

Clostridium tertium の産生する A 型 分解酵素に関する研究

川崎医科大学 微生物学教室

美 祢 弘 子

川崎医科大学 法医学教室

富 田 正 文

(昭和61年5月20日受付)

Studies on A-decomposing Enzyme Produced by *Clostridium tertium*

Hiroko Mine

Department of Microbiology, Kawasaki Medical School

Masafumi Tomita

Department of Legal Medicine, Kawasaki Medical School

(Accepted on May 20, 1986)

Clostridium tertium はヒトの A 型血液型活性を分解する酵素を産生する。我々は A 型分解酵素の産生に及ぼす培地組成の効果を調べた。この結果最大の酵素活性は以下の組成の培地において得られた。7% enzymatic hydrolyzate of casein 0.5% yeast extract, 0.1% glucosamine, 0.5% KH_2PO_4 , および 0.1% NaCl である。

Clostridium tertium を上記の培地で 37°C, 4 日間嫌氣的に培養し, その培養上清を DEAE Sephadex を通すことにより部分的に精製した。この部分精製酵素でヒトの A 型赤血球を処理すると A 型活性が失われ H 型活性が増加した。粗精製酵素の至適 pH は pH 7~8, 至適温度は 20°C であった。この酵素を応用する点からみて興味深いことは酵素が 5°C や 0°C のような低温においても作用することである。

Clostridium tertium produces an enzyme which decomposes the A-activity of human red blood cells. The effects of medium components on the production of the A-decomposing enzyme were studied in this paper. The highest activity was obtained with a medium consisting of 7% enzymatic hydrolyzate of casein, 0.5% yeast extract, 0.1% glucosamine, 0.5% KH_2PO_4 and 0.1% NaCl.

Clostridium tertium was grown anaerobically for 4 days at 37°C in the medium described above and the culture supernatant including the A-decomposing enzyme was partially purified by passage through DEAE-sephadex.

Human A-type red blood cells treated with the crude enzyme lost their A-activity with rising H-activity.

The optimum pH of this partially purified enzyme was 7~8 and the highest activity was obtained at 20°C. It is of interest from the point of practical application that this enzyme produces enough activity at such low temperatures as 5°C and 0°C.

Key Words ① *Clostridium tertium* ② A-decomposing enzyme

はじめに

ヒトのABO式血液型物質は種々の生物の産生する glycosidase の作用により分解されて他の血液型に変換することが知られている。このような glycosidase のなかでB型物質を分解してO型に変換する α -galactosidase^{1)~3)} とO型物質を分解してその活性を失わせる α -fucosidase^{4), 5)} についてはすでに数種類の生物材料由来のものが精製されている。ところがA型物質を分解するA型分解酵素についてはその存在が多くの生物において報告されてはいるが,^{6)~8)} 精製が完成しておらず^{9), 10)} その化学的性質についても研究者間で意見がくいちがっており,^{11), 12)} 由来が異なればA型分解酵素の性質も異なる可能性がある。

我々はA型分解酵素を産生することが知られている生物材料のなかから実験室での取りあつかいの最も簡単な *Clostridium tertium* を選り取りA型分解酵素の精製を目的とし、まず酵素産生条件の検討をおこない、部分精製した標品を用いて化学的性質を調べた。

材料と方法

1. 細菌の培養

Clostridium tertium A (群馬大学法医学教室より分与を受けた) を Todd-Hewitt 寒天平板培地 (Difco) で 37°C, 2日間 gas pack system (BBL) を用いて嫌気培養し、得られた colony を種菌とした。酵素産生培地は Howeら¹³⁾ の semidefined medium を改変したものである。すなわち、0.1% NaCl と 0.5% K₂HPO₄ を含む basal solution に N源として enzymatic hydrolyzate of casein (Sigma) を、Vitamine 源として yeast extract (Difco)

を、そして C源として7種類の糖のうちから1種類を加えた。用いた糖は glucose, galactose, fucose, glucosamine, galactosamine, N-acetyl-glucosamine, および N-acetyl-galactosamine である。これらの3種類の添加物を各種の濃度で加えた。

enzymatic hydrolyzate of casein と yeast extract は basal solution に同時に加えて高圧蒸気滅菌した。糖類は高濃度のもを濾過除菌しておき、使用直前に添加した。

