



Title	ヒトフィブリノーゲンによる <i>Porphyromonas gingivalis</i> と <i>Streptococcus oralis</i> との共凝集の阻害
Author(s)	永田, 英樹
Citation	大阪大学, 1994, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3075156">https://doi.org/10.11501/3075156</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	永 なが 田 ひで 英 き 樹
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 1 1 0 4 0 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 6 年 1 月 20 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	ヒトフィブリノーゲンによる <i>Porphyromonas gingivalis</i> と <i>Streptococcus oralis</i> との共凝集の阻害
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 霽石 聰 (副査) 教 授 岡田 宏 助教授 大嶋 隆 助教授 小川 知彦

### 論 文 内 容 の 要 旨

成人性歯周炎の有力な原因菌として注目されている *Porphyromonas gingivalis* が歯肉溝内に定着する過程において、先に定着しているグラム陽性菌への本菌の付着が重要な役割を果たすといわれている。そして、近年、*P. gingivalis* とグラム陽性菌との付着や共凝集が、ヒト唾液や血清により阻害されることが報告されていることから、唾液や歯肉溝浸出液中に存在するある成分が、歯肉溝内で *P. gingivalis* のグラム陽性菌への付着を阻害する宿主防御因子として作用していると考えられる。しかしながら、これら体液中に含まれている付着阻害因子の本態についての解明はあまり進展しておらず、従って、その阻害機序についても殆ど不明である。

この研究で、著者は、濁度分光分析法を用いて、*P. gingivalis* 381株と *Streptococcus oralis* ATCC 9811株との共凝集を定量的に測定し、この共凝集に及ぼす体液の影響を調べた。ヒト混合唾液、顎舌下腺唾液、耳下腺唾液および血漿はすべて濃度依存的にこの共凝集を阻害し、なかでも、歯肉溝浸出液に似た成分を示す血漿が最も強い阻害を示した。さらに、供試したヒト血漿由来の主なタンパク質のなかでは、フィブリノーゲンが最も強い阻害を示した。これらのことから、共凝集を阻害する体液中に存在する因子として、フィブリノーゲンに焦点を当て、その阻害機序を調べた。

種々のフィブリノーゲンフラグメントを用いて共凝集阻害を調べたところ、フィブリノーゲンの COOH 末端領域にあたるフラグメント D は、NH<sub>2</sub>末端領域にあたるフラグメント E よりも強い阻害を示した。フィブリノーゲンを構成する 3 本のポリペプチド鎖のなかでは、A $\alpha$ 鎖が最も強い阻害を示し、 $\gamma$ 鎖にも阻害がみられたが、B $\beta$ 鎖には阻害はみられなかった。A $\alpha$ 鎖および $\gamma$ 鎖をさらに臭化シアンで処理し、得られた画分のアミノ酸配列を決定後、その阻害活性を調べた。A $\alpha$ 鎖を処理して得られたフラグメントには共凝集を阻害するフラグメントがいくつかみられたが、NH<sub>2</sub>末端148番目から207番目のアミノ酸残基よりなるフラグメント(A $\alpha$  148-207)が最も強い阻害を示した。一方、 $\gamma$ 鎖を処理して得られたフラグメントのなかでは、NH<sub>2</sub>末端フラグメントが最も強い阻害を示したが、ブドウ球菌クランプ因子の結合部位として知られている COOH 末端フラグメントにはわずかな阻害しかみられなかった。フラグメント D の A $\alpha$ 鎖にはほぼ相当する A $\alpha$  148-207をさらにリシリエンドペプチダーゼで処理して得られた

フラグメントでは、 $A\alpha 158-176$ と $A\alpha 192-206$ が濃度依存的に共凝集を阻害した。この2つのフラグメントのアルギニン残基をフェニルグリオキサールを用いて化学修飾したところ、その阻害活性は著しく低下した。

フィブリノーゲンによる共凝集阻害の過程において、フィブリノーゲンがどちらの菌体に作用して阻害を起こすのかを調べるために、予めフィブリノーゲンと片方の菌体とを反応させた後、通法で共凝集活性を測定した。どちらの菌体をフィブリノーゲンで前処理しても共凝集の阻害はみられなかったが、 $N$ -エチルマレイミド (NEM),  $p$ -クロロマーキュリフェニルスルホン酸あるいは $N\alpha$ - $p$ -トシル-L-リシンクロロメチルケトン存在下で、*P. gingivalis* 381株をフィブリノーゲンで前処理すると、いずれの場合も共凝集の阻害がみられるようになった。一方、*S. oralis* ATCC 9811株の場合には、これらのプロテアーゼインヒビターを添加しても共凝集の阻害はみられなかった。これらの結果から、プロテアーゼインヒビター非存在下では、フィブリノーゲンは *P. gingivalis* 381株菌体のもつチオール依存性のトリプシン様プロテアーゼによって分解され共凝集阻害活性を消失することが、また、プロテアーゼインヒビター存在下では、フィブリノーゲンは *P. gingivalis* 381株菌体に結合し共凝集阻害活性を発現することが示唆された。両菌体によるフィブリノーゲンの結合と分解を確かめるため、NEM 存在下あるいは非存在下で、菌体と<sup>125</sup>I 標識フィブリノーゲンとを反応させ、その反応上清または菌体抽出物を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、オートラジオグラフィを行った。*P. gingivalis* 381株の場合、NEM 非存在下では、反応上清および菌体抽出物には放射活性をもつバンドはほとんどみられなかったが、NEM 存在下では、フィブリノーゲンの大部分は分解せずに菌体より抽出された。一方、*S. oralis* ATCC 9811株の場合には、NEM の有無にかかわらず菌体抽出物にはフィブリノーゲンに相当するところに弱い放射活性を示すバンドがみられた。また、各菌体とフィブリノーゲンとの結合を<sup>125</sup>I 標識フィブリノーゲンを用いて測定した結果、*P. gingivalis* 381株は、*S. oralis* ATCC 9811株よりもフィブリノーゲンに対して高い親和性を示した。

以上の結果より、*P. gingivalis* 381株と *S. oralis* ATCC 9811株との共凝集は、ヒトフィブリノーゲンにより強く阻害されることが明らかにされた。このフィブリノーゲンによる共凝集の阻害は、フィブリノーゲンが *P. gingivalis* 381株菌体に結合することにより生ずること、また、その阻害には、フィブリノーゲン分子内のいくつかの領域が関与し、さらに、それら領域に存在するアルギニン残基が重要な役割を担っ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 *Porphyromonas gingivalis* 381株と *Streptococcus oralis* ATCC 9811株との共凝集に及ぼすヒトフィブリノーゲンの影響について調べたものである。

その結果、フィブリノーゲンは *P. gingivalis* と *S. oralis* との共凝集を強く阻害することが明らかにされた。このフィブリノーゲンによる阻害は、フィブリノーゲンが *P. gingivalis* 381株菌体に結合することにより生ずること、また、その阻害には、フィブリノーゲン分子内のいくつかの領域が関与し、さらに、それら領域に存在するアルギニン残基が重要な役割を担っていることが示された。

この論文は、*P. gingivalis* の歯肉溝内への定着の過程における本菌と体液中に存在する付着阻害因子との相互の係わりを解析する上で、重要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。