

Title	ヒトフィブリノーゲンによる Porphyromonas gingivalis と Streptococcus oralis 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	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

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

Osaka University

ヒトフィブリノーゲンによる Porphyromonas  
gingivalis と Streptococcus oralis との  
共凝集の阻害

永田英樹

Inhibition of coaggregation between  
Porphyromonas gingivalis and Streptococcus  
oralis by human fibrinogen

Hideki Nagata

## 緒言

Porphyromonas gingivalisは、歯周炎病巣より高頻度に分離され、歯周炎を惹起する種々の病原因子を有することから、成人性歯周炎の有力な病原菌として注目されている<sup>1-3)</sup>。本菌が歯周病原性を発揮するためには、まず、歯肉溝内の歯面や歯肉溝上皮表面などに付着し、集落を作り、歯肉縁下歯垢を形成することが必要である<sup>4)</sup>。P. gingivalisは、歯肉溝上皮細胞<sup>4)</sup>や頬粘膜細胞への付着能<sup>4, 5)</sup>、唾液で被覆されたハイドロキシアパタイトに対する付着能<sup>4, 6)</sup>および口腔内に存在するある種のグラム陽性菌との共凝集能(異種菌体間の凝集能)<sup>7-13)</sup>など、種々の付着能をもっていることが明らかにされている。SlotsとGibbons<sup>4)</sup>は、P. gingivalisの歯周ポケット内への定着には、既に形成された歯垢中に存在するグラム陽性菌菌体への付着が重要であることを示唆した。その後、Kolenbranderら<sup>14)</sup>は、P. gingivalisと他の多くの口腔細菌との共凝集について、肉眼での半定量的な方法で調べたところ、P. gingivalisとグラム陽性菌との間には、共凝集がほとんどみられなかったと報告した。しかしながら、最近では、共凝集活性や付着能に対する測定法の改良に伴い、P. gingivalisが、Actinomyces viscosus<sup>8-11)</sup>、Streptococcus gordonii<sup>12)</sup>、Streptococcus sanguis<sup>13)</sup>およびStreptococcus oralis<sup>13)</sup>のようなグラム陽性菌と付着または共凝集するという報告がみられるようになってきている。従って、P. gingivalisとグラム陽性口腔細菌との相互作用は、P. gingivalisの歯肉溝内での定着の第一歩として重要な役割を果たしていると考えられる。

唾液や歯肉溝浸出液は、細菌の口腔表面への付着を阻害し、歯垢形成を抑制する方向に作用する可能性が指摘されている<sup>15)</sup>。SlotsとGibbons<sup>4)</sup>は、P. gingivalisのハイドロキシアパタイト表面への付着は、唾液や血清により阻害されるが、本菌のグラム陽性菌への付着に対しては、唾液や血清は影響を及ぼさないと報告した。しかし、Ellenら<sup>16)</sup>は、in vitroで、ヒト混合唾液が、P. gingivalisのA. viscosusへの付着を阻害することを見出し、Stinsonら<sup>12)</sup>は、P. gingivalisのS. gordoniiへの付着が、混合唾液や血清により阻害されることを示した。従って、唾液や歯肉溝浸出液中に存在するある成分が、P. gingivalisの歯肉溝内での歯面や上皮表面への付着を制御する重要な宿主防御因子として働いていることが考えられる。これら体液中のP. gingivalisとグラム陽性菌との共凝集を阻害する因子を調べることは、宿主のもつ防御機構を明らかにするばかりでなく、P. gingi-

valisの他の細菌への付着機序の解明にも役立つかもしれない。本研究では、P. gingivalisと共凝集を起こすグラム陽性菌として、S. oralisを選んだ。そして、濁度分光分析法を用いて、P. gingivalisとS. oralisとの共凝集活性を定量的に測定し、この共凝集に及ぼすヒト唾液や血漿の影響を調べた。さらに、供試した血漿タンパク質のなかで最も強い阻害を示したフィブリノーゲンによる共凝集の阻害機序の一端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. 試薬

ヒト血漿由来のタンパク質として、アルブミン（和光純薬工業，大阪），フィブリノーゲン（KabiVitrum, Stockholm, Sweden）， $\beta_2$ -ミクログロブリン（Calbiochem Co., La Jolla, CA, U.S.A.），免疫グロブリンG（IgG；生化学工業，東京），フィブロネクチン（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, U.S.A.）， $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質（Sigma）， $\alpha_2$ -マクログロブリン（Sigma）およびトランスフェリン（Sigma）を用いた。なお、フィブリノーゲンは、Lysine-Sepharose 4B（Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Sweden）と混合し、プラスミンを除去した後、実験に供した。フィブリノーゲンのフラグメントのうち、フラグメントDおよびEはDiagnostica Stago（Asnières, France）より購入し、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法（方法は後述）で精製度を調べたところ、フラグメントDは分子量約85kDa、フラグメントEは分子量約50kDaに相当する部位にバンドがみられ、夾雑物の混入はほとんど認められなかった。また、フィブリノペプチドAはSigmaより得た。

プロテアーゼインヒビターとして、N-エチルマレイミド（NEM；和光純薬工業），p-クロロマーキュリフェニルスルホン酸（pCMPS；Sigma），N $\alpha$ -p-トシル-L-リシンクロロメチルケトン（TLCK；Sigma），フッ化フェニルメチルスルホニル（PMSF；和光純薬工業）およびエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（EDTA；和光純薬工業）を用いた。

### 2. 供試菌株

P. gingivalis 381株は、サンスター株式会社研究開発部より分与され、40mg/mlのトリプチケースソイアガー（BBL；Becton Dickinson Microbiology Systems, Cockeysville, MD, U.S.A.），1mg/mlの酵母エキス末（BBL），5 $\mu$ g/mlのヘミン，1

$\mu\text{g/ml}$ のメナジオンおよび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; Marietta, OH, U. S. A.)を用い、嫌气的条件下( $10\%\text{CO}_2$ ,  $10\%\text{H}_2$ ,  $80\%\text{N}_2$ )にて $35^\circ\text{C}$ 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 $1\text{mg/ml}$ の酵母エキス末、 $5\mu\text{g/ml}$ のヘミンおよび $1\mu\text{g/ml}$ 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、嫌气的条件下にて $35^\circ\text{C}$ で培養した。この培養液を同培養液90mlに移し、同一条件下で静止期初期(約18時間)まで培養した。S. oralis ATCC 9811株は、American Type Culture Collection(Rockville, MD, U. S. A.)より得た。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、 $4^\circ\text{C}$ 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を用いた。供試菌の培養は、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、大気中にて $37^\circ\text{C}$ で培養した。この培養液を同培養液90mlに移し、同一条件下で静止期初期(約12時間)まで静置培養した。

両供試菌株とも、 $8,000\times g$ , 20分間の遠心操作により集菌し、 $0.15\text{M}$ 塩化ナトリウムを含む $10\text{mM}$ リン酸ナトリウム塩緩衝液(PBS; pH6.0)で3回洗浄後、特に断らない限り、共凝集活性の測定には、 $1\times 10^9$ 個/ml,  $^{125}\text{I}$ 標識フィブリノーゲンとの結合実験には、 $4\times 10^9$ 個/mlの菌懸濁液を同緩衝液により調製した。懸濁液中の菌数は、Bürker-Türk型の血球計算盤を用いて算定し、その菌懸濁液の波長 $550\text{nm}$ の吸光度( $A_{550}$ )に基づき供試菌数を調整した。

### 3. 唾液および血漿の採取

唾液と血漿は、健康な歯周状態を有する20才から40才までの血液型O型の男子5人より得た。混合唾液は吐出法により、耳下腺唾液はガムによって刺激し、Keeneの方法<sup>17)</sup>により採取し、また、顎舌下腺唾液はクエン酸溶液によって刺激し、BlockとBrottmanの方法<sup>18)</sup>により採取した。各唾液は、食後少なくとも2時間後に、氷冷下で採取し、 $10,000\times g$ , 20分間の遠心操作により得られた上清を各唾液標品とした。血漿は、ヒト静脈血を $26.3\text{g/l}$ のクエン酸ナトリウム、 $3.27\text{g/l}$ のクエン酸、 $23.2\text{g/l}$ のブドウ糖および $2.51\text{g/l}$ のリン酸二水素ナトリウム入りの採取管に取り、 $1,500\times g$ , 15分間の遠心操作により得た上清を用いた。

### 4. 共凝集活性の測定

共凝集活性の測定は、特に断らない限り、10mMPBS(pH6.0)2mlの反応液中に、 $5 \times 10^8$ 個の *P. gingivalis* 381株懸濁液と  $5 \times 10^8$ 個の *S. oralis* ATCC 9811株懸濁液を加え、分光光度計 (UV-265FW; 島津製作所, 京都) を用いて、37°Cで攪拌しながら、 $A_{550}$ の変化を7.5分間測定した。ある時点の前後0.5分間、すなわち各1分間の吸光度の差 ( $dA/dt$ ) を連続的にかつ自動的に計算させ、それを記録させた後、1分あたりの最大の吸光度変化量を読み取った。なお、*P. gingivalis* 381株または *S. oralis* ATCC 9811株の片方の菌株のみを加えて吸光度を測定したところ、*S. oralis* ATCC 9811株の場合は、両菌体を加えた場合の最大の吸光度変化量の1%以下の変化量しかみられなかったが、*P. gingivalis* 381株の場合には、両菌体を加えた場合の最大の吸光度変化量の約30%の変化量がみられた。従って、共凝集活性は、両菌体を加えた場合の最大の吸光度の変化量から *P. gingivalis* 381株のみを加えたときの最大の吸光度の変化量を差し引いた値とした。また、阻害物質を加えた時の阻害率は、次の式から算出した。

$$\text{阻害率 (\%)} = \frac{\text{阻害物質を添加しない時の共凝集活性} - \text{阻害物質を添加した時の共凝集活性}}{\text{阻害物質を添加しない時の共凝集活性}} \times 100$$

## 5. フィブリノーゲンフラグメントの精製

### 1) $A\alpha$ 鎖, $B\beta$ 鎖および $\gamma$ 鎖の精製

3本のポリペプチド鎖、 $A\alpha$ 鎖、 $B\beta$ 鎖および $\gamma$ 鎖はMiyataらの方法<sup>19)</sup>に準じて精製した。100mgのフィブリノーゲンを6Mグアニジン塩酸塩、10mMEDTAおよび0.066gのジチオスレイトール (DTT; Sigma) を含む0.5Mトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.2) 10mlに溶解し、窒素ガスを送りながら50°Cで3時間放置した後、140 $\mu$ lの4-ビニルピリジンを加え、さらに暗室で2時間静置した後、4°Cにて蒸留水で繰り返し透析した。その凍結乾燥標品をVYDAC218TP54 (0.46 $\times$ 25cm; Separations Group, Hesperia, CA, U. S. A.) 逆相カラムによる高速液体クロマトグラフィ (HPLC) システム (L6210; 日立製作所, 東京) で展開した。すなわち、0.1%トリフルオロ酢酸溶液 (TFA; 和光純薬工業) を含む30%アセトニトリル溶液で平衡化したカラムを用い、0.6ml/分の流速で、30-55% (1%/分) のアセトニトリル溶液による直線的濃度勾配法により、 $A\alpha$ 鎖、 $B\beta$ 鎖、 $\gamma$ 鎖の3つのポリペプチドを溶出させた。

### 2) $A\alpha$ 鎖および $\gamma$ 鎖の臭化シアン処理フラグメントの精製

A $\alpha$ 鎖と $\gamma$ 鎖の凍結乾燥標品を、5 mg/mlの濃度になるように70%ギ酸（和光純薬工業）に溶解し、10mg/mlの臭化シアン（CNBr；和光純薬工業）を加えた。24時間、室温で反応させた後、蒸留水で10倍に希釈し、凍結乾燥後、0.1%TFAを含む10%アセトニトリル溶液で平衡化したVYDAC218TP54逆相カラムに展開し、0.6ml/分の流速で、10-50%（1%/分）のアセトニトリル溶液による直線的濃度勾配法によりCNBr処理フラグメントを溶出させた。

### 3) A $\alpha$ 148-207のリシルエンドペプチダーゼ処理フラグメントの精製

A $\alpha$ 鎖の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）を、さらに、2 M尿素（和光純薬工業）を含む10mMトリス-塩酸緩衝液（pH9.15）200  $\mu$ lに溶解し、リシルエンドペプチダーゼ（*Achromobacter lyticus*由来、和光純薬工業）を酵素/基質=1/100（モル比）の割合で加え、37°Cで一晩反応させ、フラグメントのリシル残基COOH末端側で切断した。そして、生成したペプチドを、0.1%TFAを含む蒸留水で平衡化したVYDAC214TP54（0.46  $\times$  25cm）逆相カラムに展開し、0.6ml/分の流速で、0-50%（1%/分）のアセトニトリル溶液による直線的濃度勾配法により溶出させた。

