



Title	Porphyromonas gingivalisの赤血球凝集活性を阻害するヒト耳下腺由来の唾液ペプチドの精製とその諸性質
Author(s)	村上, 幸孝
Citation	大阪大学, 1992, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3089981
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

Porphyromonas gingivalisの赤血球凝集活性
を阻害するヒト耳下腺由来の唾液ペプチドの
精製とその諸性質

村上 幸孝

Purification and some properties
of a peptide from human parotid saliva
which inhibits hemagglutination of
Porphyromonas gingivalis

Yukitaka Murakami

緒 言

成人性歯周炎の病原性菌として、現在注目されている偏性嫌気性菌の一種である黒色色素産生性の Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis^{1~5)} は、唾液で被覆されたハイドロキシアパタイトに付着したり、赤血球をはじめグラム陽性レンサ球菌と凝集したり、口腔粘膜上皮細胞に付着することがよく知られている^{6~12)}。OkudaとTakazoeは口腔より分離した黒色集落を形成する Bacteroides 種の59株中29株に強い赤血球凝集活性を有することを明らかにした¹³⁾。その後、Porphyromonas gingivalis (以下、P. gingivalisと記載) のもつ赤血球凝集素の分離・精製が多くの研究者により試みられてきたが^{9, 14, 15)}、いずれの報告も部分精製されたものであり、従って、凝集素の分子量に関しては様々な数値が提示されている。ごく最近、NishikataとYoshimuraは凝集素を単離し、その分子量は

約 44 kDa のタンパク質であると報告している¹⁶⁾。また、P. gingivalisの外膜上には、線毛様構造物 (pili, pilus-like fibers, fimbria-like structures) が存在することが知られている^{6, 7, 13)}。以前には赤血球凝集素はこの線毛様構造物にあると考えられていたが^{6, 7, 13)}、Yoshimuraら¹⁷⁾が精製した線毛 (fimbriae) には赤血球凝集活性がないという報告があって以来、最近ではむしろ否定的な見解が強い。一方、本菌の菌表面には膜胞 (vesicles) が存在し、37℃の培養条件下では膜胞は培養上清に放出される。Okudaら¹⁵⁾は培養上清から分離した赤血球凝集素を電子顕微鏡で観察すると、膜胞または管状構造物 (vesicle or tubelike structure) がみられるという。一方、Grenier と Mayrand は培養上清より膜胞を分離し、この標品は、外膜とは異なり、タンパク質分解酵素活性、赤血球凝集活性および菌凝集活性などを併せて保有していることを指摘している

18). 本菌のもつ赤血球凝集活性を一つの指標として測定することは、本菌の口腔組織への付着能や異菌種との凝集能を知る上で非常に有用である。さらに、赤血球凝集活性に対する阻害因子を調べることは、本菌のもつ受容体特異性の解明が可能であるばかりか、さらに、本菌の先述した付着機構の解明にも役立つと考えられる。Slots と Gibbons はヒト唾液には、P. gingivalis と赤血球との凝集を阻害する高分子量の物質が存在することを初めて指摘した⁶⁾。その後、同様の結果を Okuda ら⁷⁾が報告したものの、赤血球凝集阻害因子の研究には進展がみられず、その本態は明らかにされていない。

そこで、本研究では、低分子量の阻害ペプチドに焦点を絞り、ヒト耳下腺由来の唾液より、分離・精製することを試み、精製ペプチドの諸性質ならびに本ペプチドの P. gingivalis 菌表層部に存在する赤血球凝集素との結合性を明らかにすることを目的として、以下

の 実 験 を 行 っ た .

実験材料ならびに方法

1. ヒト耳下腺由来の唾液採取

ヒト耳下腺由来の唾液は，クエン酸刺激で，Keene¹⁹⁾の方法により，年齢20～30歳の健康な成人より氷冷下で採取した．採取後，直ちに-20℃にて凍結保存した．

2. 供試菌株

Porphyromonas gingivalis 381, ATCC

33277 株, Prevotella loescheii ATCC

15930 株, Prevotella melaninogenica ATCC

25845 株, Prevotella intermedia ATCC

25261 株, Prevotella denticola ATCC

33185 株は，サンスター（株）基礎研究所より

分与された．これらの菌株を，40mg/ml の

トリプチケースソイアガー（BBL; Becton

Dickinson Bicrobiology Systems, Cockeys-

ville, MD, U.S.A.），1mg/mlの酵母エキス末

（BBL），5μg/mlのヘミン，1μg/mlのメナ

ジョン, 5%ヒツジ脱繊維血を含む血液寒天培地に接種し, 嫌気培養装置 (Forma Scientific Anaerobic System Model 1024; Morietta, OH, U.S.A.) を用い, 嫌气的条件下 (10% CO₂, 10% H₂, 80% N₂) にて 37℃ で培養を行い, 1週間ごとに, 新たな培地に継代培養して保存した。供試菌の培養は, 保存培地より 1mg/ml の酵母エキスを末, 5μg/ml のヘミン, 1μg/ml のメナジオンを含むトリプチケースソイブロス (BBL) 10ml に接種し, 嫌气的条件下 (10% CO₂, 10% H₂, 80% N₂) にて 37℃, 48時間培養した。この培養液を同培養液 90ml に移し, 同一条件下で培養した。

Streptococcus cricetus E49株, Streptococcus rattus FA-1株, Streptococcus mutans NCTC 10449, MT703R, OMZ175 株, Streptococcus sobrinus B13, 6715株, Streptococcus downei MFe28株, Streptococcus mitis ATCC 9811株, Streptococcus sanguis ATCC 10557株は, 本学口腔細菌学

講座， 浜田茂幸教授より分与を受けた。 供試菌は， ブレインハートインフュージョンアガー（Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.）の高層培地に穿刺培養した後， 4℃で冷所保存し， 1ヶ月ごとに， 新たに穿刺継代培養したものを用いた。 これらの菌の培養は， 保存培地よりブレインハートインフュージョン（Difco Laboratories）10mlに接種し， 好氣的条件下で37℃， 24時間静置培養した。 この培養液を同培養液90mlに移し， 同一条件下で培養した。

培養した口腔細菌を， 10,000xg, 20分間の遠心操作により集菌し， 生理的食塩水で3回洗浄後， 0.15M塩化ナトリウムを含む10mMリン酸ナトリウム緩衝液（PBS）（pH 7.0）または0.15M塩化ナトリウムを含む10mMトリス塩酸緩衝液（TBS）（pH 7.0）に適当に懸濁した。 また， 供試菌数と赤血球数はBürker-Türk型の血球計算盤を用いて算定した。

3. 赤血球凝集活性の阻害効果の判定

1) マイクロタイタープレートを用いた

P. gingivalis 381株の赤血球凝集活性の阻害度の測定

赤血球凝集反応は菌懸濁液 50 μ l をマイクロタイタープレート (V底型; ペトレイ 96 V, テルモ, 東京) 上で, 10 mM PBS (pH 7.0) 50 μ l で連続 2 倍希釈した各ウェルに, 2% のヒト赤血球 50 μ l を加え, プレートミキサー (東洋科学産業, 東京) で 30 秒間混合し, 室温にて 1 時間放置した後, それぞれの凝集を判定した. 赤血球の凝集の判定は, マイクロタイタープレートの底にカーペット状の赤血球薄膜を形成するものを陽性と判定した. 赤血球凝集活性力価は凝集が認められるウェルの最大希釈倍数で表した. なお, 赤血球凝集現象は光学顕微鏡下でも確認した.

赤血球凝集活性の阻害度は, 阻害物質 25 μ l と, 赤血球凝集活性力価を PBS で 4 に調整した菌懸濁液 25 μ l を混合し, 室温で 30 分

間反応させた後，さらに2%赤血球 50 μ lを添加し，1時間，室温で放置した後，判定した．

2) 分光光度計を用いた P. gingivalis 381株の赤血球凝集活性の阻害度の測定

10 mM PBS (pH 7.0) 2 mlの反応液中に 5×10^7 個の赤血球と 3×10^8 個の P. gingivalis 381菌体および阻害物質を入れ，分光光度計 (UV-265FW, 島津製作所, 京都) を用いて、37℃で攪はんしながら，波長542 nmにおける吸光度変化を測定した．反応開始後5分における吸光度の減少から，阻害率を算出した．

4. アミノ酸分析

精製ペプチドを6N HClに溶解し，減圧封管した試験管中で，110℃，24時間の加水分解を行った後，アミノ酸分析計 (L-8500, 日立製作所, 東京) で分析した．

5. アミノ酸配列の決定

精製ペプチドのアミノ酸配列の決定は，

477A気相式シーケンサー (Applied Biosystems Inc., Fostercity, CA, U.S.A.) を用い、自動エドマン法により、3-フェニル-2-チオヒダントイン誘導体 (PTH-アミノ酸) を生成させ、PTH-アミノ酸を単一溶媒溶出法により同定することにより行った²⁰⁾。

6. 質量分析

精製ペプチドの質量数は、質量分析計 (JMS-HX 100; Jeol Ltd., 東京) を用いて、高速電子衝撃法 (FAB) で、分子に水素イオンが1個付加した1価の正イオン $[M+H]^+$ を測定し、その数値から決定した。

7. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は、Phast System (Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Sweden) を用い、通法に従って行った。分離したペプチド標品を2.5%ドデシル硫酸ナトリウム (

sodium dodecyl sulfate; SDS), 1mM エチレンジアミン四酢酸ナトリウム塩 (sodium ethylenediaminetetraacetate; EDTA), 0.01% ブロムフェノールブルー および 5% 2-メルカプトエタノールを含む 10mM トリス塩酸緩衝液に溶解した後, 100℃, 5分間熱処理した. 0.112M 酢酸および 0.112M トリスを含む PhastGel high density (Pharmacia LKB) を支持体として, 0.2M トリシン, 0.2M トリスおよび 0.55% SDS を含む PhastGel SDS Buffer Strips (Pharmacia LKB) を用い, 15℃, 10mA の条件下で泳動し, そのゲル中のタンパク質を 0.1% クマシーブリリアントブルーを用いて検出した. 分子量の測定には, ミオグロビン III, ミオグロビン II, ミオグロビン I, ミオグロビン I & II および ミオグロビン (分子量測定キット, 1860-101 分子量マーカー, Pharmacia LKB) を用いた.

