The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Porphyromonas gingivalis感染細胞におけるインテグリンシグナル伝達に関わる分子群の動態 : fimA型による異同の解析
Author(s)	山村, 泰平
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45562
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

【16】

氏　　名	山　村　泰　平（やま　むら　たい　へい）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯　学）
学　位　記　番　号	第　１９３９７　号
学位授与年月日	平成 17 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学　位　論　文　名	***Porphyromonas gingivalis* 感染細胞におけるインテグリンシグナル伝達に関わる分子群の動態：*fimA* 型による異同の解析**
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　大嶋　　隆 （副査） 教　授　浜田　茂幸　　助教授　島袋　善夫　　助教授　永田　英樹

論　文　内　容　の　要　旨

【目的】

歯周病原性細菌である *Porphyromonas gingivalis* の菌体表層に存在する線毛は、本菌の最も重要なビルレンス因子のひとつとして考えられている。この線毛をコードする遺伝子 *fimA* タイプにより *P. gingivalis* はⅠ型からⅤ型に分類されている。近年、これら線毛遺伝子型のなかでⅡ型 *fimA* を有する *P. gingivalis* が、重度の歯周病患者から高頻度で検出されることが報告された。また、Ⅱ型の組み換えタンパク（rFimA）が歯肉上皮細胞株に最も強く付着・侵入すること、さらにこの付着・侵入が抗α5β1インテグリン抗体によって阻害されることが示され、*P. gingivalis* が上皮細胞上のレセプターであるα5β1インテグリンを介して宿主へ付着・侵入することが報告されている。本研究の目的は *P. gingivalis* が上皮細胞にどの程度付着・侵入するのか線毛タイプにより比較・検討し、それに際してインテグリンシグナル伝達に関わるパキシリンや focal adhesion kinase（FAK）に対する影響を本菌の産生するプロテアーゼの関与を含めて検討することである。

【材料と方法】

1）使用菌株、使用細胞株

各線毛タイプに属する *P. gingivalis* として ATCC 33277 株（Ⅰ型 *fimA*）、OMZ 314 株（Ⅱ型）、6/26 株（Ⅲ型）、HG 564 株（Ⅳ型）、HNA-99 株（Ⅴ型）を使用した。感染実験に使用した細胞株としてヒト咽頭癌由来上皮細胞 HEp-2 細胞、およびヒト子宮頸癌由来上皮細胞株 HeLa 細胞を使用した。

2）*P. gingivalis* の上皮細胞への付着・侵入試験

培養細胞に［^{3}H］チミジンでラベルした *P. gingivalis* を感染率 100（細胞 1 に対して細菌 100）で 1 時間感染させ放射活性の割合を判定した。

3）ウェスタンブロットによるパキシリンおよび FAK の検出

P. gingivalis を感染させた培養細胞を細胞溶解液で経時的に溶解し、溶出したタンパク試料をパキシリンと FAK の抗全タンパク抗体および抗リン酸化抗体を用いて検出した。

4）Ⅱ型 *fimA* 欠失株の作成

ORF 中央を欠失させたⅡ型 *fimA* 遺伝子断片を作成し、自殺ベクターである pYKP009 に挿入した。このベクターを接合伝達によって遺伝子導入し、Ⅱ型 *fimA* の欠失株を得た。

5）共焦点レーザー顕微鏡下での感染細胞におけるパキシリンの局在の観察

EGFP-パキシリンを導入した HeLa 細胞に *P. gingivalis* を感染率 200 で 1 時間感染させた後に細胞固定した。この試料を Alexa Fluor 594 標識ファロイジン（Molecular Probes）を添加してアクチンの染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した。

【結果】

1）Ⅱ型 *fimA* 株は他の型の株に比して有意に高い上皮細胞への付着・侵入率および侵入率を示した。

2）感染率 100 では、Ⅱ型 *fimA* 株感染群のみパキシリンと FAK の分解が認められた。

3）サイトカラシン D や TLCK によってⅡ型 *fimA* 株の上皮細胞内への侵入を阻害すると、パキシリンや FAK の分解の抑制が認められた。

4）Ⅱ型 *fimA* 株の線毛欠失変異株では、上皮細胞への付着・侵入能はほとんど認められなかった。また、パキシリンや FAK の分解も認められなかった。

5）Ⅱ型 *fimA* 株感染細胞を共焦点レーザー顕微鏡で観察すると、接着斑に点状に局在するパキシリンが細胞質内に拡散する像が認められた。一方で線毛欠失変異株ではパキシリンの局在に変化は認められなかった。

6）感染率 1200 において認められるⅠ型 *fimA* 野生株感染後 30 分以降におけるパキシリンと FAK の分解はリシン特異的プロテアーゼ：Kgp 欠失Ⅰ型株においては認められたが、アルギニン特異的プロテアーゼ：Rgp 欠失Ⅰ型株においては認められなかった。

【結論と考察】

本研究の結果は、Ⅱ型 *fimA* 株が高頻度で細胞内に侵入すると同時にパキシリンと FAK の分解を誘導し、その分解には本菌の産生する Rgp が深く関与することが示唆された。特定の病原性遺伝子を持つ *P. gingivalis* だけが細胞内タンパクを分解するという報告は他にされておらず、本研究で得られた知見はⅡ型 *fimA* の *P. gingivalis* を持つ歯周病患者における歯周病の進行性の解明の手がかりになると考えられる。

論文審査の結果の要旨

本研究は、菌体表層の線毛をコードする遺伝子 *fimA* により型別される *Porphyromonas gingivalis* の病原性を、上皮細胞への付着・侵入能で調べるとともに、感染細胞におけるインテグリンシグナル伝達に関与するパキシリンと FAK の動態を本菌の産生するプロテアーゼの関与を含めて検討したものである。その結果、重度の歯周病患者から高頻度で検出されるⅡ型 *fimA* を持つ菌株は上皮細胞への侵入能が高く、細胞内でのパキシリンや FAK の分解能も強いことが示された。また、Ⅱ型 *fimA* 欠失変異株では侵入能も分解能もほとんど認められなかった。さらに、Ⅰ型株の各プロテアーゼ遺伝子欠失株を用いた実験からパキシリンと FAK の分解には上皮細胞内に侵入した本菌の産生するアルギニン特異的プロテアーゼが深く関与していることが示唆された。

以上のことから、本研究は歯周病原性細菌 *P. gingivalis* の病原性を明らかにする上で重要な示唆を与えるものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。