



Title	Mycoplasma salivariumのヒトIgG Fc結合活性について
Author(s)	沢, 禎彦
Citation	北海道大学. 博士(歯学) 甲第3583号
Issue Date	1995-03-24
DOI	10.11501/3106721
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/51281
Type	theses (doctoral)
File Information	000000291368.pdf



[Instructions for use](#)

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

Human immunoglobulin G Fc binding activity of
Mycoplasma salivarium

北海道大学大学院歯学研究科

口腔細菌学講座

沢 禎彦

指導

北海道大学歯学部細菌学講座

渡邊 継男 教授

①
Mycoplasma salivarium のヒト IgG Fc 結合活性について

Human immunoglobulin G Fc binding activity of
Mycoplasma salivarium

北海道大学大学院歯学研究科

口腔細菌学講座

沢 禎彦

指導

北海道大学歯学部細菌学講座

渡邊 継男 教授

目次

	頁
緒言	3
材料および方法	6
1. 試薬類	
2. 供試株	
3. 培養ならびに供試株細胞の収穫	
4. 供試株細胞の IgG Fc 断片結合活性の測定	
5. MS 細胞表層タンパク質が IgG Fc 断片結合活性を担っていることを証明するための実験	
6. MS 細胞膜の IgG Fc 断片結合活性	
1) 細胞膜の調整	
2) IgG Fc 断片結合活性の pH 安定性	
3) 膜タンパク質の IgG Fc 断片結合活性	
7. 90 kp の精製	
1) 出発材料の調整	
2) 陽イオン交換カラムクロマトグラフィー	
3) 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー	
4) クロマトフォーカシング	
5) 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー	
8. 精製 90 kp の IgG Fc 断片、抗原特異的 IgG ならびに Con A との活性	
1) イムノブロッティング法	
2) ELISA	

9. 赤血球凝集反応

- 1) SRBC
- 2) 90 kp 感作 SRBC の調整
- 3) Hemolysin 感作 SRBC の調整
- 4) 赤血球凝集反応

結果 15

1. MS 細胞のヒト IgG Fc 断片結合活性
2. MS 細胞膜タンパク質のヒト IgG Fc 断片結合活性
3. MS 細胞膜のヒト IgG Fc 断片結合活性の pH 安定性
4. 90 kp の精製
5. 90 kp の性状
 - 1) IgG Fc 結合活性
 - 2) Con A 結合活性

考察 18

結論 21

文献 22

付図 30

- ・ Table 1-9
- ・ Fig. 1-6

緒言

マイコプラズマは細胞壁を欠く原核細胞生物である。その最小増殖単位は直径が約 300 nm の粒子で、マイコプラズマは自己増殖可能な微生物の中で最小の微生物である。したがって、細胞内に納まりうる DNA の大きさには限度があり、遺伝子の数は少なく、500 前後で、大腸菌の遺伝子の数の約 1/6 である。このため、マイコプラズマは栄養要求が厳しく、栄養価の高い培地でないと増殖できない。生体内にあっては、宿主への依存度が高く、宿主細胞に直接（細胞壁を介することなく）付着して、宿主細胞と緊密な関係を維持しながら、栄養の供給を得ている。

ヒトから検出されるマイコプラズマは 10 種 (species) である。肺炎マイコプラズマ (Mycoplasma pneumoniae) は原発性異形肺炎の病原体である。非淋菌性尿道炎と診断される症例の約 20 % が Mycoplasma hominis、Mycoplasma genitalium あるいは Ureaplasma urealyticum 感染症であり、これらのマイコプラズマは不妊症、早産、死産、骨盤腔内感染症との病因的関連についても注目されている。さらに、AIDS 関連マイコプラズマとして、Mycoplasma fermentans と Mycoplasma penetrans が最近多くの研究者の関心を集めている。

Mycoplasma salivarium (MS) は口腔常在微生物叢の一員であり、主な棲息部位は歯垢と歯肉溝である。MS の歯肉溝からの検出率ならびに MS に対する抗体保有率は、歯周疾患患者では健常者と比べて有意に高く、それぞれ、87 対 32 % ならびに 64.1 対 14.6 % と報告されている。MS は、無歯顎の成人口腔からは検出されないか、検出されたとしても、極めてまれである。唾液中の生細胞数は歯数と相関して増加する。歯周炎、智歯周囲炎、顎骨周囲炎ならびに骨炎などのある口腔では、生細胞数が有意に増加しており、症例によっては病態の変化にともなって、MS に対する血中抗体価の変動が認められる。

MS の生物学的活性のうち、組織傷害性に作用すると思われる、幾つかの性状は下記の通りである。溶血性がある。エネルギー源としてアルギニンを分解して、大量のアンモニアを産生する。細胞膜構成成分である糖脂質はシュワルツマン活性、発熱性、体重低下活性などの内毒素様活性を示す。リン脂質分解活性 (phospholipase C および A₂) がある。ヒツジ赤血球 (SRBC) に付着して、補体を副経路で活性化し、SRBC を溶解する。ヒト口腔粘膜細胞ならびに様々な組織培養細胞に付着する。

以上の所見から、MS は歯周疾患などの口腔感染症においてなんらかの病因的役割を果たしているものと推測される。

マイコプラズマ細胞には様々な物質が付着しやすいことがよく知られている。ウサギ血清添加培地で増殖させ、遠心 (15,000 x g、15 分) で収穫し、十分に洗浄した MS 細胞から多量 (細胞タンパク質量の約 10 % に相当する) のウサギ IgG が検出される。このマイコプラズマ細胞をウサギに接種すると、ウサギ IgG に対する IgM クラスの自己抗体が産生される。したがって、MS 細胞はウサギ血清由来 IgG と結合するものと考えられる。その結合様式の一つとして、MS 細胞と IgG Fc 部位との結合の可能性が示唆されている。すなわち、免疫グロブリンを含まない、PPL0 シーラム・フラクション (PPL0 serum fraction、ディフコ社) 添加培地で収穫した MS 細胞がヘモリジン (hemolysin、生研; ウサギを SRBC で積極的に免疫して得られた、SRBC に対する抗血清) で感作した SRBC を強く凝集する。

IgG は感染防御抗体として、Fab 部位で病原体を捕らえ、Fc 部位で食細胞の Fc レセプターと結合することによって、オプソニンとしての機能を果たしている。MS は IgG の Fc 部位と結合することによって、IgG のオプソニン活性を失わせ、感染防御抗体としての存在意義を喪失させるだけでなく、IgG で擬装することによっ

て自らを食細胞による補食から守り、持続的な感染を可能にしているのかもしれない。この活性を通して、MS は口腔常在微生物叢ならびに口腔感染病巣において重要な役割を果たしているものと考えられる。

ヒト系マイコプラズマの IgG Fc 結合活性に関する報告は皆無である。

本研究の目的は、MS 細胞とヒト IgG Fc 部位との結合活性について調べ、結合に関わるMS 細胞表層タンパク質を精製して、精製タンパク質の性状を明らかにすることである。

材料ならびに方法

1. 試薬類

アルカリフォスファターゼ (AP) 標識イムノグロブリン G (IgG) Fc 断片 (AP-Fc; ヒト、ブタ、マウス、ウサギ、ヒツジ、ラット、ヤギならびにウシ) はジャクソン社から、ペルオキシダーゼ (Per) 標識ヒト IgG Fc 断片 (Per-Fc) はロックランド社から、AP 標識抗原特異的ヤギ抗ヒト IgG (アフィニティー・クロマトグラフィーで精製された、ヒト IgG の γ 鎖に特異的なヤギ IgG)、N-アセチル-D-グルコサミン (N-acethyl-D-glucosamine) ならびにプロテイン A はシグマ社から、金標識コンカナバリン A (concanavalin A-gold、Con A) は E.Y. 社から、ペルオキシダーゼとアルカリフォスファターゼの基質キット {Per-substrate kit [Per 基質ならびに基質反応液、enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 用] と AP-substrate kit [イムノプロテイング用]} および金標識標品検出キット (gold enhancement kit) はバイオ-ラッド社から、プロナーゼ (Pronase E) はメルク社から、メチル- α -D-マンノピラノシド (methyl- α -D-mannopyranoside)、メチル- α -D-グルコピラノシド (methyl- α -D-glucopyranoside)、マンノース (D-mannose)、グルコース (D-glucose) は和光純薬から、そしてガラクトース (D-galactose) は関東化学から、それぞれ、購入した。

その他の試薬は特級または生化学用を用いた。

2. 供試株

MS ATCC 23064、Esherichia coli K12、Staphylococcus aureus 209P、Streptococcus pyogenes C201、Streptococcus mutans B13、OMZ175 ならびに JC2 を用いた。

3. 培養ならびに供試株細胞の収穫

ATCC 23064 株を、1 % (vol/vol) PPL0 serum fraction、1 % (wt/vol) アルギニン塩酸塩、0.002 % (wt/vol) フェノールレッド、0.05 % (wt/vol) 酢酸タリウムおよびペニシリン G (1,000 U/ml) を添加した PPL0 ブロス (PPL0 broth、ディフコ社; pH 6.8) で培養した。pH が 7.4 に達した培養液を、15,000 x g で 30 分間遠心して、MS 細胞を収穫し、0.25 M NaCl で 3 回洗浄した。MS 細胞を、0.25 M NaCl 含有 10 mM トリス塩酸緩衝液 (Tris-HCl、pH 7.4)(TBS) または 6 % (wt/vol) ウシ血清アルブミン (BSA) 含有 TBS (BSA-TBS) に 1 ml 当りの細胞タンパク質量が 1 mg となるように浮遊させた。MS細胞のタンパク質量は Lowry 法で測定した。

