

Staphylococcus epidermidis 菌体外濾液を用いた タンパク質分解活性改良測定法の検討

美祢弘子*¹ 尾池 麗*² 日笠友美*²

緒 言

われわれは、これまで代表的な皮膚常在菌である *Staphylococcus epidermidis* の培養上清が示すタンパク質分解活性を sodium casein を基質として寒天培地に加えて定性的な方法で測定してきたが¹⁾、今回は同一の基質を用いて定量的な活性測定法を検討した。タンパク質分解活性は一般には casein 分解法で定量的に測定されている²⁾。これは基質である casein が TCA などの酸の添加で変性沈殿するのに対し、タンパク質の分解産物であるアミノ酸や低分子のペプチドが酸可溶性であるという性質を利用したものである。未反応の casein を TCA で沈殿させ除去後上清の反応生成物の量を 280nm の吸光度を測定して求めている。今回われわれはこの casein 分解法を改変し、casein に TCA を添加して白濁させ、沈殿に移行する前にすみやかに濁度を測定して未反応の casein 量を求めてタンパク質分解活性とした。この方法は迅速、簡便であり、培養上清や未精製の protease 標品の活性測定に適していると思われる。使用する基質の濃度や buffer の種類、および濃度の検討が特に重要であった。

実験方法

1. 菌体外濾液の調整

健常ヒト手指より分離同定した *Staphylococcus epidermidis* SAT17株を EHC 培地¹⁾ で 35℃、48時間培養した。菌体を遠心除去後、上清を 0.22 μ m のフィルターで濾過し、さらに蒸留水に対して24時間透析したものを菌体外濾液とした。今回 EHC 培地は培養上清を透析したものと同一の透析膜を使用した透析外液を使用して菌体外濾液に培地成分が混入するのを防いだ。得られた菌体外濾液の280nmにおける吸光度を測定し、 A_{280} 値が0.5になるように蒸留水で希釈調整したものを実験に使用した。

2. 基質液の調整

基質として sodium casein (nutrose: NAKARAI) を使用した。Sodium casein は一般に基質として用いられる casein と異なり加熱することなく攪拌のみで水に容易に溶けた。完全に溶解した sodium casein 液を 0.22 μ m のフィルターで濾過して基質液とした。実験に使用した sodium casein の濃度は予備実験を行い 0.25% とした。

3. Buffer の調整

数種の buffer の中から予備実験を行い sodium casein 液および菌体外濾液と混合しても非特異的な白濁や沈殿を生じないものを選択した。Tris HCl buffer, glycine NaOH buffer および Britton-Robinson の広域 buffer などのリン酸を含有しないか、リン酸含有量の低い buffer が使用可能であった。今回は広範囲の pH に使用できる Britton-Robinson の buffer を使用した。pH 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 の 8 種類の pH の buffer を 1/25mol の混合酸液 (H_3PO_4 3.92g, CH_3COOH 2.4g, H_3BO_3 2.47g を 1,000ml の蒸留水に溶解) と 1/5 mol の NaOH 液を一定量混合して調整した。

4. タンパク質分解活性測定法

3 種類の protease 阻害剤液を準備した。EDTA2Na (DOTITE) は 15mg/ml 水溶液, soy-bean trypsin inhibitor (SIGMA) は 20 μ g/ml 水溶液, N-ethylmaleimide (NAKARAI) は 20 μ g/ml 水溶液をそれぞれ予備実験の結果調整した。

5. Protease 阻害剤液の調整

試験管に 0.25% sodium casein 液 (基質) 200 μ l, 菌体外濾液 200 μ l, buffer 400 μ l および阻害剤液または蒸留水 200 μ l の合計 1,000 μ l を入れ反応液とし、一定時間一定温度で incubate した。一定時間後 5% TCA を 3 ml 添加し、反応を止めるとともに残存す

*1 川崎医療福祉大学 医療技術学部 臨床栄養学科 *2 川崎医療福祉大学大学院 医療技術学研究科 臨床栄養学専攻
(連絡先) 美祢弘子 〒701-0193 倉敷市松島288 川崎医療福祉大学

る未反応の sodium casein を白濁させ、直ちに濁度を測定した。濁度は予備実験の結果吸収量が最大であった350nmの吸光度 (A_{350}) として求めた。今回タンパク質分解活性は暫定的に反応前の反応液の A_{350} 値から反応後の反応液の A_{350} 値を引いた値であらわした。すべての実験は5本の試験管を用いておこない平均値を求めた。