## 6. アミノ酸分析とアミノ酸配列の決定

精製フラグメントの同定は、NH<sub>2</sub>末端から約10残基のアミノ酸配列を調べ、既知のフィブリノーゲンのアミノ酸配列<sup>20)</sup>を基に推定した。アミノ酸配列は、470A気相式シーケンサー（Applied Biosystems Inc., Fostercity, CA, U. S. A.）とオンラインのモデル120PTHアナライザー（Applied Biosystems Inc.）を用いて決定した。タンパク質の濃度はBradfordの方法<sup>21)</sup>により、また、A $\alpha$  148-207をリシルエンドペプチダーゼで消化したフラグメントの濃度は、アミノ酸分析により定量した。アミノ酸分析は、精製ペプチドを5.7NHC1に溶解し、減圧封管した試験管中で、110°C、24時間の加水分解を行った後、アミノ酸分析装置（835S Amino Acid Analyzer；日立製作所）で行った。各フラグメントについて共凝集阻害効果を調べたが、10mMPBS（pH6.0）に不溶のフラグメントは、最終濃度1 Mの尿素に溶解して測定に用いた。なお、この濃度の尿素は、共凝集活性には影響を及ぼさなかった。

## 7. フェニルグリオキサールによるA $\alpha$ 158-176およびA $\alpha$ 192-206のアルギニン残基の修飾

10nmolのA $\alpha$  158-176およびA $\alpha$  192-206を、5%メタノールおよび25mMフェニルグ

リオキサール(PGO;Sigma)を含む2.5mlの0.2M炭酸塩緩衝液(pH8.1)に溶解し、暗室で3時間インキュベートした。過剰のPGOを除去するため、反応液は10mMPBS(pH6.0)で平衡化されたPD-10 Sephadex G-25M(Pharmacia LKB Biotechnology AB)カラムに展開し、2mlごとに分取し、各画分の $A_{250}$ および $A_{280}$ を測定した。PGOにより修飾されたフラグメントはボイドボリュームの直後の画分に溶出された。PGOを添加せずに、同様の方法で処理したフラグメントを対照として用い、PGOにより修飾されたフラグメントと非修飾フラグメントの共凝集の阻害効果を、先述した方法で調べた。

#### 8. $^{125}\text{I}$ 標識フィブリノーゲンと *P. gingivalis* 381株あるいは *S. oralis* ATCC 9811株との結合性

結合実験は、遠心管への菌体やタンパク質の非特異的結合を抑制するために、ウシ血清アルブミン(BSA)で被覆した1.5mlポリプロピレン遠心管を用いて行った。菌への標識フィブリノーゲンの結合は、Lantzらの方法<sup>22)</sup>に準じて行った。 $1.6 \times 10^9$ 個の菌体を、0.1%BSAと20mMNMEMを含む10mMPBS(pH6.0)に懸濁させ、 $^{125}\text{I}$ 標識フィブリノーゲン(ICN Biomedicals Inc., Costa Mesa, CA, U.S.A.)と非標識フィブリノーゲンを $1.0 \times 10^4$ cpm/ $\mu\text{g}$ の比活性になるように添加して、最終容量500 $\mu\text{l}$ とし、37°C、30分間反応させた。反応後、900 $\times$ g、15分間の遠心操作により集菌し、0.02%BSAを含む10mMPBS(pH6.0)で菌体を3回洗浄し、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。

50倍量の非標識フィブリノーゲン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。

#### 9. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)

20mMNMEM存在下あるいは非存在下で、 $2 \times 10^5$ cpmの $^{125}\text{I}$ 標識フィブリノーゲンと菌体を結合実験と同一の条件で反応させた。反応後、900 $\times$ g、15分間の遠心操作により集菌した。得られた菌体は、0.02%BSAを含む10mMPBS(pH6.0)で3回洗浄した。菌体と400 $\mu\text{l}$ の上清に、50 $\mu\text{l}$ のトリスSDSセプラゾール(Enprotech Corp., Madison, NY, U.S.A.)を加え、100°C、2分間熱処理した。SDS-PAGEは、Laemmliの方法<sup>23)</sup>に従い、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)を支持体として行った。泳動用緩衝液は0.1%ドデシル硫酸ナトリウム(



SDS)を含む0.025Mトリス-グリシン緩衝液(pH8.6)を用い、40mAの条件で室温で1.5時間電気泳動を行った。泳動後、クーマシーブリリアントブルーを用いてタンパク質を染色した。次いで、ゲルを脱色し、水洗後、70°Cで加熱、乾燥した。乾燥したゲルをX-Omat AR film(Eastman Kodak Co., Rochester, NY, U.S.A.)上で、-70°C、8日間感光後、現像、定着した。分子量の測定には、ミオシン、 $\alpha_2$ -マクログロブリン、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、トランスフェリン、グルタミン酸脱水素酵素、フォスホリラーゼb、BSA、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 $\alpha$ -ラクトアルブミン(分子量測定キット、HMW kit E and LMW kit E(SDS); Pharmacia LKB Biotechnology AB)を用いた。

## 実験結果

### 1. P. gingivalis 381株とS. oralis ATCC 9811株との共凝集活性

図1に、P. gingivalis 381株とS. oralis ATCC 9811株とを反応させた時、P. gingivalis 381株菌体のみを加えた時およびS. oralis ATCC 9811株菌体のみを加えた時のそれぞれの $A_{550}$ および $-dA/dt$ の変化の1例を示した。共凝集における $A_{550}$ の変化は、反応開始後、わずかの間緩やかな減少を示した後、急速な減少に転じ、約3分後には最低レベルに達し、共凝集反応が完了したと考えられた。その $-dA/dt$ は、反応開始後、 $A_{550}$ の緩やかな減少の直後に最大に達した。一方、P. gingivalis 381株菌体のみの場合の $A_{550}$ の変化は、測定開始後、わずかの間はほとんど変化せず、その後、緩やかな減少を示し、約5分後には最低レベルに達し、自己凝集反応が完了したと考えられた。その $-dA/dt$ は反応開始後すぐに最大に達した。S. oralis ATCC 9811株菌体のみの場合、 $A_{550}$ は測定時間内ではほとんど変化せず、その $-dA/dt$ は、ほぼ0であった。

S. oralis ATCC 9811株の菌数を一定( $5 \times 10^8$ 個)にし、P. gingivalis 381株の菌数を変化させて共凝集活性を調べたところ、図2に示すように、菌数比が1:1で共凝集活性はほぼ最大に達し、P. gingivalis 381株菌体を過剰に加えると、むしろ共凝集活性はわずかに減少した。

共凝集に及ぼすpHおよび温度の影響を調べ、その結果を表1に示した。それぞれ0.15M塩化ナトリウムを含む10mM酢酸ナトリウム緩衝液(pH4.0, 5.0)、10mMリン酸ナトリウム緩衝液(pH6.0, 7.0)、10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.0, 9.0)を用いて、反応系のpHを変化させたところ、最大の活性はpH5.0-6.0で認められた。また、反

応系の温度を4℃, 20℃, 37℃および50℃に変化させて共凝集活性を調べたところ, 37℃で最大を示し, 50℃ではあまり変化しなかったが, 4℃の共凝集活性は, 37℃の時の67%に低下した。

共凝集に及ぼす塩濃度の影響を調べるため, pH6.0のリン酸ナトリウム塩緩衝液を用い, 37℃で, 塩化ナトリウムの濃度を0.15M-2Mまで変化させて共凝集活性を測定したところ, その影響はほとんど認められなかった(データ省略)。

以上の結果より, 標準的な共凝集活性の測定条件として, 菌数は両菌株とも $5 \times 10^8$ 個, pHは6.0, 温度は37℃, そして塩化ナトリウム濃度は0.15Mで共凝集活性の測定を行った。標準的な条件で測定した共凝集活性(N=10)は,  $0.112 \pm 0.001$  (平均±標準誤差)であり, 変異係数は1%以下でばらつきは非常に小さく, 共凝集活性を表すのに十分再現性があることが示された。

## 2. 共凝集に及ぼす糖およびアミノ酸の影響

共凝集に対する阻害効果を表2に示した。供試したアミノ酸のなかでは, L-アルギニンとL-リシンが濃度依存的に共凝集を阻害し, 特に, L-アルギニンは同一濃度でL-リシンの約2倍の阻害効果を示した。しかし, 供試した糖はいずれも, 100mMの濃度では共凝集に対する阻害を示さず, この共凝集反応には, レクチン様物質は関与していない可能性が示唆された。

## 3. 共凝集に及ぼすヒト唾液および血漿の影響

図3に示すように, 供試したヒト唾液および血漿は, すべて共凝集を濃度依存的に阻害した。ヒト血漿(50%阻害濃度;  $I_{50} = 0.89 \pm 0.18 \mu\text{l/ml}$ ; 平均±標準誤差)は最も強い共凝集阻害を示し, 混合唾液( $I_{50} = 15.0 \pm 3.22 \mu\text{l/ml}$ )および顎舌下腺唾液( $I_{50} = 23.8 \pm 8.30 \mu\text{l/ml}$ )は, 耳下腺唾液( $I_{50} = 65.0 \pm 7.65 \mu\text{l/ml}$ )よりも強い共凝集阻害を示した。各唾液および血漿による阻害の強さは, 5人の被験者すべてで同じ傾向を示した。

## 4. ヒト血漿由来のタンパク質による共凝集の阻害

ヒト血漿中に存在する主なタンパク質による共凝集の阻害効果を調べた結果を表3に示した。供試したタンパク質のなかでは, フィブリノーゲンが最も強い共凝集阻害を示し, フィブロンectinやトランスフェリンも共凝集を阻害したが, IgGや $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質にはわずかな阻害効果しか認められなかった。

## 5. 共凝集に及ぼすフィブリノーゲンフラグメントの影響

フィブリノーゲン、フラグメントDおよびフラグメントEによる共凝集の阻害を調べた結果を図4に示したが、フラグメントD( $I_{50}=0.07\mu\text{M}$ )による共凝集阻害は、もとのフィブリノーゲン( $I_{50}=0.06\mu\text{M}$ )とほぼ同程度で、フラグメントE( $I_{50}=0.2\mu\text{M}$ )よりも強い共凝集阻害を示した。

フィブリノーゲンの3つのポリペプチド鎖、 $A\alpha$ 鎖、 $B\beta$ 鎖および $\gamma$ 鎖による共凝集の阻害を調べた。図5に示すように、 $A\alpha$ 鎖( $I_{50}=0.07\mu\text{M}$ )が最も強い共凝集阻害を示し、 $\gamma$ 鎖( $I_{50}=0.3\mu\text{M}$ )も共凝集を阻害したが、 $B\beta$ 鎖には共凝集阻害は認められなかった。

$A\alpha$ 鎖および $\gamma$ 鎖をCNBrで処理し、VYDAC218TP54逆相カラムを用いて分画を行った。その結果、図6および図7に示す分画パターンが示された。こうして得られた画分のアミノ酸配列を決定した後、その共凝集の阻害を調べたところ、表4のような結果が得られた。 $A\alpha$ 鎖をCNBr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認められたが、 $A\alpha$  148-207が最も強い共凝集阻害を示した。 $A\alpha$ 鎖の $\text{NH}_2$ 末端領域の $A\alpha$  1-51と $\text{COOH}$ 末端側の親水性の強い領域に含まれる $A\alpha$  241-476および $A\alpha$  518-584は同一の画分に溶出され、今回用いた方法では分離できなかった。表には示していないが、この3つのペプチドを含む画分も、共凝集を阻害した。しかし、 $A\alpha$ 鎖の $\text{NH}_2$ 末端の16残基からなるフィブリノペプチドAは、 $1\mu\text{M}$ の濃度では共凝集を阻害しなかったことや、 $A\alpha$  241-476および $A\alpha$  518-584は、強い共凝集阻害を示したフラグメントDには含まれないことなどから、これら3つのペプチドを含む画分を、さらには分離しなかった。一方、 $\gamma$ 鎖をCNBr処理して得られたフラグメントの中では、 $\text{NH}_2$ 末端フラグメントが最も強い共凝集阻害を示したが、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<sup>24,25)</sup> $\text{COOH}$ 末端フラグメントには、わずかな共凝集阻害活性しか認められなかった。従って、本研究では、フラグメントDの $A\alpha$ 鎖にほぼ相当する $A\alpha$  148-207をさらに調べることにした。

$A\alpha$  148-207をリシルエンドペプチダーゼで処理し、VYDAC214TP54逆相カラムを用いて分画を行うと、図8のような分画パターンが示された。こうして得られた画分のアミノ酸配列を決定した後、その共凝集の阻害を調べた。表5に示すように、 $A\alpha$  158-176と $A\alpha$  192-206のフラグメントに濃度依存的に共凝集阻害活性が認められた。他のフラグメントによる阻害は、 $5\mu\text{M}$ の濃度ではごくわずかししか認め