K12 ならびに 209P を普通ブイヨン(栄研)で、C201、B13、OMZ175 ならびに JC2 をガムブイヨン (ニッスイ) で培養し、MS 細胞と同様に菌体を収穫した。菌体を洗浄したのちに、MS 細胞浮遊液の濁度 (660 nm) と一致するように、BSA-TBS に浮遊させた。

4. 供試株細胞の IgG Fc 断片結合活性の測定

1 ml の供試株細胞浮遊液 (BSA-TBS) に、AP-Fc 5 μ l (Fc 断片、3 μ g) あるいは Per-Fc 5 μ l (Fc 断片、8 μ g) を加えて、糖 (100 mM) あるいは金属イオン (1、10 あるいは 100 mM) の存在下ならびに非存在下 (コントロール) で、20°C で 1 時間反応させた。反応後、供試株細胞を 0.25 M NaCl 1 ml で 3 回遠心洗浄したのち、沈渣を 1 ml の AP 基質反応液 (1 mM MgCl₂ 添加 0.05 M carbonate buffer、pH 9.8) あるいは Per-substrate kit の基質反応液に浮遊させた。

反応系に加えた糖ならびに金属イオンは表ならびに図に記載した。

AP-Fc 結合活性: AP 基質反応液に浮遊させた細胞をリンブロ EIA マイクロタイ

トレーションプレート（平底型、フロー社）の 5 つのウェル（well）に、それぞれ、100 μ l ずつ分注し、AP 基質 [2 mg の p-ニトロフェニルリン酸（p-nitrophenyl phosphate、pNPP）を 1 ml の AP 基質反応液に溶解] 100 μ l を加えて、37°C で反応させた。マイクロプレート・リーダー（バイオ・ラッド社）を用いて、405 nm の吸光度を測定し、IgG Fc 断片結合活性とした。

Per-Fc 結合活性：Per 基質反応液に浮遊させた細胞をマイクロタイトレーションプレートの 5 つの well に、それぞれ、90 μ l ずつ分注し、Per-substrate kit の基質 10 μ l を加えて、37°C で反応させた。415 nm の吸光度を測定し、IgG Fc 断片結合活性とした。

なお、AP-Fc の AP 活性 (OD/min/ μ g) は pH 4.0 と 7.0 で、それぞれ、1.60 と 6.87、そして Per-Fc の Per 活性は pH 4.0 と 7.0 で、それぞれ、22.27 と 15.05 であった。そこで、pH 4.0 での AP-Fc ならびに Per-Fc 結合活性は、それぞれ、測定値 \times 4.29 (6.87/1.60) ならびに 測定値 \times 0.68 (15.05/22.27) とした。

5. MS 細胞表層タンパク質が IgG Fc 断片の結合活性を担っていることを証明するための実験

1) MS 細胞を TBS に浮遊させ、MS 細胞のタンパク質量に対して等量あるいは 5 倍量のプロナーゼを加え、37°C で 1 時間反応させた。0.25 M NaCl で十分に遠心洗浄したのち、MS 細胞を BSA-TBS に再浮遊させ、IgG Fc 結合活性を測定した。

2) プロナーゼ処理ならびに未処理 MS 細胞のタンパク質を 10 % のゲルでドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で泳動し、銀染色した。

3) MS 細胞を TBS に浮遊させ、細胞タンパク質の 5 倍量のプロナーゼを加え、37°C で 1 時間反応させた。コントロールとして、プロナーゼ無添加細胞浮遊液を、

4°C、20°Cあるいは37°Cで1時間放置した。細胞浮遊液を6,000 x gで30分間遠心し、沈渣を0.25 MのNaClで3回洗浄したのちに、0.5% (wt/vol) のSDSに溶解して、260 nmで吸光度を測定し、壊れていない細胞の核酸量とした。また、上清を10% (wt/vol) のトリクロロ酢酸処理で除タンパクしたのちに、260 nmで吸光度を測定し、壊れた細胞の核酸量とした。総核酸量に対する壊れた細胞の核酸量の割合で反応系における細胞破壊の程度を評価した。

6. MS細胞膜のIgG Fc断片結合活性

1) 細胞膜の調製

MS細胞を蒸留水(DW)に浮遊させ、超音波(ヒートシステム、ウルトラソニック社)で破碎したのちに、100,000 x gで1時間遠心した。沈渣をDWと10 mMのリン酸バッファー(phosphate buffer、pH 7.2; PB)で交互に10回洗浄し、PBに再浮遊させて、細胞膜標品とした。

2) IgG Fc断片結合活性のpH安定性

[7. 1)] に述べるように、MS細胞膜標品をトリトン X-100で処理し、その100,000 x g上清(タンパク質量にして、0.58 mg/ml)を得た。その上清200 μ lに、等容量のブリットン-ロビンソン緩衝液(Britton-Robinson buffer、pH 2.0-11.0)を加えて混和し、37°Cで1時間放置した。この反応液に含まれる膜タンパク質を、ニトロセルロース膜(バイオ-ラッド社)にスロットブロット・キット(Slot-blot kit、バイオ-ラッド社)を用いて付着させた。このニトロセルロース膜を0.15 M NaClならびに6% (wt/vol) BSA含有PB(BSA-PBS、pH 7.2)に浸漬し、37°Cで2時間、ブロッキング処理したのちに、BSA-PBSで希釈したAP-Fc(Fc断片、6 μ g/ml BSA-PBS)と37°Cで3時間反応させた。タンパク質と結合した

AP-Fc を AP-substrate kit で発色させて、デンシトメーター (Dual-Wave Length TLC Scanner CS-930、島津社) で 400 nm での反射吸光度を測定し、活性を評価した。

3) 膜タンパク質の IgG Fc 断片結合活性 MS 細胞膜標品のタンパク質を 10 % のゲルで SDS-PAGE で泳動し、分画したタンパク質を PVDF 膜 (Immobilon PVDF Transfer Membrane、ミリポア社) に転写した。PVDF 膜を BSA-PBS に浸漬し、室温で 1 時間処理したのちに、BSA-PBS で希釈した AP-Fc (Fc 断片、30 μ g/ml BSA-PBS) と室温で 1.5 時間反応させた。PVDF 膜を 0.05 % (vol/vol) ツイーン 20 (Tween-20) 含有 PBS で、15 分間、2 回洗浄したのちに、タンパク質と結合した AP-Fc を AP-substrate kit を用いて発色させた。

これまでの実験で、MS 細胞表層の分子量 90 kDa のタンパク質 (90 kp) が IgG Fc 断片と結合する主要タンパク質であることが明らかにされた (Fig. 3 ならびに Fig. 5 の lane A と B) ので、次に 90 kp の精製を試みた。

7. 90 kp の精製

1) 出発材料の調製

細胞膜標品を 1 % (vol/vol) トリトン X-100 含有 10 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (sodium acetate buffer、pH 6.0) (SB-Triton) に浮遊させ、37°C で 1 時間振盪・処理した。浮遊液を 100,000 x g で 1 時間遠心し、上清を分離した。90 kp は上清に含まれていることを [6. 3)] で述べたイムノブロッティングで確認した。

2) 陽イオン交換カラムクロマトグラフィー

CM-セファロース FF (CM-Sepharose FF、ファルマシア社) カラム (3.0 x 12.0 cm) を作製し、SB-Triton で平衡化した。トリトン X-100 で可溶化した画分を添加したのち、カラム容積の 2-3 倍量の SB-Triton を 30 ml/h で流して、未吸着

画分を除去した。次に、NaClの直線濃度勾配 (0-1.0 M) で吸着画分を溶出し、分画した。

3) 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

DEAE-セファセル (DEAE-Sephacel、ファルマシア社) カラム (1.1 x 9.7 cm) を作製し、トリトン X-100 を 1 % (vol/vol) となるように加えた 10 mM トリス塩酸緩衝液 (Tris-HCl、pH 8.0; TB)(TB-Triton) で平衡化した。CM-Sepharose FF クロマトグラフィーで得られた 90 kp を含む画分を、あらかじめ、TB-Triton で透析しておき、DEAE-Sephacel カラムに添加し、カラム容積の 2-3 倍量の TB-Triton を 30 ml/h で流して、未吸着画分を除去した。次に、NaCl の直線濃度勾配 (0-1.0 M) で吸着画分を溶出し、分画した。

4) クロマトフォーカシング

PBE 94 (ファルマシア社) のカラム (1.2 x 24.8 cm) を作製し、1 % (vol/vol) のトリトン X-100 を含む、25 mM のイミダゾール塩酸緩衝液 (Imidazole-HCl、pH 7.4) で平衡化した。このカラムに、10 ml の溶出液を流したのちに、DEAE-Sephacel クロマトグラフィーで得られ、カラムを平衡化した緩衝液で透析した 90 kp を含む画分を添加し、225 ml の溶出液で溶出した。

なお、DW で 12.5 % (vol/vol) に希釈したポリ緩衝液 74 (Polybuffer 74、ファルマシア社) にトリトン X-100 を 0.5 % (vol/vol) となるように加え、pH 4.0 に調整し、溶出液とした。

5) 陰イオン交換カラムクロマトグラフィー

クロマトフォーカシングで得られた活性画分を TB で透析し、3) で用いた DEAE-Sephacel カラムに添加し、カラム容積の 3 倍容量の TB を 30 ml/h で流し