結果と考察

1. Sodium casein 量と A_{350} 値の相関関係

反応液中の菌液のかわりに蒸留水と10段階の濃度の sodium casein を入れ、5%TCA液を3ml添加して A_{350} 値を求めた。図1に示すように反応液中の sodium casein 量と A_{350} 値は比例し、この濃度範囲で A_{350} 値で sodium casein 量を算定できることが示された。

2. タンパク質分解活性に及ぼす incubate 温度の影響

反応液に pH7 の buffer を入れ、5℃、15℃、25℃、35℃、45℃、55℃および65℃の7段階の温度で60分間 incubate し、タンパク質分解活性を比較した。この結果、図2に示すように45℃で最大活性が得られた。このため、以後の実験では incubate 温度を45℃とした。

3. タンパク質分解活性に及ぼす incubate 時間の影響

反応液に pH7 の buffer を入れ、45℃で incubate し、10分毎にタンパク質分解活性を測定した。図3に示すように、40分間の incubate で反応液中のほとんどすべての sodium casein が分解された。しかしながら実験に用いた菌体外濾液のタンパク質分解活性が弱い場合も考慮して pH や阻害剤の影響を調べる実験では incubate 時間を60分間とした。

4. タンパク質分解活性に及ぼす pH の影響

反応液の buffer を pH 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12の8種類のものを用い、45℃で60分間 incubate してタンパク質分解活性を測定比較した。図4に示すように pH 7 の buffer で最大活性が示された。この結果は *S.epidermidis* SAT-17株の菌体外濾液に含まれる protease が中性 protease である³⁾ことを示唆している。