以上の方法で作製した種々の組成の酵素産生培地に種菌を接種し、gas pack system を用い 37°C で4日間嫌気培養した。培養上清のA型分解活性を測定、比較して最も適切な培地の組成を求めた。また、この最適な酵素産生培地を用いてA型分解酵素の産生を経目的に調べた。

2. A型分解酵素の部分精製

酵素産生培地での4日間の嫌気培養上清 4,000 ml を Carbowax 6000 を用いて濃縮し約 400 ml とした。濃縮液を蒸留水に対して2日間、0.01M Tris-HCl buffer (pH 7.4) に対して1日間透析した。濃縮、透析および以後の精製はすべて5°Cでおこなった。濃縮透析液 400 ml を活性化した DEAE Sephadex A-50 (Pharmacia) 20 g に吸着させ、0.01M Tris-HCl buffer に NaCl を 0M, 0.01M, 0.05M, 0.1M, 0.2M, 0.5M, 1M の割合で溶かした液を 1,000 ml ずつ順次流して吸着したタンパク質を分別溶出した。タンパク量は Folin 法¹⁴⁾ で測定した。各溶出画分のA型分解活性を測定し、活性を示した溶出画分を蒸留水に対して1日間透析した後に凍結乾燥してA型分解酵素の部分精製標品とした。

3. A型分解活性の測定

A型分解活性は吸収阻止法¹⁵⁾で測定した。A型基質としては Neutr AB (Dade) を、抗A血清は抗ヒトA型判定用血清 (Dade) を用いた。

酵素活性を測定しようとするサンプル液の50 μ l ずつの倍数希釈列を作製した。ここに力価256の Neutr AB液 (256倍に希釈しても力価4の抗A血清を等量吸収できる) を50 μ l ずつ添加し、5°Cで overnight 反応させた。反応終了後力価4の抗A血清 (4倍に希釈してもA型血球液を等量加えると凝集がおこる) を100 μ l 加え室温で2時間反応させた。最後に2%のヒトA型赤血球を200 μ l ずつ加え、室温で2時間反応させた。凝集がおこったサンプル液の最大の希釈倍数の逆数をA型分解活性とした。活性測定に用いたすべての試薬の希釈およびコントロール液には pH 7.4の $Ca^{++}Mg^{++}$ free phosphate buffer saline [PBS(-)と略す] を用いた。

4. A型分解酵素の至適 pH および 至適温度の検討

a. 至適 pH の検討

pH 2, 3, 4の buffer としては1/10M クエン酸ナトリウム-HCl-buffer を、pH 5, 6, 7, 8, 9の buffer としては1/15M KH_2PO_4 - Na_2HPO_4 buffer を、pH 10, 11, 12の buffer としては1/10M Na_2HPO_4 -NaOH buffer を用いた。A型分解酵素の部分精製標品を上記のいずれかの buffer に0.1 mg/ml に溶かしたものを酵素液とした。酵素液50 μ l に同一の buffer に溶かした力価256の Neutr AB液50 μ l を加え、20°Cで4時間反応させA型分解活性を測定し比較した。

b. 至適温度の検討

至適 pH の buffer に0.1 mg/ml に溶かしたA型分解酵素液50 μ l に、至適 pH の buffer に溶かした力価256の Neutr AB液50 μ l を加え、0°C, 5°C, 10°C, 20°C, 30°C, 40°C, 50°Cの各温度で4時間反応させてA型分解活

性を測定し比較した。

5. ヒト赤血球の酵素処理による型活性の変化

A, BおよびO型ヒト赤血球をPBS(-)に4%の割合に浮遊させた血球液5mlに0.1mg/mlの割合にPBS(-)に溶かしたA型分解酵素液5mlを加え、5°Cで overnight 反応させた。反応終了後、血球液をPBS(-)で3回遠心洗滌した後2%血球液として倍数希釈した抗血清あるいはレクチンを等量加えて凝集反応をおこなった。抗A血清と抗B血清はDade社の抗ヒト血液型血清を、抗Hレクチンとしては *Ulex europaeus* から我々が抽出したものをを用いた。

