The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Porphyromonas gingivalis のヘモグロビン結合性タンパク質の同定と同タンパク質を標的としたDNAワクチンの病原性抑制効果
Author(s)	久保庭, 雅恵
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43196
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

【3】

氏　　名	久保庭　雅　恵（くぼにわ　まさえ）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　16562　号
学位授与年月日	平成13年11月6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* のヘモグロビン結合性タンパク質の同定と同タンパク質を標的としたDNAワクチンの病原性抑制効果」
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　雫石　聰 （副査） 教　授　天野　敦雄　　助教授　川端　重忠　　講　師　藤原　卓

論　文　内　容　の　要　旨

多くの病原性細菌にとって、鉄はその生存と増殖に必須の栄養素であり、細菌の病原性発揮にも重要な役割を果たしているといわれている。しかしながら、宿主生体の鉄成分は大部分が結合鉄やヘム鉄として存在しており、また、細菌が容易に利用できる遊離鉄は極めて低い濃度でしか存在しないことから、細菌は鉄獲得のための種々の機構を保有していると考えられる。歯周病原性菌である *Porphyromonas gingivalis* も、増殖に際して強い鉄要求性を示し、その鉄獲得系については、一部の細菌にみられるような Fe^{3+} に高親和性の輸送キレート剤であるシデロフォアを介した系を持たないこと、ヒトヘモグロビン（Hb）をトランスフェリンやヘミンなどよりも有効な鉄源として利用できること、同菌菌体外膜にはヘモグロビン結合性タンパク質が存在することなどの知見が報告されている。従って、本菌は歯周ポケット内において、歯肉溝滲出液中の Hb を主要な鉄源として直接利用していると考えられるが、*P.gingivalis* の鉄獲得機構についての詳細は未だ不明である。

本研究では、まずヒトヘモグロビン結合性外膜タンパク質（Hbp）を *P.gingivalis* ATCC33277株菌体粗標品から分離精製した。精製 Hbp のアミノ酸配列解析の結果、Hbp のN端末23アミノ酸残基は、*P.gingivalis* のリジン特異的システインプロテアーゼ（Lys-gingipain; KGP）のプロテアーゼ活性領域（KGP_{cd}）のものと完全に一致した。BIACORE による親和性解析の結果、KGP_{cd} と Hb との解離定数（*K*d）は、1.45×10^{-8} と特異的結合を示唆する高い値を示した。また、KGP_{cd} と Hb との結合は酸性条件下および嫌気条件下で亢進し、KGP_{cd} のプロテアーゼ活性の至適条件とは異なっていた。作製されたリコンビナント KGP_{cd}（$rKGP_{cd}$）は Hb 結合能を示し、さらに $rKGP_{cd}$ のプロテインジスルフィドイソメラーゼによる立体構造の再構築により、Hb 結合能は顕著に亢進したが、逆にプロテアーゼ活性は低下した。また、立体構造再構築後の $rKGP_{cd}$ により *P.gingivalis* 菌体抽出物の Hb 結合は量依存的に阻害された。これらのことから、Hbp は KGP_{cd} と同一のタンパク質であり、KGP_{cd} の Hb 結合領域は酵素活性中心領域とは異なることが示唆された。

KGP_{cd} が歯周組織破壊に果たす役割を評価するために、*kgp* および *rgp* のプロテアーゼ領域をコードする遺伝子断片をそれぞれ哺乳動物細胞発現ベクター pSecTag2 に組み込み、pSecTag2A/kgp_{cd} と pSecTag2B/rgp_{cd} を構築した。これらベクターを DNA ワクチンとして BALB/c マウスに筋肉内接種したところ、血清抗 KGP_{cd}IgG および抗 RGP_{cd}IgG が著明に誘導された。これら抗体の反応特異性を ELISA 法および Western Blot 法により調べた結果、抗 KGP_{cd}IgG と抗 RGP_{cd}IgG は互いに交差反応性を有していた。抗 KGP_{cd}IgG および抗 RGP_{cd}IgG によるプロテアー

ゼ活性の阻害効果を検討したところ、それぞれの抗体はKGPプロテアーゼ活性とRGPプロテアーゼ活性の双方を量依存的に阻害した。また、抗KGP_{cd}IgG、抗RGP_{cd}IgG、抗線毛IgGおよび抗全菌体IgGを用いて、これら抗体が*P.gingivalis*菌体抽出物のHb結合能に及ぼす影響を調べた。その結果、抗KGP_{cd}IgGによる結合阻害が認められ、さらに抗KGP_{cd}IgGと抗線毛IgGの添加によりこの結合はほぼ完全に阻害された。次に、鉄欠乏状態においた*P.gingivalis* ATCC33277株菌体を、抗KGP_{cd}IgG、抗RGP_{cd}IgGおよび抗全菌体IgGと嫌気条件下でそれぞれ反応させた後、Hbのみを鉄源とした培地で培養し増殖速度を測定したところ、抗KGP_{cd}IgGによる増殖速度の明確な遅延が認められた。DNAワクチンpSecTag2A/kgp_{cd}による感染防御効果を測定するために、*P.gingivalis* W50株生菌9×10^9 CFUを、免疫または非免疫マウスの腹腔内に感染させ、腹部に形成されたびらんの面積、全身の衰弱状態および生死を観察した。その結果、非免疫マウスは菌感染後72時間以内に全て死亡したが、pSecTag2A/kgp_{cd}によって免疫したマウスでは炎症症状の軽減と有意な生存率の上昇が認められた。

以上の結果より、*P.gingivalis*のHbp（KGP_{cd}）は、本菌の鉄獲得に主たる役割を果たすとともに、本菌の病原性の発揮にも関与していると考えられ、感染防御における標的分子として有効であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本研究では、*Porphyromonas gingivalis*のヘモグロビン結合性外膜タンパク質（Hbp）の同定および機能解析を行い、さらに、同分子を標的としたDNAワクチンを構築し、マウスにおいて誘導された特異抗体が*P.gingivalis*の増殖や病原性に及ぼす影響について検討した。その結果、*P.gingivalis*菌体の外膜粗標品より精製されたHbpは、リジン特異的システインプロテアーゼのcatalytic domain（KGP_{cd}）と同定され、ヘモグロビン（Hb）に強い結合能をもつことが明らかとなった。そして、kgp_{cd} DNAワクチンにより誘導された抗KGP_{cd}IgGは、*P.gingivalis*菌体成分のHbとの結合を抑制するとともに、本菌の増殖を著明に遅延させたことから、KGP_{cd}は本菌の主たるHb結合タンパク質として機能することが示唆された。さらに、マウスへの*P.gingivalis*感染実験において、kgp_{cd} DNAワクチンによる明確な感染防御効果が得られた。

この論文は、*P.gingivalis*の鉄獲得機構のみならず本菌の歯周病原性を解明する上で、重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位に十分値するものと認める。