られなかった。

A $\alpha$  158-176は19残基中4残基のアルギニン残基を含み、A $\alpha$  192-206は15残基中2残基のアルギニン残基を含んでいた。この2つのフラグメントのアルギニン残基が共凝集の阻害に何らかの役割を果たしている可能性が考えられるため、フラグメントのアルギニン残基をPGOを用いて化学修飾し、共凝集の阻害活性を調べた。表6に示すように、両フラグメントともPGOでアルギニン残基を修飾すると、その共凝集阻害活性は著しく低下した。

## 6. 共凝集に及ぼす菌体のフィブリノーゲンによる前処理の影響

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に作用して阻害を起こすのかを調べた。1 $\times$ 10<sup>9</sup>個/mlのP. gingivalis 381株またはS. oralis ATCC 9811株の懸濁液と100 $\mu$ g/mlのフィブリノーゲンあるいは適当な濃度のプロテアーゼインヒビターを全容量が5mlになるように加え、37 $^{\circ}$ Cで30分間反応させた。反応液より菌体を1,300 $\times$ g、15分間の遠心操作で集菌した後、10mMPBS(pH6.0)で一回洗浄し、同緩衝液で1 $\times$ 10<sup>9</sup>個/mlになるように再び懸濁した。このようにして得られた片方の菌体を通常の共凝集活性の測定に供した。その結果を表7に示した。一方の菌体をプロテアーゼインヒビターの非存在下で、フィブリノーゲンと前処理したところ、予想に反して、フィブリノーゲンによる共凝集の阻害は認められなかった。しかし、プロテアーゼインヒビターとして、20mMNEM、1mMpCMPSおよび20mMTLCK存在下で、P. gingivalis 381株菌体をフィブリノーゲンと予め反応させると、フィブリノーゲンによる共凝集の阻害がみられるようになり、しかも、すべて100%の阻害を示した。しかし、2mMPMSFや10mMEDTAの存在下では、フィブリノーゲンによる共凝集の阻害はほとんど認められなかった。

フィブリノーゲンを加えずに、NEMとP. gingivalis 381株菌体を予め反応させても、共凝集には影響を及ぼさなかったが、pCMPSやTLCKを同様に、P. gingivalis 381株菌体と予め反応させると、共凝集活性は減少した。このpCMPSやTLCKとの前処理による共凝集活性の減少は、これら試薬によるプロテアーゼ活性の阻害というより、むしろこれらによる菌表面の化学的修飾の結果と思われる。一方、S. oralis ATCC 9811株に関しては、いずれのプロテアーゼインヒビターの存在下で、フィブリノーゲンで前処理しても、フィブリノーゲンによる共凝集の阻害は認められなかった。以下の各菌体とフィブリノーゲンとの結合実験では、プロテアー

ゼインヒビターとしてNEMを用いた。

## 7. フィブリノーゲンと P. gingivalis 381株菌体または S. oralis ATCC 9811株菌体との結合性

両菌体によるフィブリノーゲンとの結合と分解を確かめるため、20mMNEM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を反応させ、その反応上清または菌体の抽出物をSDS-PAGE後、オートラジオグラフィを行った(図9)。P. gingivalis 381株の場合、NEM非存在下では、その菌体抽出物にはフィブリノーゲンをはじめとしてバンドはほとんどみられず、その上清にもフィブリノーゲンの分解されたフラグメントと考えられる低分子量の非常に放射活性の弱いバンドしか認められなかった。NEM存在下では、フィブリノーゲンの大部分は分解せずに P. gingivalis 381株菌体より抽出されたが、泳動先端部分など、いくつかの分解されたフラグメントと考えられるバンドがみられた。その上清中には、分解を受けていないフィブリノーゲンはほとんどみられず、低分子量のところいくつかのバンドが認められた。一方、S. oralis ATCC 9811株では、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。

P. gingivalis 381株菌体または S. oralis ATCC 9811株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、添加するフィブリノーゲンの量が増加するとともに、両菌体へのフィブリノーゲンの特異的結合も増し、約12 $\mu$ gのフィブリノーゲンを添加した時にほぼ飽和に達した(図10A)。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た。フィブリノーゲンの分子量を $3.4 \times 10^5$ とし、飽和状態では、すべてのレセプターがフィブリノーゲン分子と結合していると仮定すれば、P. gingivalis 381株菌体にはKd値が約 $2.9 \times 10^{-8}$ Mのレセプターが細胞1個あたり約 $1.7 \times 10^3$ 個存在し、S. oralis ATCC 9811株菌体にはKd値が約 $1.4 \times 10^{-7}$ Mのレセプターが細胞1個あたり約 $1.8 \times 10^3$ 個存在することになり、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親和性が高いことが示された(図10B)。

## 考察

本研究では、P. gingivalis 381株と S. oralis ATCC 9811株を用いて、共凝集反

応を測定し、ヒト唾液や血漿、特に、フィブリノーゲンによる共凝集の阻害について調べた。著者の研究室<sup>26)</sup>では、以前に、種々のグラム陽性口腔細菌を用いて、P. gingivalis 381株との共凝集反応を調べたところ、供試したレンサ球菌26株のうち19株の菌体が、P. gingivalis 381株菌体との共凝集を示した。その中でも、S. oralis ATCC 9811株、ATCC 10557株、Streptococcus parasanguis ATCC 15909株、Streptococcus MG ATCC 15913株およびS. sanguis ST6株が、P. gingivalis 381株と強い共凝集を示した。また、予備実験として、S. oralis ATCC 9811株と6株のP. gingivalisとの共凝集を調べたところ、P. gingivalis 381株、33277株およびSU-3株とは強い共凝集が認められたが、W83株、51株および165株とは、ほとんど共凝集は認められなかった。従って、本研究では、共凝集の測定に用いる菌株としてP. gingivalis 381株とS. oralis ATCC 9811株を選んだ。

共凝集活性の測定法には、肉眼で判定する方法<sup>4)</sup>、2株の菌体を混合した反応液を低回転の遠心操作により凝集塊を沈澱させ、その上清の吸光度を測定する方法<sup>27)</sup>および標識した菌体ともう一方の菌体を混合した反応液をポリカーボネート膜で濾過し、膜に残った共凝集塊の放射能を測定する方法<sup>28)</sup>など、種々の方法が報告されている。Malamudら<sup>29, 30)</sup>は、唾液による菌の凝集を測定する方法として、濁度を測定する方法のほうが、標識した菌を用いた遠心操作による測定法よりも、感度が高かったと報告している。濁度分光分析法は、唾液による菌の凝集活性<sup>31)</sup>、ヒト血小板凝集活性<sup>32)</sup>およびラテックスビーズを用いた菌の凝集活性<sup>33)</sup>を定量的に測定する方法として用いられており、本研究のように、共凝集に及ぼす種々の阻害物質の微妙な影響を調べるには、濁度分光分析法がより適していると考えられた。また、共凝集活性を表す指標については、Ericsonら<sup>31)</sup>は、凝集の定量分析には、凝集の初期の変化を基にし、単位時間あたりの最大の変化量とそれに要する時間をもって、その凝集を特徴づけるべきであると述べている。しかし、P. gingivalis 381株とS. oralis ATCC 9811株との共凝集反応では、両菌体を加えた場合も、P. gingivalis 381株菌体のみを加えた場合も、いずれの場合も変化量が最大に達するまでの時間が非常に短いため、変化量が最大に達するまでの時間を基準にすると、大きな誤差が生じた。従って、本研究では、1分間あたりの最大の吸光度の変化量を指標として共凝集活性を表すことにした。

本研究で供試した体液、すなわち混合唾液、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P. gingivalis 381株とS. oralis ATCC 9811株との共凝集を阻害した。共凝集に及ぼす体液の影響を調べる場合には、体液自身による

菌の凝集を考慮する必要がある。KomiyamaとGibbons<sup>34)</sup>は、唾液を一方の菌体と予め反応させ、唾液の凝集素を除去した後、共凝集の阻害を調べる方法を用いた。結果には示していないが、本実験の測定系で、各菌体と体液を反応させ、吸光度の変化量を測定したが、体液による菌の凝集は、測定時間内ではほとんど認められなかった。これは、体液による菌の凝集反応は非常に遅く、吸光度の変化として現れるには、今回の測定時間(7.5分)以上の時間が必要なためと考えられる。本実験で得られた結果は、緒言で述べたEllenら<sup>16)</sup>やStinsonら<sup>12)</sup>の結果と一致する。耳下腺唾液は、混合唾液や顎舌下腺唾液よりも阻害効果が小さかった。これは、混合唾液や顎舌下腺唾液は、口腔からの菌の排除に影響を及ぼすムチンや凝集素などの高分子量の成分に富んでいる<sup>15)</sup>ためであると考えられる。また、Stinsonら<sup>35)</sup>は、顎舌下腺唾液には、*P. gingivalis*の*S. gordonii*への付着を阻害する分子量43kDaのタンパク質が存在することを報告している。従って、唾液中に存在する成分も*P. gingivalis*のグラム陽性菌への付着の阻害に関与している可能性は強い。しかし、歯肉溝浸出液は、血漿成分と似た組成を示すことや<sup>36,37)</sup>、歯肉溝内では、唾液よりも歯肉溝浸出液が細菌の定着に大きな影響を及ぼしていると思われること、また、本研究において、血漿は唾液よりも強い阻害効果を示したことなどから、共凝集を阻害する因子として、歯肉溝浸出液成分がより重要であると考えられる。歯肉溝浸出液に含まれると考えられるヒト血漿由来の主なタンパク質による阻害を調べた結果、フィブリノーゲンが最も強い阻害を示した。また、結果には示していないが、Sephacryl S-300 Superfine(Pharmacia Fine Chemicals)カラムを用いてヒト血漿を分画し、その共凝集阻害活性を調べたところ、ボイドボリュームの画分から分子量45kDaの画分間に、少なくとも3つの阻害活性をもつタンパク質画分が得られ、その1つは分子量的にフィブリノーゲンが溶出される画分と一致していた。以上のことから、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ることにした。

フィブリノーゲンは、図11<sup>38)</sup>に示すように、A $\alpha$ 鎖、B $\beta$ 鎖および $\gamma$ 鎖の3本のポリペプチド鎖が、NH<sub>2</sub>末端近傍でS-S結合し、それらが2量体構造をとっている分子量約340kDaの血漿タンパク質である<sup>39)</sup>。フィブリノーゲンをプラスミンで処理すると、1つのNH<sub>2</sub>末端領域のフラグメントEと、2つのCOOH末端領域のフラグメントDに分解される<sup>39)</sup>。従って、フィブリノーゲン分子は中央NH<sub>2</sub>末端寄りのフラグメントE1個と両端COOH末端寄りのフラグメントD2個が、コイル状によじれ

た3本のサブユニット鎖でつながれた形を示す。フィブリノーゲンは、種々の細菌と特異的に結合することが報告されている<sup>22,40-44</sup>。Hawigerら<sup>24</sup>)およびStrongら<sup>25</sup>)は、ブドウ球菌クランプ因子に対するヒトフィブリノーゲンの活性部位が $\gamma$ 鎖のCOOH末端に位置することを示した。一方、フィブリノーゲンのフラグメントDは、Candida albicans<sup>41</sup>), Streptococcus pyogenesのMタンパク質<sup>45,46</sup>)およびAspergillus fumigatus<sup>47</sup>)に特異的に結合することが報告されている。Lantzら<sup>48</sup>)は、Prevotella intermediaへのフィブリノーゲンの結合部位はフラグメントDであるのに対して、P. gingivalisへのフィブリノーゲンの結合部位は、D領域とE領域の間のコイル状のプラスミン感受性の部位であると推定している。本研究で、フィブリノーゲンを切断し、得られたフラグメントを用いてP. gingivalis 381株とS. oralis ATCC 9811株との共凝集の障害を調べたところ、フラグメントEよりもフラグメントDの方が強い共凝集障害を示し、3本のポリペプチド鎖の中ではA $\alpha$ 鎖が最も強い共凝集障害を示した。さらに、フラグメントDのA $\alpha$ 鎖にほぼ相当するA $\alpha$  148-207が強い共凝集障害を示した。A $\alpha$  148-207をさらに切断したところ、A $\alpha$  158-176とA $\alpha$  192-206に強い障害が認められた。これらの結果から、フィブリノーゲン分子の中でもフラグメントDのA $\alpha$ 鎖が、共凝集障害に重要な役割を担っていると考えられる。しかし、A $\alpha$ 鎖や $\gamma$ 鎖の他のフラグメントにも共凝集を障害するフラグメントがいくつか認められることから、共凝集の障害に関与するフィブリノーゲン分子の領域は1つではなく、いくつか存在すると考えるのが妥当であろう。本研究で得られた共凝集障害活性をもつ最小のフラグメントであるA $\alpha$  158-176およびA $\alpha$  192-206のペプチドに存在するアルギニン残基をPGOを用いて化学修飾したところ、そのペプチドの共凝集の障害は著しく低下した。このことは、P. gingivalis 381株とS. oralis ATCC 9811株との共凝集が、L-アルギニンにより障害された結果と一致する。このようなアルギニンによる障害は、P. gingivalisの赤血球凝集<sup>49,50</sup>), P. gingivalisの小胞体様構造物とCapnocytophaga ochraceaやEubacterium saburreumの凝集<sup>51</sup>), P. gingivalisとA. viscosus<sup>11</sup>)との共凝集およびP. gingivalisとTreponema denticola<sup>52</sup>)との共凝集に関して報告されており、P. gingivalisがアルギニンやアルギニン含有ペプチドにより障害される凝集素をもつことが示唆されている。従って、フィブリノーゲン分子内のある領域のアルギニン残基とP. gingivalis 381株の相互作用が、P. gingivalis 381株とS. oralis ATCC 9811株との共凝集の障害を起こしていることが考えられる。しかし、本研究では、フィブリノーゲンの化学的または酵素的分解で得られたフ



