



Title	Streptococcus oralisのglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenaseはPorphyromonas gingivalis線毛に対する共凝集素として機能する
Author(s)	前田, 和彦
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/880">https://hdl.handle.net/11094/880</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

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

The University of Osaka

氏 名	まえ だ かず ひこ 前 田 和 彦
博士の専攻分野の名称	博 士 (歯 学)
学 位 記 番 号	第 18987 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 16 年 8 月 5 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	<i>Streptococcus oralis</i> の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase は <i>Porphyromonas gingivalis</i> 線毛に対する共凝集素として機能する
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 雉石 聰
	(副査) 教 授 天野 敦雄 講 師 中川 一路 講 師 山田 聰

### 論 文 内 容 の 要 旨

有力な歯周病原性菌である *Porphyromonas gingivalis* がその病原性を発揮するには、まず、歯周ポケット内に定着することが必要であり、その過程において、初期プラーク形成菌などへの付着が重要な役割を果たすと考えられている。著者の研究室では、これまでに、*P. gingivalis* 381 株と *Streptococcus oralis* ATCC 9811 株が強い共凝集を示し、この共凝集には *P. gingivalis* の線毛が関与していることを報告した。しかし、*S. oralis* ATCC 9811 株の菌体表層に存在する共凝集素についての詳細は未だ不明である。本研究では、*S. oralis* ATCC 9811 株の共凝集素を同定・精製し、遺伝子をクローニングするとともに、その結合特性を調べ、さらに、この共凝集素が種々の口腔レンサ球菌の菌体表層に広く存在することを示すことにより、*P. gingivalis* の歯周ポケットへの定着機序の一端を明らかにすることを目的とした。

まず、免疫沈降法により *S. oralis* ATCC 9811 株の *P. gingivalis* 線毛に対する共凝集素は約 40 kDa の分子量をもつと推定された。*S. oralis* ATCC 9811 株の共凝集素を精製し、クローニングした結果、本共凝集素は、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus gordonii*、*Streptococcus pyogenes* や *Streptococcus equisimilis* の GAPDH とは 90% 以上の非常に高い相同意を示し、*Fusobacterium nucleatum*、*Staphylococcus aureus* や *Staphylococcus epidermidis* の GAPDH とも 70% 以上の相同意を示した。さらに、この共凝集素が GAPDH と同一のものであることを確認するために、Nelson らの方法 (2001) に準じて、pH を調整することにより *S. oralis* から分泌される GAPDH を精製した。得られた GAPDH もウェスタンプロット法で *P. gingivalis* リコンビナント線毛 (rFimA) と結合することが認められた。また、クローニングした *S. oralis* ATCC 9811 株 GAPDH の塩基配列を基にリコンビナント GAPDH (rGAPDH) を作製したところ、rGAPDH は約 40 kDa の分子量をもち、ウェスタンプロット法により rFimA と結合することが示された。以上の結果から、*P. gingivalis* に対する *S. oralis* ATCC 9811 株の共凝集素は GAPDH であることが明らかとなった。さらに、サザンハイブリダイゼーションにより GAPDH をコードする遺伝子は単一のものである可能性が高いことが示された。*S. oralis* ATCC 9811 株から精製した GAPDH または rGAPDH と *P. gingivalis* 線毛との結合を BIACore により解析した結果、高い親和性を示し、それぞれの  $K_a$  は  $4.34 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  と  $6.75 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$  と算出された。

GAPDH の塩基配列はよく保存されていることが知られており、*S. oralis* ATCC 9811 株以外の口腔レンサ球菌の GAPDH も *P. gingivalis* と結合することが推測された。口腔レンサ球菌 14 菌株の菌体表層 GAPDH 活性と共に凝集活性

性との相関を調べた結果、有意に強い相関を示した ( $r=0.854$ 、 $P<0.01$ )。高い菌体表層 GAPDH 活性と共凝集活性を示した口腔レンサ球菌 4 菌株 (*S. oralis* ATCC 10557 株、*S. gordonii* G9B 株、*Streptococcus parasanguinis* ATCC 15909 株、*Streptococcus sanguinis* ATCC 10556 株) の GAPDH を精製したところ、これら GAPDH はすべて約 40 kDa の分子量を示し、ウェスタンプロット法で rFimA との結合を示した。これらの GAPDH の塩基配列を決定したところ、*S. oralis* ATCC 9811 株の GAPDH に対して、97%以上の相同性がみられた。さらに、*S. oralis* ATCC 9811 株の rGAPDH は *P. gingivalis* 381 株と供試した口腔レンサ球菌 4 菌株との共凝集を濃度依存時に阻害し、2  $\mu$  g/ml 濃度で共凝集を完全に阻害した。

以上の結果より、*P. gingivalis* 線毛と結合する *S. oralis* ATCC 9811 株より精製した共凝集素は約 40 kDa の分子量をもつ GAPDH であることが明らかとなり、*P. gingivalis* の口腔内への新たな定着機序として、*P. gingivalis* 線毛と初期デンタルバイオフィルムを形成する種々の口腔レンサ球菌の GAPDH との結合が重要な役割を果たしている可能性が示された。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、*Porphyromonas gingivalis* 線毛と結合する *Streptococcus oralis* ATCC 9811 株の共凝集素を同定・精製し、遺伝子をクローニングするとともに、その結合特性について検討し、さらに、種々の口腔レンサ球菌の菌体表層における本共凝集素の存在を調べたものである。その結果、*S. oralis* ATCC 9811 株の共凝集素は約 40 kDa の分子量をもつ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) であることが明らかにされた。そして、供試した口腔レンサ球菌の菌体表層に *P. gingivalis* 線毛と結合する GAPDH が広く存在することが明示された。

この論文は、*P. gingivalis* の口腔内への定着機序を解明する上で重要な知見を示したものであり、博士（歯学）の学位に十分値するものと認める。