



Title	Porphyromonas gingivalis とStreptococcus oralis との共凝集に関する菌体表層成分の同定
Author(s)	堀江, 博
Citation	大阪大学, 2000, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41863
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

氏名	堀江 博 ^{ひろし}
博士の専攻分野の名称	博士(歯学)
学位記番号	第 15334 号
学位授与年月日	平成12年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 歯学研究科歯学臨床系専攻
学位論文名	<i>Porphyromonas gingivalis</i> と <i>Streptococcus oralis</i> との共凝集に関与する菌体表層成分の同定
論文審査委員	(主査) 教授 雫石 聡 (副査) 教授 浜田 茂幸 助教授 森崎市治郎 講師 藤原 卓

論文内容の要旨

有力な歯周病原性菌と考えられている *Porphyromonas gingivalis* が病原性を発揮するためには、本菌が歯周ポケット内に定着することが前提となる。特に、*P. gingivalis* の口腔常在グラム陽性菌への付着は、口腔内での *P. gingivalis* の定着の初期段階において重要な役割を果たすことが報告されているが、両菌の共凝集に関与する菌体表層成分やその機序に関しては不明な点が多い。本研究では、*P. gingivalis* と代表的な口腔常在グラム陽性菌のひとつである *Streptococcus oralis* との共凝集に関与する菌体表層成分を同定することを目的として実験を行った。

まず、*S. oralis* との共凝集に関与する *P. gingivalis* の菌体表層成分を同定するため、*P. gingivalis* 381株菌体の超音波破碎処理による表層抽出物を Sepharose CL-6B ゲルクロマトグラフィーにより分画し、*P. gingivalis* 381株と *S. oralis* ATCC 9811株との共凝集の阻害活性を示す画分を得た。この画分には主に43kDaの分子量をもつタンパク質が含まれていることが SDS-ポリアクリルアミド電気泳動法により示された。このタンパク質は分子量から線毛と推定されたため、*P. gingivalis* 381株菌体から線毛を精製し、*S. oralis* ATCC 9811株菌体との結合をドットプロット法により調べた。その結果、精製線毛は *S. oralis* ATCC 9811株菌体と強く結合することが示された。また、精製線毛による共凝集阻害活性を調べたところ、精製線毛は共凝集を濃度依存的に阻害し、その50%阻害濃度は $13.5 \mu\text{g/ml}$ であり、 $50 \mu\text{g/ml}$ ではほぼ100%阻害した。さらに、*P. gingivalis* 381株線毛を構成するフィンブリリンの核酸配列およびアミノ酸配列を基に線毛タンパク質の各種フラグメントを作製し、各フラグメントによる共凝集阻害活性を調べた。線毛タンパク質のN末端フラグメントである1-265アミノ酸残基のペプチドは非常に弱い共凝集の阻害を示したが、C末端フラグメントである266-286アミノ酸残基および287-337アミノ酸残基のペプチドに強い阻害活性が認められ、線毛のこれらC末端ペプチド領域が共凝集に関与することが示唆された。

次に、*P. gingivalis* 線毛との結合に関与する *S. oralis* 菌体表層成分を同定するために、*S. oralis* ATCC 9811株菌体から超音波破碎処理により抽出した表層成分と *P. gingivalis* 381株リコンビナントフィンブリリン (r-Fim) との結合を酵素免疫測定法またはウエストウエスタン法により調べた。その結果、*S. oralis* ATCC 9811株の35kDaの分子量をもつ菌体表層タンパク質が r-Fim と結合することが示された。*S. oralis* ATCC 9811株菌体の表層抽出物から、Sepharose CL-6B ゲルクロマトグラフィー、Bio-Scale Q2 イオン交換クロマトグラフィーおよび Bio-Scale CHT2-I ハイドロキシアパタイトクロマトグラフィーを用いて、r-Fim と結合する35kDa タンパク質を部分精製した。この部分精製標品と菌体表層抽出粗標品との共凝集阻害活性を比較したところ、部分精製標品の50%阻

害濃度は $0.95 \mu\text{g/ml}$ であるのに対して、粗標品のそれは $15.9 \mu\text{g/ml}$ であり、部分精製標品は強い共凝集阻害活性を示した。また、この35 kDa タンパク質のN末端アミノ酸配列を調べたところ、グリシン-イソロイシン-アルギニン-バリン-チロシン-リジン-プロリンスレオニンであった。このタンパク質のN末端アミノ酸配列を基に、すでに報告されているタンパク質とのホモロジー検索を行ったところ、既知のグラム陽性菌の表層付着因子のそれとの間には高い相同性はみられなかった。種々の口腔常在グラム陽性菌の菌体表層成分とr-Fimとの結合をウエストウエスタン法で調べた結果、供試した18菌株のうち *S. oralis* ATCC 10557株、*Streptococcus gordonii* G 9 B株および *Streptococcus sanguis* ATCC 10556株をはじめとする7菌株で、*S. oralis* ATCC 9811株と同様に、r-Fimと結合する35 kDaの分子量をもつタンパク質が認められた。

以上の結果より、*P. gingivalis* 381株と *S. oralis* ATCC 9811株との共凝集には、*P. gingivalis* 381株の線毛と *S. oralis* ATCC 9811株の35 kDaの菌体表層タンパク質が関与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究は、有力な歯周病原性菌と考えられている *Porphyromonas gingivalis* と代表的な口腔常在グラム陽性菌のひとつである *Streptococcus oralis* との共凝集に関与する菌体表層成分について調べたものである。その結果、*P. gingivalis* 381株と *S. oralis* ATCC 9811株との共凝集には、*P. gingivalis* 381株の線毛と *S. oralis* ATCC 9811株の35 kDa 菌体表層タンパク質が関与することを示した。

この論文は、*P. gingivalis* が口腔内に定着する過程において本菌のグラム陽性菌への付着機序を解析する上で重要な知見を示したものであり、博士（歯学）の学位に十分値するものと認める。