The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Porphyromonas gingivalis バイオフィルム形成過程における遺伝子発現に関する研究
Author(s)	山本, れいこ
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59296
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

【34】

氏　　名	山　本　れいこ（やま　もと）
博士の専攻分野の名称	博　士（歯学）
学　位　記　番　号	第　２５０４２　号
学位授与年月日	平成 24 年 3 月 22 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 **バイオフィルム形成過程における遺伝子発現に関する研究**
論文審査委員	（主査） 教　授　恵比須繁之 （副査） 教　授　川端　重忠　　准教授　北村　正博　　准教授　仲野　和彦

論　文　内　容　の　要　旨

＜研究目的＞

Porphyromonas gingivalis は、辺縁性歯周炎の主要な病原性細菌の 1 種で、線毛、プロテアーゼ、莢膜ならびにリポ多糖 (Lipopolysaccharide; LPS) などの病原因子を産生する。バイオフィルムは、初期付着から成熟に至る一連の過程を経て形成され、菌体外マトリックス産生性などのバイオフィルム細菌の生物学的性質やバイオフィルムの形態は、各形成過程で異なることが報告されており、これらの性状の相違はバイオフィルム細菌中の遺伝子の発現と関連があると推察されている。

本研究では、全ゲノム配列が解読された *P. gingivalis* ATCC 33277 株を用いて、フローセル系モデルによりバイオフィルムを作製し、その遺伝子発現、構成成分量、3 次元的構造、ならびに微細形態学的構造を、各形成過程において経時的に解析した。さらに、バイオフィルム形成過程において顕著な発現の変化を認めた PGN_0088 遺伝子のバイオフィルム形成における役割を検討した。

＜材料及び方法＞

1. バイオフィルム形成過程における遺伝子発現の解析

テフロン製カラム管にハイドロキシアパタイト (HA) 顆粒を填塞し、*P. gingivalis* の培養液を 14 日間嫌気的条件下にて灌流することにより、HA 顆粒表面にバイオフィルムを作製した。バイオフィルムの形成開始より 3、6、9、ならびに 14 日後に、HA 顆粒を回収し、Total RNA を抽出した後、マイクロアレイ法を用いて遺伝子発現解析を行った。そして、遺伝子発現の Fold Change 値を、3–6 日、6–9 日、9–14 日の各時点間において算出し、その結果 1.5 倍以上の発現変化を認めた遺伝子のうち、Welch's t-test による統計処理にて各時点間で有意差 ($P < 0.001$) がみられたものを、発現変動遺伝子 (Differentially Expressed Genes: DEGs) とした。

2. バイオフィルム形成過程における各種構成成分の解析

上記 1 項と同一の方法で得られた各時点のバイオフィルム懸濁液より、タンパク質濃度および糖濃度を測定し、菌体当りのタンパク質および糖の成分量を算出した。得られた結果は Welch's t-test にて統計処理を行い、$P < 0.001$ で有意差検定を行った。

3. バイオフィルムの 3 次元的および微細形態学的観察

上記 1 項に記載した方法で各時点のバイオフィルムを採集し、共焦点レーザー (CLSM)、走査型電子 (SEM)、ならびに透過型 (TEM) 顕微鏡観察に供した。

4. PGN_0088 欠損株と相補株の作製および PGN_0088 遺伝子の *P. gingivailis* バイオフィルム形成における役割解析

バイオフィルムの菌体外マトリックス形成への関与が *Bacillus subtilis* において示されている *sinR* のオルソログである PGN_0088 遺伝子の *P. gingivalis* バイオフィルム形成における役割を解析するため、PGN_0088 配列にエリスロマイシン耐性カセットを相同組換えにより挿入して PGN_0088 欠損株を作製するとともに、接合伝達法により欠損株に PGN_0088 配列を挿入して PGN_0088 相補株を作製した。その後、野生株、欠損株、ならびに相補株のバイオフィルムを作製し、CLSM および SEM による観察、ならびに糖およびタンパク質の濃度測定を行った。

