

Title	ヒト顎舌下腺由来の唾液より精製したシアロ糖タンパク質に対するモノクローナル抗体の作製とその応用
Author(s)	高垣, 勝
Citation	大阪大学, 1990, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/37608
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名・(本籍)	たか 高	がき 垣	まさる 勝
学位の種類	歯	学	博 士
学位記番号	第	9324	号
学位授与の日付	平成 2 年 9 月 19 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	ヒト顎舌下腺由来の唾液より精製したシアロ糖タンパク質 に対するモノクローナル抗体の作製とその応用		
論文審査委員	(主査) 教授 常光 旭		
	(副査) 授 授 鈴木不二男 助教授 小川 裕三 講 師 三木 靖夫		

論 文 内 容 の 要 旨

ヒト唾液に含まれている数種のタンパク質や糖タンパク質は、エナメル質表面での獲得皮膜の形成に重要な役割を果していると考えられている。現在まで、エナメル質表面の獲得被膜に見い出されている主な構成成分として、酸性高プロリン含有タンパク質、シスタチン、リゾチーム、アルブミンなどのタンパク質、さらに塩基性高プロリン含有糖タンパク質、 α -アミラーゼ、免疫グロブリン、ラクトフェリン、フィブロネクチン、ペルオキシダーゼなどのシアロ糖タンパク質の存在が知られている。しかし、獲得被膜内のこれらの物質の存在については、分析方法の違いや報告者によって、その結果は必ずしも一致しておらず、しかも、口腔細菌と結合性が高い可能性があるシアロ糖タンパク質に関しては、その存在と獲得被膜形成後の経時的な消長には、不明な点が多い。

著者はO型血液の成人(年齢30~40歳の男性)より氷冷下で、各個人用に作製した唾液採取器を用いて、顎舌下腺由来の唾液を採取し、Q-Sepharose Fast Flowを用いた陰イオン交換クロマトグラフィーおよびSuperose 6 prep gradeを用いたゲルろ過を組み合わせて、比較的高分子量をもつシアロ糖タンパク質(sialoglycoprotein; SGP と略す)の分離精製を行った。得られた精製SGPには、H型血液型物質やIgA, IgG, IgMは、いずれも含まれておらず、分子量は約44万と推定され、メルカプトエタノールで還元処理した精製標品のsodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electro-phoresis (SDS-PAGE)では、推定分子量約75,000, 60,000, 25,000の3つのタンパク質バンドに分かれた。一方、還元処理しない場合は、分離ゲルに少し入った位置と推定分子量約60,000の位置に不鮮明なバンドが認められたが、本標品のほとんどが、濃縮ゲルと分離ゲルの境界部に留まった。また等電点は5.2~5.8であり、本標品は酸性糖タンパク質であることがわかった。

アミノ酸組成は、グルタミン酸、プロリン、グリシンおよびアスパラギン酸が多く、これらのアミノ酸は、全残基の57%を占め、中性糖はガラクトースが最も多く、次にフコースが多く含まれていたが、マンノースは少なく、アミノ糖としては、N-アセチルノイラミン酸、N-アセチルガラクトサミンおよびN-アセチルグルコサミンが認められ、N-アセチルノイラミン酸はアミノ酸1000分子あたり7.5分子、リン酸は4.1分子含まれていたが、硫酸は検出されなかった。精製SGPのリジン残基を〔¹⁴C〕で標識し、口腔細菌との結合性について調べた結果、供試した口腔細菌27株のうち、偏性嫌気性菌である *Bacteroides gingivalis* 381株と高い結合性が認められた。次に、このSGPに対するモノクローナル抗体を作製したところ、23種のモノクローナル抗体（8種はIgG₁、15種はIgMであった）が得られ、そのうち4種のモノクローナル抗体について諸性質を調べたところ、精製SGPとモノクローナル抗体との結合は、SGPを数種のグリコシダーゼで処理し、糖鎖を切断したタンパク質では、未処理の場合よりも阻害が強くなるか、または変化を示さなかったが、SGPをプロナーゼで処理すると、阻害が全くみられなくなった。SDS-PAGEによって分画した後、モノクローナル抗体と反応する精製SGP画分をイムノブロット法により検出したところ、3つのタンパク質バンドのうち、推定分子量約60,000の画分が抗体により検出され、分離ゲルに少し入った位置にもわずかに検出された。一方、還元処理しない場合は、濃縮ゲルと分離ゲルの境界部と易動度の低いタンパク質バンドに一致して、抗体により検出されるバンドが認められた。また、このモノクローナル抗体は、*B. gingivalis* 381株と精製SGPとの結合を強く阻害した。次に、獲得被膜内でのSGPの存在と、その経時的变化を、ヒト口腔内にエナメル質切片を固定させたプレートを装着し、経時的に取り出したエナメル質切片から、獲得被膜成分を抽出し、その試料中の本SGPの存在を調べたところ、5例全てに、モノクローナル抗体により認識される本物質が検出され、このSGPは口腔内にプレートを装着した後、1時間以内に、急速にその量が増加し、その後は一定のレベルを示す例や漸増を示す例がみられ、装着後24時間以内では、明らかな減少は認められなかった。

以上の結果より、ヒト顎舌下腺由来の唾液より精製した比較的高分子量のSGPは、*B. gingivalis* 381株などの口腔細菌と結合することが明らかにされた。また、このSGPに対するモノクローナル抗体を用いることにより、ヒト獲得被膜中にSGPが存在することが証明され、さらに、SGPが経時的に明らかな減少を示さないことから、本SGPは獲得被膜の構成成分として、口腔細菌の歯面への付着に密接に関与していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究はヒト顎舌下腺由来の唾液より、比較的高分子量のシアロ糖タンパク質（SGP）を分離・精製し、そのモノクローナル抗体を作製して、SGPの諸性質を調べたものである。

その結果、SGPは1)分子量約44万の酸性糖タンパク質であること、2) *B. gingivalis* 381株などの口腔細菌と結合すること、3)SGPに対するモノクローナル抗体を用いることにより、ヒト獲得

被膜内に24時間は存在することなどが明らかとなった。

この論文はヒト唾液に存在する種々のタンパク質や糖タンパク質に対するモノクローナル抗体を作製し、それらの抗体を用いる手法により、獲得被膜内に唾液タンパク質や糖タンパク質の存在することを経時的に確認する上で、重要な手がかりを与えるものであり、歯学博士の学位に十分値するものと認める。