結 果

1. 培地組成の A型分解酵素産生に及ぼす影響

a. 糖類の影響

basal solution に enzymatic hydrolyzate of casein 7%, yeast extract 0.5%を加え、ここに糖類を0.1%の割合で加えた培地で *Clostridium tertium* を4日間嫌気培養し、培養上清のA型分解活性を測定した。fucose, galactose, galactosamine, N-acetyl-galactosamine, glucoseの5種類の糖を添加した培地ではA型分解活性は全く出現しなかった。これに対し N-acetyl-glucosamine を加えた培地でのA型分解活性は32, glucosamine を加えた培地でのA型分解活性は256であった。次に glucosamine について最適添加濃度を検討した (Fig. 1-A)。A型分解活性は0.1%の添加量で256と最も高く、これ以下の濃度でもこれ以上の濃度では活性は低下した。この結果から酵素産生培地は glucosamine を0.1%添加することとした。

b. Enzymatic hydrolyzate of casein の影響

basal solution に yeast extract 0.5%, glucosamine 0.1%を加え、ここに enzymatic hydrolyzate of casein を種々の濃度で添加し

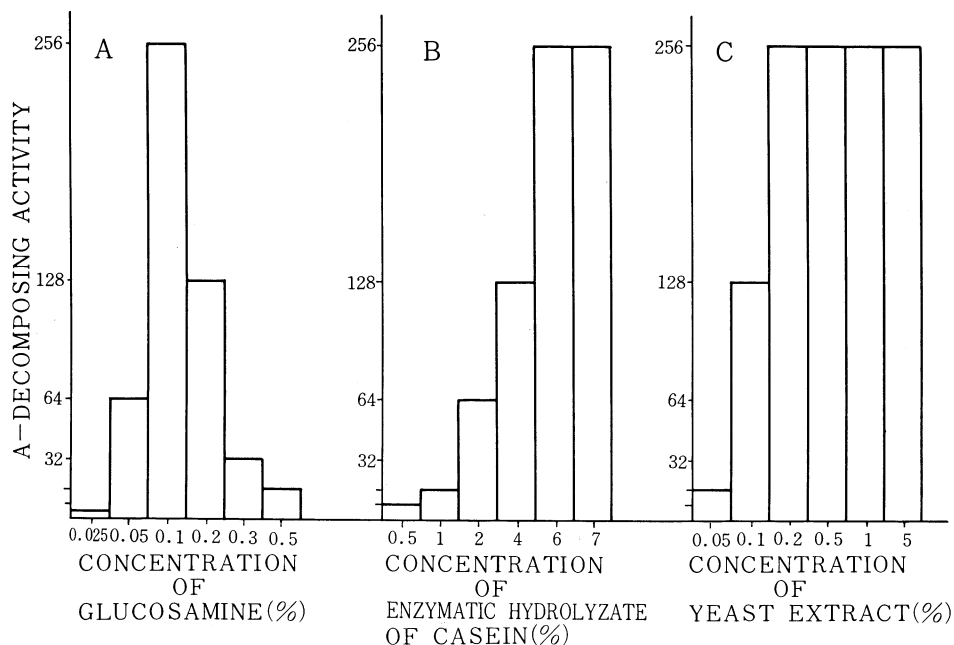


Fig. 1. Effects of the concentrations of medium components on A-decomposing activity of *Clostridium tertium*.

た培地でのA型分解活性を測定して比較した (Fig. 1-B). この結果 enzymatic hydrolyzate of casein の添加量に比例して培養上清のA型分解活性が増加することが示された. enzymatic hydrolyzate of casein は7%以上では水に溶けにくいので酵素産生培地としては7%のものを使用することに決定した.

c. Yeast extract の影響

basal solution に enzymatic hydrolyzate of casein 7%, glucosamine 0.1%を加え, ここに yeast extract を各種の濃度で添加した培地でのA型分解活性を測定し比較した (Fig. 1-C). yeast extract の添加量が0.05%ではA型分解活性は16, 0.1%では128であるが, 0.2%以上5%までA型分解活性は256であった. この結果から yeast extract を0.5%の割合に加えたものを酵素産生培地と決定した.

d. 菌の増殖とA型分解酵素の産生

以上の実験結果からA型分解酵素産生のための培地組成を enzymatic hydrolyzate of casein 7%, yeast extract 0.5%, glucosamine

0.1%, NaCl 0.1%, および K_2HPO_4 0.5%と決定した. この培地のpHは7.4である. この培地における菌の増殖とA型分解活性の経日変化を調べた (Fig. 2).

