモニウム・マグネシウム結石の形成がその尿中における濃度と尿のpHとでは説明がつくのと異なり、尿酸カルシウム結石の形成メカニズムはより複雑である。すなわち結石の素材となるカルシウムと尿酸が尿中で

過飽和の状態となると結晶核が形成され、これが成長しない凝集してゆき結石が形成される。しかし、尿中には結晶成長・凝集に対する抑制物質が含まれている¹¹⁾¹²⁾。これより、結石形成は尿中の溶質濃度と抑制物質とのかねあいが決まる。今回はこれらのうちの尿酸の代謝に関係するかもしれない腸内細菌の産生する尿酸分解酵素について研究した。

尿酸を分解する菌は反芻動物、草食動物、齧歯類のみならずヒトの腸管からも発見された¹³⁾。草食動物のように多量の尿酸を摂取する場合には腸管中にこれを分解する菌が常在することは尿酸の毒性を除く重要な意味をもつであろう。ヒトにおいても腸性高尿酸血症の発生に腸内細菌が関与する可能性が明らかにされた¹²⁾。すなわち、胆汁酸のデオキシコール酸が尿酸分解菌の増殖を抑制するので食餌中尿酸が大腸で分解されることが少なく、そのために大量の尿酸が吸収されてしまう。なお、本症のさいには脂肪の吸収不良があるため長鎖脂肪酸がカルシウムと結合し、カルシウムと結合しない吸収可能な遊離の尿酸が増加している。このような特殊な疾患を認めない原因不明の腎結石患者においても腸内の尿酸分解菌の異常が結石形成の一因である可能性も否定はできないであろう。

さて、ヒト糞便が尿酸を分解することは1940年 Barber らにより報告された⁹⁾。彼らはこの現象は芽胞を形成しない微生物により引き起こされると推測した。Hayaishi らは土壌中の細菌より他の尿酸脱炭酸酵素を分離した¹⁵⁾。この酵素の至適pHは6.9であり、補酵素としてATP、CoA、acetate、Mgイオン、thiamine pyrophosphateを必要とした。この1年後に、Shimazono と Hayaishi は Collybia velutipes より尿酸脱炭酸酵素を分離した¹⁴⁾。この酵素の至適pHは2.5~4.0の間であり、そのKmは $2.05 \times 10^{-3} \text{M}$ であっ

た。Quaylら¹⁶⁾は *Pseudomonas oxalaticus* より蓚酸脱炭酸酵素を分離した。この酵素は活性発現のためには上記と同じ補酵素を必要とした。Allisonらはヒトの消化管内より得られた *Oxalobacter formigenes* より蓚酸脱炭酸酵素を分離した⁷⁾。この酵素は上記と同じ補酵素を必要とした。また、pH 7.0における Km 値は5.7mM であった。

本実験において、われわれはヒト糞便より分離された菌体より蓚酸脱炭酸酵素を分離した。本酵素の至適 pH は7.0であったが、thiamine pyrophosphate を必要としなかった。この酵素は thiamine pyrophosphate や CoA と密に結合しているため、これらを要求しないものと推測される。しかし、本酵素は formate dehydrogenase とカップリングするとき NAD を必要とした。以前に報告された酵素のアミノ酸組成、分子量、紫外吸収などのデータは発表されていないので、これらと本酵素との分子性状を比較することはできなかった。

腸内の蓚酸分解菌から蓚酸分解酵素を分離精製できれば、本酵素と腎結石形成との関係について、さらには結石の再発予防、結石溶解などへの応用の可能性についても検討できるであろう。

文 献

- Argenzio, R.A., Allison, J.A. and Allison, M.J.: Intestinal oxalate-degrading bacteria reduce oxalate absorption and toxicity in guinea pigs. *J. Nutr.*, 118, 787—792, 1988.
- 伊藤晴夫：腎結石形成に腸内細菌は関与するか。医学のあゆみ, 152, 602, 1990.
- Robertson, W.G., Peacock, M., Ouimet, D., Heyburn, P.J. and Rutherford, A.: The Main Risk Factor for Calcium Oxalate Stone Disease in Man: Hypercalciuria or Mild Hyperoxaluria? *Urolithiasis*, Smith, L., ed., p. 3—12, Plenum Press, New York, 1981.
- 伊藤晴夫, 真田寿彦, 村上光右, 宮内大成, 島崎淳：蓚酸代謝異常と尿路結石。第4編。蓚酸カルシウム結石患者尿中への蓚酸排泄量について。日泌尿会誌, 69, 643—646, 1978.
- Finlayson, B.: Renal lithiasis in review. *Urol. Clin. N. Am.*, 1, 181—212, 1974.
- Robertson, W.G. and Peacock, M.: The cause of idiopathic calcium stone disease. Hypercalciuria or hyperoxaluria? *Nephron.*, 26, 105—110, 1980.
- Allison, M.J., Cook, H.M., Milne, D.B., Gallagher, S. and Clayman, R.V.: Oxalate degradation by gastrointestinal bacteria from humans. *J. Nutr.*, 116, 455—460, 1986.
- Barber, H.H. and Gallimore, E.J.: The metabolism of oxalic acid in the animal body. *Biochem. J.*, 34, 144—148, 1940.
- 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—275, 1951.
- Ito, H., Murakami, M., Miyauchi, T., Yamaguchi, K., Usui, T. and Shimazaki, J.: The incidence of cystinuria in Japan. *J. Urol.*, 129, 1012—1014, 1983.
- Ito, H. and Coe, F.L.: Acidic peptide and polyribonucleotide crystal growth inhibitors in human urine. *Am. J. Physiol.*, 233, F455—F463, 1977.
- 伊藤晴夫, 島崎 淳：蓚酸カルシウム結晶の成長を抑制する高分子物質についての研究。第3編。蓚酸カルシウム結晶成長を抑制する高分子物質について。日泌尿会誌, 69, 1349—1354, 1978.
- Donne, L.T., Liebman, M. and Caldwell, D.R.: Microbial oxalate degradation: Effects on oxalate and calcium balance in humans. *Nutr. Res.*, 9, 957—964, 1989.
- Shimazono, H., Hayaishi, O.: Enzymatic decarboxylation of oxalic acid. *J. Biol. Chem.*, 227, 151—159, 1957.
- Jacoby, W.B., Ohmura, E. and Hayaishi, O.: Enzymatic decarboxylation of oxalic acid. *J. Biol. Chem.*, 222, 435—446, 1956.
- Quayle, J.R., Keech, D.B. and Taylor, G.A.: Carbon assimilation by *Pseudomonas oxalaticus*. 4. Metabolism of oxalate in cell-free extracts of the organism growth on oxalate. *Biochem. J.*, 78, 225—236, 1961.

(1992年6月1日受理, 特別掲載)