8. ペプチドの合成

ペプチドの合成は，430Aペプチド合成装置（Applied Systems Inc.）を用いて，Boc-アミノ酸を使用して，対掌性無水物法による固相法により行った．本実験に使用した合成ペプチドは，大阪大学蛋白質研究所，相本三郎助教授よりご提供を受けたものである．

9. ペプチドの Na^{125}I による標識

ペプチドはクロラミン-T法により Na^{125}I で標識した²¹⁾．すなわち， $100\mu\text{g}$ のペプチドを $10\mu\text{l}$ の 50mM リン酸ナトリウム緩衝液（ pH 7.5）に溶解させ，さらに， $10\mu\text{l}$ の $33\text{mCi}/\text{ml}$ Na^{125}I （ICN Radiochemicals, Irvine, CA, U.S.A.）と $5\mu\text{l}$ の $0.5\text{mg}/\text{ml}$ クロラミン-T溶液を加えて，室温にて反応を開始した．60秒後に $10\mu\text{l}$ の $1\text{mg}/\text{ml}$ メタ重亜硫酸ナトリウム溶液， $10\mu\text{l}$ の 0.2M N-アセチルチロシン溶液および $10\mu\text{l}$ の $1\text{mg}/\text{ml}$ ヨウ化ナトリウム溶液を添加して反応を停止した．

標識ペプチドはベッド体積 0.1ml の

Heparine-Sepharose CL-6B (Pharmacia LKB) カラムにて分離した。10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したカラムに吸着させた後、同緩衝液で充分洗浄し、1.5 M 塩化ナトリウムを含む10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) で溶出し、標識ペプチドを得た。

10. 標識ペプチドの口腔細菌との結合性

結合実験は、非特異的結合を抑制するために、シリコン処理を行った1.5 ml ポリプロピレン遠心管を用いて行った。口腔細菌を10 mM TBS (pH 7.0) に懸濁させた液に標識ペプチドと非標識のペプチドを添加して、最終容量100 μ lとして、4℃と37℃で反応させた。反応後、菌体を10 mM TBS (pH 7.0) で2回洗浄し、さらに0.5 M 塩化ナトリウムを含む10 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0) で1回洗浄した。沈殿物に少量の10 mM TBS (pH 7.0) を加えて懸濁させた後、別のシリコン処理を行った1.5 ml ポリプロピレン遠心管に懸濁液を移し、

菌体の放射能をガンマカウンター (LKB-Wallac 1282 CompuGamma, Wallac Oy., Turku, Finland) で測定した。

非標識ペプチドを添加しなかった際にみられる結合を総結合, 非標識ペプチド (1×10^{-3} M) を添加した際にみられる結合を非特異的結合とし, 総結合から非特異的結合を差し引いた値を特異的結合とした。なお, 各実験は2回行い, その平均値を求め, 結果にそれぞれ示した。

1 1. レセプターの分子量の測定

Neufeld と Gospodarowicz の方法²²⁾により標識ペプチドとレセプターとを架橋剤によりクロスリンクした。標識ペプチドを試験管あたり 1×10^6 cpm 添加し, 0.5 mM Cu^{2+} イオン存在下で, 結合実験と同様に反応させ, その後, 洗浄した。これに $0.15 \text{ mM Disuccinimidyl suberate}$ (DSS; Pierce, Rockford, IL, U.S.A.) を含む 10 mM PBS (pH 7.0) を加え,

室温で15分間作用させクロスリンクさせた。
次いで 1mM phenylmethanesulfonyl fluoride,
1mM EDTAを含む 10mM PBS (pH 7.0) で2回洗
浄し, 上清を吸引除去した。沈殿物を 10mM 試
料用 トリス塩酸緩衝液 (pH 6.8) (1% SDSと
20% グリセリン含有) 中で, 65℃, 15分間加
熱した。その後, 遠心処理を行い, 上清に 2-
メルカプトエタノールを加え, 100℃, 3分間
加熱した後, SDS-ポリアクリルアミドグラジ
エントゲル (4-20%) (第一化学薬品工業,
東京) で電気泳動を行った²³⁾。次に, 10%
トリクロロ酢酸で固定後, 0.1% クマシーブ
リリアントブルーで染色した。次いでゲルを
脱色し, 流水中で水洗後, 65℃で加熱乾燥し
た。乾燥したゲルを Kodak Diagnostic film-
X-Omat XAR-5 (Eastman Kodak Company,
Rochester, NY, U.S.A.) 上で, -70℃, 21日
間感光後 Kodak GBXにて現像, 定着した。分
子量の測定には, フォスフォリラーゼ b, ウ
シ血清アルブミン, 卵白アルブミン, 炭酸脱

水素酵素，大豆トリプシンインヒビターおよび α -ラクトアルブミン（分子量測定キット，LMW kit E, Pharmacia LKB）を用いた。

実験結果

1. P. gingivalis 381株の赤血球凝集活性を阻害するヒト耳下腺由来の唾液ペプチドの精製

1) 限外濾過

-20℃にて凍結保存しておいたヒト耳下腺由来の唾液500mlを、4℃の条件下で解凍し、10,000×gで20分間遠心して得られた上清を、さらに200,000×gで3時間超遠心処理した。得られた上清を分画分子量が50,000のウルトラフィルター（東洋濾紙，東京）を使用し、限外濾過を行い、濾液を集め、凍結乾燥し、粗標品とした。

2) DEAE-Sephadex A-25によるイオン交換クロマトグラフィ

粗標品を20mlの50mM酢酸アンモニウム緩衝液（pH 8.0）に溶解し、同緩衝液にて平衡化したDEAE-Sephadex A-25（Pharmacia LKB）カラム（2.2×30 cm）を用いて分画を行った。

非吸着画分の溶出後，1.5Mの炭酸水素アンモニウムを含む同緩衝液を用いて，直線濃度勾配により吸着画分を溶出させた．280nmにおける吸光度にてタンパク質を検出した．流速は20ml/hで，6mlごとに分取した．その結果，図1に示す分画パターンが得られた．マイクロタイタープレート法で調べたところ，赤血球凝集活性を阻害する画分は，非吸着画分のみ認められた．この画分を集め，凍結乾燥した．

3) Sephadex G-25 によるゲル濾過

DEAE-Sephadex A-25 で得られた凍結乾燥標品を50mM酢酸アンモニウム緩衝液(pH 8.0)に溶解し，同緩衝液で平衡化したSephadex G-25 (Pharmacia LKB) カラム(1.6x70 cm)にてゲル濾過を行った．230nmにおける吸光度よりタンパク質を検出した．流速は2ml/minで，1.5mlごとに分取した．その結果，図2に示す分画パターンが得られた．中央のピークに赤血球凝集活性を阻害す

る画分（マイクロタイタープレート法による）が存在した。この画分を集め、凍結乾燥した（これを部分精製標品と呼称する）。部分精製標品のSDS-PAGEを行った結果を図3に示した。分子量約2.5kDaの位置に単一のバンドが認められた。つまり、唾液500mlより約40mgのタンパク質が分離・精製された。

4) 逆相高速液体クロマトグラフィ（逆相 high performance liquid chromatography, 逆相 HPLC）

部分精製標品を YMC-GEL ODS S5（10x250 mm, YMC, 京都）カラムに展開し、0.01% トリフルオロ酢酸溶液と 0.01%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリル溶液による直線濃度勾配により、流速 2.5 ml/min で溶出させた。

220 nmにおける吸光度でタンパク質を検出した。その結果、図4に示す分画パターンが得られた。矢印で示した最大のピークを分取し、凍結乾燥を行った。

この凍結乾燥標品をさらに Cosmosil 5C18

(4.6 x 250 mm, ナカライテスク, 京都) に展開し, 酢酸アンモニウム (pH 5.7) を含むアセトニトリル溶液による直線濃度勾配により溶出させた。分画パターンは図に示さなかったが, 主要なピークの直前に小さなピークが分離された。主要なピークのみを分取し, 凍結乾燥した (これを精製標品と呼称する) 。

2. 精製標品のアミノ酸分析およびアミノ酸配列

部分精製標品と精製標品のアミノ酸分析の結果を表 1 に示した。部分精製標品には, 塩基性アミノ酸であるヒスチジン, リジン, アルギニンが多く含まれていた。精製標品はアミノ酸残基 12 個からなると推定され, そのうちに 4 残基のヒスチジン, 2 残基のリジン, 1 残基のアルギニンを含んでいた。

精製標品のアミノ酸配列はエドマン分解により Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr と決定された。このアミノ酸配

列はアミノ酸分析と質量分析の結果と一致した。精製標品の擬分子イオン ($[M+H]^+$) の計算値が 1562.9 で、測定値と一致していた。このアミノ酸配列に従って、固相法によりペプチドを合成した。合成ペプチドを逆相 HPLC で展開すると、精製標品と全く同じ保持時間のところに溶出された。

3. ペプチドによる赤血球凝集活性の阻害

精製標品とその合成ペプチド Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr (ペプチド I と呼称する) 並びに Oppenheimら²⁴⁾ により報告されている合成ペプチド Asp-Ser-His-Ala-Lys-Arg-His-His-Gly-Tyr-Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr (ペプチド II と呼称する) とを用いて、赤血球凝集活性の阻害を調べた。

分光光度計による赤血球凝集活性の阻害曲線を図 5 に示した。精製標品を反応系に加えると、542nm における吸光度の変化はみられ

なかった。合成したペプチド I は精製標品と同様に赤血球凝集活性を阻害したので、以下の実験には、合成ペプチドを用いた。表 2 と表 3 に赤血球凝集活性の阻害の結果を示した。赤血球凝集活性はペプチド I により強く阻害されたが、ペプチド II によりさらに強力に阻害された。対照に用いたブラジキニンポテンシエーター C は阻害効果を示さなかった。ペプチド I と II は 100°C 、30 分の熱処理を行っても、赤血球凝集阻止活性になんら影響を与えなかった。

4. 標識ペプチドと口腔細菌との結合性

Na^{125}I で標識したペプチド I の放射能の比活性は $2.6\text{ mCi}/\mu\text{mol}$ であった。標識ペプチドは非標識ペプチドと同程度に赤血球凝集活性を阻害した。

種々の口腔細菌との結合性のスクリーニングでは、 1×10^9 個の菌体と $5 \times 10^4\text{ cpm}$ の標識ペプチドを 4°C ならびに 37°C で 2 時間反応さ

せた。供試菌株と結合した標識ペプチドの放射能活性を表4に示した。4℃と37℃とでは、結合性の傾向に大きな違いはみられなかった。供試菌株の中では、P. gingivalis 381株を含む偏性嫌気性菌が標識ペプチドと強い結合性を示した。また、 1×10^9 個の赤血球を用いて、同様に結合実験を行ったところ、殆ど結合性は認められなかった。

以下の実験では、P. gingivalis 381株を用いて、反応温度を4℃として、結合性を検討した。

図6に 1×10^9 個の P. gingivalis 381株菌体と 5×10^4 cpmの標識ペプチドとの結合の経時的変化を示した。特異的結合は10分でほぼ最大に達し、120分まで減少しなかった。そのため、以後の結合実験の反応時間は120分とした。

次に、非標識ペプチドを用いて、 1×10^9 個の P. gingivalis 381株菌体と 5×10^4 cpmの標識ペプチドとの結合の阻害実験を行った（図

7) . 反応系へ 1nmol の非標識ペプチドを添加すると標識ペプチドの結合の阻害がみられはじめ, 100nmol の添加で結合は約 1/3 と減少した.