て、未吸着画分を除去した。次に、NaCl の直線濃度勾配 (0-2.0 M) で吸着画分を溶出した。

8. 精製 90 kp の IgG Fc 断片、抗原特異的 IgG ならびに Con A との結合活性

1) イムノブロットイング法

「6. 3) 膜タンパク質の IgG Fc 断片結合活性」の項で記載した方法で、精製した 90 kp を SDS-PAGE で泳動させ、PVDF 膜に転写して、AP-Fc ならびにヤギ IgG (ヒト IgG γ 鎖に対して特異的) と反応させ、結合活性を評価した。

Con A との結合活性は、90 kp を転写した PVDF 膜を BSA-PBS で 5 倍に希釈した Con A に浸漬し、室温で 1 時間反応させたのちに、gold enhancement kit を用い、90 kp と結合した Con A を発色させて、結合活性を評価した。

2) ELISA

基本的には、Bussolo の方法に従って行った。しかしながら、MS 細胞膜タンパク質の IgG Fc 断片結合活性は、pH 10.0 で非常に不安定で (Table 5)、コーティング緩衝液 (0.1 M carbonate buffer、pH 9.6; coating buffer) で不可逆的に約 80 % 失活した。この活性は pH 7.0 で最も安定していたので、90 kp ならびにプロテイン A (比較のために用いた) を PBS 溶液として、マイクロタイトレーションプレートの well に付着させる条件を以下のように検討した。

マイクロタイトレーションプレートの well を 200 μ l の coating buffer で、37°C で 30 分間、37°C で 2 時間、あるいは 37°C で 4 時間、室温でさらに 8 時間処理したのち、300 μ l の DW で 3 回洗浄 (5 min/wash) した。90 kp あるいはプロテイン A 溶液 (タンパク量にして、20 μ g/ml PBS) 200 μ l、コントロールとして PBS 200 μ l を、それぞれ、well にいれ、37°C で 4 時間あるいは室温でさらに 8 時間放置した。well を洗浄したのちに、200 μ l の BSA-PBS で、37°C

で 2 時間ブロッキング処理した。well に BSA-PBS で希釈した AP-Fc 200 μ l (Fc 断片、6 μ g)をいれ、37°C で 4 時間反応させた。AP-Fc を捨て、0.05 % Tween 20 含有生理的食塩水 300 μ l で 3 回洗浄した well に、AP 基質溶液 200 μ l (pNPP、1 mg) を加えて、37°C で反応させ、経時的に 405 nm の吸光度を測定して、IgG Fc 断片結合活性とした。

9. 赤血球凝集反応

1) SRBC

ヒツジ保存血 (生研) を 1,330 x g で 5 分間遠心し、沈澱させ、生理的食塩水で 3 回洗浄し、以下の実験に用いた。

2) 90 kp 感作 SRBC の調製

Taylor-Robinson の方法でタンニン酸処理した SRBC を 2 % (vol/vol) となるように PBS に浮遊させた。この浮遊液 1 ml と等容量の 90 kp 溶液 (タンパク量にして、4 μ g/ml) とを混和し、37 °C で 1 時間振盪・処理した。浮遊液を 1,330 x g で 10 分間遠心して集めた SRBC を、2 ml の PBS に再浮遊させて、90 kp 感作 SRBC 浮遊液 (1 %)とした。

3) Hemolysin 感作 SRBC の調製

PBS で 300、400 そして 500 倍に希釈した hemolysin 1 ml と、等容量の 2 % SRBC 浮遊液とを混和し、37 °C で 30 分間振盪・処理した。その血球浮遊液を 1,330 x g で 10 分間遠心し、沈澱させて、生理的食塩水で 3 回洗浄したのちに、2 ml の PBS に再浮遊させて、hemolysin 感作 SRBC (1 %) を調製した。

4) 赤血球凝集反応

1 % (vol/vol) の 90 kp 感作 SRBC 浮遊液 50 μ l と 1 % (vol/vol) の

hemolysin 感作または未感作 SRBC 浮遊液を等容量混和し、37°C で 2 時間反応させて、90 kp の血球凝集活性を調べた。

結果

1. MS 細胞のヒト IgG Fc 断片結合活性

MS 細胞は ヒト IgG Fc 断片 (AP-Fc ならびに Per-Fc) と結合し (Table 1)、pH の低い反応系で強い活性を示した (Table 1)。比較のために調べた細菌では、*Sta. aureus* 209P のみが強い活性を示した。しかしながら、MS とは異なり、209P は pH 4.0 よりも 7.0 ではるかに強い活性を示した (Table 2、3)。したがって、MS 細胞はプロテイン A とは異なる様式で IgG Fc 部位と結合するものと考えられた。MS 細胞の Fc 断片結合活性は Mn^{2+} および Cu^{2+} によって顕著に増強された (Fig. 1) が、マンノース (D-mannose) で阻害された (Table 4)。プロナーゼ処理によって、MS 細胞の Fc 断片結合活性は顕著に低下し (Fig. 2)、分子量約 150、90 ならびに 88 kDa のタンパク質 (150 kp、90 kp ならびに 88 kp) が消失あるいは減少した (Fig. 3)。したがって、これらのタンパク質は MS 細胞表層にあり、IgG Fc 断片との結合に関与していることが示唆された。

なお、この実験系では、90 % 以上の MS 細胞は壊れていない (Fig. 4) ことが確認された。

2. MS 細胞膜タンパク質のヒト IgG Fc 断片結合活性

MS 細胞の膜タンパク質のうち、90 kp が Fc 断片と特異的に結合 (Fig. 5、lane C) した。90 kp は MS 細胞膜ではマイナーなタンパク質 (Fig. 5、lane A and B) であるにもかかわらず、MS 細胞の IgG Fc 断片結合活性を担う主要タンパク質であることが明かとなった。

3. MS 細胞膜のヒト IgG Fc 断片結合活性の pH 安定性

MS 細胞膜の IgG Fc 断片結合活性は、pH 6.0-7.0 で安定で、pH 7.0 で最も強い活性を示した (Table 5)。pH 5.0 ならびに pH 10.0 で、pH 7.0 の時の活性の

87.5 % ならびに 81.2 % が、それぞれ、不可逆的に失活した (Table 5)。

4. 90 kp の精製 (Table 6)

MS 細胞膜標品をトリトン X-100 で処理した結果、90 kp を含む細胞膜タンパク質が可溶化された。可溶化した膜タンパク質を CM-Sepharose FF (ファルマシア社) カラムにかけることによって、0.42-0.62 M NaCl で、90 kp を含む画分を得た。この画分を DEAE-Sepharose (ファルマシア社) カラムにかけ、0.18-0.30 M NaCl で 90 kp を含む画分を得た。この画分のクロマトフォーカシングで得られた、90 kp を含む画分 (pH 5.5) を、1.5 M のトリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) でただちに pH を 7.0 に修正したのち、トリトン X-100 非存在下で DEAE-Sepharose カラムにかけた。0.2-1.2 M NaCl で得られた活性画分のタンパク質は、SDS-PAGE で分子量 90 kDa の単一のバンドとなり (Fig. 5、lane G)、単一のタンパク質として精製された。

5. 90 kp の性状

1) IgG Fc 結合活性

(1) ヒトならびに動物由来 IgG Fc 断片結合活性

イムノブロッティング: 90 kp はヒト IgG Fc 断片と結合した (Fig. 5、lane H)。ELISA: PBS に溶解したタンパク質 (90 kp ならびに プロテイン A) は、coating buffer であらかじめ処理したマイクロタイトレーションプレートの well に吸着した (Fig. 6)。Coating buffer ならびにタンパク質溶液による well の処理時間が長いほど、タンパク質の well への吸着効率は上昇した (Fig. 6)。そこで、以下の実験では、coating buffer で 37°C で 4 時間、室温でさらに 8 時間処理した well に 200 μ l のタンパク質溶液を入れ、37°C で 4 時間、そして室温

でさらに 8 時間処理することによって、well にタンパク質を付着させた。

90 kp はヒトならびに 7 種の動物由来 IgG Fc 断片と結合し、その活性はプロテイン A のように強い種特異性を示さなかった (Table 7)。

なお、90 kp のヒト IgG Fc 断片結合活性は、ヒト IgM と IgG で阻害された。すなわち、90 kp を付着させた well を、10 μ g のヒト IgG あるいは IgM (シグマ社) BSA-PBS 溶液 200 μ l で、37°C で 2 時間処理したのち、BSA-PBS で希釈した AP-Fc 200 μ l (Fc 断片、6 μ g) と、37 °C で 4 時間反応させたところ、90 kp の IgG Fc 断片結合活性は IgM で 57.1 %、IgG で 93.2 % 阻害された (Table 8)。

(2) 90 kp の抗原特異的ヤギ抗ヒト IgG 結合活性

90 kp は抗原特異的ヤギ IgG と結合した (Fig. 5、lane I)。

(3) 赤血球凝集反応

90 kp 感作 SRBC は、hemolysin 未感作ならびに感作 SRBC を凝集した (Table 9) が、特に後者を強く凝集した (Table 9)。hemolysin 感作 SRBC に対する 90 kp 感作 SRBC の比率が増すのにもない、強い凝集が認められた。

