

Title	Porphyromonas gingivalisのPGN1251遺伝子の病原因子発現およびバイオフィルム形成における役割解析
Author(s)	山口, 幹代
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49790
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	山 口 幹 代
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学位記番号	第 2 2 8 5 9 号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科分子病態口腔科学専攻
学位論文名	Porphyromonas gingivalis の PGN1251 遺伝子の病原因子発現およびバイオフィーム形成における役割解析
論文審査委員	(主査) 教授 恵比須繁之 (副査) 教授 天野 敦雄 准教授 永田 英樹 准教授 寺尾 豊

論文内容の要旨

<研究目的>

Porphyromonas gingivalis は、主要な歯周病関連細菌であり、根尖性歯周炎が難治化する原因の一つである根尖孔外バイオフィームからも高頻度に検出される。*P. gingivalis* の病原因子としては、線毛、ジンジパイン、リポ多糖(LPS)ならびに莢膜などが挙げられる。そして、ある種のグリコシルトランスフェラーゼは、本菌の主要な病原因子である莢膜の産生やジンジパインの活性化およびバイオフィーム形成等に関わっていることが報告されている。本研究では、*P. gingivalis* ATCC 33277 株を用いて、グリコシルトランスフェラーゼのモチーフを持つ遺伝子である PGN1251 の病原因子発現およびバイオフィーム形成における役割について検討した。

<材料および方法>

1. PGN1251 変異株および相補株の作製

P. gingivalis ATCC 33277 株を用いて、相同組替えにより PGN1251 変異株および相補株を作製した。

2. PGN1251 の変異が赤血球凝集能、ジンジパイン活性ならびにリジン特異的システインプロテアーゼ(Lys-ジンジパイン)の局在に及ぼす影響の検索

調整した赤血球と段階希釈した野生株、変異株あるいは相補株のいずれかとを混合し、沈殿の有無により赤血球凝集能への影響を評価した。ジンジパイン活性は、菌体あるいは培養上清に基質を添加し、37°C で 1 時間反応後、蛍光分光光度計(励起 380 nm, 蛍光 460 nm)にて測定した。統計学的有意差の検討には Student *t*-test を用いた(p<0.001)。また、菌体をフレンチプレスおよび遠心により、菌体外膜画分、内膜画分、サイトプラズム/ペリプラズム画分あるいは上清画分に分離したものを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)にて泳動した後、抗 Lys-ジンジパイン抗体を用いてイムノブロットを行い、Lys-ジンジパインの局在を検索した。

3. PGN1251 の変異が菌体外膜タンパク、LPS ならびに陰イオン性多糖(APS)の発現に及ぼす影響の検索

野生株および変異株の外膜画分を SDS-PAGE にて泳動し、発現に相違のみられたタンパ

クを質量分析により同定した。また、LPS を精製し、SDS-PAGE にて泳動後、銀染色を行った。APS の発現は野生株および変異株の外膜画分を SDS-PAGE にて泳動した後、抗 APS 抗体(MAb1B5)を用いてイムノブロットを行うことにより検討した。

4. PGN1251 変異株の超微細形態学的観察

野生株および変異株を固定後、水溶性メタクリレート樹脂にて包埋し、超薄切片を作製した。得られた切片を電子染色した後、透過型電子顕微鏡(TEM)下の観察に供した。

5. PGN1251 の変異がバイオフィーム形成に及ぼす影響の検索

1) バイオフィームの形成

野生株、変異株および相補株を嫌気的条件下にて Modified Robbins device 内で 14 日間灌流し、ハイドロキシアパタイト(HA)ディスクおよびセルタイトディスク上にバイオフィームを形成した。

2) 定量的解析、微細形態学的観察および 3 次元解析

バイオフィーム形成細菌の定量は、HA ディスクからバイオフィームを剥離分解した後、吸光度(OD₆₅₀)を測定することにより評価し、統計学的有意差の検討には Student *t*-test を用いた(p<0.001)。試料の一部は、走査型顕微鏡(SEM)による微細形態学的観察に供した。3 次元解析には、セルタイトディスク上に形成したバイオフィームを、Live/Dead (BacLight Bacterial Viability Kits)にて染色し、共焦点レーザー顕微鏡(CLSM)観察を行い、得られた画像を画像解析ソフトを用いて解析した。

6. PGN1251 タンパクの局在の検索

PGN1251 配列の直後に Myc タグの配列を挿入した株を作製し、上記 2 項に記載した方法に従って菌体を分離し、SDS-PAGE で泳動後、抗 c-Myc 抗体を用いてイムノブロットを行った。

<結果>

- PGN1251 変異株は、黒色色素産生能が欠損しており、自己凝集能が亢進していた。
- PGN1251 変異株では、赤血球凝集能およびジンジパイン活性が低下していた。この PGN1251 変異株では、高分子量のプロ型 Lys-ジンジパインがサイトプラズム/ペリプラズム画分に蓄積していた。
- PGN1251 変異株のいくつかの菌体外膜タンパクの分子量は低下していた。また、PGN1251 変異株では、LPS の 0 抗原および APS が欠損していた。
- TEM 観察により、PGN1251 変異株では、野生株と比較し菌体同士が密着している像が観察された。
- バイオフィームの定量的解析より、PGN1251 変異株の OD 値は、野生株と比較して有意に高かった。CLSM 観察においても、PGN1251 変異株のバイオフィームの厚みは野生株と比較して約 2 倍の 20 μm であった。また、SEM 観察より、PGN1251 変異株のバイオフィームでは、野生株でみられない網目状の菌体外マトリックス様構造物が観察された。
- 抗 c-Myc 抗体を用いたイムノブロットより、PGN1251 タンパクは菌体内膜に局在していた。

<考察>

PGN1251 変異株におけるジンジパイン活性の低下は、PGN1251、LPS の 0 抗原、あるいは APS の欠損によるジンジパインの活性化型への転換不全に起因する可能性が推察された。その結果として、ジンジパイン活性と相関関係にある黒色色素産生能および赤血球凝集能が低下することが示唆された。また、PGN1251 変異株では LPS の 0 抗原や APS が欠損している他、いくつかの菌体外膜タンパクの分子量が低下しており、PGN1251 変異株でみられる自己凝集能の亢進は、菌体表面層の変化に起因することが示唆された。また、PGN1251 変異株のバイオフィーム形成の亢進は、自己凝集能の亢進およびバイオフィームにおける菌体外マトリックスの構造の変化に起因すると推察された。

<結論>

P. gingivalis の内膜に存在するグリコシルトランスフェラーゼのモチーフを持つ遺伝子で

ある PGN1251 は、LPS の O 抗原や APS の発現，ならびにジンジパインの活性化に必須の遺伝子であり，さらに本菌のバイオフィーム形成に抑制的に機能することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

本論文は，辺縁性および根尖性歯周炎の病原性細菌の一種である *Porphyromonas gingivalis* のグリコシルトランスフェラーゼのモチーフを有する遺伝子 PGN1251 の病原因子発現およびバイオフィーム形成における役割について，分子生物学的手法を用いて解析を行ったものである。

その結果，PGN1251 はリポ多糖の O 抗原や陰イオン性多糖 (anionic polysaccharide) の発現およびジンジパインの活性化に必須の遺伝子であり，バイオフィームの形成過程で，初期付着や自己凝集，ならびに菌体外マトリックスの産生に関与し，バイオフィーム形成に抑制的に機能することが明らかとなった。

以上の研究成果は，*P. gingivalis* における病原因子発現およびバイオフィーム形成機構の解明の一助となるものであり，本論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。