

氏名・(本籍) 藤山佳秀 (和歌山県)
 学位の種類 医学博士
 学位記番号 論医博第1号
 学位授与の要件 学位規則第5条第2項該当
 学位授与年月日 昭和60年6月27日
 学位論文題目 **A novel IgA protease from *Clostridium sp.* capable of cleaving IgA 1 and IgA 2 : A 2 m (1) allotype but not IgA 2 : A 2 m (2) allotype paraproteins.**
 (IgA 1 と IgA 2 : A 2 m (1) allotype paraprotein を分解する *Clostridium sp.* 由来の新たな IgA protease)

審査委員 主査 教授 野崎光洋
 副査 教授 細田四郎
 副査 副学長 尾崎良克

論文内容の要旨

〔目的〕

ヒト IgA に特異的に作用して Fab と Fc に分解する IgA protease は、Plaut らによって *Streptococcus sanguis* の培養上清中に見いだされた細菌由来の endopeptidase である。その後、様々な菌種から同様の酵素活性が見いだされ、粘膜表面に分泌され機能する IgA に対する、当該産生菌の持つ virulency と推察されている。しかし、これらの IgA protease は何れもヒト IgA の 2 つの subclass のうち IgA 1 subclass のみに基質特異性を有しており、IgA 1 protease と総称される。即ち、これら IgA 1 protease は IgA 1 subclass の H 鎖 ($\alpha 1$) の hinge に存在し、 $\alpha 2$ で欠失した duplicated octapeptide 上に作用部位を持つ。

本研究では、健常人及び非特異的炎症性腸疾患症例の腸内細菌叢構成菌の IgA protease 産生の有無のスクリーニングにより、*Clostridium sp.* (M. O. - 6) 株培養上清中に見いだした、IgA 1、IgA 2 両 subclass に対する endopeptidase 活性を、IgA 1、及び A 2 m (1)、A 2 m (2) 両 allotype の IgA 2 paraprotein を用いて示し、その作用部位を解析した。

〔方法〕

Clostridium sp. (M. O. - 6) 及び *Bifidobacterium* (C. F. - 59) は、15 例の未治療潰瘍性大腸炎症例の便からの分離株 287 株中に見いだした IgA 1 protease 産生株であり、*Streptococcus pneumoniae* は肺炎症例からの臨床分離株である。各菌株の嫌気培養上清を酵素液とし、精製 IgA subclass、IgA 2 : A 2 m (1) allotype、及び IgA 2 : A 2 m (2) allotype の各 paraprotein

teinに対する endopeptidase 活性を、得られる fragment を免疫電気泳動および SDS-PAGE に展開して検討した。また、protease 処理にて得られた Fc を精製し、N末端アミノ酸を、dancyl chloride 標識による polyamide thinlayer chromatography で解析した。

〔結果〕

IgA 1 paraprotein は *Bifidobacterium* (C. F. -59)、*Clostridium sp.* (M. O. -6)、*S. pneumoniae* の何れの酵素液処理によっても、免疫電気泳動上 Fab、Fc と同定される 2 つの、fragment に分解された。SDS-PAGE より求めた Fd および Fc の分子量は、*Bifidobacterium* が 29,000、32,600、*Clostridium sp.* が 27,900、36,300、*S. pneumoniae* が 28,800、32,400 であった。

一方、IgA 2 : A 2 m (1) allotype paraprotein に対しては *Clostridium sp.* の酵素液のみが IgA 1 paraprotein に対すると同様の protease 活性を有し、*Bifidobacterium* および *S. pneumoniae* の酵素液には認めなかった。*Clostridium sp.* の酵素液処理にて得られる Fd および Fc の分子量は 28,400 と 34,300 であった。IgA 2 : A 2 m (2) allotype paraprotein は、これら何れの酵素液処理によっても分解されなかった。

この *Clostridium sp.* の培養上清中に認められる protease 活性は、ヒト IgG、albumin や BSA に対しては無く、IgA 1 および IgA 2 : A 2 m (1) allotype に特異的であった。IgA 1、IgA 2 : A 2 m (1) paraprotein 各々より得られた Fc の N末端アミノ酸は共に valine であった。

〔考察〕

Bifidobacterium (C. F. -59) 株、*Clostridium sp.* (M. O. -6) 株及び *S. pneumoniae* の IgA protease 産生を示したが、*Bifidobacterium* (C. F. -59) は *S. pneumoniae* と同様、IgA 1 subclass のみに基質特異性を有する IgA 1 protease 産生株であった。これに対して *Clostridium sp.* (M. O. -6) 株の培養上清に見いだされた protease は IgA 1、IgA 2 両 subclass に作用して Fab、Fc に分解する endopeptidase であり、初めての報告である。しかし、この IgA 2 subclass に対する活性は A 2 m (1) に対するもので、A 2 m (2) allotype に対する作用は認めなかった。