2) Con A 結合活性

90 kp は Con A に対して強い親和性を示した (Fig. 5、lane J)。

考察

本研究では、MS のヒト IgG Fc 結合活性を AP で標識したヒト IgG Fc 断片をプローブ (probe) として調べた。

MS 細胞はヒト IgG Fc 断片と結合し、その結合部位は細胞表層タンパク質 (88 kp、90 kp ならびに 150 kp) であることが示唆された (Table 1-3、Fig. 2、3)。その結合活性は Mn^{2+} と Cu^{2+} で増強され (Fig. 1)、マンノースで阻害された (Table 4)。したがって、MS 細胞表層のレクチン様物質が IgG Fc断片結合活性を担っているものと推測された。

イムノブロットイング法で、90 kp が IgG Fc 断片と結合する主要タンパク質であることが明らかにされた (Fig. 5、lane C)。精製した 90 kp は、抗原特異的ヤギ IgG と結合した (Fig. 5、lane I)。90 kp 感作 SRBC は、hemolysin 感作 SRBC を凝集した (Table 9)。これらの所見は 90 kp がヤギならびにウサギ IgG と Fc 部位を介して結合することの直接的な証明である。さらに、90 kp はヒト IgG のみならず IgM とも Fc 部位を介して結合することが、IgG ならびに IgM が 90 kp とヒト IgG Fc 断片との結合を阻害した (Table 8) ことで、明らかとなった。

90 kp は等電点が pH 5.5 で、強い Con A結合活性を示した (Fig. 5、lane J)。

IgG Fc 結合活性のあるタンパク質としては、Sta. aureus Cowan I 株のプロテイン A が良く知られている。プロテイン A は、ほとんどの哺乳動物由来の IgG Fc 部位と結合し、ヒト IgG のサブクラス 1、2 ならびに 4 と結合する。ヒト IgG を精製する場合、ヒト血清をプロテイン A-セファロース CL-4B カラムにかけ、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で非付着画分を十分に流出させたのちに、0.1 M グリシン-塩酸緩衝液 (pH 3.0) で溶出させる方法が広く用いられる。したがって、Sta. aureus 209P 菌体が pH 4.0 よりも pH 7.0 で IgG Fc 断片に対してより強い

親和性を示した (Table 2、3) のは予想された通りであったが、MS 細胞は全く逆に pH 7.0 よりも pH 4.0 で強い親和性を示した (Table 1-3)。各種動物由来 IgG Fc 断片との親和性を比較すると、プロテイン A が強い種特異性を示したのに対して、MS 細胞ではそのような傾向は認められなかった (Table 7)。これらの実験結果から MS 細胞はプロテイン A とは異なる結合様式で IgG Fc と結合するものと考えられた。

免疫グロブリンとマイコプラズマとの非特異的結合については、これまで 2 つの研究グループによって報告がなされている。すなわち、Mycoplasma hominis 6 株ならびに Mycoplasma arginini 1 株の分子量 95 ないし 105 kDa のタンパク質とウマ、ヒト、ウサギならびにヤギ IgG L 鎖との結合について Alexander らが、また Mycoplasma arginini と IgG Fc 部位との結合について Lemke らが、それぞれ、報告している。なお、M. arginini は、主として、ヒツジ、ヤギ、ならびにウシから検出されるマイコプラズマで、IgG Fc 部位糖鎖のマンノースと結合するといわれている。しかしながら、M. arginini 細胞の Fc レセプターの詳細については未だ明らかにされていないし、そのレセプターを構成する物質の精製も行われていない。

MS 細胞は pH 4.0 で強い IgG Fc 結合活性を示したのに対して、MS 細胞膜のトリトン X-100 可溶化画分の活性は pH 7.0 で最も強く、pH 4.0 ではほぼ 95 % の活性が不可逆的に失われた (Table 5)。この矛盾した結果がもたらされたのは、MS 細胞の IgG Fc レセプターは本来 150 kp、90 kp ならびに 88 kp の複合体であり、トリトン X-100 処理によってこの複合体が壊れたためであろうと考えられるが、今後、さらに検討する必要があると思われる。90 kp は、トリトン X-100 可溶化膜画分を出発材料として精製されたが、クロマトフォーカシングで pH 5.5 の画分に溶

出され、直ちに pH を修正しないと、その活性は失われてしまった。

ELISA では、通常、マイクロタイトレーション・プレートの well にタンパク質を付着させるために、タンパク質を溶解した coating buffer (pH 9.6) で well を処理する。90 kD と各種動物由来 IgG Fc 断片との結合活性を ELISA で測定するにあたって、90 kD の Fc 断片結合活性は高い pH 領域で極めて不安定であることが障害となっていた。そこで、様々な試みの後に、あらかじめ、well を coating buffer で処理することによって、PBS (pH 7.0) に溶解したタンパク質を well に付着させることができることを見いだした (Fig. 6)。この方法によって、高い pH 領域で不安定なタンパク質の活性測定に ELISA を応用することが可能となる。

MS 細胞は膜表層にアルギニン特異的なアミノペプチダーゼならびにカルボキシペプチダーゼを持っていて、炎症のメディエーターであるブラジキニンならびにアナフィロトキシン (C3a、C5a) の血管透過性高進活性、食細胞の食作用を賦活化するタフトシン、ニューロテンシン、サブスタンス P などを失活させる。MS をはじめとしてアルギニンをエネルギー源としているマイコプラズマは、感染病巣において、哺乳動物細胞では認められないアルギニン・ジハイドロレーズ経路で、アルギニンを枯渇させることによって、リンパ球の機能を障害し、免疫抑制的に働いていることが明らかにされている。これらの活性と本研究の成果として追加された IgG Fc 結合活性は、いずれも、MS が感染病巣において宿主感染防御機構を回避するのを助け、感染症の遷延化に寄与するものと思われる。

結論

MS はヒト IgG Fc 部位の糖鎖とレクチン様活性で結合する。結合に関与するのは、分子量 150、90 ならびに 88 kDa の細胞表層タンパク質で、活性を担う主要タンパク質は、分子量 90 kDa の糖タンパク質である。

文献

- 1) Razin, S.: The mycoplasmas. *Microbiol. Rev.*, 42: 414-470, 1978.
- 2) Razin, S.: Molecular biology and genetics of mycoplasmas (mollicutes). *Microbiol. Rev.*, 49: 419-455, 1985.
- 3) Eaton, M. D., Meiklejohn, G., and Herick, W.: Studies on the etiology of primary atypical pneumonia. A filterable agent transmissible to cotton rats, hamsters, and chick embryos. *J. Exp. Med.*, 79: 649-669, 1944.
- 4) Chanock, R. M., Hayflick, L., and Barile, M. F.: Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPL0. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 48: 41-49, 1962.
- 5) Denny, F. W., Clyde, Jr., W. A., and Glezen, W. P.: Mycoplasma pneumoniae disease: clinical spectrum, pathophysiology, epidemiology, and control. *J. Infect. Dis.*, 123: 74-92, 1971.
- 6) Taylor-Robinson, D., and McCormack, W. M.: The genital mycoplasmas. *New Eng. J. Med.*, 302: 1003-1010 and 1063-1067, 1980.
- 7) Cassell, G. H., and Cole, B. C.: Mycoplasmas as agents of human disease. *New Eng. J. Med.*, 304: 80-89, 1981.
- 8) Kundsinn, R. B., Driscoll, S. G., Monson, R. R., Yeh, C., Bianco, S. A., and Cochran, W. D.: Association of Ureaplasma urealyticum in the placenta with perinatal morbidity and mortality. *New Eng. J. Med.*, 310: 941-945, 1984.
- 9) Naessens, A., Foulon, W., Breynaert, J., and Lauwers, S.: Postpartum

- bacteremia and placental colonization with genital mycoplasmas and pregnancy outcome. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 160: 647-650, 1989.
- 10) Gray, D. J., Robinson, H. B., Malone, J., and Thomson, Jr., R. B.: Adverse outcome in pregnancy following amniotic fluid isolation of Ureaplasma urealyticum. *Prenatal Diagnosis*, 12: 111-117, 1992.
- 11) Lo, S. C., Tsai, S., Benish, J. R., Shin, J. W.-K., Wear, D. J., and Wong, D. M.: Enhancement of HIV-1 cytotoxic effects in CD⁴⁺ lymphocytes by the AIDS-associated mycoplasmas. *Science*, 251: 1074-1076, 1990.
- 12) Lemaitre, M., Henin, Y., Destoesse, F., Ferrieux, C., Montagnier, L., and Blanchard, A.: Role of mycoplasma infection in the cytopathic effect induced by human immunodeficiency virus type 1 in infected cell lines. *Infect. Immun.*, 60: 742-748, 1990.
- 13) Taylor-Robinson, D., Davies, H. A., Sarathchandra, P., and Furr, P. M.: Intracellular location of mycoplasma in cultured cells demonstrated by immunocytochemistry and electron microscopy. *Int. J. Exp. Pathol.*, 72: 705-714, 1991.
- 14) Franzoso, G., Dimitrov, D. S., Blumenthal, R., Barile, M. F., and Rottem, S.: Fusion of Mycoplasma fermentans strain incognitus with T-lymphocytes. *FEBS Lett.*, 303: 251-254, 1992.
- 15) Lo, S. C., Hayes, M. M., Tully, J. G., Wang, Y. H., Kotani, H., Pierce, P. F., Rose, D. L., and Shih, J. W.-K.: Mycoplasma penetrans

