

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	
Issue Date	
oaire:version	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3089981
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	むら 村 上 幸 孝
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学位記番号	第 1 0 3 0 3 号
学位授与年月日	平成 4 年 4 月 8 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当
学位論文名	<i>Porphyromonas gingivalis</i> 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
論文審査委員	(主査) 教授 常光 旭 (副査) 教授 鈴木不二男 教授 祖父江鎮雄 助教授 小川 知彦

論 文 内 容 の 要 旨

成人性歯周炎の病原性菌として、現在、注目されている *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* は、赤血球をはじめ口腔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。Slots と Gibbons(1978) 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物質が存在することを初めて指摘した。その後、ヒト唾液に存在する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かった。

この研究で、著者は低分子量の阻害ペプチドに焦点を絞り、クエン酸刺激により採取したヒト耳下腺由来の唾液から、*P. gingivalis* 381株のもつ赤血球凝集活性の阻害度を指標として、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、さらにSephadex G-25を用いたゲル濾過、逆相HPLCを組み合わせて、阻害活性を示すペプチドを分離・精製した。次いで、精製標品のアミノ酸組成とアミノ酸配列を、アミノ酸分析計と気相式シーケンサーならびに質量分析計を用いて分析した。その結果、精製標品はアミノ酸残基12個のペプチドで、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。さらに、ペプチド合成装置を用いて固相法により、精製ペプチドと全く同じ配列をもつペプチドを合成し、赤血球凝集活性に及ぼす影響をマイクロタイタープレート法ならびに542 nmにおける吸光度の減少度から調べたところ、精製したペプチドは合成品と同程度に *P. gingivalis* の赤血球凝集活性を 10^{-6} Mの濃度で完全に阻害した。さらに、クロラミンT法によりNa¹²⁵Iでヨード化した合成品を用いて、口腔レンサ球菌および偏性嫌気性菌を含む16菌株と合成ペプチドとの結合性を調べると、*P. gingivalis* を含む偏性嫌気性菌との結合能が強かったが、赤血球に対しては、本ペプチドの結合性は極めて弱いものであった。次いで、*P. gingivalis* と合成ペプチドとの結合実験の結果を基にして、Scatchard解析を行い、本ペプチドとレセプターの親和性(Kd値)および細胞1個当りのレセプター数を4℃の条件下で求めると、Kd値は 3.9×10^{-6} 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。また、Cu²⁺存在下でレセプターと標識ペプチドとをDisuccinimidyl suberate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44KDaと41KDaにレセプターが認められた。

以上の結果から、ヒト耳下腺由来の唾液より、*P. gingivalis* 381株の赤血球凝集活性を阻害するペプチドを精製したところ、1) 本物質はヒスチジン含量の多い塩基性ペプチドであり、分子量は1562であること、2) 本ペプチドは*P. gingivalis*と強く結合することにより、赤血球凝集阻止を起こすこと、3) *P. gingivalis*の菌表面に、本ペプチドに対して、Kd値が 3.9×10^{-6} Mで、細胞1個当たり 1.5×10^4 個のレセプターが存在することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本研究は *Porphyromonas gingivalis* 381株のもつ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を精製し、その諸性質を調べたものである。

その結果、1) 精製標品はヒスチジン含量の多い塩基性ペプチドであり、その一次構造は Lys - Phe - His - Glu - Lys - His - His - Ser - His - Arg - Gly - Tyr で、分子量は1562であること、2) 本ペプチドは *P. gingivalis* と強く結合することにより、赤血球凝集阻止を起こすこと、3) *P. gingivalis* の菌表面に、本ペプチドに対してKd値が 3.9×10^{-6} M で、細胞1個当たり 1.5×10^4 個のレセプターが存在することが明らかとなった。

この論文は *P. gingivalis* の口腔内での動態と唾液ペプチドとの係わり合いを解析する上で、重要かつ新たな知見を示したものであり、博士(歯学)の学位に十分値するものと認める。