

学位論文題名

Mycoplasma salivarium の
ヒト IgG Fc 結合活性について

学位論文内容の要旨

Mycoplasma salivarium (MS) 細胞は、ヒト IgG Fc 断片と結合した。結合活性は pH 7.0 よりも pH 4.0 で強く、 Mn^{2+} ならびに Cu^{2+} で増強されたが、マンノースで阻害された。MS 細胞のプロナーゼ処理によって、IgG Fc 断片結合活性が著しく低下し、分子量 150、90 ならびに 88 kDa のタンパク質が減少または消失した。これらの成績から、MS 細胞はレクチン様活性でマンノース特異的に IgG Fc 部位の糖鎖と結合し、結合に関与するのは分子量が 150、90 ならびに 88 kDa の細胞表層タンパク質であることが明らかとなった。

IgG Fc 断片と結合する主要タンパク質は、分子量 90 kDa のタンパク質 (90 kD) であることがイムノブロッティング法で証明された。

すなわち、90 k p は M S 細胞膜ではマイナーなタンパク質であるにもかかわらず、M S 細胞の I g G F c 断片結合活性をになう主要タンパク質であることが明らかとなった。

90 k p は、トリトン X-100 によって M S 細胞の膜画分から可溶化され、イオン交換クロマトグラフィーならびにクロマトフォーカシングで精製された。最終精製標品の比活性は膜画分の約 10 倍、回収率は 20.3 % であった。90 k p は、ヒトおよび 7 種の動物由来 I g G F c 断片と結合した。

90 k p のヒト I g G F c 断片結合活性は I g M で約 57 %、I g G で約 93 % 阻害された。このことから 90 k p は I g G のみならず I g M とも F c 部位で結合する可能性が示唆された。比較のために用いたプロテイン A

(Staphylococcus aureus 由来の I g G F c 結合性タンパク質) は、ヒト、ブタ、マウスおよびウサギ I g G F c 断片とこの順序で強く結合したことから、90 k p はプロテイン A とは異なる結合様式で I g G F c 部位と結合することが

示唆された。90 k p はヤギならびにウサギ Ig G の F c 部位と結合し、Con A に対して強い親和性を示した。これらの成績は、90 k p が Ig G の F c 部位と結合する糖タンパク質であることを示している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 邊 継 男

副 査 教 授 久 保 木 芳 徳

副 査 教 授 松 本 章

学 位 論 文 題 名

Mycoplasma salivarium の

ヒト IgG Fc 結合活性について

研究目的

Mycoplasma salivarium はヒトの口腔常在微生物叢の一員であり、主な常在部位は歯垢と歯肉溝である。この微生物は、組織傷害性に作用し得る生化学的ならびに免疫学的活性を持ち、口腔内における生細胞数(CFU)の動態ならびに抗体応答の誘導などに関する所見から、口腔感染症(歯周疾患、知歯周囲炎、顎骨炎など)に病因的にかかわっている場合のあることが示唆されている。

M. salivarium (ATCC 23064) (MS) 細胞がヘモリジン感作ヒツジ赤血球(SRBC)を末感作 SRBC よりも強く凝集することに着目し、ヒト IgG の Fc 断片をプローブとして、MS 細胞が IgG のFc 部位と結合することを明らかにし、その活性を担う物質を同定し、精製する目的で本研究を行った。

結果

MS 細胞のヒト IgG Fc 断片結合活性

MS 細胞は IgG Fc 断片と結合し、その活性は D-mannose で阻害され、Mn イオンならびに Cu イオンによって活性化された。

MS 細胞を pronase で処理すると、その活性は失われ、分子量 88、90 ならびに 150 kDa の細胞表層タンパク質が消失していることが細胞タンパク質の SDS-PAGE で示された。これらのタンパク質のうち、90 kDa のタンパク質(90 kp)が結合活性において主要な役割を果たしていることが immunoblotting 法で明らかにされた。

90 kp の精製

MS 細胞膜標品を調製し、1% (v/v) Triton X-100含有 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液(pH 6.0)に浮遊させ、37°Cで 1 時間振盪・処理した。浮遊液の 100,000 x g 上清に 90 kp は存在することが immunoblotting 法で確認された。

この上清を、Triton X-100 存在下で、CM-Sepharose FF、DEAE Sephacel、chromatofocusing で順次処理したのちに、さらに Triton X-100 非存在下で再度 DEAE Sephacel で処理することによって、90 kp を単一のタンパク質として精製することが出来た。

90 kp の性状

1. 等電点が pH 5.5 であった。この pH で IgG Fc 断片結合活性は不可逆的に失われた。したがって、精製の際に、chromatofocusing で溶出した画分の pH を直ちに 7.0 となるように調整した。
2. concanavalin A に対して強い親和性を示した。
3. IgG Fc 断片結合活性は抗原特異的ヤギ IgG、ヒト IgG ならびに IgM によって阻害された。
4. 90 kp 感作タンニン酸処理 SRBC がヘモリジン感作 SRBC を凝集した。
5. ウシ、ヤギ、ヒツジ、ブタ、マウス、ラットならびにウサギ由来 IgG Fc 断片とはほぼ同程度に結合し、対照として調べた精製プロテイン A のように強い種特異性を示さなかった。

考察ならびに総括

以上の成績から、MS 細胞はヒト IgG Fc 部位と結合することが明かとなった。その結合様式はプロテイン A との結合様式とは異なり、MS 細胞膜表層の 90 kp がレクチン様活性によって、IgG Fc 部位の糖鎖を構成する D-mannose を認識してこれと結合することが示唆された。

IgG Fc 結合活性によって、*M. salivarium* は、IgG と非特異的に結合し、擬装することによって食細胞によって捕捉されることを逃れ、さらに、感染防御抗体の中で主役を果たしている IgG の機能を喪失させることによって、自らのみならず共存する他の微生物の生存を可能とし、感染の遷延化に寄与しているものと考えられる。*M. salivarium* は、宿主の感染防御機構から逃れるために、いくつかの形態的ならびに機能的特徴を備えていることが知られている。その機能的特徴の一つとして、本研究で明らかにされた活性が新たに追加された。

審査担当者は、論文提出者に論文要旨の説明を求め、ひきつづいて、研究目的を設定するに至った経過、研究方法、結果、考察などについて質問し、関連事項について試問したところ、合格と判定するに足る解答を得た。本研究論文は、口腔常在微生物叢における *M. salivarium* の役割ならびに、ほとんどが、口腔常在微生物による混合感染である口腔感染症の病因論と治療法を考える上で重要な情報を提示している。さらに、精製した活性物質は試薬として免疫学的研究への利用の可能性も考えられる。以上の審査結果にもとづき、審査担当者は、本研究が学位論文に値し、論文提出者が歯学博士の学位を授与されるにふさわしいものと認定した。