菌体量を変化させて, 5×10^4 cpm の標識ペプチドとの結合を調べると, 1×10^9 個で特異的結合はほぼ最大に達し, それ以上に菌体量を増加させると, 非特異的結合が急激に増加した (図 8) .

添加する標識ペプチド量を変化させて, 1×10^9 個の P. gingivalis 381株菌体との結合の飽和曲線を得た (図 9) . 2×10^6 cpm の添加で特異的結合は最大となった. この結合飽和曲線より Scatchard 解析を行ったところ, 直線プロットが得られ, P. gingivalis 381株菌体には, K_d 値が約 3.9×10^{-6} M の親和性の低いレセプターが, 細胞 1 個あたり約 1.5×10^4 個存在することが判明した (図 10) .

1×10^9 個の P. gingivalis 381株菌体と 5×10^4 cpm の標識ペプチドとの結合に及ぼす 2

価金属イオンの影響を表5に示した。0.5 mM Cu^{2+} イオンの添加により著しく結合が増大した。

5. レセプターの分子量の測定

レセプターと標識ペプチドとを0.5 mM Cu^{2+} イオン存在下でDSSを用いてクロスリンクさせ、SDS-PAGE後、オートラジオグラフィを行った(図11)。2-メルカプトエタノールにて還元処理を行った場合、分子量46 kDaと43 kDaの位置に2つの明瞭なバンドが認められた。このことから、レセプターの分子量は、約44 kDaと41 kDaであると推定された。

考 察

本実験では、耳下腺由来の唾液を分離・精製の出発材料とし、P. gingivalis 381株のもつ赤血球凝集活性を阻害する低分子量のペプチドの精製を試みた。その結果、精製されたペプチドは、一次構造が Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr であり、分子量が1562であった。このペプチドはアミノ酸残基12個中に、塩基性のアミノ酸を7残基含み、特に、ヒスチジン残基は4残基含んでおり、ヒスチジンの多いペプチド (histidine-rich polypeptide, HRP) であることが確認された。

Hay はヒト耳下腺唾液から HRPを分離し、これがハイドロキシアパタイトに強い親和性を示すことを見だし、このペプチドがエナメル質表面の獲得皮膜の形成に関与することを示唆した²⁵⁾。続いて、Baumら²⁶⁾、MacKayら²⁷⁾によって HRPが分離され、この

HRP には Streptococcus mutans や Candida albicans に対して抗菌性があることが報告され^{28, 29)}, その後, 多数の研究者によって確認されている^{24, 30~35)}. 1988年に, Oppenheim らは HRP に対してヒスタチン (histatin) という名称を与え, ヒスタチン 1, 3 および 5 の一次構造を明らかにした²⁴⁾. 次いで1990年には, Troxler らがヒスタチン 1-12 を精製し, それらの一次構造を決定した³⁶⁾. このヒスタチンはヒトでは唾液腺にのみに局在することが cDNA プローブにより明らかにされている^{37, 38)}.

著者は, 上記の研究者らとは全く独自に, 別の角度より, つまり赤血球凝集阻害因子の本態を追究したところ, 精製ペプチドは Troxler らが報告したヒスタチン 8 と全くアミノ酸配列が偶然にも一致していた. ヒスタチン 8 の構造はヒスタチン 3, 4, 5, 6, 7, 9 および 10 にも共通に存在するため, ヒスタチンの必須構造ではないかと考えられる. 図

4 の逆相 HPLC パターンに示したように，一次構造を決定した主要なピーク以外にも多数のピークが含まれていた．結果には示さなかったが，逆相 HPLC における分離条件を検討して他のピークを分取し，その一次構造を調べたところ，ヒスタチンが分解されたと思われるアミノ酸残基数の少ない多数の断片が得られた．しかしながら，Oppenheim らをはじめとして，多数の研究者^{24, 31, 36, 39, 40)}が分離しているようなヒスタチン 1, 3 および 5 などのアミノ酸残基数の多いペプチドは得られなかった．この事実は恐らく分離・精製法の違いによるものと考えられる．ヒスタチン 1 と 3 は異なる遺伝子から生成され，他のヒスタチンはヒスタチン 1 と 3 から酵素的分解を受けて生じたものであると言われている^{37, 38, 41)}．従って，著者が逆相 HPLC パターンで得た多数のピークは実験操作中に何らかの分解を受け，短い断片ペプチドのみが分離されたのかもしれない．

赤血球凝集活性の阻害効果を調べる際に用いた合成ペプチド I と II は、それぞれ、ヒスタチン 8 と ヒスタチン 5 に相当する。ペプチド I (ヒスタチン 8) よりペプチド II (ヒスタチン 5) の方が強い赤血球凝集阻害を示した (表 2, 3)。次いで、ヒスタチン 3~10 に共通して存在するヒスタチン 8 の部分配列をもつペプチドを 5 種類 (Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-Ser-His-Arg, His-Glu-Lys-His-His-Ser-His-Arg, Lys-His-His-ser-His-Arg-Gly-Tyr, Lys-His-His-Ser-His-Arg, Lys-Phe-His-Glu-Lys) 合成し、同様に阻害実験を試みたところ、実験結果には示さなかったが、ヒスタチン 8 に比べ、弱い阻害効果がいずれの断片ペプチドにおいても認められた。しかし、Arg をもたない Lys-Phe-His-Glu-Lys は阻害活性は極めて弱いものであった。このように、塩基性アミノ酸を多くもつヒスタチンおよびその断片ペプチドは赤血球凝集活性を阻害したが、一方、対照に用いた

塩基性アミノ酸をもたないブラジキニンポテンシエーターCは赤血球凝集活性を阻害しなかった。以前に、著者の研究室ではサルミン（鮭由来のプロタミン）、ヘパリンーフィブロネクチン結合阻害因子、アンジオテンシンI、IIおよびIIIのようなArgを含む塩基性ペプチドが赤血球凝集活性を阻害することを見出しているが⁴²⁾、この現象は著者の得た結果と相矛盾するものではないと思われる。

赤血球の凝集阻害の際、ペプチドIが P. gingivalis 381株に実際に結合するかどうかを確かめるために、¹²⁵Iで標識したペプチドIを用いて結合実験を行った。まず、供試した16株の口腔細菌を用いてスクリーニングを行うと、P. gingivalis 381株を含むグラム陰性偏性嫌気性菌との結合性が高く、グラム陽性レンサ球菌との結合性は低かった（表4）。供試した偏性嫌気性菌のうち、予備実験において強い赤血球凝集活性を確認した菌株は P. gingivalis 381株と P. gingivalis ATCC

33277株のみであった。次いで、赤血球に対する本ペプチドの結合性を調べてみたところ、P. gingivalis 381株との結合性に比べ、極めて弱いものであった。このことから、赤血球の凝集阻害は、ペプチドIが P. gingivalis 381株の菌体表面に結合することによって起こると考えられた。次いで、反応温度を4℃ならびに37℃としてスクリーニングを行ったが、結合性の傾向には差がみられなかった。生理的条件下での結合性を追究するには37℃の方が望ましいのであるが、この温度では¹²⁵Iで標識したペプチドやそのレセプターの内部化 (internalization)、崩壊 (decay)、再循環 (recycling) が生じている可能性があり、また P. gingivalis 381株菌体から膜胞をはじめ、数種類のタンパク分解酵素やリポ多糖 (LPS) などが放出される可能性もある。Lantzらは P. gingivalisとフィブリノーゲンとの結合実験を37℃で行うと、フィブリノーゲンの分解が起こると報告している^{43, 44}。

これと同様の現象が生じ、37℃では本ペプチドが分解される恐れがある。そのため、以後の ^{125}I で標識したペプチド I と *P. gingivalis* 381株菌体との結合実験では、反応温度を4℃とし、細胞の代謝活性を抑圧した (suppressed) 条件下で行うこととした。

結合は約10分で最大に達する迅速な反応であり (図6)、非標識のペプチドにより阻害された (図7)。結合飽和曲線の結果 (図9) を基にして、Scatchard解析を行ったところ、*P. gingivalis* 381株菌体には、 K_d 値が約 $3.9 \times 10^{-6} \text{ M}$ で、細胞1個当たり約 1.5×10^4 個の親和性の低いレセプターが存在することが明らかになった (図10)。実験結果には示していないが、著者は既に、 ^{125}I で標識したペプチド II を用いて同様な結合実験を行い、Scatchard解析を行うと、 K_d 値が約 $1.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ で、細胞1個当たり約 3.6×10^3 個のレセプターが存在することを報告した⁴⁵⁾。

^{125}I で標識したペプチド I と *P. gingivalis*

381株菌体との結合に及ぼす2価金属イオンの影響を調べると、反応系に Cu^{2+} イオンを0.5mM加えることによって、特異的結合が約2.8倍に増加した(表5)。 Zn^{2+} イオン、 Cd^{2+} イオンなどによっても特異的結合の増加が認められたが、 Cu^{2+} イオンと比較するとわずかであった。 Cu^{2+} イオンが*P. gingivalis* 381株の培養上清ならびに菌表層部より精製したコラーゲン分解酵素活性やトリプシン様酵素活性を強く抑制することが報告されている^{46~50)}。ペプチドIと本菌株との特異的結合が、 Cu^{2+} イオンにより強く増大する現象には、上記の両酵素の Cu^{2+} イオンによる阻害によって、菌表面の立体構造が変化する可能性がある。また Cu^{2+} イオンがペプチドIに存在するHisのイミダゾール基と化学的結合を起こし、より安定な立体構造に変わることも考えられるが、そのメカニズムはよく分らない。本実験では Cu^{2+} イオン存在下でのScatchard解析を行っていないが、今後、検討する必要がある。