O. D. 620 m μ の吸収量で測定した菌量は培養0.5日から急激に増加し, 2日目まで最大となった. 2.5日目から菌量は徐々に減少した. A型分解活性は培養1日目から急激に増加し, 2.5日目まで最大となった. 以後菌量の減少にかかわらず高い活性を示し続けた. これらの結果に基づき, 培養4日目の菌液を酵素精製の出発材料とした.

2. A型分解酵素の部分精製

培養上清の濃縮透析液を DEAE Sephadex A-50 に吸着させた後段階的な濃度の NaCl を含む0.01M Tris-HCl buffer で溶出し, 各画分のA型分解活性を調べた (Table 1). 濃縮透析液中に含まれていたすべてのタンパク質は DEAE Sephadex A-50 に吸着した. 吸着したタンパク質の73%は各種の濃度の NaCl を含む buffer により溶出された. 7種類の溶出画

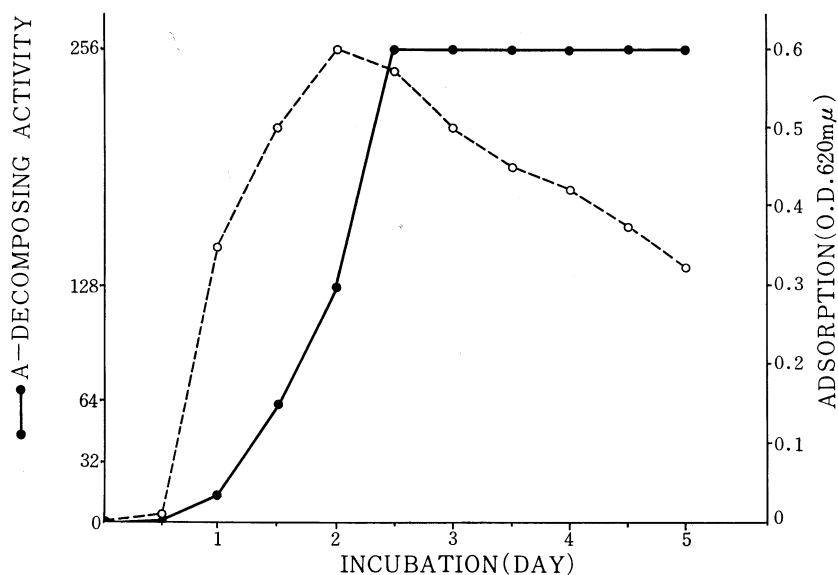


Fig. 2. Production of A-decomposing enzyme during the growth of *Clostridium tertium*.

Table 1. Fractionation of *Clostridium tertium* proteins passing through DEAE Sephadex.

	Total Protein (mg)	A-decomposing Activity /mg protein	Total A-decomposing Activity
Concentrated and Dialyzed Culture Supernatant	1580	512	808,960
Filtrate	0	0	0
0M NaCl Extracted Fraction	40	0	0
0.01M NaCl Extracted Fraction	140	0	0
0.05M NaCl Extracted Fraction	120	0	0
0.1M NaCl Extracted Fraction	200	16	3,200
0.2M NaCl Extracted Fraction	300	2,048	614,400
0.5M NaCl Extracted Fraction	280	8	2,240
1M NaCl Extracted Fraction	80	0	0

分についてタンパク量とA型分解活性を調べたところ濃縮透析液に存在したA型分解活性の76%が0.2M NaCl含有bufferで溶出される画分に局在していた。0.2M NaCl溶出画分のタンパク質1mgあたりのA型分解活性は濃縮透析液のその4倍となった。