- sp. nov., from the urogenital tract of patients with AIDS. Int. J. System. Bacteriol., 42: 357-364, 1992.
- 16) Engel, L. D., and Kenny, G. E.: Mycoplasma salivarium in human gingival sulci. J. Periodont. Res., 5: 163-171, 1970.
 - 17) Kumagai, K., Iwabuchi, T., Hinuma, Y., Yuri, K., and Ishida, N.: Incidence, species, and significance of Mycoplasma species in the mouth. J. Infect. Dis., 123: 16-21, 1971.
 - 18) Watanabe, T., Matsuura, K., and Seto, K.: Enumeration, isolation, and species identification of mycoplasmas in saliva sampled from the normal and pathological human oral cavity and antibody response to an oral mycoplasma (Mycoplasma salivarium). J. Clin. Microbiol., 23: 1034-1038, 1986.
 - 19) Kwek, H. S. N., Wilson, M., and Newman, H. N.: Mycoplasma in relation to gingivitis and periodontitis. J. Clin. Periodontol., 17: 119-122, 1990.
 - 20) Rasin, S., Michmann, J., and Shimshoni, Z.: The occurrence of mycoplasma (pleuropneumonia-like organisms, PPL0) in the oral cavity of dentulous and edentulous subjects. J. Dent. Res., 43: 402-405, 1964.
 - 21) 三嶋健次: 口腔マイコプラズマの溶血性について. 口病誌, 40: 389-403, 1973.
 - 22) Schimke, R. T., Berlin, C. M., Sweeney, E. W., and Carrol, W. R.: The generation of energy by the arginine dihydrolase pathway in

- Mycoplasma hominis 07. J. Biol. Chem., 241: 2228-2236, 1966.
- 23) Shibata, K., and Watanabe, T.: Carboxypeptidase activity in human mycoplasmas. J. Bacteriol., 168: 1045-1047, 1986.
- 24) Matuura, M., Seto, K., and Watanabe, T.: Ammonia production as a virulence expression by Mycoplasma salivarium. Microbiol. Immunol., 34: 467-470, 1990.
- 25) Totsuka, M., Shibata, K., and Watanabe, T.: Chemical analyses, local Shwartzman reactivity, and body weight-decreasing activity of aqueous-phenol extracts of Mycoplasma salivarium cells. Antonie van Leeuwehoek, 58: 73-77, 1990.
- 26) Ichimaru, H., and Nakamura, M.: The components of Mycoplasma salivarium and its growth medium that are responsible for film formation. J. Gen. Microbiol., 112: 389-392, 1979.
- 27) Watanabe, T., Yukitake, H., and Shibata, K.: Hemagglutinating activity of Mycoplasma salivarium and its attachment to sheep red blood cells. Microbiol. Immunol., 34: 439-446, 1990.
- 28) 中永大喜、高木興氏、渡邊継男: Mycoplasma の口腔粘膜細胞への付着性. 口衛誌, 39: 330-336, 1989.
- 29) Manchee, R. J., and Taylor-Robinson, D.: Studies on the nature of receptors of tissue culture cells to mycoplasmas. Br. J. Exp. Pathol., 50: 66-75, 1969.
- 30) Manchee, R. J., and Taylor-Robinson, D.: Utilization of neuraminic

- acid receptors by mycoplasmas. *J. Bacteriol.*, 198: 914-919, 1969.
- 31) Bradbury, J. M., and Jordan, F. T. W.: Studies on the adsorption of certain medium proteins to Mycoplasma galliseptium and their influences on agglutination and haemagglutination reactions. *J. Hyg.*, 70: 267-279, 1972.
- 32) Sugiyama, T.: Medium components adsorbed to mycoplasmal cells. *Yale J. Biol. Med.*, 56: 691-693, 1983.
- 33) Watanabe, T., Shibata, K., and Hasegawa, K.: Production of immunoglobulin M (IgM) auto-antibodies to IgG in rabbits inoculated with Mycoplasma salivarium cells grown in medium supplemented with rabbit serum. *Infect. Immun.*, 55: 263-265, 1987.
- 34) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193: 265-275, 1951.
- 35) Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T 4. *Nature*, 227: 680-685, 1970.
- 36) Shibata, K., and Watanabe, T.: Purification and characterization of an aminopeptidase from Mycoplasma salivarium. *J. Bacteriol.*, 169: 3409-3413, 1987.
- 37) Britton, H. T. S., and Robinson, R. A.: The use of the antimony-antimonous oxide electrode in the determination of the concentration of hydrogen ions and in potentiometric titrations, the Prideau-Ward universal buffer mixture. *J. Chem. Soc.*, 458-473, 1931.

- 38) Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J.: Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 4350-4354, 1979.
- 39) Busolo, F., Tonin, E., and Conventi, L.: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of Mycoplasma pneumoniae antibodies. J. Clin. Microbiol., 12: 69-73, 1980.
- 40) Taylor-Robinson, D., Canchola, J., Fox, H., and Chanock, R. M.: A newly identified oral mycoplasma (M. orale) and its relationship to other human mycoplasmas. J. Hyg., 80: 135-148, 1964.
- 41) Surolia, A., Pain, D., and Khan, M. I.: Protein A: nature's universal anti-antibody. Trends Biochem. Sci. 7: 74-76, 1982.
- 42) Hjelm, H., Hjelm, K., and Sjoquist, J.: Protein A from Staphylococcus aureus. Its isolation by affinity chromatography and its use as an immunosorbent for isolation of immunoglobulins. FEBS Lett., 28: 73-75, 1972.
- 43) Alexander, A. G., Lowes, H. R., and Kenny, G. E.: Identification of a mycoplasmal protein which binds immunoglobulins nonimmunologically. Infect. Immun., 59: 2147-2151, 1991.
- 44) Lemke, H., Kreusse, R., Lorenzen, J., and Havsteen, B.: Mycoplasma infection of cell lines can simulate the expression of Fc receptors by binding of the carbohydrate moiety of antibodies. Eur. J. Immunol., 15: 442-447, 1985.

- 45) Shibata, K., and Watanabe, T.: Purification and characterization of an arginine-specific carboxypeptidase from Mycoplasma salivarium. J. Bacteriol., 170: 1795-1799, 1988.
- 46) Shibata, K., and Watanabe, T.: Inactivation of the vascular permeability-increasing activity of bradykinin by mycoplasmas. FEMS Microbiol. Lett., 65: 149-152, 1989.
- 47) Shibata, K., and Watanabe, T.: The location of the arginine-specific carboxypeptidase in the membrane of Mycoplasma salivarium and its physiological functions. FEMS Microbiol. Lett., 94: 81-84, 1992.
- 48) Copperman, R., and Morton, H. E.: Reversible inhibition of mitosis in lymphocyte cultures by nonviable mycoplasma. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 123: 790-795, 1966.
- 49) Barile, M. F., and Levinthal, B. G.: Possible mechanism for mycoplasma inhibition of lymphocyte transformation induced by phytohemagglutinin. Nature, 219: 751-752, 1968.
- 50) Cole, B. C., Naot, Y., Stanbridge, E. J., and Wise, K. S.: Interactions of mycoplasmas and their products with lymphoid cells in vitro. edited by Razin, S., and Barile, M. F., The mycoplasmas I V. Mycoplasma pathogenicity, 204-257, Academic Press, New York, 1985.
- 51) Sugimura, K., Ohno, T., Fukuda, S., Wada, Y., Kimura, T., and Azuma, I.: Tumor growth inhibitory activity of a lymphocyte blastogenesis inhibitory factor (LBIF). Cancer Res., 50: 345-349, 1990.
- 52) Sugimura, K., Kimura, T., Arakawa, H., Ohno, T., Wada, Y., Kimura, Y.,

- Saheki, T., and Azuma, I.: Elevated arginosuccinate synthetase activity in adult T leukemia cell lines. *Leukemia Res.*, 14: 931-934, 1990.
- 53) Sugimura, K., Fukuda, S., Wada, Y., Tanai, M., Suzuki, M., Kimura, T., Ohno, T., Yamamoto, K., and Azuma, I.: Identification and purification of arginine deiminase that originated from Mycoplasma arginini. *Infect. Immun.*, 58: 2510-2515, 1990.

付図

・ Table 1-9

・ Fig. 1-6

Table 1. Effect of pH on IgG Fc fragment binding activity of *M. salivarium* cells

Fc fragment conjugated with	Fc fragment binding activity*	
	at pH	
	4.0	7.0
Alkaline phosphatase	26.5	0.16
Peroxidase	45.6	0.92

*Values (OD/min/mg) are means of 3 determinations.

Table 2. Per-Fc binding activity of *M. salivarium* and some bacteria

Organisms**	Per-Fc binding activity*	
	at pH	
	4.0	7.0
<i>Sta. aureus</i> 209P	0.169	1.348
<i>E. coli</i> K12	0.063	0.008
<i>Str. mutans</i> JC2	0.124	0.002
<i>Str. pyogenes</i> C201	0.091	0.002
<i>M. salivarium</i> ATCC 23064	0.529	0.005

*Values (OD/min) are means of 3 determinations.

**The optical density at 660 nm of bacterial cell suspensions used in this experiment was adjusted to that of *M. salivarium* cell suspension (1 mg of protein/ml).

Table 3. AP-Fc binding activity of *M. salivarium* and some bacteria

Organisms**	AP-Fc binding activity*	
	at pH	
	4.0	7.0
<i>Sta. aureus</i> 209P	0.013	0.541
<i>E. coli</i> K12	0.048	0.005
<i>Str. mutans</i> JC2	0.013	0.001
<i>Str. mutans</i> OMZ175	0.009	0.001
<i>Str. mutans</i> B13	0.008	0.001
<i>Str. pyogenes</i> C201	0.009	0.001
<i>M. salivarium</i> ATCC 23064	0.534	0.010

*Values (OD/min) are means of 3 determinations.