う。

さらに、標識ペプチド I とレセプターとを DSS によりクロスリンクし、SDS-PAGE 後、オートラジオグラフィを行うことにより、ペプチド I - レセプター複合体の存在を確認した (図 11)。Cu²⁺イオンを加えない場合、ペプチド - レセプター複合体のバンドは検出できなかったが、Cu²⁺イオンを加えて結合量を増加させると、約 46 kDa と 43 kDa にバンドが認められた。しかも、このバンドは非標識ペプチド I を加えると消失した。このことは、このバンドがペプチド I とレセプターとの複合体であることを示しており、本ペプチドと DSS の分子量を差し引くと、レセプターの分子量は約 44 kDa と 41 kDa であると計算された。SDS-PAGE を行うときに、SDS を含む試料用トリス塩酸緩衝液で本ペプチド - レセプター複合体を溶解した。次いで、放射能活性を測定すると、可溶化されずに菌体とともに残留したものが多かった。今後、凍結融解法や他の

可溶化剤との併用を含めて，ペプチド－レセプター複合体の可溶化に工夫が必要であろう．そうすれば， Cu^{2+} イオン非存在下でも，オートラジオグラフィによりレセプターバンドが検出できるようになるかもしれない．

Scatchard 解析では，そのプロットは直線を示しており，1種類のレセプターの存在が予想された．クロスリンク後にオートラジオグラフィを行うと，2本のレセプターバンドが近接して検出された．SDS-PAGEは2-メルカプトエタノールを加えた還元状態のみで行ったので，ペプチド－レセプター複体内のS-S結合が切断されたことが考えられる．あるいは，操作中にペプチド－レセプター複合体が一部分解したのか， Cu^{2+} イオン存在下のため，本来のレセプター以外のバンドを検出した可能性もある．

ヒスタチン（HRP）の生物学的活性としては，これまでに，前述した細菌に対する抗菌性が知られているので，著者は *P. gingivalis*

に対する抗菌作用を調べるために，MacKayらの方法²⁸⁾に従って実験を行ってみた。結果には示さなかったが，抗菌作用は認められなかった。しかし，結合実験の結果より考えると，ヒスタチンはP. gingivalisに対して抗菌的ないしは殺菌的に作用しているとは考えられず，むしろ静菌的 (bacteriostatic) に作用しているものと思われる。そのほか，ヒスタチンには，ラット肥満細胞からヒスタミンを遊離させる作用があることが報告されている^{39, 40)}。本実験では，ヒスタチンがP. gingivalis 381株に特異的に結合し，赤血球凝集活性を阻害するペプチドであることを明らかにすることができた。P. gingivalisのもつタンパク分解酵素と赤血球凝集素との関連について，これまでに，いくつか報告がみられ^{16, 51)}，赤血球凝集素はトリプシン様酵素ではないかと示唆する見解が多い。ごく最近，NishikataらはP. gingivalis 381株のエンペローブよりトリプシン様酵素を精製し，

ヒスタチン 5 がトリプシン様酵素活性を抑制することを報告している⁵²⁾。著者らも、Otsukaらの方法⁵³⁾によって、本菌株の培養上清より精製したトリプシン様酵素画分には赤血球凝集活性が存在し、ロイペプチンやアンチパイン程強くはないが、ペプチド I および II がトリプシン様酵素活性を抑制することを確認している（未発表）。ヒスタチンのトリプシン様酵素の阻害様式には基質（ヒスタチン）-酵素（トリプシン様酵素）結合の可能性が考えられ、本実験で示されたオートラジオグラフィで検出された 44 kDa のレセプターがトリプシン様酵素である可能性は極めて強い。しかし、41 kDa のタンパク質の正体は現在のところ不明である。これらの点とレセプターの局在性の解明は、今後の研究に待ちたい。

ヒスタチンの口腔生物学的意義に関してはまだよく分らない点が多いが、著者の得た成績やこれまで報告された結果を勘案すると、

ヒト唾液には6-10 mg/dlのヒスタチンが存在
すると考えられる^{27, 39, 40}). P. gingivalis
のもつ病原性に対するヒスタチンの影響をさ
らに追究することによって, 本ペプチドによ
る口腔内自浄作用のほかに, 本菌による感染
に対する防御的因子としての役割が次第に明
らかにされるであろう.

結 論

ヒト耳下腺由来の唾液より, P. gingivalis の赤血球凝集活性を阻害するペプチドを分離・精製し, 諸性質の一端を調べた結果, 以下の結論を得た.

1. ヒト耳下腺由来の唾液より, 限外濾過, DEAE-Sephadex A-25を用いた陰イオン交換クロマトグラフィ, Sephadex G-25を用いたゲル濾過および逆相高速液体クロマトグラフィを組み合わせて精製したペプチドは, アミノ酸残基が12個で, その一次構造は Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr であり, 分子量は1562であった.

2. 精製したペプチドは合成品と同程度に P. gingivalis 381株の赤血球凝集活性を 10^{-5} M の濃度で完全に阻害した.

3. 種々の口腔細菌と合成ペプチドとの結合性を調べると, P. gingivalis 381株を含む偏性嫌気性菌との結合能が強かった.

4. P. gingivalis 381株と合成ペプチドとの結合実験の結果から, Scatchard 解析を行い, 本ペプチドとレセプターの親和性 (K_d 値) および細胞1個当りのレセプター数を 4°C の条件下で求めると, K_d 値は $3.9 \times 10^{-6} \text{ M}$ となり, 低親和性を示し, レセプター数は 1.5×10^4 個/細胞であった.

5. P. gingivalis 381株と合成ペプチドとの結合に及ぼす2価金属イオンの影響を調べたところ, Cu^{2+} の添加により結合能が著しく増加した.

6. レセプターと標識ペプチドとを Cu^{2+} 存在下で DSS を用いてクロスリンクさせ, SDS-PAGE 後, オートラジオグラフィを行ったところ, 分子量約 44 kDa と 41 kDa に本ペプチドに対するレセプターが認められた.

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った大阪大学歯学部予防歯科学講座常光旭教授ならびに雫石聰助教授に深甚なる謝意を表します。また、アミノ酸分析、アミノ酸配列の決定、ペプチドの合成に御協力いただきました大阪大学蛋白質研究所附属蛋白質工学基礎研究センターペプチド研究系、相本三郎助教授に深謝いたします。そして、ペプチドの結合実験に御協力いただきました元本学生化学講座加藤幸夫助教授（現在、広島大学歯学部生化学講座教授）ならびに本学生化学講座中島和久博士に厚く御礼申し上げますとともに、予防歯科学講座の諸先生方に謝意を表します。

Purification and some properties
of a peptide from human parotid saliva
which inhibits hemagglutination of
Porphyromonas gingivalis

Yukitaka MURAKAMI

Department of Preventive Dentistry
Osaka University Faculty of Dentistry
1-8, Yamadaoka, Suita, Osaka 565, Japan

Key words: histidine-rich peptide · hemagglutination · Porphyromonas
gingivalis · receptor

It is known that hemagglutination of Porphyromonas gingivalis is inhibited by whole saliva, especially high-molecular-mass components of saliva. However, little attention has been paid to the inhibitory substances such as low-molecular-mass peptides on hemagglutination.

A peptide from human parotid saliva which inhibits hemagglutination of P. gingivalis 381 was purified by ultrafiltration followed by DEAE-

Sephadex A-25 column chromatography and by gel filtration on Sephadex G-25, and then by reverse-phase HPLC. The complete amino acid sequence of the peptide determined by automated Edman degradation was as follows; Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-Ser-His-Arg-Gly-Tyr. The peptide contained 12 residues and the charged amino acid predominated with 4 histidine, 2 lysine, 1 arginine and 1 glutamic acid residues, thus being a histidine-rich peptide. The peptide was an active inhibitor of hemagglutination of P. gingivalis 381. The bacterial cells were incubated with the ^{125}I -peptide in the presence or absence of the unlabeled peptide, to evaluate the peptide binding capacity of the cells. The binding of the peptide was rapid, reversible, saturable and specific. The number of the peptide binding sites per cell was 1.5×10^4 , and the dissociation constant (K_d) was in the order of 10^{-6} M. The binding was increased about 30-fold by addition of 0.5 mM Cu^{2+} . Crosslinking experiment of ^{125}I -peptide to P. gingivalis cell surface receptor with disuccinimidyl suberate (DSS) in the addition of 0.5 mM Cu^{2+} revealed the presence of two receptors with apparent molecular masses of about 44 and 41 kDa respectively.

文 献

- 1) Tanner, A. C. R., Haffer, C.,
Bratthal, G. T., Visconti, R. A. and
Socransky, S. S. (1979): A study of
the bacteria associated with advancing
periodontitis in man. J. Clin.
Periodontol., 6, 278-307.
- 2) Slots, J. (1979): Subgingival
microflora and periodontal disease. J.
Clin. Periodontol., 6, 351-382.
- 3) Mayrand, D. and Holt, S. C. (1988):
Biology of asaccharolytic black-
pigmented Bacteroides species.
Microbiol. Rev., 52, 134-152.
- 4) van Winkelhoff, A. J., van
Steenbergen, T. J. M. and de Graaff,

- J. (1988): The role of black-pigmented Bacteroides in human oral infections. J. Clin. Periodontol., 15, 145-155.
- 5) Klausen, B. (1991): Microbiological and immunological aspects of experimental periodontal disease in rats: a review article. J. Periodontol., 62, 59-73.
- 6) Slots, J. and Gibbons, R. J. (1978): Attachment of Bacteroides melaninogenicus subsp. asaccharolyticus to oral surfaces and its possible role in colonization of the mouth and of periodontal pocket. Infect. Immun., 19, 254-264.
- 7) Okuda, K., Slots, J. and Genco, R. J. (1981): Bacteroides gingivalis,

Bacteroides asaccharolyticus and
Bacteroides melaninogenicus subspecies:
Cell surface morphology and adherence
to erythrocytes and human buccal
epithelial cells. Curr. Microbiol., 6,
7-12.

8) Gibbons, R. J. and Etherdrn, I.
(1983): Comparative hydrophobicities
of oral bacteria and their adherence
to salivary pellicles. Infect. Immun.,
41, 1190-1196.

9) Boyd, J. and McBride, B. C. (1984):
Fractionation of hemagglutinating and
bacterial binding adhesins of
Bacteroides gingivalis. Infect.
Immun., 45, 403-409.

10) Cimasoni, G., Song, M. and McBride,

B. C. (1987): Effect of crevicular fluid and lysosomal enzymes on the adherence of Streptococci and Bacteroides to hydroxyapatite. Infect. Immun., 55, 1484-1489.

11) Isogai, H., Isogai, E., Yoshimura, F., Suzuki, T., Kagota, W. and Takano, K. (1988): Specific inhibition of adherence of an oral strain of Bacteroides gingivalis 381 to epithelial cells by monoclonal antibodies against the bacterial fimbriae. Archs oral Biol., 33, 479-485.