ラグメントを用いたので、それらフラグメントは、修飾していないフィブリンノーゲンのその領域とは立体構造が大きく変化していることを考慮しなければならず、阻害活性部位のより詳細な説明には、フィブリンノーゲンやそのフラグメントに対する抗体を用いるなど、本研究とは異なった手法を用いる余地も残されている。

フィブリンノーゲンが共凝集を阻害する機序として、フィブリンノーゲンが片方または双方の菌体と結合することにより、共凝集を阻害することが考えられる。菌体とフィブリンノーゲンを予め反応させた後、共凝集活性を調べたところ、いずれの菌体とフィブリンノーゲンを反応させても、フィブリンノーゲンによる阻害は認められなかった。P. gingivalisはフィブリンノーゲン<sup>22)</sup>やトランスフェリンおよびアルブミン<sup>53)</sup>のような血漿由来のタンパク質を分解する強い活性をもっていることが知られている。菌体とフィブリンノーゲンを反応させる際にNEM, pCMPSおよびTLCKのようなプロテアーゼインヒビターを添加すると共凝集阻害がみられるようになった。これらの結果は、P. gingivalis 381株のプロテアーゼが、菌体表面にあるフィブリンノーゲンに対する受容体を分解することによって生ずる可能性も考えられるが、フィブリンノーゲンおよびプロテアーゼインヒビターを加えずに、予めインキュベートしたP. gingivalis 381株菌体をS. oralis ATCC 9811株菌体との共凝集に用いたところ、前処理していない場合と同程度に、フィブリンノーゲンの阻害がみられた(データ省略)ことから、この可能性は否定された。従って、前処理の過程で、P. gingivalis 381株がもつチオール依存性トリプシン様プロテアーゼにより、フィブリンノーゲンが分解された結果と考えるのが妥当であろう。

SDS-PAGEとオートラジオグラフィを組み合わせて分析した結果、NEM非存在下で、P. gingivalis 381株と<sup>125</sup>I標識フィブリンノーゲンを反応させた菌体からの抽出物にはバンドはほとんどみられず、また、その反応上清にも低分子量の非常に弱い放射活性を示すバンドしか認められなかったのに対し、NEM存在下ではP. gingivalis 381株菌体からの抽出物には、フィブリンノーゲンに相当するところに主要なバンドがみられた。これらの結果は、チオールプロテアーゼインヒビターの添加により、P. gingivalis W12株によるフィブリンノーゲンの分解が抑制され、P. gingivalis W12株へのフィブリンノーゲンの結合がみられたというLantzら<sup>22)</sup>の結果と一致する。さらに、Lantzら<sup>54)</sup>は、P. gingivalis W12株によって、フィブリンノーゲンが分子量97KDaと50KDaの2つの分解産物に分解されることを示した。本実験では、P. gingivalis 381株によりフィブリンノーゲンはより小さな分子量のペプチドに分解されたと考えられる。Stinsonら<sup>35)</sup>は、S. gordonii G9B株へのP. gingi-

valis W50株の付着は、顎舌下腺唾液から精製した分子量43KDaのタンパク質により阻害され、P. gingivalisへのこの唾液タンパク質の結合は、PMSFとヨード酢酸ナトリウムを添加しなければ起こらないことを示した。以上の結果にみられるP. gingivalisによるタンパク質の分解の程度やプロテアーゼインヒビターの作用の違いは、菌株の違いによりいくつかの異なる種類のプロテアーゼが作用することによると思われる。また、NEM存在下でのP. gingivalis 381株菌体またはS. oralis ATCC 9811株菌体のフィブリノーゲンとの結合飽和曲線よりScatchard解析を行ったところ、両菌体のフィブリノーゲン受容体の数には、ほとんど差は認められなかったが、P. gingivalisはS. oralisよりもフィブリノーゲンに対して高親和性を示した。従って、P. gingivalisへのフィブリノーゲンの結合が、フィブリノーゲンによる共凝集の阻害における重要なステップであると考えられる。S. oralis菌体とフィブリノーゲンを予め反応させた場合にも、S. oralis菌体へのフィブリノーゲンの結合はある程度起こることが示されたが、フィブリノーゲンによる共凝集の阻害は認められなかった。このことは、S. oralis菌体表層に存在するフィブリノーゲンに対する結合部位とP. gingivalis菌体に対する結合部位が異なることを示唆している。本研究でのフィブリノーゲンの結合実験は、共凝集阻害を測定する時と同じ反応温度で行ったが、オートラジオグラフィの結果からもわかるように、この条件では、P. gingivalis菌体表面に結合したフィブリノーゲンはわずかではあるが分解されていた。従って、各菌体のフィブリノーゲンに対する正確なKd値や受容体数を求めるには、分解などの影響を除いたより低温の反応条件で行う必要があると思われる。

本研究の結果から、歯肉溝内において、フィブリノーゲンはP. gingivalisと結合するが、すぐにP. gingivalisのプロテアーゼにより分解されてしまうことが推測される。従って、歯肉溝内で、フィブリノーゲンがP. gingivalisとS. oralisとの共凝集を阻害するためには、プロテアーゼインヒビターによってフィブリノーゲン自身の分解を阻止されることが必要であるかもしれない。実際に、Sandholm<sup>55)</sup>は血漿や歯肉溝浸出液中には宿主由来のプロテアーゼインヒビターが存在すると報告しており、さらに最近では、Fishburnら<sup>56)</sup>が、P. gingivalisのトリプシン様プロテアーゼは、アンチトロンビンⅢのようなヒト血漿成分によって阻害されることを示した。また、フィブリノーゲンは、歯周疾患に罹患している部位から得られた歯肉溝浸出液中にも、罹患していない部位から得られた歯肉溝浸出液中にも検出されると報告されている<sup>57)</sup>。従って、フィブリノーゲンは、歯肉溝内に

存在するグラム陽性菌への *P. gingivalis* の付着を制御する重要な宿主防御因子の 1 つとなり得ると考えられる。

*P. gingivalis* 菌体表面に存在するプロテアーゼが、*A. viscosus*<sup>10)</sup> や *S. gordonii*<sup>35)</sup> などのグラム陽性菌との共凝集に関与していることを示す報告もある。Lantzら<sup>54)</sup> は、フィブリノーゲンと結合する *P. gingivalis* の菌体表層成分とフィブリノーゲン分解活性をもつ *P. gingivalis* の菌体表層成分は、同じ分子量を示すが、ある種の界面活性剤により分別抽出できることを報告した。しかし、フィブリノーゲンの結合と分解は、同じタンパク質分子が異なる様式で作用しているのか、または、同じ分子量をもつ異なった分子により起こるかは、現在のところ不明である。従って、*P. gingivalis* のもつフィブリノーゲンに対する受容体が、*S. oralis* との凝集を起し、しかも、この受容体がフィブリノーゲンを分解するプロテアーゼである可能性も考えられる。しかしながら、*P. gingivalis* によるフィブリノーゲンとの結合と他の細菌との共凝集の相互の関連性を明らかにするためには、今後、さらに、*P. gingivalis* のもつこれら結合に関与する菌体表層成分の局在性とそれらの構造と機能を詳細に調べる必要がある。

#### 結論

本研究では、*P. gingivalis* 381株と *S. oralis* ATCC 9811株との共凝集活性を定量的に測定し、この共凝集に及ぼすヒト唾液や血漿の影響を調べた。さらに、この共凝集を特に強く阻害したヒト血漿由来のタンパク質であるフィブリノーゲンによる共凝集阻害について検討した結果、以下の結論を得た。

1. *P. gingivalis* 381株と *S. oralis* ATCC 9811株との共凝集は、反応系の菌数比が 1 : 1 のときに、また、pHは 5.0-6.0で、温度は 37℃で最大の活性を示した。
2. 共凝集は、供試した糖類では阻害されなかった。しかし、供試したアミノ酸のうちでは、アルギニンとリシンが共凝集を阻害し、その阻害の程度は、アルギニンの方がリシンより強かった。
3. 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共凝集を阻害した。これらの体液のなかでは、ヒト血漿が最も強い共凝集阻害を示した。
4. 供試したヒト血漿由来のタンパク質のなかでは、フィブリノーゲンが最も強い共凝集阻害を示した。

5. フィブリノーゲンのフラグメントDは、フラグメントEより強い共凝集阻害を示した。また、フィブリノーゲンの3つのポリペプチド鎖のなかでは、A $\alpha$ 鎖が最も強く共凝集を阻害し、 $\gamma$ 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。

6. A $\alpha$ 鎖を臭化シアンで処理し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認められたが、フラグメントDのA $\alpha$ 鎖にほぼ相当するA $\alpha$ 148-207が最も強い阻害を示した。 $\gamma$ 鎖を臭化シアンで処理し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共凝集阻害を示した。さらに、A $\alpha$ 148-207をリシルエンドペプチダーゼで処理して得られたフラグメントのなかでは、A $\alpha$ 158-176とA $\alpha$ 192-206のフラグメントに阻害活性が認められた。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で化学修飾すると、両フラグメントともに、その阻害効果は著しく低下した。

7. 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。しかし、どちらの菌体をフィブリノーゲンで前処理しても、共凝集活性は影響されなかった。プロテアーゼインヒビターであるNEM、pCMPSあるいはTLCK存在下で、*P. gingivalis* 381株菌体をフィブリノーゲンと予め反応させると、共凝集の阻害がみられるようになった。*S. oralis* ATCC 9811菌体をフィブリノーゲンとこれらのプロテアーゼインヒビター存在下で予め反応させても、共凝集の阻害は認められなかった。

8. オートラジオグラフィの結果、*P. gingivalis* 381株をフィブリノーゲンとNEM非存在下で反応させると、反応後の菌体からの抽出物には放射活性をもつバンドはほとんどみられず、また、その反応上清にもフィブリノーゲンの分解されたフラグメントと考えられる低分子量の非常に弱い放射活性を示すバンドしか認められなかった。しかし、NEM存在下では、*P. gingivalis* 381株菌体からの抽出物には、フィブリノーゲンに相当するところに主要なバンドがみられた。しかし、*S. oralis* ATCC 9811株では、NEMの有無にかかわらず、その菌体抽出物には、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。これらの結果は、NEM存在下では、*P. gingivalis* 381株のもつプロテアーゼによるフィブリノーゲンの分解が阻止されることを示している。

9. 各菌体とフィブリノーゲンとの結合実験の結果よりScatchard解析を行ったところ、フィブリノーゲンに対して、*P. gingivalis* 381株は*S. oralis* ATCC 9811株

よりも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。

#### 謝辞

稿を終えるに臨み、御助言を賜った常光 旭大阪大学名誉教授ならびに御懇切なる御指導と御校閲を賜った本学歯学部予防歯科学講座栗石 聰教授に深甚なる謝意を表します。また、フィブリノーゲンフラグメントの精製にあたり御指導ならびに御助言を賜りました国立循環器病センター研究所脈管生理部血栓研究室宮田敏行室長ならびに元本学蛋白質研究所蛋白質化学構造部門助教授、現宝酒造株式会社綱沢 進博士に深謝いたします。さらに、アミノ酸配列の決定、アミノ酸分析およびフィブリノーゲンの化学修飾に御協力いただきました本学部予防歯科学講座天野敦雄博士に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。

Inhibition of coaggregation between  
Porphyromonas gingivalis and Streptococcus oralis  
by human fibrinogen

Hideki Nagata

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

Key words: Coaggregation·Porphyromonas gingivalis·Streptococcus oralis·Fibrinogen

Cohesive interactions between Porphyromonas gingivalis and gram-positive plaque-forming bacteria may play an important role in initial colonization of P. gingivalis in the periodontal sites. In this study, the modulating effects of saliva and plasma on the coaggregation between P. gingivalis 381 and Streptococcus oralis ATCC 9811 were explored. Furthermore, the inhibitory mechanism of the coaggregation by fibrinogen showing the most potent inhibitory activity among the tested plasma-derived proteins was investigated.