**The optical density at 660 nm of bacterial cell suspensions used in this experiment was adjusted to that of *M. salivarium* cell suspension (1 mg of protein/ml).

Table 4. The effect of carbohydrates on the Fc fragment binding activity of *M. salivarium* cells

	Relative activity (%)		
	Mean (n=5)	SD	P*
Control	100	32	-
D-Galactose	79	32	NS
Methyl- α -D-mannopyranoside	77	16	NS
D-Mannose	71	14	<0.05
Methyl- α -D-glucopyranoside	82	24	NS
D-Glucose	72	17	NS
N-Acetyl-D-glucosamine	67	20	NS

*Analysed by Student's *t* test. NS: Not significant.

Table 5. pH stability of AP-Fc binding activity of membrane proteins

pH	OD/mg*	Relative activity (%)
4.0	0.1	4.2
5.0	0.4	12.5
5.25	0.8	26.2
5.5	1.2	36.5
5.75	1.4	43.9
6.0	3.1	96.9
7.0	3.2	100.0
8.0	2.3	71.9
9.0	2.1	65.6
10.0	0.6	18.8

*Values (OD/mg) are means of 3 determinations.

Table 6. Purification of 90 kp from *M. salivarium* cells

	Amount of protein (mg)	Specific activity (OD/min/mg)	Yield (%)
Cell membrane	133.0	0.32	100.0
Triton X-100 treatment	66.0	NT	
CM-Sepharose FF	10.3	2.09	50.6
DEAE-Sephacel	6.2	2.86	41.5
Chromatofocusing	--*	--*	--*
DEAE-Sephacel	2.3	3.75	20.3

*Data were not obtained, because Polybuffer 74 interfered with the protein assay. NT: Not tested.

Table 7. IgG Fc fragment binding activity of 90 kp and protein A

Wells coated with	Binding*of Fc fragments of IgG from							
	Human	Swine	Mouse	Rabbit	Cattle	Rat	Goat	Sheep
Protein A	>2.000	>2.000	0.740	0.299	0.088	0.107	0.130	0.107
90 kp	0.303	0.129	0.239	0.244	0.199	0.327	0.159	0.294

*Expressed as differences between A_{405} of wells coated with protein and A_{405} of wells not coated with. Values are means of 3 determinations.

Table 8. Effects of human IgG and IgM on the attachment of human IgG Fc fragment to 90 kp

Attachment of IgG Fc fragment		
Wells treated with	Binding activity*	Relative activity (%)
None	0.322	100.0
IgM	0.178	42.9
IgG	0.022	6.8

*Expressed as differences between A_{405} of wells coated with 90 kp and A_{405} of wells not coated with. Values are means of 3 determinations.

Table 9. Hemagglutination

SRBC treated with	SRBC			
	Not sensitized	Sensitized with hemolysin		
		1:500	1:400	1:300
Tannic acid +90kp	+	++	++	++
Tannic acid	-	-	+	+
None	-	-	-	-

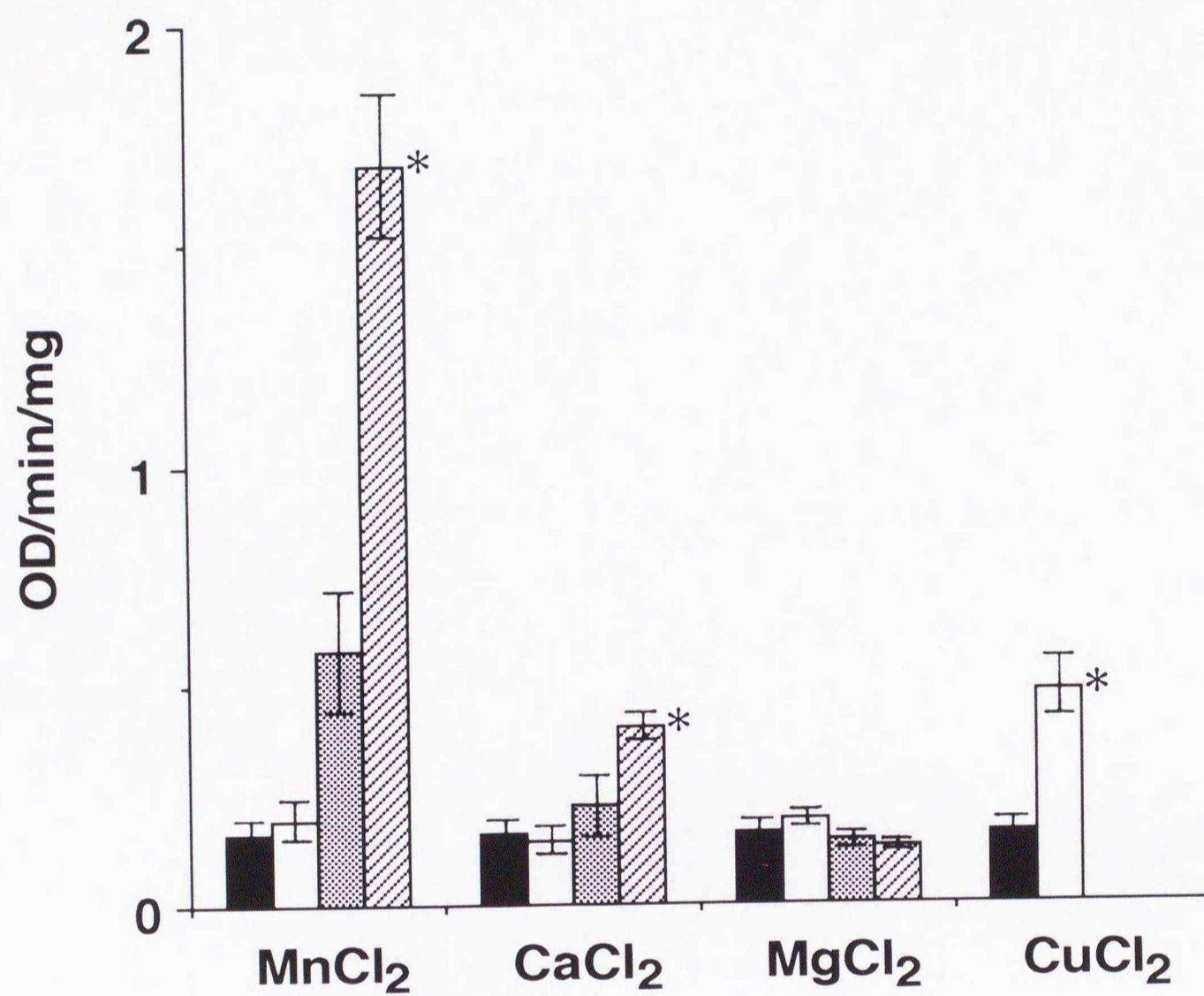


Fig. 1. The effect of metal ions on the human IgG Fc fragment binding activity of *Mycoplasma salivarium* cells. The cells were examined for the Fc fragment binding activity in the absence (■) or presence of 1 (□), 10 (▤) and 100 mM (▨) of metal ions. Each value, expressed as absorbance change at 405 nm per one minute per one mg of cell protein, represents the mean and standard deviation of five determinations. Analysed by Student's *t* test and significantly different from control ($p < 0.001$, $n = 5$).