＜結果＞

1. バイオフィルム形成過程における遺伝子発現の変化

病原因子に関与する遺伝子の発現を検索した結果、線毛関連遺伝子においては、4 遺伝子の発現が 3–6 日に促進され、2 遺伝子の発現が 6–9 日に抑制されたが、9–14 日での遺伝子発現の変化は認められなかった。一方、LPS 関連遺伝子は、9–14 日で 7 遺伝子の発現が低下した。

各時点間における DEGs 数は、3–6、6–9、ならびに 9-14 日でそれぞれ、202、43、ならびに 312 遺伝子であった。

2. バイオフィルム形成過程における各種構成成分量の変化

菌体当りのタンパク質成分量は、バイオフィルム形成の全時点において有意差は認められな

かった。一方、バイオフィルム形成 14 日目の菌体当りの糖成分量は、他の時点と比べて有意に減少した ($P < 0.001$)。

3. バイオフィルム形成過程における微細形態学的変化

CLSM 観察により、バイオフィルム細菌の密度が経時的に増加していく様子が観察された。また、SEM 観察により、形成 3 日後の時点から、菌体外マトリックス様構造物に被覆された像が観察された。さらに、TEM 観察により、9–14 日 において、バイオフィルムの厚みの増加が確認された。

4. PGN_0088 遺伝子の *P. gingivalis* バイオフィルム形成における役割

SEM 観察の結果、欠損株は野生株に比べ起伏に富んだ構造をしており、CLSM 観察の結果、欠損株は網目様の糖構造を示した。また、バイオフィルム中の菌体当りの糖成分の量は、欠損株では野生株と比べて有意に増加していた。

＜考察＞

バイオフィルム形成初期において、線毛関連遺伝子の発現が上昇することにより 線毛の産生が促進され、その結果、菌の付着が亢進すると推察された。

バイオフィルム形成 9–14 日において、DEGs 数が最多となり、LPS 関連遺伝子の発現量が減少した。また、菌体当りの糖成分の量はバイオフィルム形成 14 日後において、他の時点と比べて有意に減少していたにもかかわらず、TEM 観察において 9–14 日でバイオフィルムの厚みの増加が認められた。これらのことから、9–14 日における DEGs は、菌体外マトリックスや、バイオフィルムの 3 次元的構造などに関与すると推察された。

9–14 日に顕著な発現量の減少を認めた遺伝子、PGN_0088 は、バイオフィルム中の糖成分の合成を抑制し、バイオフィルムの 3 次元的構造に関与していると推察された。

＜結論＞

本研究より、フローセル系モデルを用いて作製した *P. gingivalis* ATCC 33277 株のバイオフィルムにおいて、バイオフィルム形成 9–14 日にバイオフィルム形成量およびバイオフィルムの厚みが顕著に増加し、その時期に一致して発現変動遺伝子数が最多となることが分かった。また、上記の期間に顕著な発現量の減少を認めた遺伝子 PGN_0088 は、バイオフィルム中の糖産生に対して抑制的に機能し、バイオフィルムの 3 次元的構造に影響することが明らかとなった。

論文審査の結果の要旨

本研究は、全ゲノム配列が解読された *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 株を用いてフローセル系モデルで作製したバイオフィルムの、遺伝子発現、構成成分量、3 次元的構造、ならびに微細形態学的構造を経時的に解析するとともに、バイオフィルム形成過程において顕著な発現の変化を認めた PGN_0088 遺伝子のバイオフィルム形成における役割を検討したものである。

その結果、バイオフィルム形成 9–14 日間にバイオフィルムの形成量と厚みが顕著に増加し、その時期に一致して発現変動遺伝子数が最多となること、また、上記の期間に顕著に発現が減少した遺伝子、PGN_0088 は、バイオフィルム中の糖産生に対して抑制的に機能し、3 次元的構造に影響することを明らかにした。

以上の研究成果は、*P. gingivalis* ATCC 33277 株のバイオフィルム形成における経時的な遺伝子発現を明らかにし、機能未知であった PGN_0088 遺伝子の役割の一端を解明したものであり、本研究は博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。