12) Nagata, H., Murakami, Y., Inoshita, E., Shizukuishi, S. and Tsunemitsu, A. (1990): Inhibitory effect of human plasma and saliva on co-aggregation

between Bacteroides gingivalis and
Streptococcus mitis. J. Dent. Res.,
69, 1476-1479.

13) Okuda, K. and Takazoe, I. (1974):
Haemagglutinating activity of
Bacteroides melaninogenicus. Archs.
oral Biol., 19, 415-416.

14) Inoshita, E., Amano, A., Hanioka,
T., Tamagawa, H., Shizukuishi, S. and
Tsunemitsu, A. (1986): Isolation and
some properties of exohemagglutinin
from the culture medium of Bacteroides
gingivalis 381. Infect. Immun., 52,
421-427.

15) Okuda, K., Yamamoto, A., Naito, Y.,
Takazoe, I., Slots, J. and Genco, R.J.
(1986): Purification and properties of

hemagglutinin from culture supernatant
of Bacteroides gingivalis. Infect.
Immun., 54, 659-665.

16) Nishikata, M. and Yoshimura, F.
(1991): Characterization of
Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis
hemagglutinin as a protease. Biochem.
Biophys. Res. Commun., 178, 336-342.

17) Yoshimura, F., Takahashi, K.,
Nodasaka, Y. and Suzuki, T. (1984):
Purification and characterization of a
novel type of fimbriae from the oral
anaerobe Bacteroides gingivalis. J.
Bacteriol., 160, 949-957.

18) Grenier, D. and Mayrand, D. (1987):
Functional characterization of
extracellular vesicles produced by

Bacteroides gingivalis. Infect.

Immun., 55, 111-117.

- 19) Keene, H. J. (1963): Parotid fluid collection system with vacuum-trap modification. J. Dent. Res., 42, 1041.
- 20) Tsunasawa, S., Kondo, J. and Sakiyama, F. (1985): Isocratic separation of PTH-amino acid at picomole level by reverse-phase HPLC in the presence of sodium dodecylsulfate. J. Biochem., 97, 701-704.
- 21) Hunter, W. M. and Greenwood, F. C. (1962): Prepararion of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. Nature, 194, 495-496.

- 22) Neufeld, G. and Gospodarowicz, D.
(1986): Basic and acidic fibroblast
growth factors interact with the same
cell surface receptors. J. Biol.
Chem., 261, 5631-5637.
- 23) Laemmli, U. K. (1970): Cleavage of
structural proteins during the
assembly of the head of bacteriophage
T4. Nature, 227, 680-685.
- 24) Oppenheim, F. G., Xu, T., McMillian,
F. M., Levitz, S. M., Diamond, R. D.,
Offner, G. D. and Troxler, R. F. (1988)
: Histatins, a novel family of
histidine-rich proteins in human
parotid secretion. Isolation,
characterization, primary structure,
and fungistatic effects on Candida

albicans. J. Biol. Chem., **263**, 7472-7477.

25) Hay, D. I. (1975): Fractionation of human parotid salivary proteins and the isolation of an histidine-rich acidic peptide which shows high affinity for hydroxyapatite surfaces. Archs oral Biol., **20**, 553-558.

26) Baum, B. J., Bird, J. L., Millar, D. B. and Longton, R. W. (1976): Studies on histidine-rich polypeptides from human parotid saliva. Arch. Biochem. Biophys., **177**, 427-436.

27) MacKay, B. J., Pollock, J. J., Iacono, V. J. and Baum, B. J. (1984): Isolation of milligram quantities of a group of histidine-rich polypeptides

from human parotid saliva. Infect. Immun., 44, 688-694.

28) MacKay, B. J., Denepitiya, L.,
Iacono, V. J., Krost, S. B. and
Pollock, J. J. (1984): Growth-
inhibitory and bactericidal effects of
human parotid salivary histidine-rich
polypeptides on Streptococcus mutans.
Infect. Immun., 44, 695-701.

29) Pollock, J. J., Denepitiya, L.,
MacKay, B. J. and Iacono, V. J. (1984)
: Fungistatic and Fungicidal activity
of human parotid salivary histidine-
rich polypeptides on Candida albicans.
Infect. Immun., 44, 702-707.

30) Santarpia III, R. P., Brant, E. C.,
Lal, K., Brasseur, M. M., Hong, A. L.

and Pollock, J. J. (1988): A comparison of the inhibition of blastospore viability and germ-tube development in Candida albicans by histidine peptides and ketoconazole. Archs oral Biol., **33**, 567-573.

31) Raj, P. A., Edgerton, M. and Levine, M. J. (1990): Salivary histatin 5: Dependence of sequence, chain length, and helical conformation for candidacidal activity. J. Biol. Chem., **265**, 3398-3905.

32) Santarpia III, R. P., Cho, M. I. and Pollock, J. J. (1990): Parameters affecting the inhibition of Candida albicans GDH 2023 and GRI 2773 blastospore viability by purified synthetic salivary histidine-rich

polypeptides. Oral Microbiol.

Immunol., 5, 226-232.

33) Brant, E. C., Santarpia III, R. P.
and Pollock, J. J. (1990): The role of
pH in salivary histidine-rich
polypeptide antifungal germ tube
inhibitory activity. Oral Microbiol.
Immunol., 5, 336-339.

34) Payne, J. B., Iacono, V. J.,
Crawford, I. T., Lepre, B. M.,
Bernzweig, E. and Grossbard, B. L.
(1991): Selective effects of
histidine-rich polypeptides on the
aggregation and viability of
Streptococcus mutans and Streptococcus
sanguis. Oral Microbiol. Immunol., 6,
169-176.

- 35) Xu, T., Levitz, S. M., Diamond, R. D. and Oppenheim, F. G. (1991): Anticandidal activity of major human salivary histatins. Infect. Immun., **59**, 2549-2554.
- 36) Troxler, R. F., Offner, G. D., Xu, T., vanderSpek, J. C. and Oppenheim, F. G. (1990): Structural relationship between human salivary histatins. J. Dent. Res., **69**, 2-6.
- 37) Savatini, L. M., Warner, T. F., Saitoh, E. and Azen, E. A. (1989): Tissue distribution of RNAs for cystatins, histatins, statherin, and proline-rich salivary proteins in humans and macaques. J. Dent. Res., **68**, 1138-1145.

- 38) vanderSpek, J. C., Wyandt, H. E.,
Skare, J. C., Milunsky, A., Oppenheim,
F. G. and Troxler, R. F. (1989):
Localization of the genes for
histatins to human chromosome 4q13 and
tissue distribution of the mRNAs. Am.
J. Hum. Genet., 45, 381-387.
- 39) Sugiyama, K., Ogino, T. and Ogata,
K. (1990): Rapid purification and
characterization of histatins
(histidine-rich polypeptides) from
human whole saliva. Archs oral Biol.,
35, 415-419.
- 40) 緒方憲一郎 (1990): ヒト唾液中のヒス
タチンに関する研究。一分離, 精製とヒス
タミン遊離。歯基礎誌, 32, 671-685, 平
成 2.

- 41) vanderSpek, J. C., Offner, G. D.,
Troxler, R. F. and Oppenheim, F. G.
(1990): Molecular cloning of human
submandibular histatins. Archs oral
Biol., **35**, 137-143.
- 42) 竹下哲生 (1989): Bacteroides
loescheii ATCC 15930株の産生するノイラ
ミニダーゼの精製とその諸性質. 阪大歯学
誌, **34**, 322-342, 平成1.
- 43) Lantz, M. S., Rowland, R. W.,
Switalski, L. M. and Hook, M. (1986):
Interaction of Bacteroides gingivalis
with fibrinogen. Infect. Immun., **54**,
654-658.
- 44) Lantz, M. S., Allen, R. D., Vail, T.
A., Switalski, L. M. and Hook, M.
(1991): Specific cell components of

Bacteroides gingivalis mediate binding
and degradation of human fibrinogen.

J. Bacteriol., 173, 495-504.

45) Murakami, Y., Shizukuishi, S.,
Tsunemitsu, A., Nakashima, K., Kato,
Y. and Aimoto, S. (1991): Binding of a
histidine-rich peptide to
Porphyromonas gingivalis. FEMS
Microbiol. Lett., 82, 253-256.

46) Toda, K., Otsuka, M., Ishikawa, Y.,
Sato, M., Yamamoto, Y. and Nakamura,
R. (1984): Thiol-dependent
collagenolytic activity in culture
media of Bacteroides gingivalis. J.
Periodont. Res., 19, 372-381.

47) Sundqvist, G., Carlsson, J. and
Hanstrom, L. (1987): Collagenolytic

activity of black-pigmented
Bacteroides species. J. Periodont.
Res., 22, 300-306.

- 48) Ono, M., Okuda, K. and Takazoe, I.
(1987): Purification and
characterization of a thiol-protease
from *Bacteroides gingivalis* strain
381. Oral Microbiol. Immunol., 2, 77-
81.
- 49) Suido, H., Neiders, M. E., Baura, P.
K., Nakamura, M., Mashimo, P. A. and
Genco, R. J. (1987): Characterization
of N-CBz-glycyl-glycyl-arginyl
peptidase and glycyl-prolyl peptidase
of *Bacteroides gingivalis*. J.
Periodont. Res., 22, 412-418.

- 50) Tsutsui, H., Kinouchi, T., Wakano,

Y. and Ohnishi, Y. (1987):

Purification and characterization of a
protease from Bacteroides gingivalis
381. Infect. Immun., 55, 420-427.

51) Nishikata, M., Yoshimura, F. and

Nodasaka, Y. (1989): Possibility of
Bacteroides gingivalis hemagglutinin
possessing protease activity revealed
by inhibition studies. Microbiol.
Immunol., 33, 75-80.

52) Nishikata, M., Kanehira, T., Oh, H.,

Tani, H., Tazaki, M. and Kuboki, Y.
(1991): Salivary histatin as an
inhibitor of a protease produced by
the oral bacterium Bacteroides
gingivalis. Biochem. Biophys. Res.
Commun., 174, 625-630.

53) Otsuka, M., Endo, J., Hinode, D.,
Nagata, A., Maehara, R., Sato, M. and
Nakamura, R. (1987): Isolation and
characterization of protease from
culture supernatant of Bacteroides
gingivalis. J. Periodont. Res., 22,
491-498.