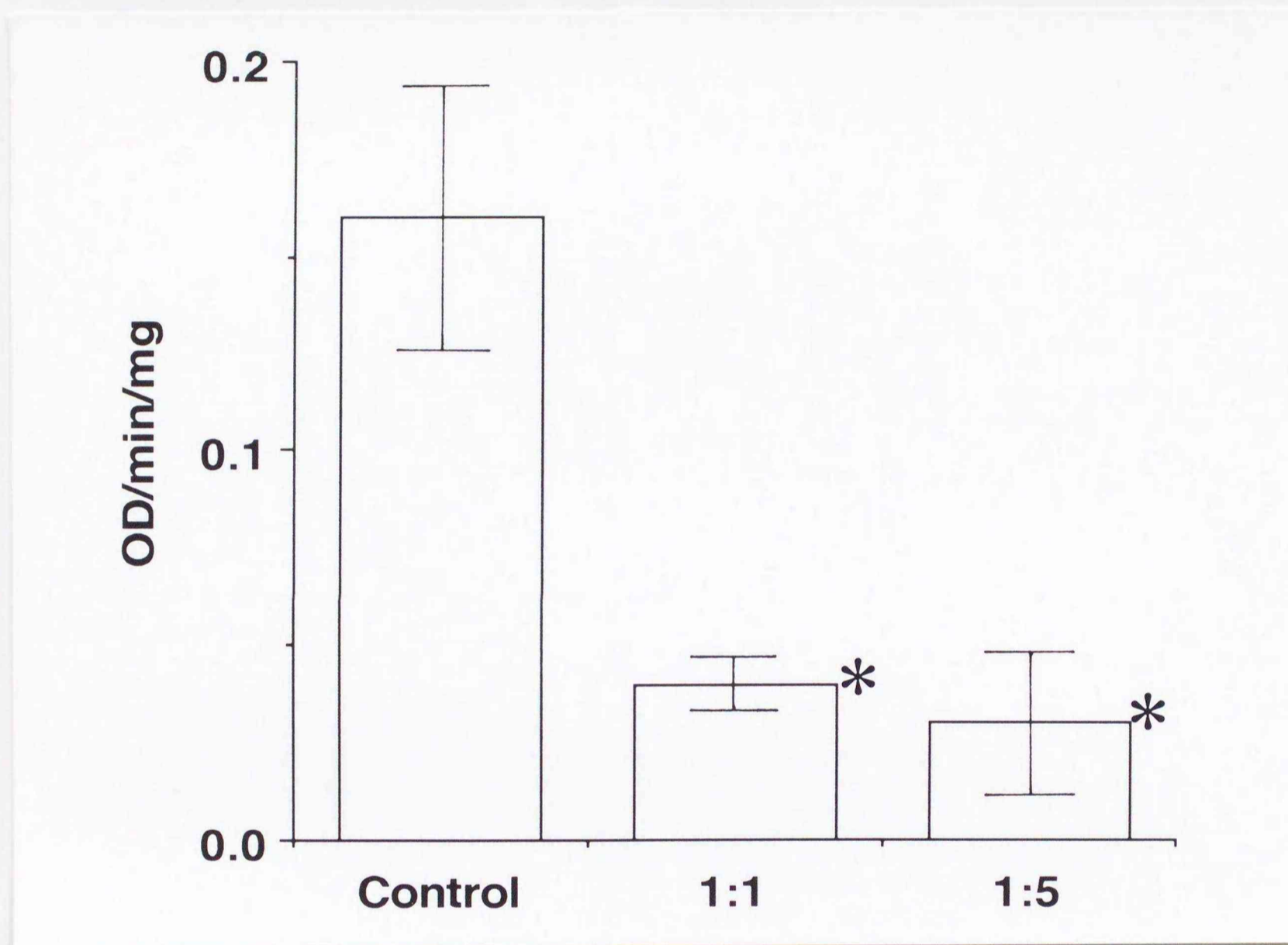


Fig. 2. The effect of pronase on the Fc fragment binding activity of *Mycoplasma salivarium* cells. One part of the cell suspension (2 mg of cell protein/ml) was treated at 37°C for one hour without (cont) or with one part of pronase solution at a concentration of 2 (1 : 1) or 10 mg/ml (1 : 5). The cells treated with pronase were examined for the Fc fragment binding activity by the method described in the text. Each value, expressed as absorbance change at 405 nm per one minute per one mg of cell protein, represents the mean and standard deviation of five determinations. Analysed by Student's t test and significantly different from control ($p < 0.001$, $n = 5$).

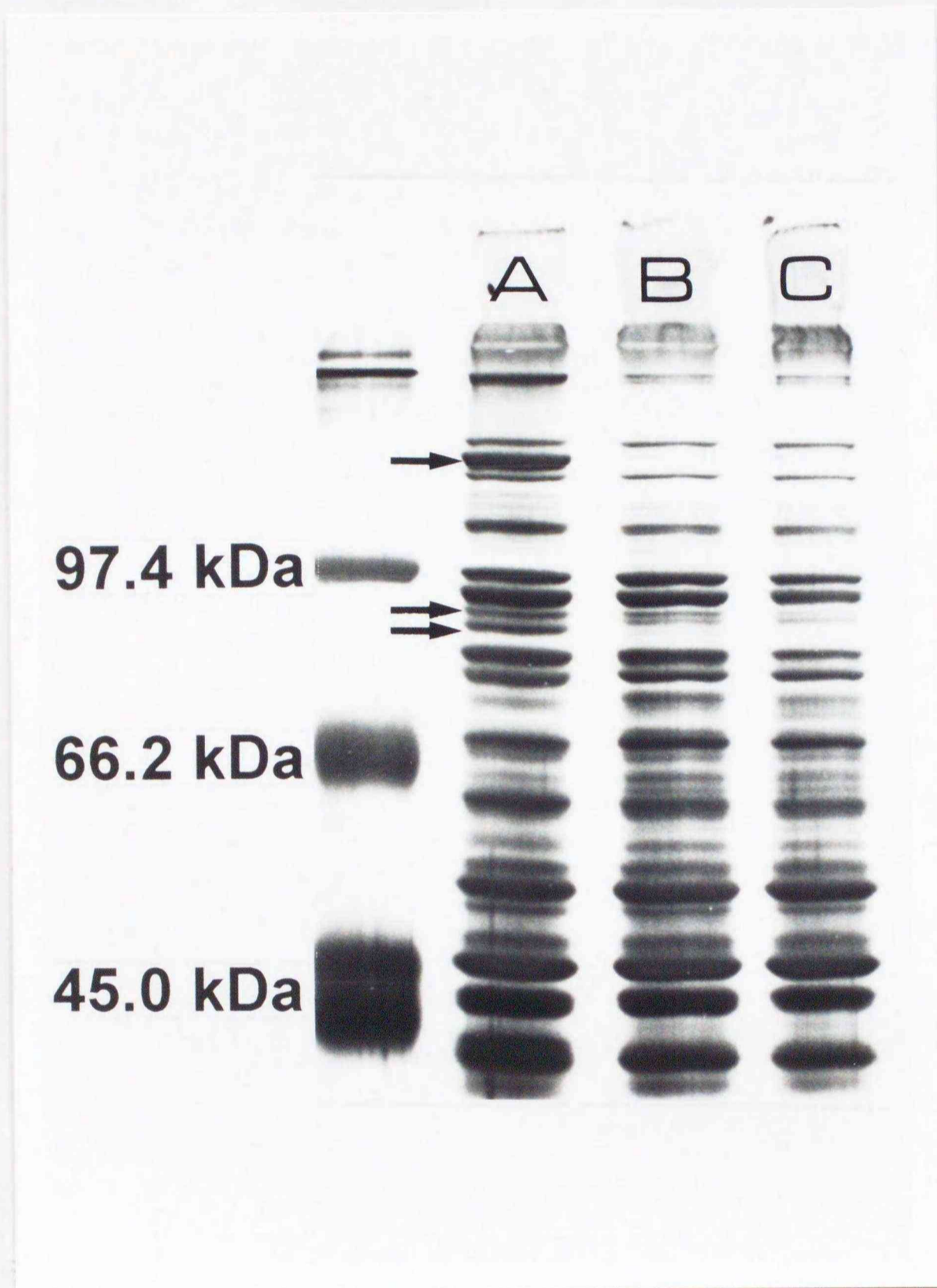


Fig. 3. SDS-PAGE of proteins of *Mycoplasma salivarium* cells treated with pronase. One part of the cell suspension (2 mg of cell protein/ml) was treated at 37°C for 1 h without (lane A) or with one part of pronase solution at a concentration of 2 (lane B) or 10 mg/ml (lane C). SDS-PAGE was performed in 10 % gels and stained by use of Silver stain kit (Bio-Rad).

