

氏名	川 端 英 二
授 与 し た 学 位	博 士
専 攻 分 野 の 名 称	歯 学
学 位 授 与 番 号	博甲第 2015 号
学 位 授 与 の 日 付	平成 12 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	歯学研究科歯学専攻（学位規則第 4 条第 1 項該当）
学 位 論 文 題 名	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> の線毛の B 細胞エピトープに関する研究
論 文 審 査 委 員	教授 滝川正春 教授 福井一博 教授 渡邊達夫

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

細菌線毛はタンパク質のサブユニットから構成される纖維状の構造体であり感染の最初の段階である宿主組織への付着に関与することから、種々の細菌において重要な病原因子であると認識されてきた。そのサブユニットタンパク質は、一般に分子量 14~30kDa であり、高い免疫原性を有するとされている。線毛に対して産生された抗体はその細菌の宿主組織への付着を阻止する作用があり、そのため線毛について、細菌の定着を阻止するためのワクチンとしての可能性が検討してきた。

Actinobacillus actinomycetemcomitans (Aa) は、グラム陰性通性嫌気性桿菌であり、若年性歯周炎や重度の歯周炎の病原菌とされている。これらの歯周病患者の血清中には、Aa 超音波破碎抗原に対する IgG 抗体のレベルが増加する。Aa の線毛は、本菌の歯および歯周組織への付着に関与すると示唆されている。その線毛のサブユニットは、分子量が 6.5 kDa と低く、糖が結合した糖タンパク質であることなど、他の線毛には見られない特徴を有することがわかつてきた。このような特徴を有する線毛構成サブユニットに対して歯周病患者でどのような体液性免疫応答が誘導されるのかは極めて興味深い問題である。

そこで本研究では、歯周病患者における Aa 線毛サブユニットに対する抗体が認識するサブユニットタンパク質上の部位、すなわちエピトープに焦点を絞り検討することとした。

【材料および方法】

1. 線毛サブユニットの調製

線毛サブユニットを、Aa 310-a 株あるいは OHN 45-10a 株を供試株として Inoue らの方法に従って分離調製した。

2. 被験血清

Aa ATCC29523 株の超音波破碎抗原に対する血清抗体価が健常者との間に比べて 2SD を超えて高い値を示す歯周病患者 22 名、また SD 範囲内の歯周病患者 10 人、健常者 10 人の末梢血血清を供した。

3. ペプチド合成

Aa 310-a 株あるいは OHN 45-10a 株線毛サブユニットタンパク質のアミノ酸配列の全てを網羅する 5 残基ずつオーバーラップさせて設計した計 12 種の 10 残基からなるペプチドを合成した。なお、サブユニットタンパク質には疎水性アミノ酸が多く含まれるため、ペプチドは親水性を増すために C 末端にポリオキシエチレンを付加し、その合成は F-moc 法により SRM96A システム（島津総合科学研究所製；東京）を用

いて行った。

4. ウエスタンプロット

歯周病患者血清に含まれる Aa 線毛サブユニットに対する IgG 抗体をウエスタンプロット法で検出した。患者血清を一次抗体として、ペルオキシダーゼを結合したゴート抗ヒト IgG 抗体を二次抗体として反応させ、基質として 4-メトキシ-1-ナフトールと過酸化水素を用いて発色させた。

5. 合成ペプチドおよび線毛サブユニットを用いた競合 ELISA

線毛サブユニットにおける抗体認識部位を Cachia らの方法を改良した競合 ELISA を用いることによって決定した。それぞれの阻害物と前反応させた血清および阻害物を加えない血清を一次抗体として、プレート上に固相化された精製線毛サブユニットと反応させた。阻害物を加えたときの発色強度の抑制率を評価した。なお阻害物としては、1) 合成ペプチド、2) 線毛サブユニット、3) 塩酸グアニジン処理した線毛サブユニット、4) 過ヨウ素酸処理した線毛サブユニット、および 5) 糖、を用いた。

【結果と考察】

1. 線毛サブユニットに対する歯周病患者血清の反応性

Aa ATCC29523 株超音波破碎抗原に対する血清抗体価が健常者との間に比べて 2SD を超えて高い値を示す歯周病患者 22 人のうち 13 人 (57%) についてはウエスタンプロットで線毛サブユニットのバンドが検出され、本菌の線毛サブユニットに対する体液性免疫応答が誘導されていることが示された。

2. 合成ペプチドを用いた B 細胞エピトープの解析

ウエスタンプロットにおいて線毛サブユニットに対するバンドが特に強く検出された患者血清について、線毛サブユニットを抗原として、合成ペプチドを阻害物質として用いた競合 ELISA を行った。