脚 注

大 阪 大 学 歯 学 部 予 防 歯 科 学 講 座 （ 主 任 ： 常 光
旭 教 授 ）

図の説明

- 図 1 DEAE-Sephadex A-25 によるイオン交換クロマトグラフィパターン
赤血球凝集活性の阻害が認められた画分を — で示した。
- 図 2 Sephadex G-25 によるゲル濾過パターン
赤血球凝集活性の阻害が認められた画分を — で示した。
- 図 3 SDS-PAGE による部分精製標品の泳動像
レーン： 1. 部分精製標品
2. 分子量測定用標準ペプチド標品

図 4 YMC-GEL ODS S5による逆相HPLCパターン

矢印で示したピークを集めた。

図 5 精製ペプチドによる P. gingivalis 381株菌体と赤血球との凝集の阻害曲線

— : 対照

---- : 精製ペプチド (10^{-5} M)

図 6 P. gingivalis 381株菌体と標識ペプチドとの結合の経時的变化

○ : 総結合 (cpm)

△ : 非特異的結合 (cpm)

● : 特異的結合 (cpm)

図 7 P. gingivalis 381株菌体と標識ペプチドとの結合に及ぼすペプチドの影響

図 8 P. gingivalis 381株菌体と標識ペプチドとの結合に及ぼす菌体量の影響

○ : 総結合 (c p m)

△ : 非特異的結合 (c p m)

● : 特異的結合 (c p m)

図 9 P. gingivalis 381株菌体と標識ペプチドとの結合の飽和曲線

○ : 総結合 (c p m)

△ : 非特異的結合 (c p m)

● : 特異的結合 (c p m)

図 10 P. gingivalis 381株菌体のペプチドレセプターの Scatchard 解析

図 1 1 標 識 ペ プ チ ド - レ セ プ タ ー 複 合 体 の
オ ー ト ラ ジ オ グ ラ フ ィ

レ ー ン : 1 . 標 識 ペ プ チ ド と 非 標 識
ペ プ チ ド を 添 加 し た も
の .

2 . 標 識 ペ プ チ ド の み 添 加
し た も の .

表 の 説 明

表 1 精製標品のアミノ酸組成

* : () 内に推定される残基数を示す。

表 2 マイクロタイタープレート法で測定した合成ペプチドによる P. gingivalis 381 株の赤血球凝集活性の阻害

対照として Bradykinin potentiator C を用いた。

表 3 吸光度計で測定した合成ペプチドによる P. gingivalis 381 株の赤血球凝集活性の阻害

対照として Bradykinin potentiator C を用いた。

ペプチド I, II の一次構造は表 2 に示したものと同一である。

表中の数値は 2 回の実験の平均値を示す。

表 4 標識ペプチドと口腔細菌, 赤血球との結合性

表中の数値は 2 回の実験の平均値を表す。

表 5 標識ペプチドと P. gingivalis 381 株との結合に及ぼす 2 価金属イオンの影響

表中の数値は 2 回の実験の平均値を示す。

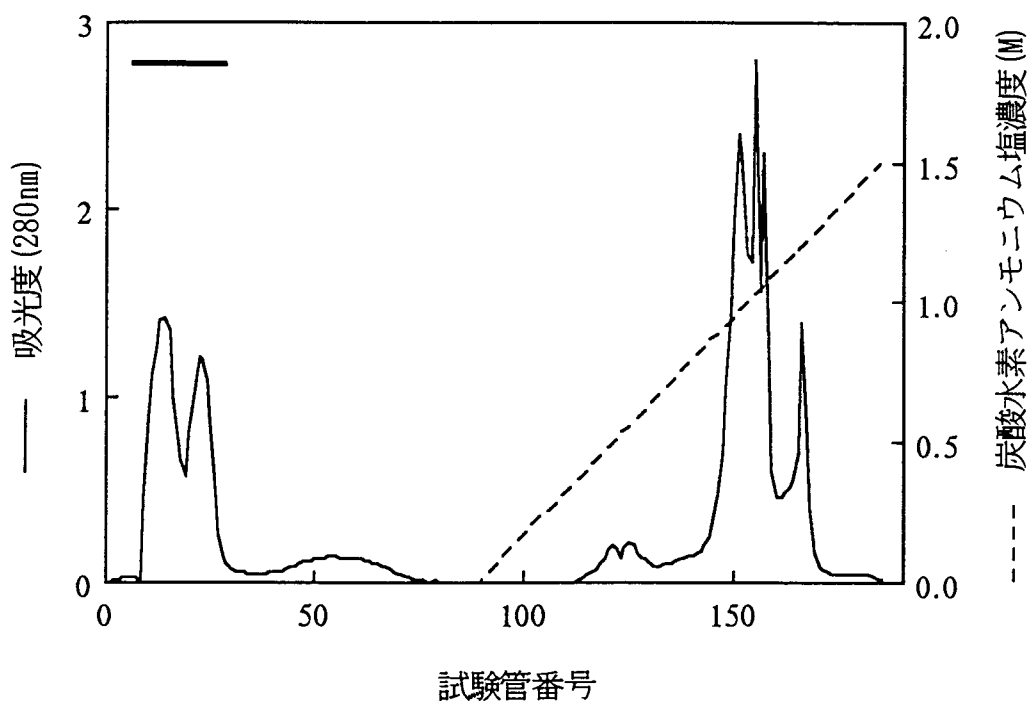


図1 DEAE-Sephadex A-25によるイオン交換クロマトグラフィパターン
赤血球凝集活性の阻害が認められた画分を —— で示した。

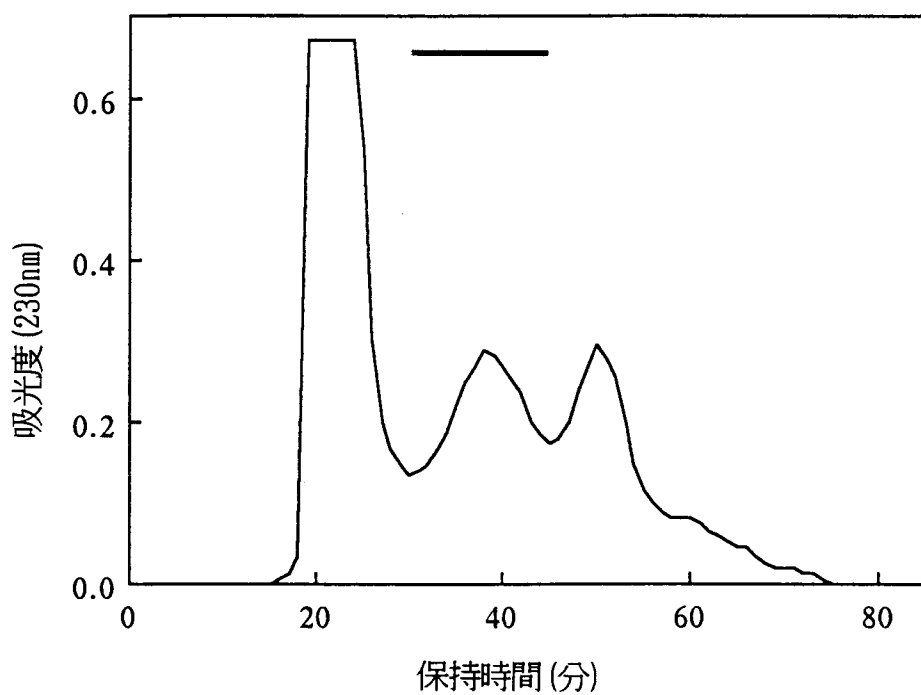


図2 Sephadex G-25 によるゲル濾過パターン
赤血球凝集活性の阻害が認められた画分を ——— で示した.

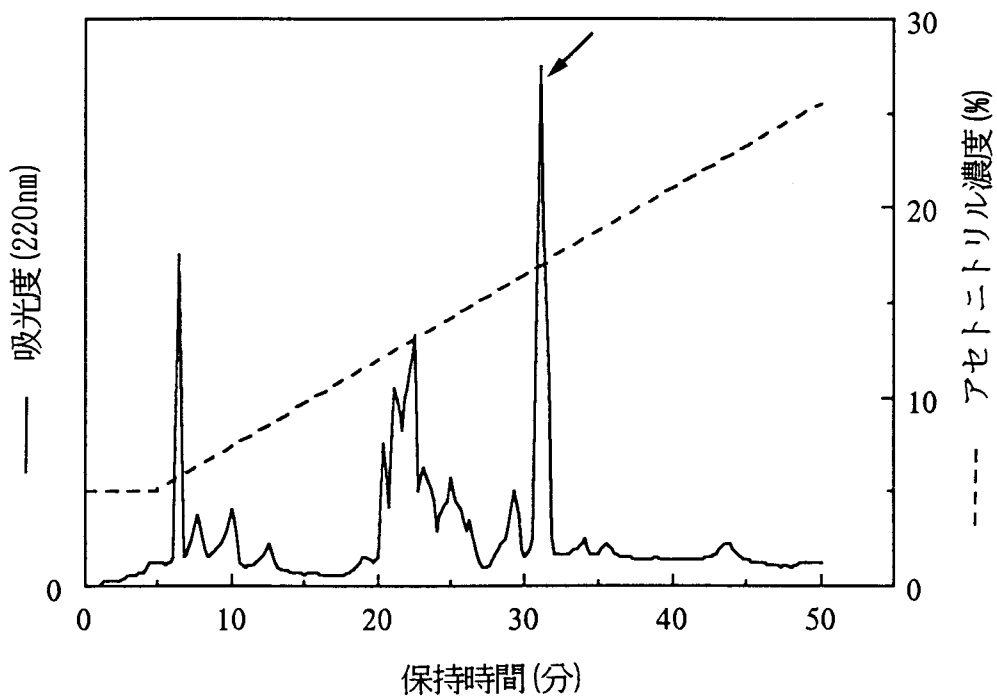


図4 YMC-GEL ODS S5による逆相HPLCパターン
矢印で示したピークを集めた。

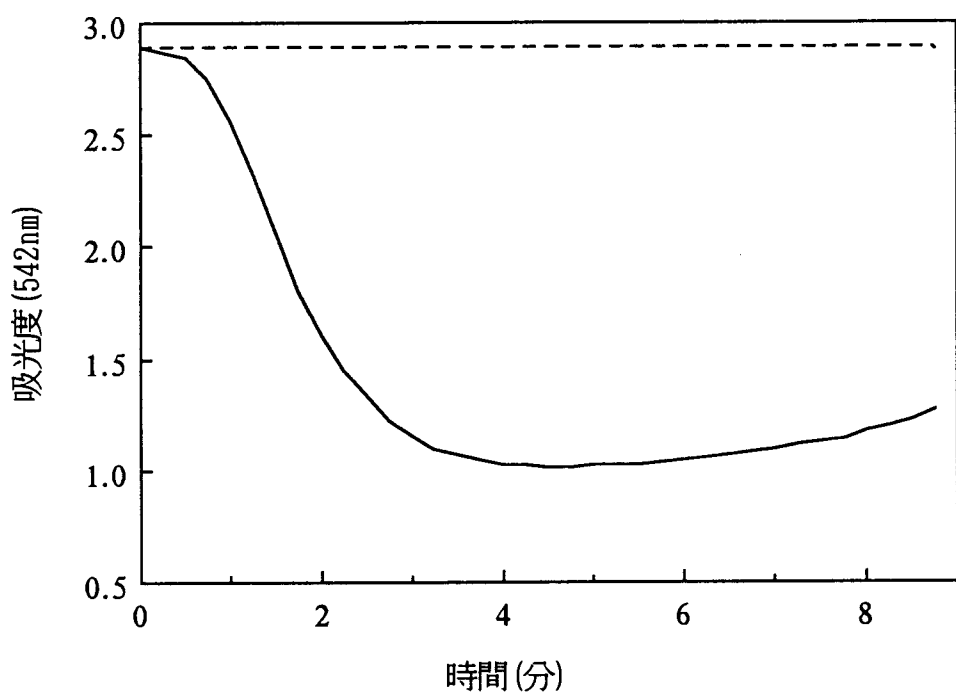


図5 精製ペプチドによる *P. gingivalis* 381 株菌体と赤血球との凝集の阻害
曲線

————— : 対照

----- : 精製ペプチド (1×10^{-5} M)