Human saliva and plasma inhibited the coaggregation in a dose-dependent manner, and plasma showed the most potent inhibitory activity of the fluids examined. Among the plasma-derived proteins tested, fibrinogen was the most potent substance. In order to search the localization of regions of fibrinogen inhibiting the coaggregation, inhibitory activities of various fibrinogen fragments were tested. The coaggregation was inhibited by A $\alpha$  and  $\gamma$  chains, but not by B $\beta$  chain. The inhibitory activity of fragment D was more potent than that of fragment E. Some cyanogen bromide-treated fragments isolated from A $\alpha$  and  $\gamma$  chains had inhibitory activities. NH<sub>2</sub>-terminal 148-207 amino acid residues of A $\alpha$  chain(

A $\alpha$  148-207) that had the most potent inhibitory activity was further digested with lysyl endopeptidase. A $\alpha$  158-176 and A $\alpha$  192-206 remained inhibitory activities. When arginine residues of these two peptides were modified with phenylglyoxal, the inhibitory activities were much reduced. We examined which bacterium fibrinogen interacts with in its inhibitory process. Although the inhibitory effect disappeared by preincubation of each bacterium with fibrinogen, it reappeared by the addition of N-ethylmaleimide(NEM) to the preincubation mixture with P. gingivalis 381, but not with S. oralis ATCC 9811. Intact fibrinogen was recovered from the extract of P. gingivalis 381 cells incubated with <sup>125</sup>I-fibrinogen in the presence of NEM, but not in the absence of NEM. In the binding assay using <sup>125</sup>I-fibrinogen, P. gingivalis 381 showed a higher affinity to fibrinogen than S. oralis ATCC 9811. These results suggest that fibrinogen may inhibit the coaggregation by binding to P. gingivalis cells and that arginine residues of some specific regions of fibrinogen may play an important role in the inhibition of the coaggregation.

## 文献

- 1) Slots, J. and Genco, R. J. (1984) : Black-pigmented Bacteroides species, Capnocytophaga species, and Actinobacillus actinomycetem-comitans in human periodontal disease : Virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. J. Dent. Res., **63**, 412-421.
- 2) van Winkelhoff, A. J., van der Velden, U. and de Graaff, J. (1987) : Microbial succession in recolonizing deep periodontal pockets after a single course of supra- and subgingival debridement. J. Clin. Periodontol., **15**, 116-122.
- 3) Mayland, D. and Holt, S. C. (1988) : Biology of asaccharolytic black-pigmented Bacteroides species. Microbiol. Rev., **52**, 134-152.
- 4) 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 pockets. Infect. Immun., **19**, 254-264.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) Boyd, J. and McBride, B. C. (1984) : Fractionation of hemagglutinating and bacterial binding adhesins of Bacteroides gingivalis. Infect. Immun., **45**, 403-409.
- 8) Schwarz, S., Ellen, R. P. and Grove, D. A. (1987) : Bacteroides gingivalis-Actinomyces viscosus cohesive interactions as measured by a quantitative binding assay. Infect. Immun., **55**, 2391-2397.
- 9) Li, J. and Ellen, R. P. (1989) : Relative adherence of Bacteroides species and strains to Actinomyces viscosus on saliva-coated hydrox-



- yapatite. J. Dent. Res., **68**, 1308-1312.
- 10) Li, J., Ellen, R. P., Hoover, C. I. and Felton, J. R. (1991) : Association of proteases of Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis with its adhesion to Actinomyces viscosus. J. Dent. Res., **70**, 82-86.
  - 11) Ellen, R. P., Song, M. and Buivids, I. A. (1992) : Inhibition of Actinomyces viscosus-Porphyromonas gingivalis coadhesion by trypsin and other proteins. Oral. Microbiol. Immunol., **7**, 198-203.
  - 12) Stinson, M. W., Safulko, K. and Levine, M. J. (1991) : Adherence of Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis to Streptococcus sanguis in vitro. Infect. Immun., **59**, 102-108.
  - 13) Lamont, R. J., Hersey, S. G. and Rosan, B. (1992) : Characterization of the adherence of Porphyromonas gingivalis to oral streptococci. Oral. Microbiol. Immunol., **7**, 193-197.
  - 14) Kolenbrander, P. E., Andersen, R. N. and Holdeman, L. V. (1985) : Coaggregation of oral Bacteroides species with other bacteria : central role in coaggregation bridges and competitions. Infect. Immun., **48**, 741-746.
  - 15) Gibbons, R. J. and van Houte, J. (1980) : Bacterial adherence and the formation of dental plaques ; in Bacterial adherence : Receptors and recognition. (Beachey, E. H., editor). Chapman and Hall, London, 63-104.
  - 16) Ellen, R. P., Schwarz-Faulkner, S. and Grove, D. A. (1988) : Coaggregation among periodontal pathogens, emphasizing Bacteroides gingivalis-Actinomyces viscosus cohesion on a saliva-coated mineral surface. Can. J. Microbiol., **34**, 299-306.
  - 17) Keene, H. J. (1963) : Parotid fluid collection system with vacuum-trap modification. J. Dent. Res., **42**, 1041.
  - 18) Block, P. L. and Brottman, S. (1962) : A method of submaxillary saliva collection without cannulization. N. Y. State D. J., **28**, 116-118.
  - 19) Miyata, T., Terukina, S., Matsuda, M., Kasamatsu, A., Takeda, Y., Murakami, T. and Iwanaga, S. (1987) : Fibrinogens Kawaguchi and Osa-

- ka: an amino acid substitution of A $\alpha$  arginine-16 to cysteine which forms an extra interchain disulfide bridge between the two A $\alpha$  chains. J. Biochem., 102, 93-101.
- 20) Henschen, A., Lottspeich, F., Kehl, M. and Southan, C. (1983) : Covalent structure of fibrinogen. Ann. N. Y. Acad. Sci., 408, 28-43.
  - 21) Bradford, M. M. (1976) : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem., 72, 248-254.
  - 22) Lantz, M. S., Rowland, R. W., Switalski, L. M. and Höök, M. (1986) : Interaction of Bacteroides gingivalis with fibrinogen. Infect. Immun., 54, 654-658.
  - 23) Laemmli, U. K. (1970) : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227, 680-685.
  - 24) Hawiger, J., Kloczewiak, M. and Timmons, S. (1983) : Interaction of fibrinogen with staphylococcal clumping factor and with platelets. Ann. N. Y. Acad. Sci., 408, 521-535.
  - 25) Strong, D. D., Laudano, A. P., Hawiger, J. and Doolittle, R. F. (1982) : Isolation, characterization, and synthesis of peptides from human fibrinogen that block the staphylococcal clumping reaction and construction of a synthetic clumping particle. Biochemistry, 21, 1414-1420.
  - 26) 村上幸孝, 埴岡隆, 井下英二, 雫石聰, 常光旭 (1987) : Bacteroides gingivalis と口腔レンサ球菌との共凝集反応. 口腔衛生会誌, 37, 532-533. 昭和62.
  - 27) McIntire, F. C., Vatter, A. E., Baros, J. and Arnold, J. (1978) : Mechanism of coaggregation between Actinomyces viscosus T14V and Streptococcus sanguis 34. Infect. Immun., 21, 978-988.
  - 28) Lancy, Jr. P., Appelbaum, B., Holt, S. C. and Rosan, B. (1980) : Quantitative in vitro assay for "corn cob" formation. Infect. Immun., 29, 663-670.
  - 29) Malamud, D., Goldman, R. and Taichman, N. S. (1983) : Modulation of bacterial aggregation by PMN and platelet extracts. Inflammation,

- 7, 133-144.
- 30) Malamud, D., Brown, C. and Goldman, R. (1984) : Inhibition of bacterial aggregation by serum- and blood-derived proteins. Infect. Immun., **43**, 386-390.
  - 31) Ericson, T., Pruitt, K. and Wedel, H. (1975) : The reaction of salivary substances with bacteria. J. Oral. Pathol., **4**, 307-323.
  - 32) Baumgartner, H. R. and Born, G. V. R. (1968) : Effects of 5-hydroxytryptamine on platelet aggregation. Nature, **218**, 137-141.
  - 33) Heeb, M. J., Costello, A. H. and Gabriel, O. (1982) : Characterization of a galactose-specific lectin from Actinomyces viscosus by a model aggregation system. Infect. Immun., **38**, 993-1002.
  - 34) Komiyama, K. and Gibbons, R. J. (1984) : Inhibition of lactose-reversible adherence between Actinomyces viscosus and oral streptococci by salivary components. Caries Res., **18**, 193-200.
  - 35) Stinson, M. W., Haraszthy, G. G., Zhang, X. L. and Levine, M. J. (1992) : Inhibition of Porphyromonas gingivalis adhesion to Streptococcus gordonii by human submandibular-sublingual saliva. Infect. Immun., **60**, 2598-2604.
  - 36) Brandtzaeg, P. (1965) : Immunochemical comparison of proteins in human gingival pocket fluid, serum and saliva. Arch. Oral. Biol., **10**, 795-803.
  - 37) Schenkein, H. A. and Genco, R. J. (1977) : Gingival fluid and serum in periodontal diseases I. Quantitative study of immunoglobulins, complement components, and other plasma proteins. J. Periodontol., **48**, 772-777.
  - 38) Mosesson, M. W. (1990) : Fibrin polymerization and its role in regulating hemostasis; in New trends in haemostasis. (Harenberg, J., Heene, D. L., Stehle, G., Schettler, G., editors). Springer-Verlag, Berlin, 27-43.
  - 39) Doolittle, R. F. (1984) : Fibrinogen and fibrin. Ann. Rev. Biochem., **53**, 195-229.
  - 40) Lantz, M. S., Switalski, L. M., Kornman, K. S. and Höök, M. (1985) :

- Bacteroides intermedius binds fibrinogen. J. Bacteriol., **163**, 623-628.
- 41) Annaix, V., Bouchara, J. P., Tronchin, G., Senet, J. M. and Robert, R. (1990) : Structures involved in the binding of human fibrinogen to Candida albicans germ tubes. FEMS Microbiol. Immunol., **64**, 147-154.
- 42) Kronvall, G., Schönbeck, C. and Myhre, E. (1979) : Fibrinogen binding structures in  $\beta$ -hemolytic streptococci group A, C, and G. Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B. **87**, 303-310.
- 43) Lämmler, C., Chhatwal, G. S. and Blobel, H. (1983) : Binding of human fibrinogen and its polypeptide chains to group B streptococci. Med. Microbiol. Immunol., **172**, 149-153.
- 44) Chhatwal, G. S., Dutra, I. S. and Blobel, H. (1985) : Fibrinogen binding inhibits the fixation of the third component of human complement on surface of group A, B, C, and G streptococci. Microbiol. Immunol., **29**, 973-980.
- 45) Whitnack, E. and Beachey, E. H. (1985) : Biochemical and biological properties of the binding of human fibrinogen to M protein in group A streptococci. J. Bacteriol., **164**, 350-358.
- 46) Whitnack, E. and Beachey, E. H. (1985) : Inhibition of complement-mediated opsonization and phagocytosis of Streptococcus pyogenes by D fragments of fibrinogen and fibrin bound to cell surface M protein. J. Exp. Med., **162**, 1983-1997.
- 47) Annaix, V., Bouchara, J. P., Larcher, G., Chabasse, D. and Tronchin, G. (1992) : Specific binding of human fibrinogen fragment D to Aspergillus fumigatus conidia. Infect. Immun., **60**, 1747-1755.
- 48) Lantz, M. S., Allen, R. D., Bounelis, P., Switalski, L. M. and Hook, M. (1990) : Bacteroides gingivlalis and Bacteroides intermedius recognize different sites on human fibrinogen. J. Bacteriol., **172**, 716-726.
- 49) Inoshita, E., Amano, A., Hanioka, T., Tamagawa, H., Shizukuishi, S. and Tsunemitsu, A. (1986) : Isolation and some properties of exo-

- hemagglutinin from the culture medium of Bacteroides gingivalis 381. Infect. Immun., **52**, 421-427.
- 50) 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.
- 51) Grenier, D. and Mayrand, D. (1987) : Functional characterization of extracellular vesicles produced by Bacteroides gingivalis. Infect. Immun., **55**, 111-117.
- 52) Grenier, D. (1992) : Demonstration of a bimodal coaggregation reaction between Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola. Oral. Microbiol. Immunol., **7**, 280-284.
- 53) Carlsson, J., Höfling, J. F. and Sundqvist, G. K. (1984) : Degradation of albumin, haemopexin, haptoglobin and transferrin, by black-pigmented Bacteroides species. J. Med. Microbiol., **18**, 39-46.
- 54) 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.
- 55) Sandholm, L. (1986) : Proteases and their inhibitors in chronic inflammatory periodontal disease. J. Clin. Periodontol., **13**, 19-26.
- 56) Fishburn, C. S., Slaney, J. M., Carman, R. J. and Curtis, M. A. (1991) : Degradation of plasma proteins by the trypsin-like enzyme of Porphyromonas gingivalis and inhibition of protease activity by a serine protease inhibitor of human plasma. Oral. Microbiol. Immunol., **6**, 209-215.
- 57) Talonpoika, J. T., Söderling, E. and Paunio, K. (1993) : Characterization of fibronectin and fibrin(ogen) fragments in gingival crevicular fluid. Scand. J. Dent. Res., **101**, 26-32.