個々の合成ペプチドによる競合阻害では、それぞれの患者血清に対して作用させたところ、血清の線毛サブユニット抗原に対する反応は、約 10% の阻害が見られた。また、9 種類のペプチドの混合物で競合阻害した場合も 10% 程度の阻害であった。次に阻害物質として精製線毛サブユニットを用いた競合 ELISA では、86% 以上の反応阻害を示した。以上のデータは、歯周病患者血清中に存在する抗線毛サブユニット抗体には、サブユニット上のペプチド一次構造のみから構成されるエピトープを認識する抗体がほとんど含まれないことを示唆している。

3. B 細胞エピトープにおけるサブユニット立体構造の関与の検討

本研究で用いた線毛サブユニットはタンパク質の変性条件下で調製されたものであり、高次構造をそのまま保持しているとは考えにくいが、タンパク質変性剤である塩酸グアニジン処理しランダムコイルとなった抗原タンパク質は、非処理の線毛サブユニットと同様に反応阻害がみられた。以上より、患者血清中の抗体は、立体構造に依存する B 細胞エピトープを認識するものではないと結論された。

4. B 細胞エピトープにおけるサブユニット結合糖鎖の関与の検討

線毛サブユニットに結合している糖鎖がエピトープの形成に関与しているかどうかを、過ヨウ素酸で糖鎖の環状構造を酸化開裂させた線毛サブユニットを阻害物質として用いた競合 ELISA により検討した。その結果、反応阻害は 0~8% にとどまり、線毛サブユニットに結合している糖がエピトープの形成に重要な役割を果たしていることが示された。また、糖を阻害物質として用いた競合 ELISA では、線毛サブユニットに対する患者血清の反応は N-アセチルヘキソサミンがヘキソースより有意に高い反応阻害を示した。この結果から、線毛サブユニットのエピトープの構造においては、おそらくサブユニットタンパク質に結合している N-アセチルヘキソサミン残基が関与しているものと推察された。

【結論】

供試した 22 人中 13 人 (57%) の患者血清中には、Aa 線毛サブユニットに対する IgG 抗体が検出され、その抗体には、サブユニットタンパク質の一次構造をエピトープとして認識しているものはほとんどなかった。また、エピトープにおけるサブユニット立体構造の関与も否定された。エピトープの形成にはこの線毛のもう一つの特徴である糖が極めて重要な因子であり、その中でもおそらくは N-アセチルヘキソサミン残基が関与していることが示唆された。

論文審査結果の要旨

本研究は歯周病原性細菌と考えられている *Actinobacillus actinomycetemcomitans* の病原因子の一つである線毛の構成サブユニットに着目し、その免疫原性ならびにB細胞エピトープを検討したものである。

免疫原性については、本菌に対する血清抗体値の高い患者 22 人を選び、サブユニットに対する血清 IgG 抗体をウェスタンプロット法により検出することにより、検討した。その結果 13 人 (57%) において抗体が検出され、本菌の線毛サブユニットに対する抗体産生が誘導されていることを示した。

B細胞エピトープについては、線毛サブユニット抗原に対する患者血清の反応に対して、以下のものを阻害物として用いた競合 ELISA 法により検討した。

- 1) 合成ペプチド：サブユニットのアミノ酸配列をもとにした 10 残基からなる合成ペプチドを阻害物とした場合、反応は最大 10% の阻害にとどまった。
- 2) 精製サブユニット：86% 以上の反応阻害を示した。
以上からエピトープはペプチド一次構造のみから構成されるのではないことを示した。
- 3) 塩酸グアニジン処理したサブユニット：非処理のサブユニットと同等な反応阻害がみられたため、サブユニットの立体構造のエピトープへの関与は否定された。
さらにこの線毛サブユニットは糖修飾されていることから、以下の阻害物を用いた。
- 4) 過ヨウ素酸処理したサブユニット：反応阻害は 0~8% にとどまり、線毛サブユニットに結合している糖がエピトープの形成に重要な役割を果たしていることを示した。
- 5) 糖：N-アセチルヘキソサミンがヘキソースより有意に高い反応阻害を示し、N-アセチルヘキソサミンのエピトープへの関与を示した。しかし、その阻害率は約 20% 程度であり、糖残基のみによりエピトープが構成される可能性は低いことを示唆した。

本研究の結果は、線毛サブユニットのB細胞エピトープはペプチドに糖が結合している糖ペプチドにより構成される可能性を強く示唆するものである。これは、*A. actinomycetemcomitans* 線毛サブユニットに対する体液性免疫応答に関する新しい知見である。特に線毛サブユニットの糖部分がエピトープ形成に重要であることを示した点は、今後この分野の研究に新しい方向性を示した。

従って、本申請論文は学位論文として価値があるものと認める。