0.2M NaCl溶出画分を透析後凍結乾燥したものをA型分解酵素の粗精製画分として以後の実験に用いた。

3. A型分解酵素の至適pHと至適温度

A型分解酵素の粗精製標品を用いて酵素活性の至適pHと至適温度を調べた。

pH 5以下およびpH 10以上では酵素活性は全く示されなかった (Fig. 3-A)。pH 6のA型分解活性は128, pH 9における活性は256であり, pH 7とpH 8におけるA型分解活性が512と最大であった。この結果至適pHは7から8の間にあると考えられるので各種の実験にはpH 7.4のPBS(-)を用いることとした。

次にpH 7.4における酵素活性の至適温度を調べた (Fig. 3-B)。50°C以上では全く活性がみられず40°CではA型分解活性は32, 30°Cで256, 20°Cで512, 10°Cで256であった。

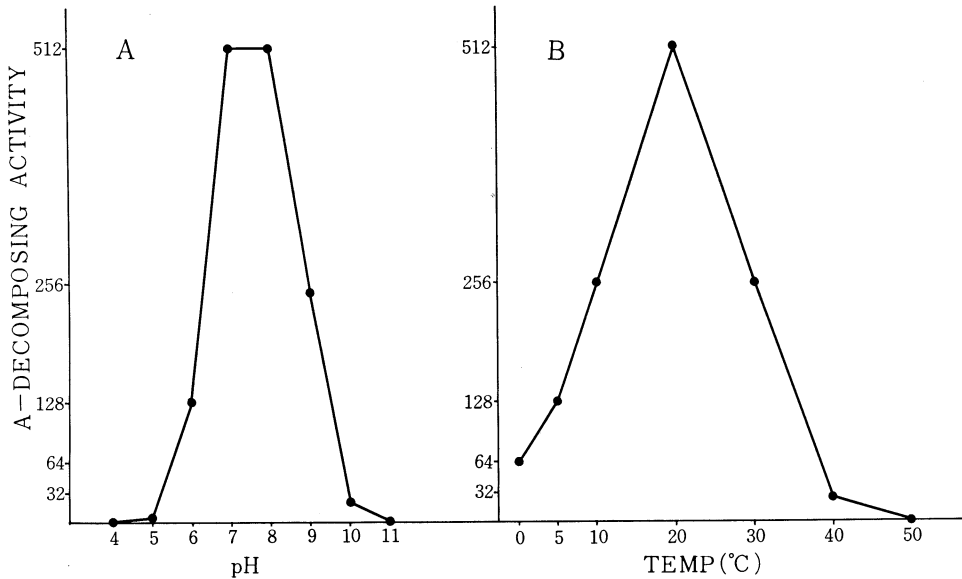


Fig. 3. Optimum pH (A) and optimum temperature (B) of the crude A-decomposing enzyme of *Clostridium tertium*.

Table 2. Changes in haemagglutinability of human red blood cells.

types of red blood cells	kinds of antisera or lectin	BEFORE TREATMENT**										AFTER TREATMENT**									
		Dilutions of antisera or lectin										Dilutions of antisera or lectin									
		2	4	8	16	32	64	128	256	512	C*	2	4	8	16	32	64	128	256	512	C*
A	Anti A	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Anti B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Anti H	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
B	Anti A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Anti B	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	Anti H	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
O	Anti A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Anti B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Anti H	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-

+; haemagglutination + -; haemagglutination - C*; control=PBS (-)
TREATMENT**; treated with 0.05 mg/ml crude A-decomposing enzyme at 5°C, overnight.

すなわち至適温度は20°Cであった。興味深い点は5°Cにおける活性が128, 0°Cでも64の活性を示したことである。このような酵素の特徴を利用し、種々の実験を5°Cでおこなった。この温度だと実験中における微生物の増殖を防ぐことができるし、また赤血球などの細胞材料の変性を防ぐことができる。

4. A型分解酵素による赤血球の型活性の变化

A型分解酵素の粗精製標品でヒトA型, B型およびO型赤血球を処理した。この結果Table 2に示すようにA型血球は酵素処理によってA型活性はほぼ完全に消失し, H型活性が増大した。B型活性の出現はみられなかった。酵素処理後わずかに残存するA型活性が