脚注

大阪大学歯学部予防歯科学講座（主任：雫石聰教授）

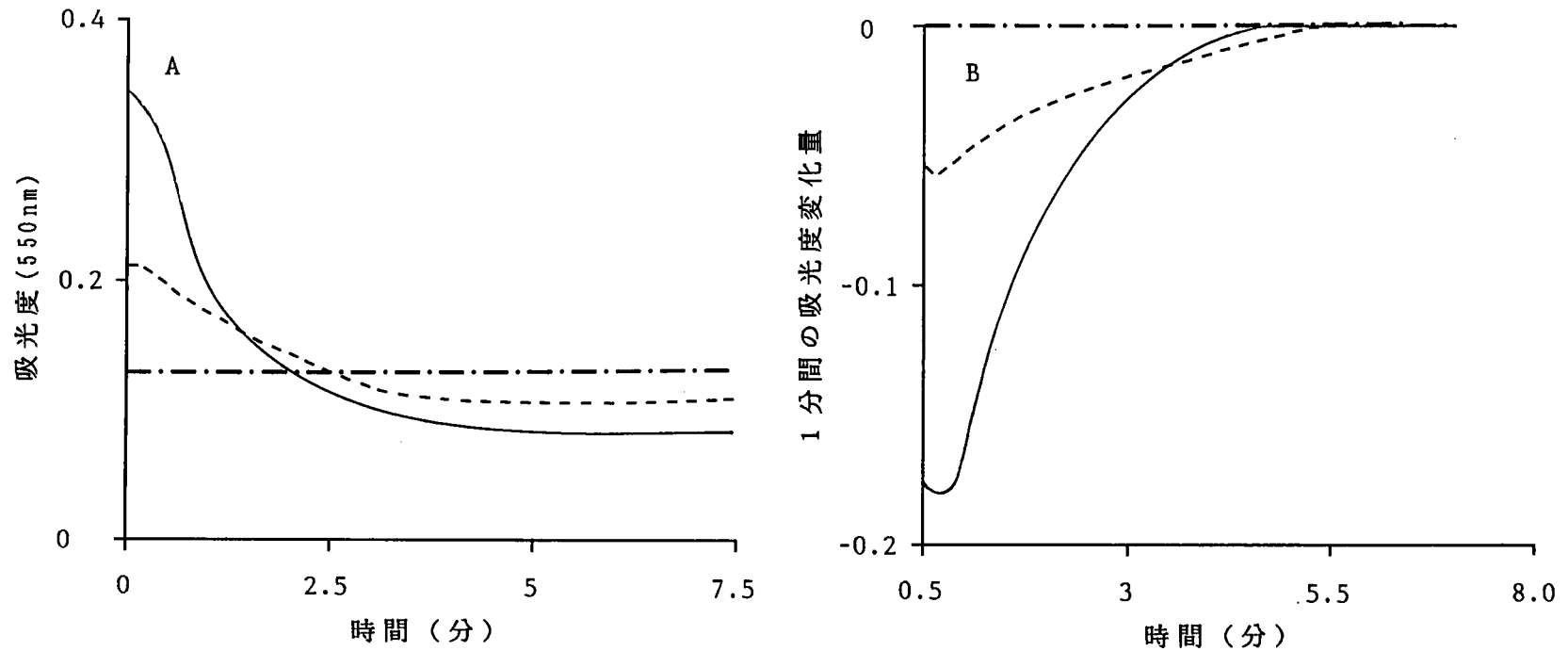


図 1 *P. gingivalis* 381株と *S. oralis* ATCC 9811株とを反応させた時あるいは各菌体のみを加えた時の波長550nmにおける吸光度の経時的変化(A) およびそれぞれの1分間の吸光度変化量の経時的変化(B)

— *P. gingivalis* 381株と *S. oralis* ATCC 9811株とを反応させた時  
- - - *P. gingivalis* 381株のみを加えた時  
- · - *S. oralis* ATCC 9811株のみを加えた時

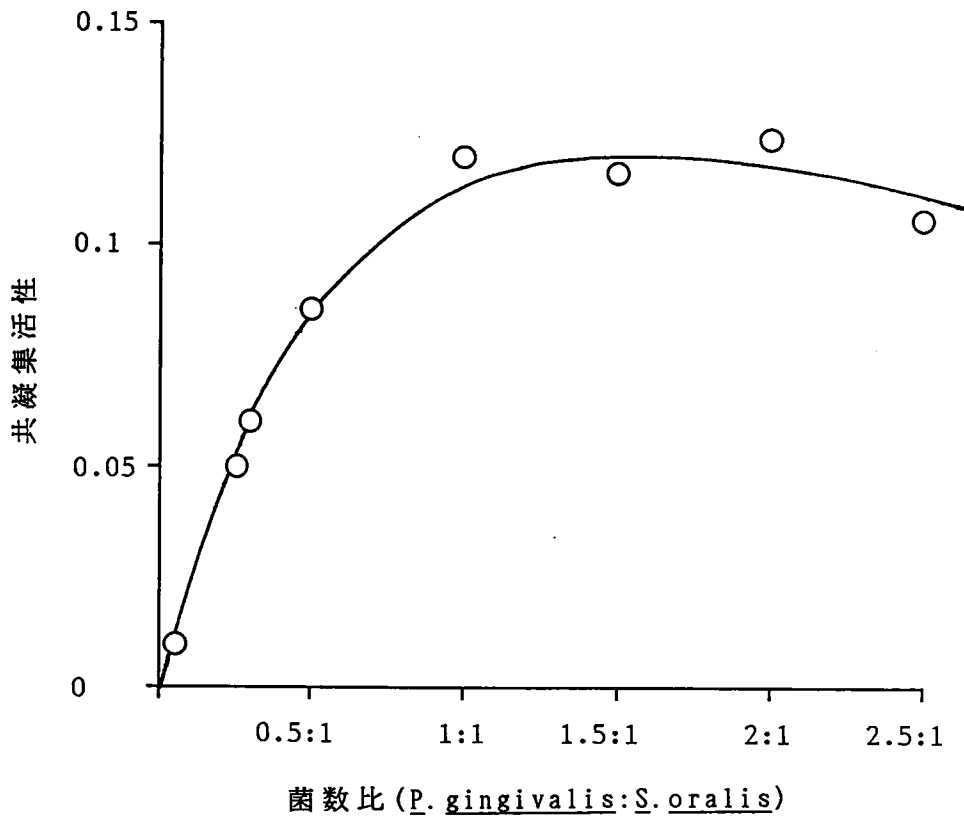


図2 *P. gingivalis* 381株と*S. oralis* ATCC 9811株との共凝集に及ぼす両菌数比の影響

図中の数値は2回の実験の平均値を表す。



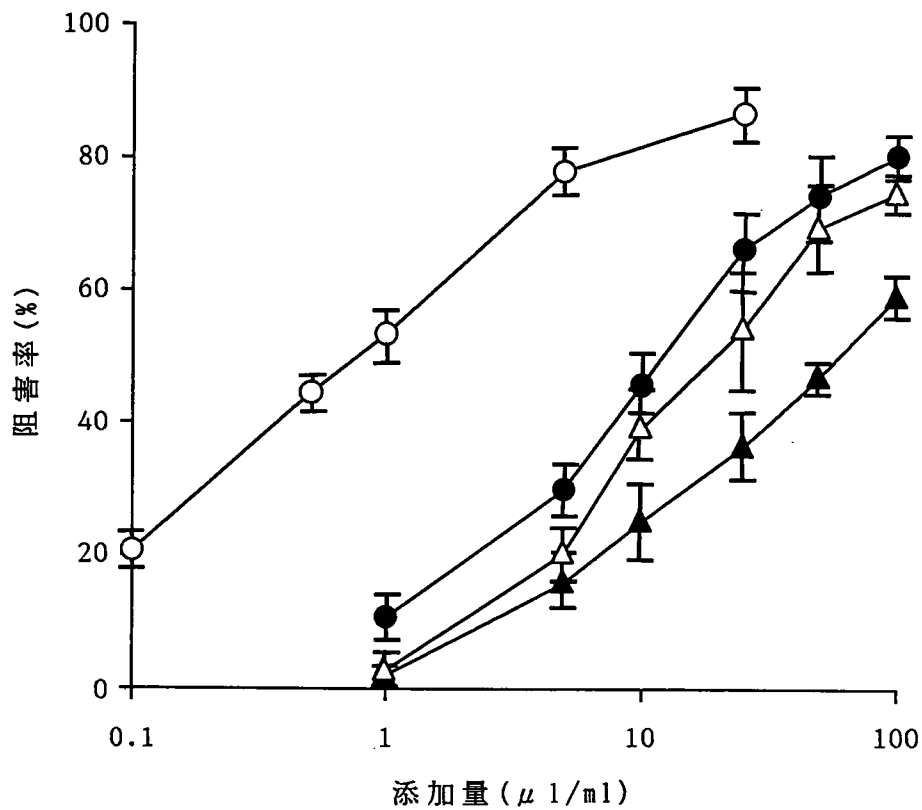


図3 *P. gingivalis* 381株と*S. oralis* ATCC 9811株との共凝集に及ぼすヒト唾液および血漿の影響

- ：血漿
- ：混合唾液
- △：顎舌下腺唾液
- ▲：耳下腺唾液

図中の数値は5例の平均値±標準誤差を表す。

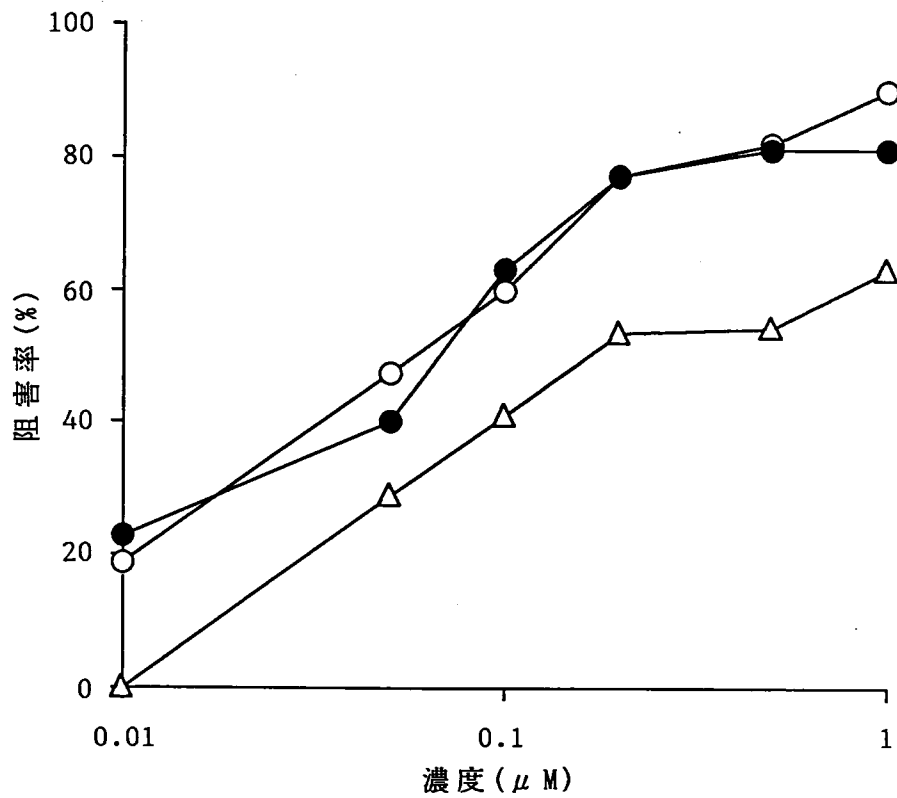


図4 *P. gingivalis* 381株と*S. oralis* ATCC 9811株との共凝集に及ぼす  
 フィブリノーゲン, フラグメントDおよびフラグメントEの影響  
 ○: フィブリノーゲン  
 ●: フラグメントD  
 △: フラグメントE  
 図中の数値は3回の実験の平均値を表す。