A 2 m (1) allotype のアミノ酸配列は、IgA 1 と A 2 m (2) allotype との hybrid 様構造とされ、hinge 直前の C_H1 と、C_H3 domain で IgA 1 と相同部分を持つ。IgA 1、IgA 2 : A 2 m (1) 両者の clostridial IgA protease によって得られる Fd の分子量は近似したが、Fc は IgA 1 が IgA 2 : A 2 m (1) に比し大であった。これは、IgA 2 α 鎖が欠く hinge の 13 個のアミノ酸を反映したものと考えられ、さらに Fc N末端アミノ酸が共に valine であることから作用部位は、C_H1 domain hinge 直前で IgA 1、IgA 2 : A 2 m (1) に共通で IgA 2 : A 2 m (2) で異なる Pro (221) - Val (222) と結論された。

IgA protease の in vivo における役割は未だ釈然としていない。IgA protease 産生菌の多くが病原性菌種であることから、slgA で担われる粘膜表面の免疫防御環境に抗した当該産生菌の病原性発現への関与が推察されている。しかし、現在までに報告されている IgA protease は総て IgA 1 protease であり、IgA 2 subclass の占める比率が高いとされる分泌液中の IgA に対する作用に懸念がある。本研究は、IgA 1、IgA 2 両 subclass に対する作用を持つ IgA protease 産生菌の腸管内での存在を初めて示したもので、臨床的にも興味深い。

学位論文審査の結果の要旨

消化器、気道、尿路系の粘膜において、感染防御に働く免疫グロブリンとして、最も重要なものが IgA 系である。この免疫グロブリンは粘膜下のリンパ系で産生され、分泌型 IgA (sIgA) となって、粘膜表面に分泌され、そこで、細菌の粘膜表面への付着の阻止、抗原との特異的結合、ウイルスの中和などの作用を介して、生体防御にあたっていると考えられている。

一方、病原性を持った各種の細菌 (*Neisseria*, *Haemophilus*, *Streptococcus* 等) の培養上清液から、IgA に作用して Fab と Fc に分割する endopeptidase (IgA protease) が見出され、細菌の病原性と密接な関係があると推察されている。しかし、現在までに報告されている IgA protease は、IgA の 2 つの subclass のうち、IgA 1 subclass のみに、基質特異性を有しており、IgA 1 protease と総称されている。これら IgA 1 protease は、IgA 1 の H 鎖 ($\alpha 1$) の hinge 部分に存在し、IgA 2 の H 鎖 ($\alpha 2$) で欠失した duplicated octapeptide 上に、作用部分を持っている。

本研究では、未治療潰瘍性大腸炎症例の便から分離した *Clostridium* sp. (M. O. - 6)、*Bifidobacterium* (C. F. - 59) および、肺炎症例の痰から分離した *Streptococcus pneumoniae* について、各菌株の嫌気培養上清を酵素液として、IgA protease の活性、基質特異性等について、比較検討を行った。

その結果、*Bifidobacterium* および、*Streptococcus pneumoniae* の菌体外酵素では、IgA protease は、いずれも IgA 1 paraprotein のみに作用するのに対し、*Clostridium* の菌体外酵素は、IgA 2 : A 2 m (1) allotype に対しても、IgA 1 paraprotein 同様、protease 活性を示すことを明らかとした。しかし、IgA 2 : A 2 m (2) allotype paraprotein には作用しなかった。この *Clostridium* の酵素はヒト IgG、Albumin や BSA に対しても活性を示さず、IgA 1 および IgA 2 : A 2 m (1) allotype に特異的でいずれの場合も分解産物の Fc の N 末端アミノ酸は、valine であった。分解産物の分子量ならびに IgA subclass のアミノ酸配列とも考え合せ、作用部位は Pro (221) - Val (222) と結論された。この結合は、IgA 1 ならびに IgA 2 : A 2 m (1) に共通に存在するが、IgA 2 : A 2 m (2) では異なる。

以上の研究は、従来から知られている IgA 1 に特異的な protease と異なり IgA 1 ならびに、IgA 2 両 subclass に対して活性を示す新しいタイプの IgA protease 産生菌の腸管内での存在を、初めて示したものである。sIgA 中に IgA 2 subclass の占める比率が高いこともかんがみ、臨床的にも非常に興味深い研究である。

以上により、本研究は、医学博士の学位論文として価値あるものと認める。