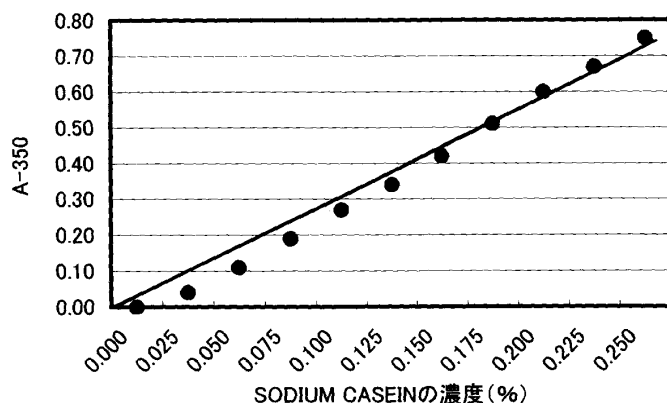


図1 Sodium casein 濃度と A_{350} 値の相関関係
縦軸の数値は350nmの吸光度を示している。

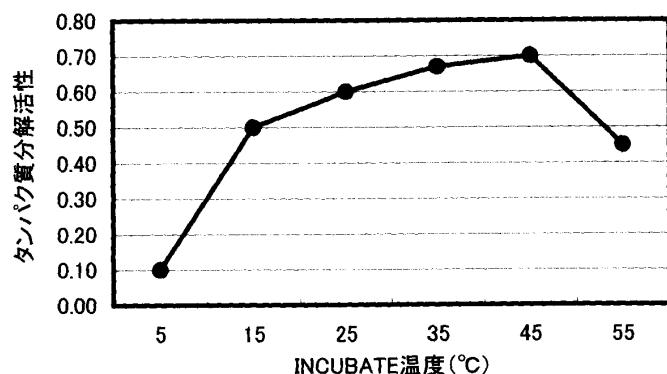


図2 タンパク質分解活性に及ぼす incubate 温度の影響

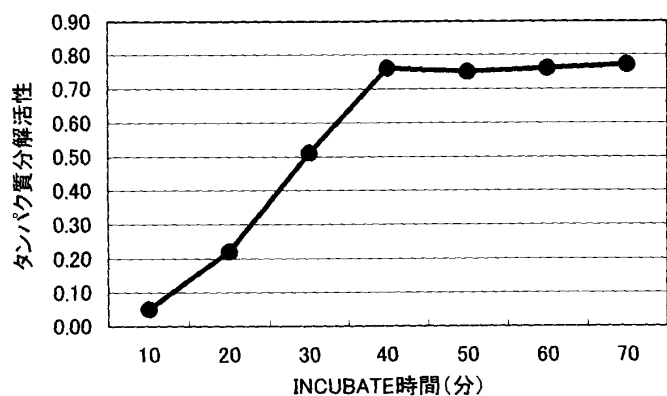


図3 タンパク質分解活性に及ぼす incubate 時間の影響

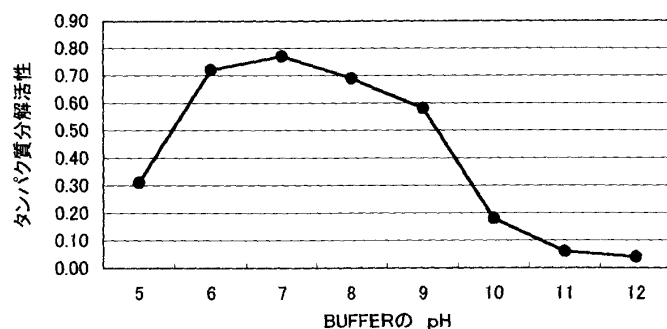


図4 タンパク質分解活性に及ぼす pH の影響

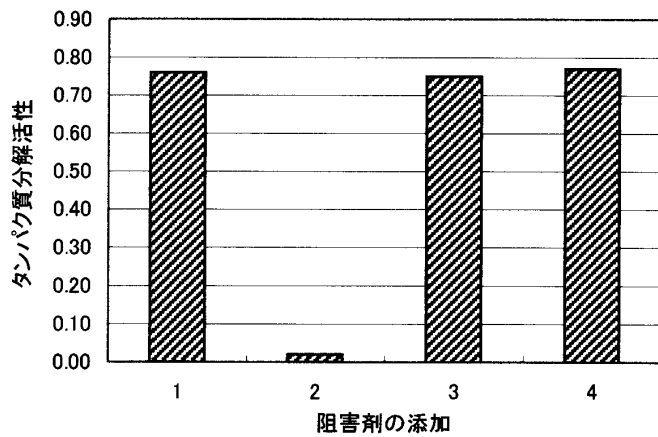


図5 タンパク質分解活性に及ぼす阻害剤の影響
横軸の1は阻害剤を添加しない control, 2は15mg/mlのEDTA2Na, 3は20 μ g/mlのsoybean trypsin inhibitor, 4は20 μ g/mlのN-ethylmaleimideをそれぞれ添加した場合である。

5. タンパク質分解活性に及ぼす阻害剤の影響

反応液に3種類のprotease阻害剤を加え、pH7で45 $^{\circ}$ Cで60分間incubateしてタンパク質分解活性を測定比較した。図5に示すように、serine proteaseの阻害剤であるsoybean trypsin inhibitorやcysteine

proteaseの阻害剤であるN-ethylmaleimideでは全く阻害を受けず、metalloproteaseの阻害剤であるEDTA2Naによってのみ強い阻害を受けた。この結果は本proteaseがmetalloproteaseであることを示している⁴⁾。

おわりに

未反応の基質(sodium casein)をTCAの添加で白濁させ沈殿に移行する前にすみやかに測定する方法は迅速・簡便で数多くのサンプルのprotease活性を調べる等の目的に適していると思われた。精製したprotease標品を使用してより厳密な酵素活性を測定するには基質の種類やbufferの種類等のさらなる検討が必要と思われる。今回データとしては示さなかったが分離した数多くのcoagulase negative staphylococciの培養上清に見られるタンパク質分解活性をこの方法で測定でき、従来の定性的な測定法では活性がないとされていたものでも弱いながら活性があることが確認できた。

文 献

- 1) 二宮健司, 美祢弘子 (1999) *Staphylococcus epidermidis*の産生するproteaseの性状について. 川崎医療福祉学会誌, **9**(1), 103-111.
- 2) 藤本幸男 (1984) 田村善蔵, 由岐英剛編集, 生化学分析法, 南江堂, 東京, 初版, pp139-165.
- 3) Tsuru D and Yoshimoto T (1987) Microbial proteases. In Laskin A I ed, *Handbook of Microbiology*.
- 4) Teufel P and Goty F (1993) Characterization of an extracellular metalloproteases with elastase activity from *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Bacteriology*, **175**, 4218-4224.

(平成12年12月12日受理)

Studies on Improved Measurement of Proteolytic Activity with Filterated Supernatant Produced by *Staphylococcus epidermidis*.

Hiroko MINE, Rei OIKE and Tomomi HIKASA

(Accepted Dec. 12, 2000)

Key words : STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS, PROTEOLYTIC ACTIVITY, SODIUM CASEIN,
IMPROVED MEASSUREMENT OF PROTEASE

Correspondence to : Hiroko MINE

Department of Clinical Nutrition, Faculty of Medical Professions
Kawasaki University of Medical Welfare
Kurashiki, 701-0193, Japan
(Kawasaki Medical Welfare Journal Vol.10, No.2, 2000 413-416)