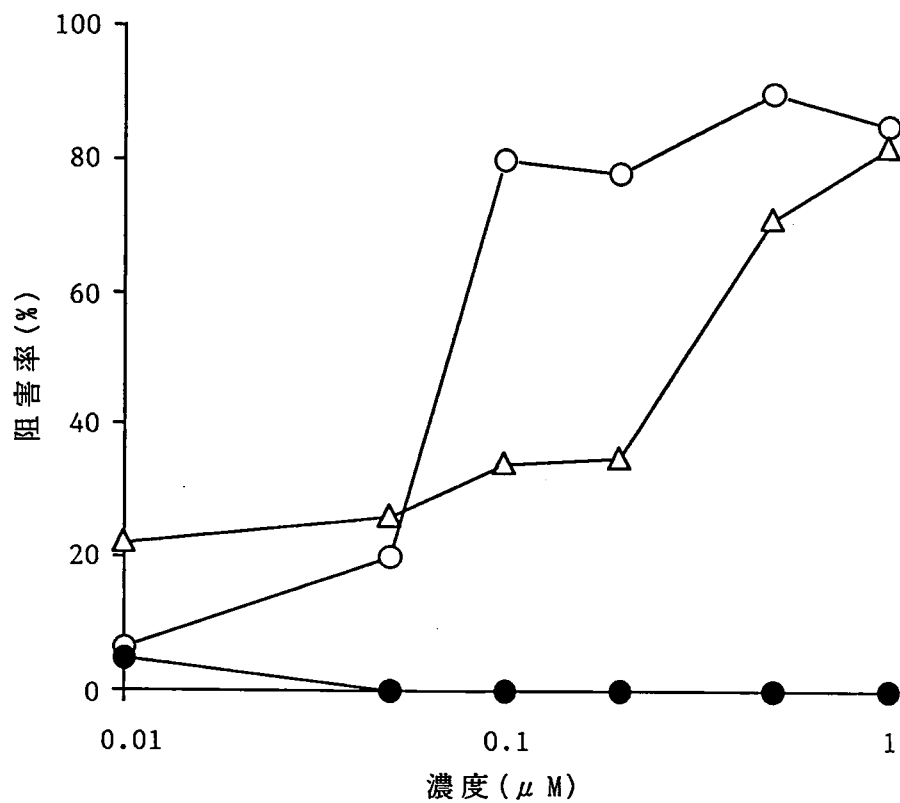


図5 *P. gingivalis* 381株と*S. oralis* ATCC 9811株菌体との共凝集に及ぼすAα鎖, Bβ鎖およびγ鎖の影響

○ : Aα鎖

● : Bβ鎖

△ : γ鎖

図中の数値は3回の実験の平均値を表す。

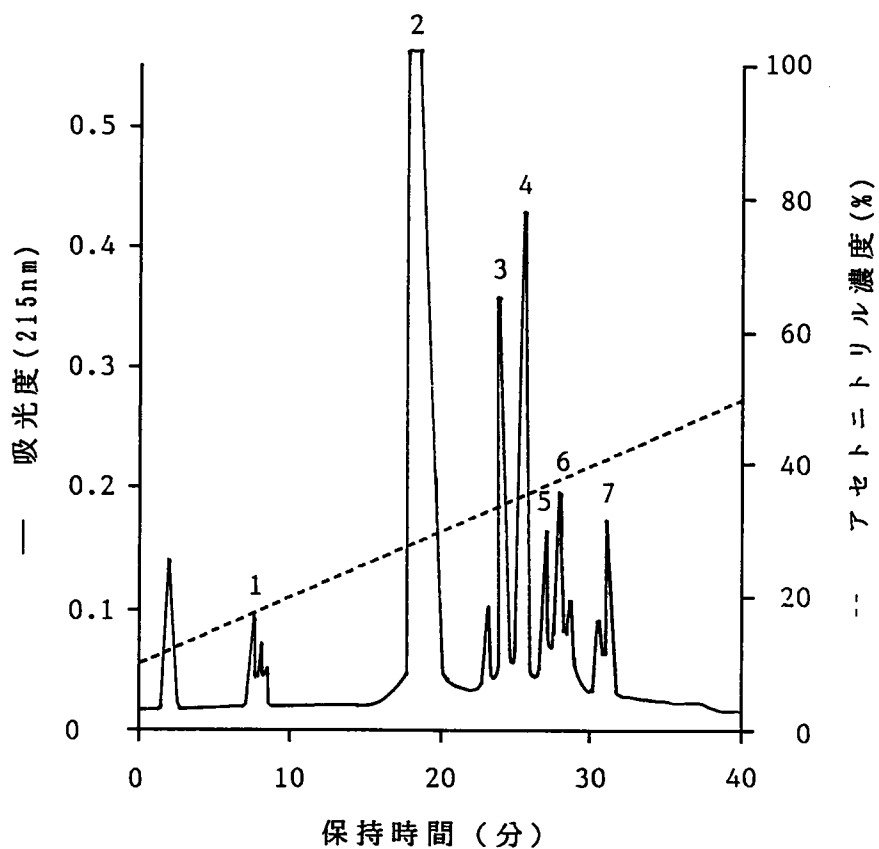


図6 CNBr処理したA $\alpha$ 鎖のVYDAC218TP54による逆相HPLCパターン

1. A $\alpha$  585-610
2. A $\alpha$  1-51, A $\alpha$  241-476, A $\alpha$  518-584
3. A $\alpha$  208-235
4. A $\alpha$  148-207
5. A $\alpha$  477-517
6. A $\alpha$  52-91
7. A $\alpha$  92-147

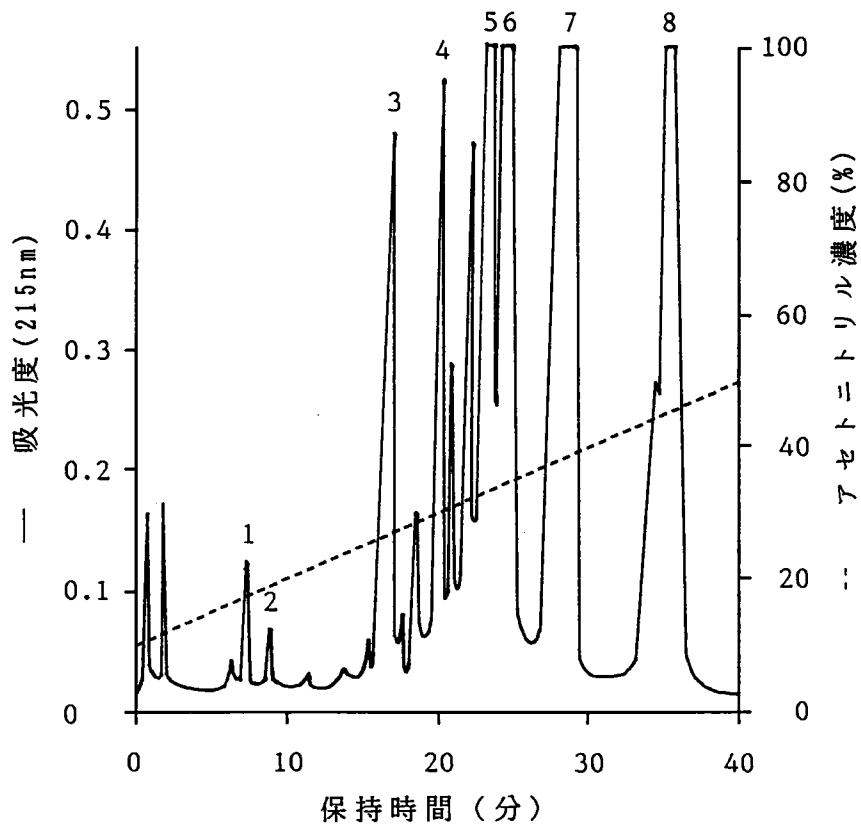


図7 CNBr処理した $\gamma$ 鎖のVYDAC218TP54による逆相HPLCパターン

1.  $\gamma$  79-89
2.  $\gamma$  90-94
3.  $\gamma$  385-411
4.  $\gamma$  311-336
5.  $\gamma$  337-379
6.  $\gamma$  265-310
7.  $\gamma$  95-264
8.  $\gamma$  1-78

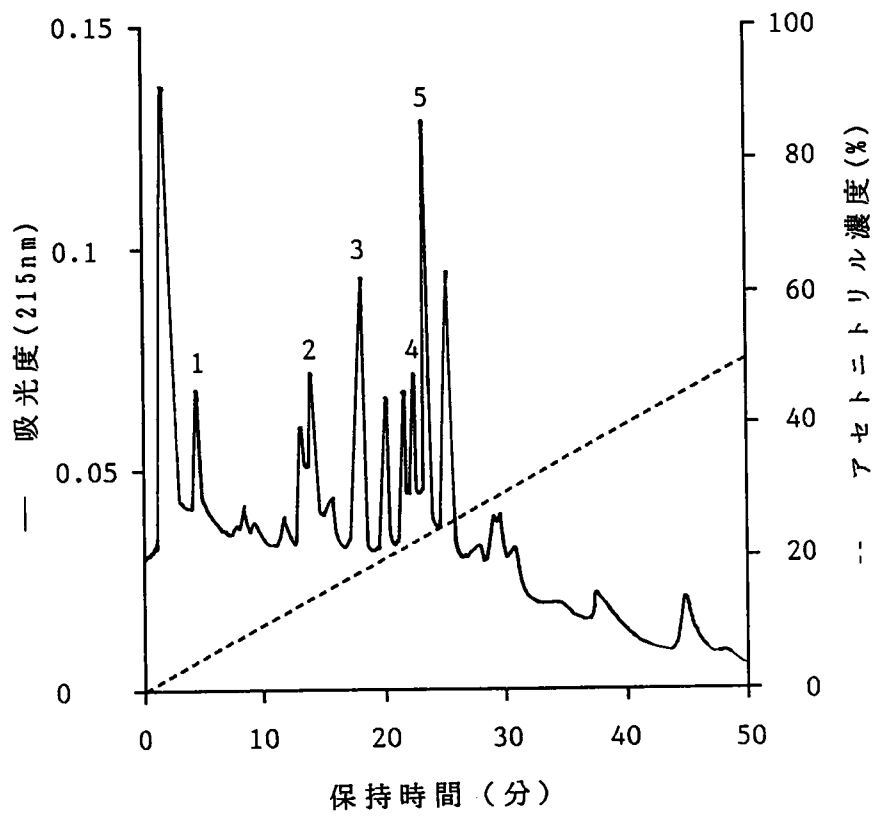


図 8 リシルエンドペプチダーゼ処理したA $\alpha$  148-207のVYDAC214TP54  
逆相HPLCパターン

1. A $\alpha$  177-183
2. A $\alpha$  184-191
3. A $\alpha$  158-176
4. A $\alpha$  149-157
5. A $\alpha$  192-206

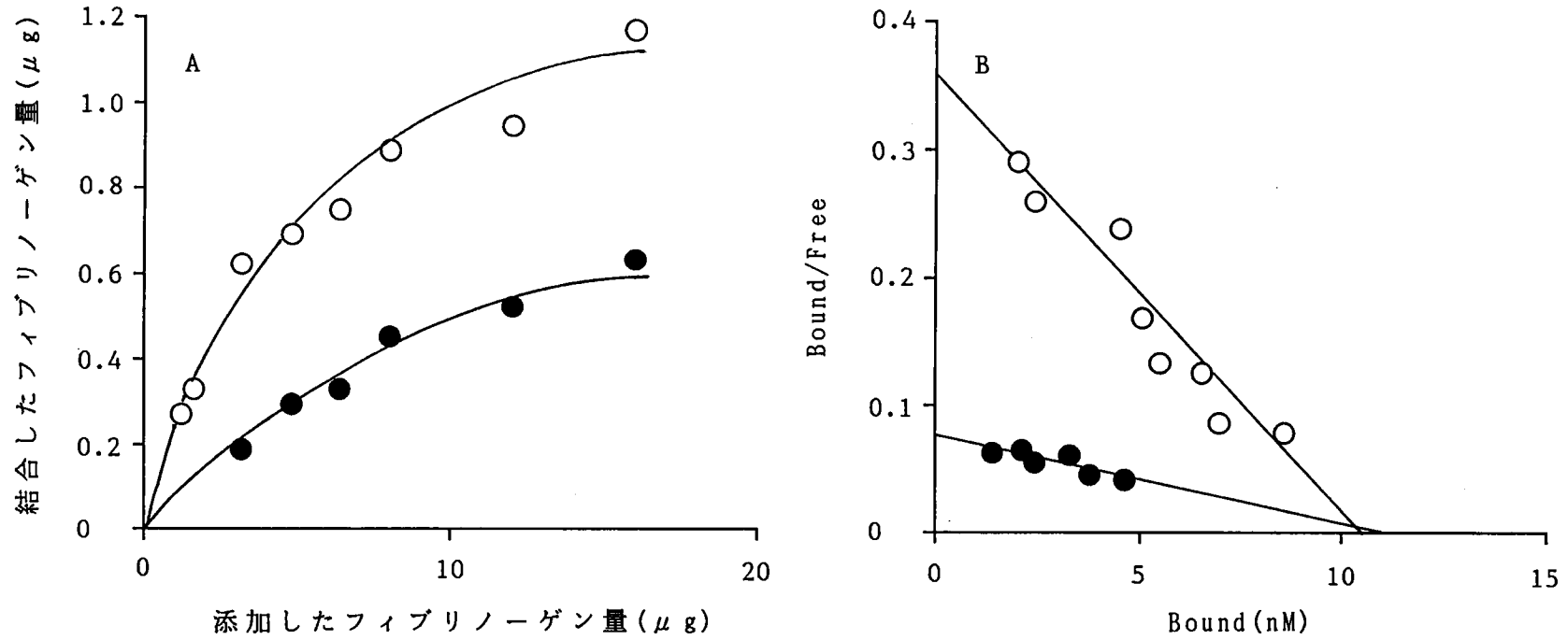


図 10 *P. gingivalis* 381株または *S. oralis* ATCC 9811株菌体とフィブリンノーゲンとの結合飽和曲線 (A) およびその Scatchard 解析 (B)  
○ : *P. gingivalis* 381株  
● : *S. oralis* ATCC 9811株  
図中の数値は2つの試料の平均値を表す。