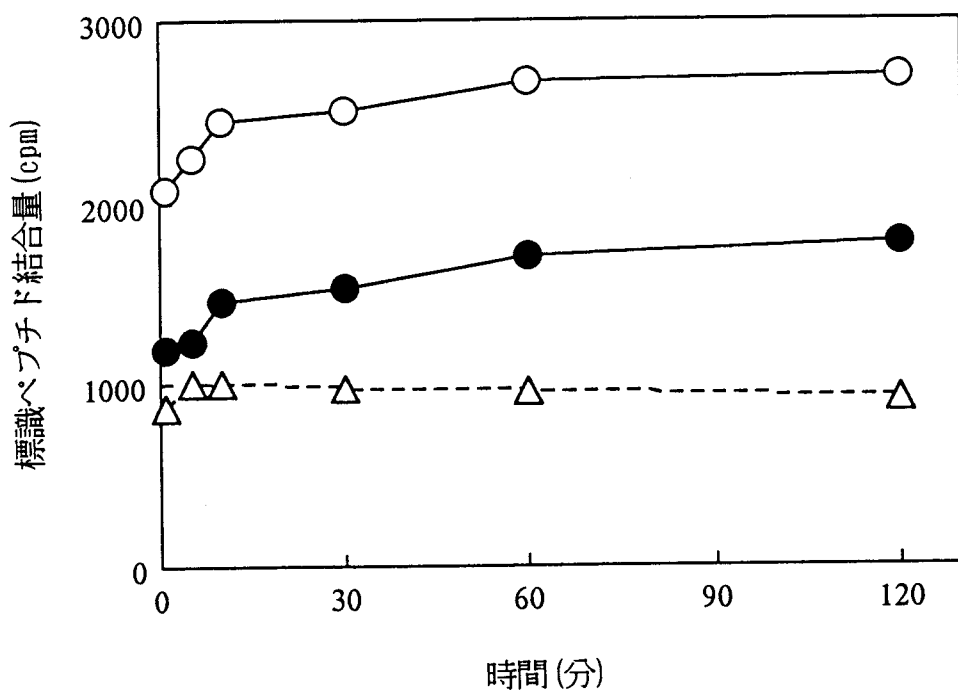


図6 *P. gingivalis* 381株菌体と標識ペプチドとの結合の経時的変化
 ○：総結合 (cpm)
 △：非特異的結合 (cpm)
 ●：特異的結合 (cpm)

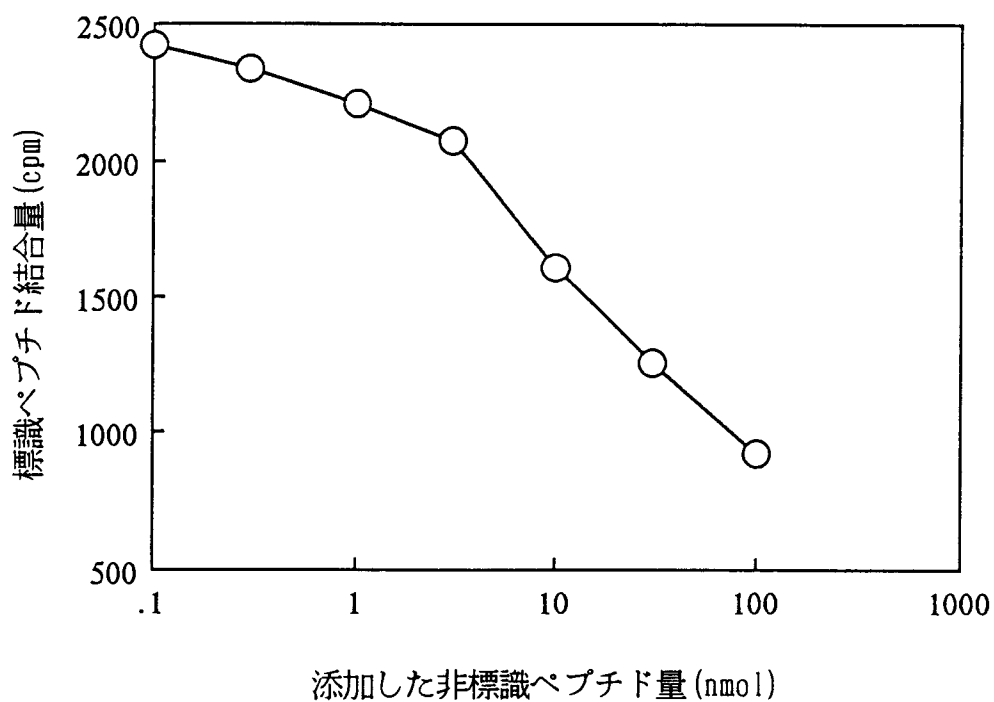


図7 *P. gingivalis* 381株菌体と標識ペプチドとの結合に及ぼす非標識ペプチドの影響

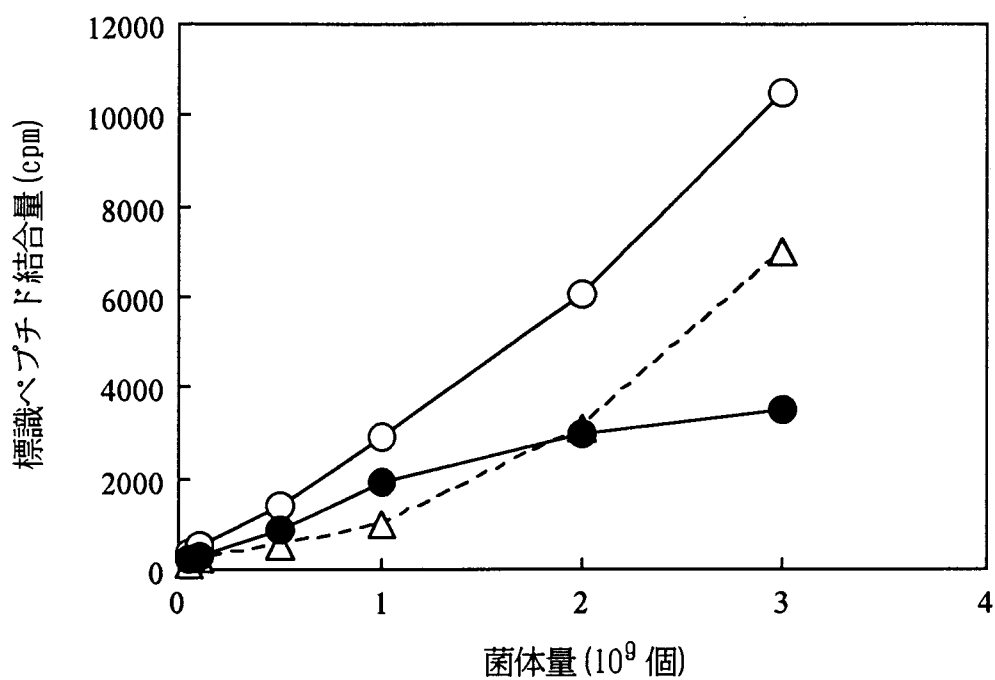


図8 *P. gingivalis* 381株菌体と標識ペプチドとの結合に及ぼす菌体量の影響
 ○：総結合 (cpm)
 △：非特異的結合 (cpm)
 ●：特異的結合 (cpm)

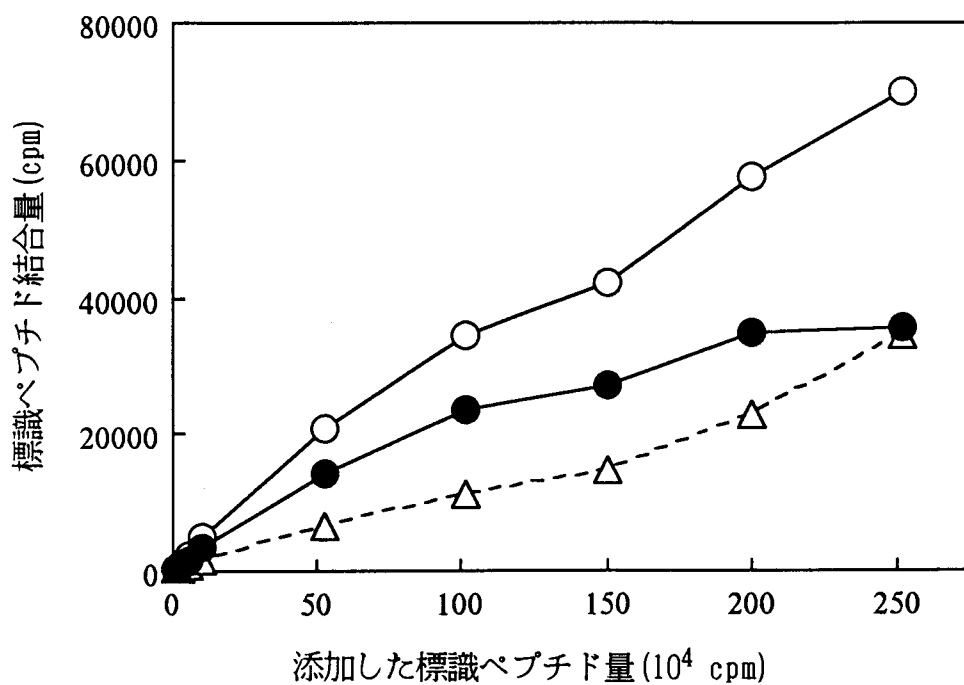


図9 *P. gingivalis* 381株菌体と標識ペプチドとの結合の飽和曲線
 ○：総結合 (cpm)
 △：非特異的結合 (cpm)
 ●：特異的結合 (cpm)

