

Title	Bacteroides gingivalis 381株の産生する赤血球凝集素の分離・精製とその諸性質
Author(s)	井下, 英二
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/35853
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【10】

氏名・(本籍)	井	下	英	二
学位の種類	歯	学	博	士
学位記番号	第	7957	号	
学位授与の日付	昭和63年1月26日			
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当			
学位論文題目	Bacteroides gingivalis 381株の産生する赤血球凝集素の分離・ 精製とその諸性質			
論文審査委員	(主査)			
	教授	常光	旭	
	(副査)			
	教授	鈴木不二男	教授	浜田 茂幸 講師 鳥居 光男
	講師	三木 靖夫		

論文内容の要旨

近年, Bacteroides gingivalis は, 成人性歯周炎の病巣から高率に分離され, さまざまな歯周病原性因子を有することから, 本疾患の有力な原因菌のひとつとして注目されている。Okuda and Takazoe (1974) は B.gingivalis には強い赤血球凝集活性が認められることを明らかにし, この性状が本菌種の歯周ポケット内への定着と係わりをもつことを示唆した。さらに, Slots and Gibbons (1978) は B.gingivalis が赤血球凝集能, 上皮細胞への付着能や他の口腔細菌との共凝集能を有していることを示すとともに, B.gingivalis の赤血球凝集能は唾液および血清由来の成分によって抑制され, これらの成分が本菌種の歯周ポケットへの定着に様々な影響を与える可能性を示した。しかしながら, B.gingivalis の赤血球凝集機構については, 未だ不明な点が多く, また, 赤血球凝集素と唾液および血清由来の成分との相互作用についてもその詳細は明らかにされていない。

この研究で, 著者は B.gingivalis 381株の培養上清にも強い赤血球凝集活性が存在することを確認し, この培養上清を超遠心処理し, 得られた沈渣を Triton X-100存在下でセファロース CL-4B によるゲル濾過クロマトグラフィー, 次いでアルギニン-アガロースによるアフィニティクロマトグラフィーを行って, B.gingivalis 381株の菌体外赤血球凝集素を分離, 部分精製した。電子顕微鏡による観察の結果, B.gingivalis 381株の菌体表面には多くの絨毛様構造物がみられたが, 精製標品には絨毛様構造物は観察されず, 本菌の菌体外赤血球凝集素は本菌体のもつ絨毛とは異なる可能性が示唆された。培養上清より精製された赤血球凝集素標品は, 主に pI4.0 の酸性タンパク質よりなり, 乾燥重量あたり 81% のタンパク質と 8% の中性糖を含んでいるが, 核酸やリポ多糖の含量はいずれも 1% 以下であった。また, この標品には, 主として推定分子量約 24,000, 37,000, および 44,000 のサブユニットをもつタンパク質が

含まれていた。精製標品を60°Cで10分間、熱処理すると赤血球凝集活性は完全に消失し、本標品は熱に対して比較的不安定であった。また、この赤血球凝集活性はEDTAや供試した二価金属イオンの影響を受けなかったが、pHやイオン強度にはある程度の依存性を示した。糖およびアミノ酸による赤血球凝集活性の阻害効果を調べたところ、精製標品の赤血球凝集活性は、供試した糖類では阻害されなかったが、アミノ酸の一種であるアルギニンにより特異的に阻害された。また、ブラジキニン (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg)、チロシルブラジキニン (Tyr-Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe-Arg)、デス-[アルギニル-9]-ブラジキニン (Arg-Pro-Pro-Gly-Phe-Ser-Pro-Phe)、アンギオテンシン I (Asp-Arg-Val-Tyr-Val-His-Pro-Phe-Asn-Leu) やプロクトリン (Arg-Tyr-Leu-Pro-Thr) などのアルギニン残基を含むペプチドも赤血球凝集活性を強く阻害したが、アルギニン残基を含まないペプチドであるブラジキニンポテンシエーターCは阻害しなかった。さらに、プロリン含量の高いヒト耳下腺唾液由来の糖タンパク質 (PRGP)、ウシ顎下腺ムチン (BSM)、ウシ血清アルブミン (BSA)、 α_1 -酸性糖タンパク質やトランスフェリンなどの唾液および血清由来の糖タンパク質やタンパク質もまた赤血球凝集活性を阻害した。特に、BSAはグアニジル化することにより、また、BSMはその糖鎖を化学的に取り除くことにより、それらの赤血球凝集活性阻害効果はさらに高められた。以上の阻害実験の結果および赤血球凝集素がアルギニン-アガロースに特異的に結合することなどの事実を勘案すると、アルギニンによる赤血球凝集活性の阻害は、赤血球凝集素がアルギニンと特異的に結合することにより、赤血球凝集素の赤血球膜への結合が阻害されるためであろうと考えられる。

次いで、*B.gingivalis* 菌体や菌体外赤血球凝集素と唾液および血清由来の成分との相互作用を追求するために、トリチウム標識したPRGP、 α_1 -酸性糖タンパク質およびトランスフェリンを用いて、菌体や菌体外赤血球凝集素との結合性を調べた。その結果、本赤血球凝集素と糖タンパク質とは結合することが認められ、しかも、この結合に対してもアルギニンは特異的阻害を示した。*B.gingivalis* 381株の菌体もまた上記の3つの糖タンパク質と結合し、この結合もまたアルギニンによって特異的に阻害された。さらに、予め菌体外赤血球凝集素標品と糖タンパク質とを反応させたのち、糖タンパク質と菌体との結合性を調べたところ、赤血球凝集素は菌体と糖タンパク質との結合性を著しく抑制した。このことから、赤血球凝集素はこれらの糖タンパク質と直接結合することにより、糖タンパク質の菌体との結合部位を塞ぎ、その結果、菌体と糖タンパク質との結合を阻害すると考えられる。

以上の結果より、1) *B.gingivalis* 381株の培養上清中に存在する菌体外赤血球凝集素の活性は、アルギニンやアルギニン残基を含むペプチドによって特異的に阻害されること、2) 部分精製された菌体外赤血球凝集素は、本菌体と唾液および血清由来の糖タンパク質との間の結合を阻害し、さらに、この阻害機構にはアルギニン残基が深く関わっていることが明らかになった。

論文の審査結果の要旨

本研究は成人性歯周炎の有力な原因菌のひとつとして、近年、注目されている *Bacteroides gingivalis* 381株の産生する赤血球凝集素を分離・精製し、その諸性質のうち、特に、これまで全く知られていなかった赤血球凝集活性の阻害物質を調べたものである。

その結果、1) 本菌株の培養上清中に存在する赤血球凝集活性は、アルギニンやアルギニン残基を含むペプチドによって特異的に阻害されること、2) 精製された赤血球凝集素は、本菌体とヒト唾液に存在するプロリン含量の多い糖タンパク質および血清由来の糖タンパク質である α_1 -酸性糖タンパク質やトランスフェリンとの間の結合を阻害し、さらに、この阻害機構にはアルギニン残基が深く係わっていることを明らかにした。

この論文は、*B.gingivalis*の歯周ポケット内での動態を支配するさまざまな要因を解析する上で、貴重な手掛りをあたえるものであり、歯学博士の学位に十分値するものと認める。