The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Porphyromonas gingivalisの線毛付着とプロテアーゼによる促進作用ならびに阻害剤による抑制メカニズムの解析
Author(s)	紺谷, 昌仙
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43051
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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【 2 】

氏　　名	紺谷昌仙（こんたにまさのり）
博士の専攻分野の名称	博　士（学　術）
学位記番号	第　14919　号
学位授与年月日	平成11年9月9日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	*Porphyromonas gingivalis* の線毛付着とプロテアーゼによる促進作用ならびに阻害剤による抑制メカニズムの解析
論文審査委員	（主査） 教　授　浜田　茂幸 （副査） 教　授　恵比須繁之　　助教授　西村　理行　　講　師　天野　敦雄

論文内容の要旨

Porphyromonas gingivalis は最も重要な歯周病原菌のひとつとされている。*P. gingivalis* の菌体表層に存在する繊維状タンパクである線毛が付着因子として機能し、また本菌の産生する複数のプロテアーゼは宿主側の感染防御因子や宿主組織の破壊に関わっていることが示唆されている。本研究は *P. gingivalis* 線毛付着におけるプロテアーゼの役割をレセプターとなる宿主の細胞外基質（ECM）タンパクに対する修飾作用と併せて解析したものである。

プロテアーゼは *P. gingivalis*381株菌体から合成基質である benzoyl-L-arginine *p*-nitroanilide（Bz-L-Arg-*p*NA）の分解を指標に各種クロマトグラフィーにより精製し、単離した。本プロテアーゼの分子サイズは SDS-PAGE により47 kDa と算出された。本酵素はシステインにより活性化されること、また 4-methyl-coumaryl-7-amine（MCA）を結合した各種の合成ペプチド基質の分解能やプロテアーゼインヒビターに対する阻害の様式などから、Arg 特異的システイン（RC）プロテアーゼであることが示された。

本研究に供した線毛は *P. gingivalis*381株菌体を攪拌により物理的に剝離し、イオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製したものである。精製線毛は biotin-*N*-hydroxysuccinimide（biotin-NHS）によりビオチンラベル化を行い、enzyme-linked biotin-avidin（ELBA）法による線毛付着試験に用いた。線毛の付着部位を特定するため、各種基質タンパクをマイクロプレートへ固相化後、線毛の付着を定量した。その結果、フィブロネクチン、コラーゲン、ラミニンなどの ECM タンパクに対して高レベルの付着がみられた。また本菌線毛は正常ヒト皮膚由来の培養線維芽細胞へも強く付着したが、上述の ECM タンパクの添加によって同付着は著しく抑制された。このことより、線毛の付着は ECM タンパクを介するものであると推定された。

つぎに固相化 ECM タンパクあるいは培養線維芽細胞を RC プロテアーゼで前処理すると、線毛の付着が著しく亢進することが明らかにされた。この効果はプロテアーゼインヒビター（leupeptin、antipain 等）を添加することによって抑制され、またそれ以外にも Arg、あるいは $(Gly)_n$-Arg、Gly-Arg-Gly、Arg-Gly などの各種 Arg 含有ペプチド、bradykinin（C、N-両末端に Arg 残基を有するペプチド）とその誘導体（bradykinin(2-9)、[Ile-Ser]-bradykinin、[Des-Arg^9]-bradykinin、bradykinin(1-7)）等により、著しい阻害作用が認められた。ついで各種ジペプチド（Gly-X）

をリガンドとして固相化したアフィニティカラムに対する線毛の付着試験を行ったところ、線毛はGly-Argを固相化したカラムに特異的に吸着した。これらの結果はプロテアーゼによるECMタンパクへの線毛の付着促進には、C-末端Arg残基がきわめて重要な働きを果たしていることを強く示唆している。

さらに表面プラズモン共鳴現象を応用した光学系バイオセンサー装置であるBIAcore（Pharmacia Biotech）を用いて前述の各種ジペプチドと線毛との相互作用を検討したところ、線毛とArg残基間に特徴的な共鳴シグナルの上昇が認められた。また線毛とフィブロネクチンとの相互作用のBIAcore解析においても、プロテアーゼの作用によって線毛とフィブロネクチンとの親和性が顕著に上昇する結果が得られた。さらにBIAcoreによる速度論的な解析により線毛とArg残基、線毛とプロテアーゼによる部分分解フィブロネクチンとの相互作用はほぼ同程度で、酵素と基質の関係に匹敵する結合力があることが明らかとなった。

また以上のような実験結果に基づいて、線毛のECMタンパクへの付着を抑制する素材を広く一般食品中からスクリーニングした結果、分子内に多数のArgを有するプロタミン（salmineおよびclupeine）が有望な素材であることが示唆された。

本研究により、*P. gingivalis*の線毛はECMタンパクのArg残基、特にC-末端Arg残基に対して強い親和性を有し、RCプロテアーゼの作用によって線毛の潜伏レセプター（cryptic receptor）であるArg残基がC-末端に露出することにより、線毛の付着が促進されることが示された。したがって、本菌自身が産生するプロテアーゼが線毛を介する宿主組織への初期付着にきわめて重要な機能を果たしていると結論された。

論文審査の結果の要旨

本研究は*Porphyromonas gingivalis*線毛の宿主細胞表層への付着におけるプロテアーゼの影響を検討し、付着メカニズムの解析を行ったものである。その結果、*P. gingivalis*線毛は細胞外マトリックス（ECM）タンパク質に付着すること、また同菌が産生するArg特異的システイン（RC）プロテアーゼの作用によってECMタンパク質への線毛の付着が促進されることを見出した。この際、RCプロテアーゼ処理により新たに露出したC-末端Argに対して、同線毛は強い親和性を示し、これによって付着が促進されることを明らかにした。一方、C-末端Arg残基を有する化合物を添加することにより、線毛付着は効果的に抑制された。以上、本研究は*P. gingivalis*線毛付着の分子メカニズムを明らかにしたものであり、博士（学術）に値するものと認める。