A型血球の表面に存在するA型物質の性質に基づくか否かについては今後検討する予定である。

B型およびO型赤血球はこの酵素で処理しても全く型活性の変化をおこさなかった。

考 察

ヒトのA型血液型活性を分解する酵素は現在のところ完全なものが得られていない。A型分解酵素を産生することの知られている数種類の生物のなかで *Clostridium tertium* はヒトに対する病原性が無く嫌気要求度も低くしかも簡単な培地で増殖するためA型分解酵素の生産材料として非常にすぐれている。

今回我々はA型分解酵素を非常に高い活性でしかも安定に産生する培地組成を決定することができた。この培地で *Clostridium tertium* を

培養しその培養上清を DEAE Sephadex を用いて部分精製したA型分解酵素の性質を調べた。この酵素の性質のうち最も特徴的なものは酵素活性が5°Cあるいは0°Cのような低温でも十分高く発揮されることである。A型分解酵素はまだ精製不十分であり種々の他の酵素が混在していると考えられるが低温で用いることにより混在する他の酵素の影響を少なくすることができると思われる。実際に我々は赤血球を5°Cで一夜処理しているが赤血球の変性はほとんど見られない。この性質は酵素の至適pHが7~8であることとあわせて生物学的な応用範囲が非常に広いと考えられる。

今後も精製をすすめ *Clostridium tertium* の産生するA型分解酵素の本態を明らかにしてゆく予定である。

文 献

- 1) Iseki, S. and Ikeda, T.: On bacterial enzyme specifically decomposing group B substance. Proc. Japan Acad. 32: 201-205, 1956
- 2) 古川 研: 型特異性分解酵素, 特に新しいB型物質分解酵素について. 北関東医学 10: 175-193, 1960
- 3) Dybus, S. and Aminoff, D.: Action of α -galactosidase from *Clostridium sporogenes* and coffee beans on blood group B antigen of erythrocytes. Transfusion 23: 244-247, 1983
- 4) Naylor, I. and Bacr, H.: Studies of an enzyme produced by *Bacillus fulminans* that inactivates blood group O substance. J. Bacteriol. 77: 771-775, 1959
- 5) Yosizawa, Z.: Biochemical studies on carbohydrates. CXCIV. Digestion of the group O and AO mucopolysaccharides from pig stomach mucus by the O enzyme from *B. fulminans*. Tohoku J. exp. Med. 65: 177-185, 1957
- 6) Chase, M. W.: A Microorganism decomposing group-specific A substance. J. Bacteriol. 36: 383-390, 1938
- 7) Iseki, S. and Okada, S.: On a specific enzyme which decomposes group A substance. Proc. Japan Acad. 27: 455-458, 1951
- 8) Watkins, W. M.: The serological inactivation of the human blood-group substances by an enzyme preparation obtained from *Trichomonas foetus*. Biochem. J. 54: 33, 1953
- 9) Gyorgy, P., Rose, C. S. and Springer, G. F.: Enzymatic inactivation of Bifidus factor and blood group substances. J. Lab. clin. Med. 43: 543-552, 1954
- 10) Tuppy, H. and Staudenbauen, W. L.: The action on soluble blood group A substances of an α -N-acetyl galactosaminidase from *Helix pomatia*. Biochemistry 5: 1742-1747, 1966
- 11) Marcus, D. M., Kabat, E. A. and Schiffman, G.: Immunochemical studies on blood groups. XXXI Destruction of blood group A activity by an enzyme from *Clostridium tertium* which deacetylates N-acetylgalactosamine in intact blood group substances. Biochemistry 3: 437-443, 1964

- 12) 山本治子：Clostridium tertium AのA分解酵素のA型物質分解作用機序。北関東医学 17：322—344, 1967
- 13) Howe, C., MacLennan, J. D., Mandel, I. and Kabat, E. A.: Enzymes of Clostridium tertium: Effects on blood group and virus receptor substances. J. Bacteriol. 74: 365—376, 1957
- 14) 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
- 15) Kabat, E. A. and Mayer, M. M.: Experimental immunochemistry. 2nd ed. Charles C. Thomas, Springfield, Illinois. 1961, pp. 97—128