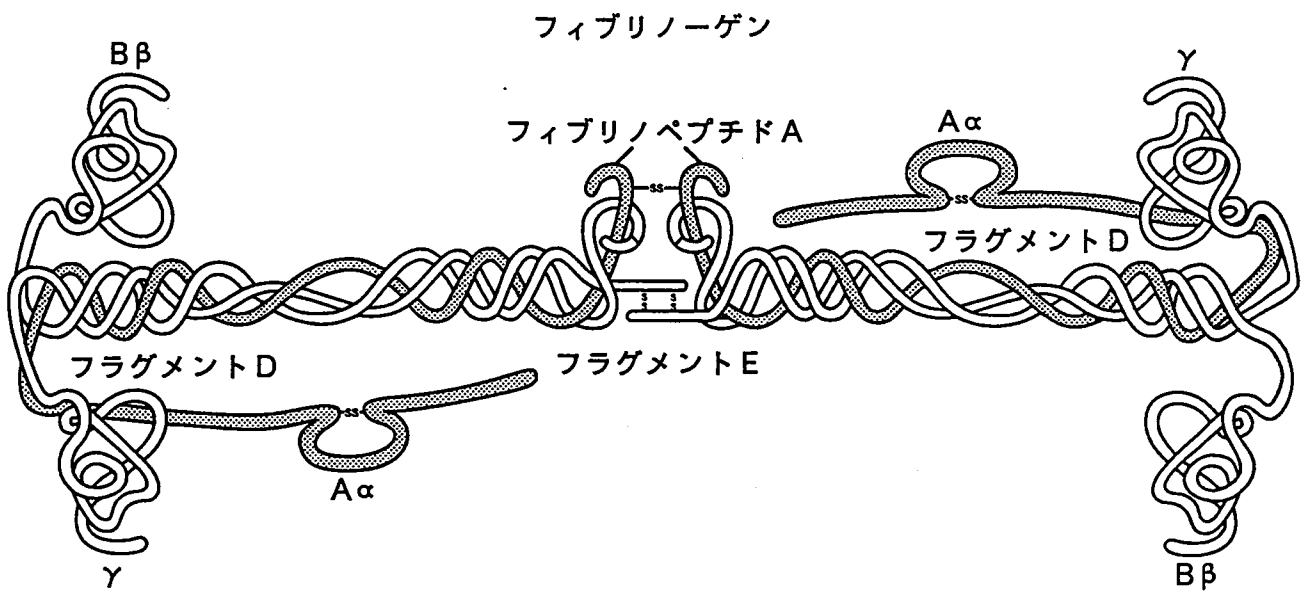


図11 フィブリノーゲンの立体構造の模式図（文献38）より引用）



表 1 P. gingivalis 381株と S. oralis ATCC 9811株との共凝集に及ぼすpHおよび温度の影響

反応条件	共凝集活性*
pH	
4.0	38
5.0	100
6.0	96
7.0	85
8.0	84
9.0	69
温度 (°C)	
4	67
20	73
37	100
50	98

\*: 共凝集活性は最大活性に対する割合(%)として求めた。  
表中の数値は2回の実験の平均値を表す。

表 2 P. gingivalis 381株とS. oralis ATCC 9811株との共凝集に及ぼす糖およびアミノ酸の影響

供試した糖およびアミノ酸	濃度 (mM)	阻害率 (%)
<b>糖</b>		
D-フラクトース	100	0
L-フコース	100	0
D-マンノース	100	0
D-ガラクトース	100	0
ラクトース	100	0
ラフィノース	100	0
<u>N</u> -アセチル-D- ガラクトサミン	100	0
<u>N</u> -アセチル-D- グルコサミン	100	0
<b>アミノ酸</b>		
グリシン	100	0
L-アラニン	100	0
L-バリン	100	0
L-セリン	100	0
L-アルギニン	10	19
	50	47
	100	56
L-プロリン	100	0
L-リシン	10	0
	50	15
	100	28
L-ロイシン	100	0

表中の数値は2回の実験の平均値を表す。

表3 P. gingivalis 381株とS. oralis ATCC 9811株との共凝集に及ぼす  
血漿由来のタンパク質の影響

血漿由来のタンパク質	50%阻害濃度 ( $I_{50}$ )	
	( $\mu$ g/ml)	( $\mu$ M)
$\alpha_1$ -酸性糖タンパク質	>500	>13
アルブミン	200	3.0
フィブリノーゲン	20	0.06
フィブロネクチン	83	0.38
IgG	>250	>1.6
$\alpha_2$ -マクログロブリン	>250	>0.34
$\beta_2$ -ミクログロブリン	50	4.3
トランスフェリン	42	0.55

表中の数値は2回の実験の平均値を表す。

表 4 P. gingivalis 381株と S. oralis ATCC 9811株との共凝集に及ぼすA $\alpha$ 鎖  
および $\gamma$ 鎖のCNBrフラグメントの影響

A $\alpha$ 鎖のCNBr フラグメント (1 $\mu$ M)	阻害率 (%)	$\gamma$ 鎖のCNBr フラグメント (1 $\mu$ M)	阻害率 (%)
残基		残基	
1- 51*	ND**	1- 78	60
(1- 16***	0)	79- 89	0
52- 91	39	90- 94	0
92-147	47	95-264	0
148-207	79	265-310	9
208-235	24	311-336	0
236-238	ND	337-379	23
239-240	ND	380-384	ND
241-476*	ND	385-411	12
477-517	42		
518-584*	ND		
585-610	15		

\*: 各フラグメントに分離できなかった。

\*\* : 測定せず。

\*\*\*: フィブリノペプチドAを用いた結果を示す。

表中の数値は2回の実験の平均値を表す。

表5 *P. gingivalis* 381株と*S. oralis* ATCC 9811株との共凝集に及ぼす  
A $\alpha$  148-207のリシルエンドペプチダーゼ処理フラグメントの影響

残基	ペプチド	アミノ酸配列	濃度 ( $\mu$ M)	阻害率 (%)
148		K	ND*	ND
149-157		RLEVDIDIK	5	6
158-176		IRSCRGSCSRAL-	1	28
		AREVDLK	2	48
			5	100
177-183		DYEDQQK	5	7
184-191		QLEQVIK	5	19
192-206		DLLPRSDRQHLP-	1	26
		LIK	2	68
			5	85
207		M	ND	ND

\*: 測定せず.

表中の数値は2回の実験の平均値を表す.

表6 P. gingivalis 381株とS. oralis ATCC 9811株との共凝集の阻害活性に  
及ぼすA $\alpha$  158-176およびA $\alpha$  192-206のアルギニン残基の化学修飾の影響

ペプチド	濃度 ( $\mu$ M)	阻害率 (%)
非修飾A $\alpha$ 158-176	2	51
修飾A $\alpha$ 158-176	2	7
非修飾A $\alpha$ 192-206	2	45
修飾A $\alpha$ 192-206	2	17

表中の数値は2回の実験の平均値を表す。

表7 P. gingivalis 381株とS. oralis ATCC 9811株との共凝集に及ぼす各菌体の  
 フィブリノーゲンによる前処理の影響

菌株および前処理した物質	阻害率 (%)	菌体および前処理した物質	阻害率 (%)
<u>P. gingivalis</u> 381株		<u>S. oralis</u> ATCC 9811株	
フィブリノーゲン*	0	フィブリノーゲン	0
20mMNEM	0	20mMNEM	ND**
フィブリノーゲン+20mMNEM	100	フィブリノーゲン+20mMNEM	0
1mMpCMPS	90	1mMpCMPS	ND
フィブリノーゲン+1mMpCMPS	100	フィブリノーゲン+1mMpCMPS	0
20mMTLCK	38	20mMTLCK	ND
フィブリノーゲン+20mMTLCK	100	フィブリノーゲン+20mMTLCK	0
2 mMPMSF	0	2 mMPMSF	ND
フィブリノーゲン+2 mMPMSF	25	フィブリノーゲン+2 mMPMSF	0
10mMEDTA	0	10mMEDTA	ND
フィブリノーゲン+10mMEDTA	0	フィブリノーゲン+10mMEDTA	0

\*: フィブリノーゲンはいずれも100 $\mu$ g/mlの濃度を用いた。

\*\* : 測定せず。

表中の数値は2回の実験の平均値を表す。

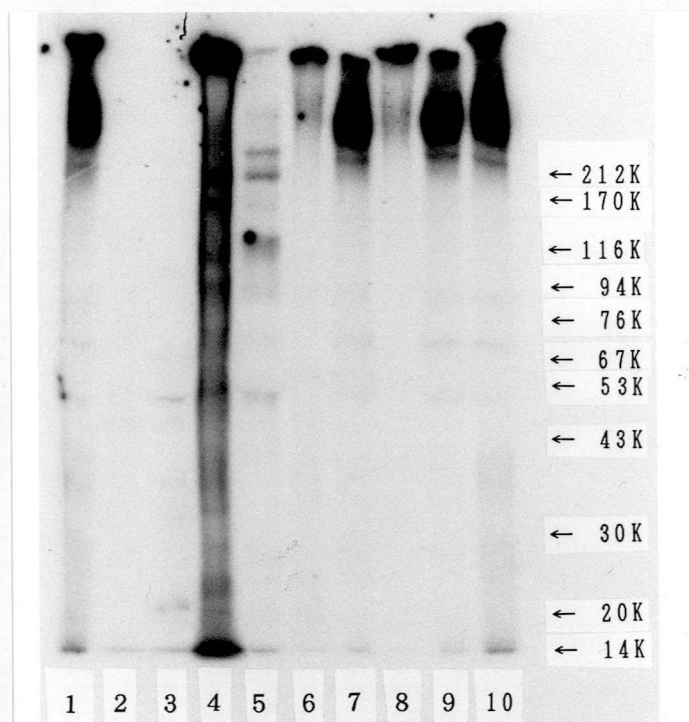


図9  $^{125}\text{I}$ 標識フィブリノーゲンと反応させた各菌体およびその上清のオートラジオグラフィ

- レーン：1. 10. 標識フィブリノーゲン
2. NEM非存在下で標識フィブリノーゲンと反応させた *P. gingivalis* 381株菌体抽出物
  3. NEM非存在下で標識フィブリノーゲンと *P. gingivalis* 381株と反応させた上清
  4. NEM存在下で標識フィブリノーゲンと反応させた *P. gingivalis* 381株菌体抽出物
  5. NEM存在下で標識フィブリノーゲンと *P. gingivalis* 381株と反応させた上清
  6. NEM非存在下で標識フィブリノーゲンと反応させた *S. oralis* ATCC 9811株菌体抽出物
  7. NEM非存在下で標識フィブリノーゲンと *S. oralis* ATCC 9811株と反応させた上清
  8. NEM存在下で標識フィブリノーゲンと反応させた *S. oralis* ATCC 9811株菌体抽出物
  9. NEM存在下で標識フィブリノーゲンと *S. oralis* ATCC 9811株と反応させた上清