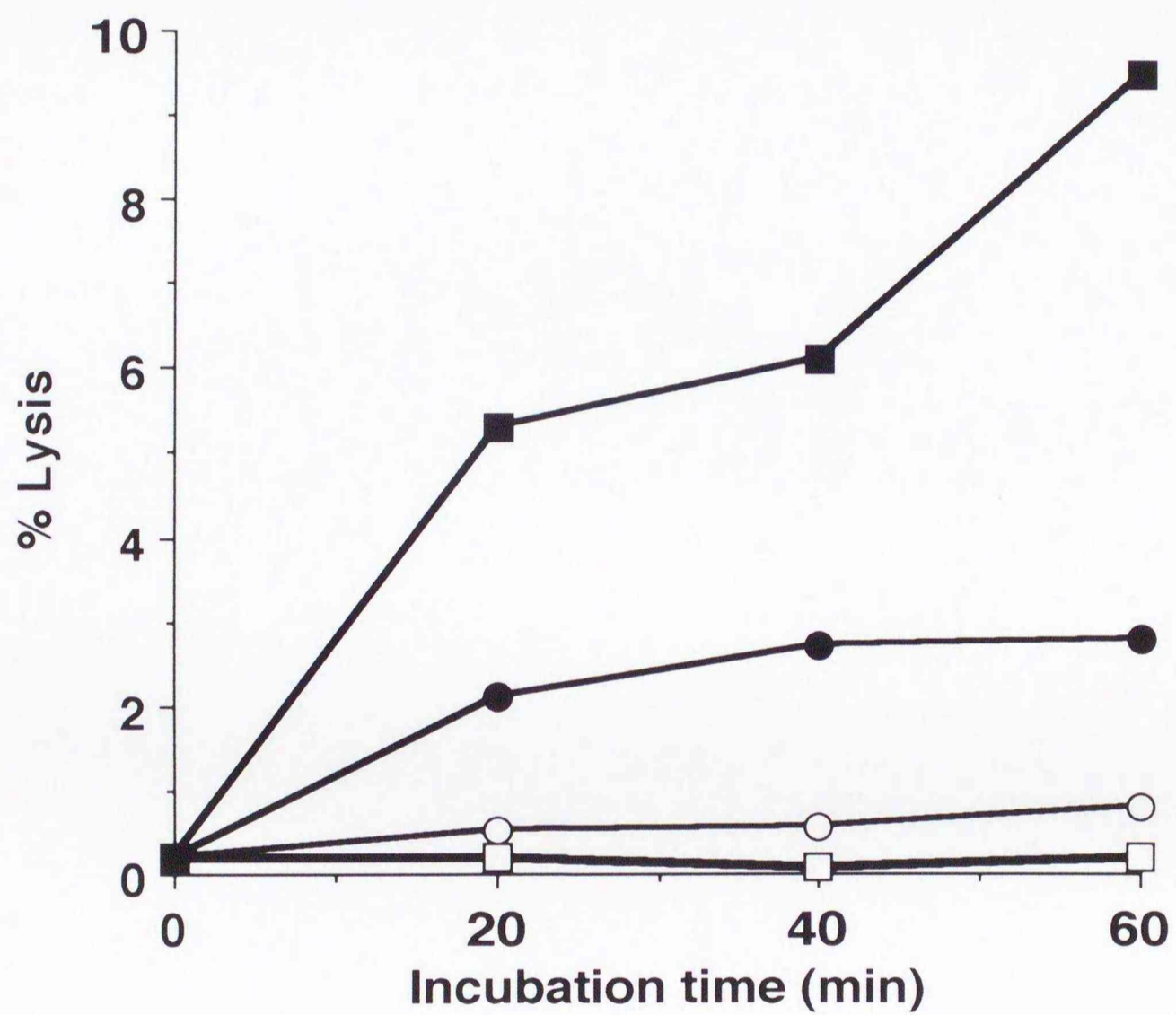


Fig. 4. The lytic effect of pronase on *Mycoplasma salivarium* cells. One part of the cell suspension (2 mg of protein/ml) was incubated with one part of pronase solution (10 mg/ml) (■) at 37°C for 1 h. As controls, the cell suspension diluted 1 : 1 with BSA-TBS was incubated for 1 hon ice (□), at 20°C (○) or at 37 °C (●). The % lysis of the cells was determined as described in the text.



Fig. 5. Purification of 90 kP from MS cells and its characterization. membrane proteins ($4 \mu\text{g}$ of protein/lane) were separated by SDS-PAGE and transferred to Immobilon PVDF membrane (Millipore). The gels were stained by use of Silver stain kit (Bio-Rad) (lane A) and scanned at 530 nm in a Dual-Wave Length TLC Scanner CS-930 (Shimadzu) (lane B). The PVDF membrane was reacted with AP-conjugated Fc fragment of human IgG (lane C). SDS-PAGE patterns of 90 kP-containing fractions obtained by chromatography on CM-Sepharose FF (lane D) and DEAE-Sepharose (lane E), chromatofocusing on PBE 94 (lane F), and chromatography on DEAE Sephacel in the absence of Triton X-100 (lane G). 90 kP was electrophoresed on SDS-PAGE gels, transferred to PVDF membrane, and reacted with AP-conjugated Fc fragment of human IgG (lane H), AP-conjugated goat anti-human IgG (lane I) or Con A (lane J).

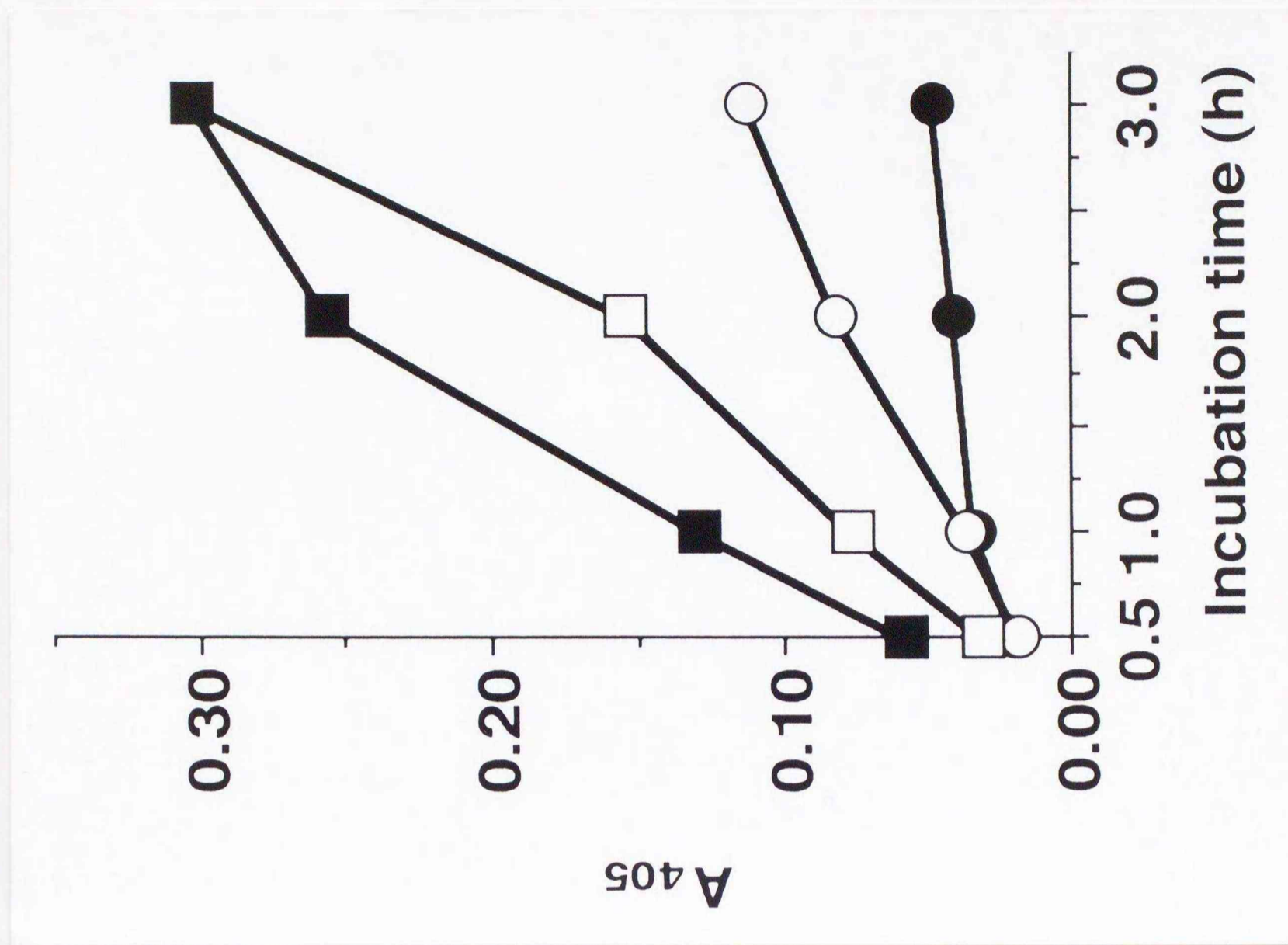


Fig 6. Determination of reactivity of 90 kp with Fc fragment of human IgG by ELISA. Wells of microtitration plates were pretreated with 200 μ l of 0.1 M carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.6) at 37 °C for 0.5 h (0.5 h-well), 2 h (2h-well) or 4 h and then at room temperature for 8 h (12 h-well), and then washed with 300 μ l DW three times (5 min/wash). The wells incubated with 200 μ l of a solution of 90 kp (20 μ g of protein/ml of PBS) or PBS at 37°C for 4 h or/and then at room temperature for 8 h (12-12 h well). The wells coated with protein (P-wells) or not (N-wells) were incubated with 200 μ l of AP-conjugated Fc fragment of human IgG diluted with BSA-PBS at 37°C for 4 h. After washed, the wells were incubated with 200 μ l of AP substrate solution at 37°C for three hours. The A_{405} was read in a Microplate Reader (Bio-Rad). IgG Fc fragment binding activity was expressed as differences between (mean A_{405} of 4 P-wells incubated with AP-conjugate - mean A_{405} of 4 N-wells incubated with AP conjugate) and (mean A_{405} of 4 P-wells incubated with PBS-BSA - mean A_{405} of 4 N-wells incubated with PBS-BSA). ●, ○, □, and ■, A_{405} of 0.5 h-wells, 2 h-wells, 12 h-wells, and 12-12 h wells coated with 90 kp, respectively.



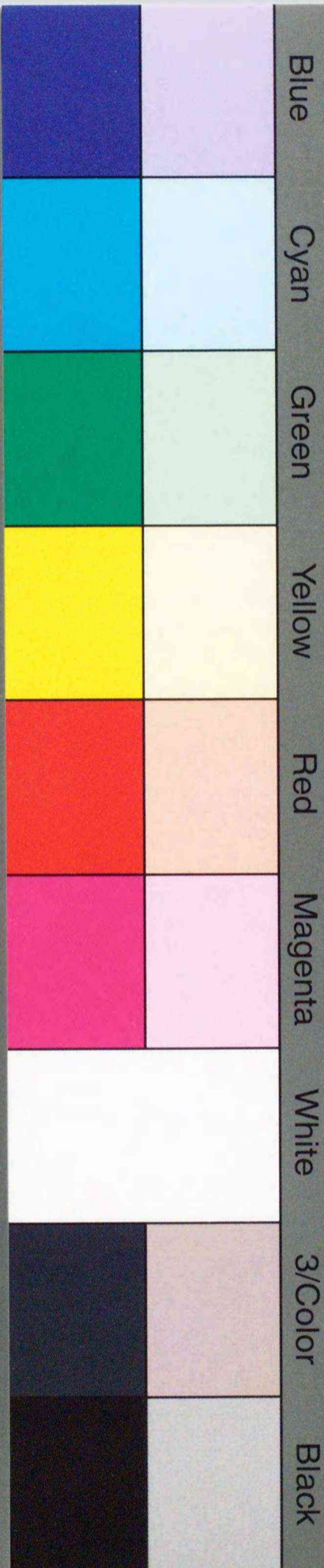
4979093015818

LF2-A4NY MADE IN JAPAN

Inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