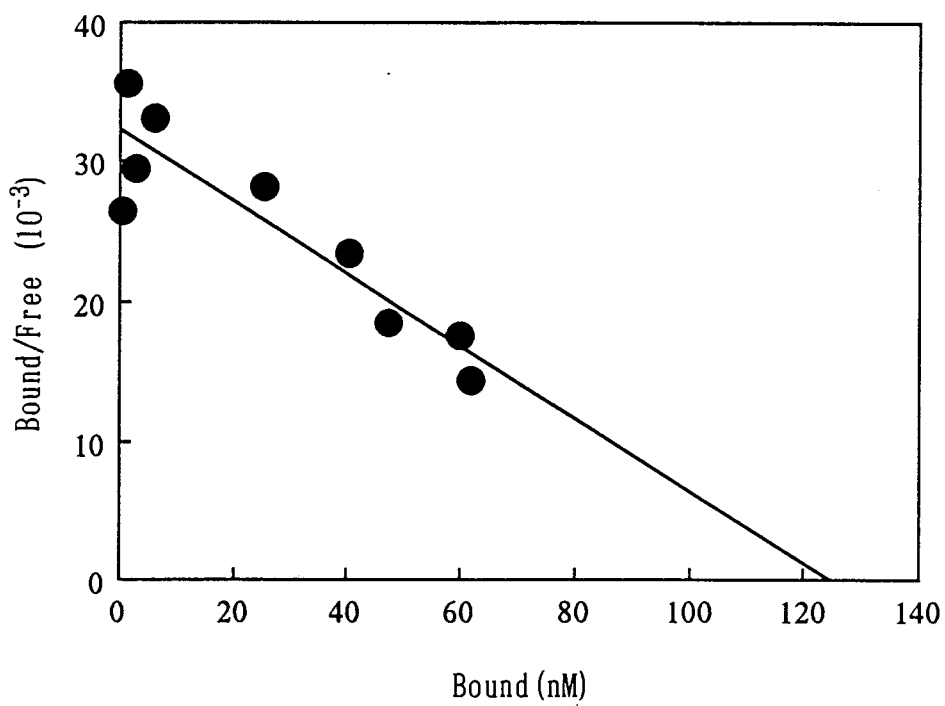


図10 *P. gingivalis* 381株菌体のペプチドレセプターのScatchard 解析

表1 精製標品のアミノ酸組成

アミノ酸	部分精製標品	精製標品
アスパラギン酸	1. 6 8	0. 0 7
スレオニン	0. 0 7	0. 0 0
セリン	2. 3 0	0. 9 1 (1) *
グルタミン酸	3. 0 2	1. 3 4 (1)
プロリン	3. 6 5	0. 0 0
グリシン	3. 0 4	1 (1)
アラニン	1	0. 0 2
バリン	0. 1 3	0. 0 3
メチオニン	0. 0 3	0. 0 2
イソロイシン	0. 1 2	0. 0 0
ロイシン	0. 2 1	0. 0 0
チロシン	0. 7 0	0. 9 6 (1)
フェニルアラニン	0. 9 5	0. 9 9 (1)
ヒスチジン	3. 8 8	3. 8 0 (4)
リジン	3. 9 3	1. 8 9 (2)
アルギニン	3. 1 1	1. 0 6 (1)
[M+H] ⁺		1 5 6 2. 9 m. u.

* : () 内に推定される残基数を示す.

表2 マイクロタイタープレート法で測定した合成ペプチドによる *P. gingivalis* 381 株菌体の赤血球凝集活性の阻害

ペプチド	一次構造	最小阻止濃度 (μ M)
対照	1 5 10 Pyr-Gly-Leu-Pro-Pro-Gly-Pro-Pro-Ile-Pro- 11 Pro	>420.0
I	1 5 10 Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-Ser-His-Arg- 11 Gly-Tyr	6.4
II	1 5 10 Asp-Ser-His-Ala-Lys-Arg-His-His-Gly-Tyr- 11 15 20 Lys-Arg-Lys-Phe-His-Glu-Lys-His-His-Ser- 21 His-Arg-Gly-Tyr	0.8

対照として Bradykinin potentiator C を用いた。

表 3 吸光度計で測定した合成ペプチドによる *P. gingivalis* 381 株菌体の赤血球凝集活性の阻害

ペプチド濃度 (M)	阻害率 (%)		
	対照	I	II
1×10^{-4}	0	100	100
5×10^{-5}	0	100	100
1×10^{-5}	0	100	100
5×10^{-6}	0	96	100
1×10^{-6}	0	25	68
5×10^{-7}	0	10	14
1×10^{-7}	0	0	7
5×10^{-8}	0	0	0

対照としてBradykinin potentiator Cを用いた。

ペプチド I, II の一次構造は表 2 に示したものと同一である。

表中の数値は 2 回の実験の平均値を示す。

表 4 標識ペプチドと口腔細菌，赤血球との結合性

菌株	特異的結合 (cpm)	
	4 °C	37 °C
<u>Porphyromonas gingivalis</u> 381	1928	2892
<u>Porphyromonas gingivalis</u> ATCC 33277	1499	906
<u>Prevotella loescheii</u> ATCC 15930	656	1006
<u>Prevotella melaninogenica</u> ATCC 25845	2400	640
<u>Prevotella intermedia</u> ATCC 25261	1561	1036
<u>Prevotella denticola</u> ATCC 33185	1740	1674
<u>Streptococcus cricetus</u> E49 (a)*	54	171
<u>Streptococcus rattus</u> FA-1 (b)	257	80
<u>Streptococcus mutans</u> NCTC 10449 (c)	50	82
<u>Streptococcus sobrinus</u> B13 (d)	5	45
<u>Streptococcus mutans</u> MT703R (e)	675	248
<u>Streptococcus mutans</u> OMZ175 (f)	43	206
<u>Streptococcus sobrinus</u> 6715 (g)	57	282
<u>Streptococcus downei</u> MFe28 (h)	61	91
<u>Streptococcus mitis</u> ATCC 9811	305	306
<u>Streptococcus sanguis</u> ATCC 10557	92	6
赤血球	107	939

* : 血清型を示す.

表中の数値は 2 回の実験の平均値を表す.

表 5 標識ペプチドと *P. gingivalis* 381 株との結合に及ぼす 2 価金属イオンの影響

2 価金属イオン (500 μ M)	特異的結合 (cpm)	相対的結合度 (倍)
対照	1454	1
Mn ²⁺	3175	2.2
Ca ²⁺	1687	1.2
Mg ²⁺	1640	1.1
Fe ²⁺	1632	1.1
Zn ²⁺	8015	5.5
Cu ²⁺	40264	27.7
Ni ²⁺	2905	2.0
Co ²⁺	3157	2.1
Cd ²⁺	6557	4.5

表中の数値は 2 回の実験の平均値を示す。

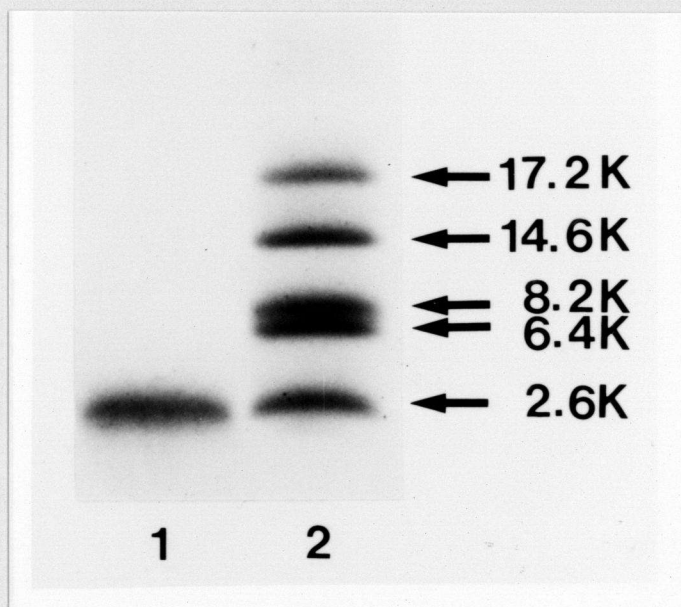


図 3 SDS-PAGEによる部分精製標品の泳動像
 レーン：1. 部分精製標品
 2. 分子量測定用標準ペプチド標品

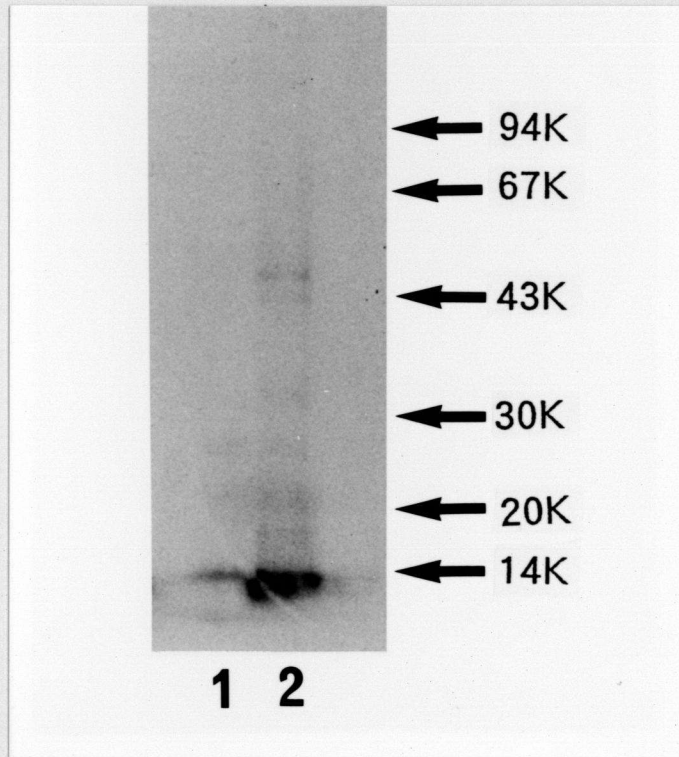


図 1 1 標識ペプチド-レセプター複合体のオートラジオグラフィ
 レーン：1. 標識ペプチドと非標識ペプチドを添加したもの
 2. 標識ペプチドのみ添加したもの