

氏名	溝 口 勝 令
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博甲第 1444 号
学位授与の日付	平成8年3月25日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	Actinobacillus actinomycetemcomitansにおける白血球毒素産生制御に関する研究
論文審査委員	教授 村山洋二 教授 福井一博 教授 滝川正春

学位論文内容の要旨

【目的】

*Actinobacillus actinomycetemcomitans*は歯周病の進行と深い関わりがあり、その病原因子としてヒト多形核白血球を特異的に傷害する白血球毒素を、産生することが知られている。*A. actinomycetemcomitans*の白血球毒素産生については、菌株間における毒素産生の多様性が指摘され、バッチ培養の結果をもとに毒素産生株、毒素非産生株、および毒素産生不定株という分類がなされてきた。しかし、*A. actinomycetemcomitans*における白血球毒素遺伝子の保存性は極めて高いことが明らかにされ、毒素産生の多様性は毒素遺伝子の発現調節の多様性に起因すると推察される。本研究は、フルクトース制限条件のケモスタット培養では、毒素産生不定株でも安定して毒素を産生するという結果(Ohta et al., Infect. Immun., 61, 4878-4884, 1993)に着目し、*A. actinomycetemcomitans*の増殖基質である糖の濃度と白血球毒素産生の関係を詳細に検討し、糖濃度による白血球毒素遺伝子の発現調節の機構を解明しようとしたものである。

【材料と方法】

1. 菌株と培養：バッチ培養では毒素産生不定株と分類される301-b株を用いた。細菌の培養には、種々の無機塩類に0.2%酵母エキスとフルクトースを加えた培地を用い、全ての増殖実験は連続培養装置の一種であるケモスタットを用いて行った。ケモスタットは、嫌気条件、pH 7.0および37℃に保持するよう設定した。

2. 白血球毒素の検出と定量：ケモスタットで定常状態に達した培養から培養液を一部採取し、遠心操作によって培養上清と菌体に分けた。培養上清は透析後、凍結乾燥を行って濃縮し、菌体はヌクレアーゼ処理して白血球毒素を抽出した。両標品ならびに菌体懸濁液は、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)と抗毒素家兎血清を用いたイムノブロットで分析した。毒素の定量は、既知濃度の精製毒素をサンプルと同じゲルでSDS-PAGEを行い銀染色後、濃度をデンシトメーターで測定して行った。

3. 化学分析：糖発酵の代謝産物はガスクロマトグラフィー、あるいは酵素法によって分析した。サイクリックAMP(cAMP)はELISA法によって定量した。

【結果】

1. フルクトース過剰条件での白血球毒素産生の抑制：培地のフルクトース濃度を10 mM以下にした培地でケモスタット培養（フルクトース制限培養）すると、301-b株は活発に毒素を産生した。また、検討した増殖速度の全範囲(0.05~0.15 h⁻¹)で毒素の産生がみられ、増殖のスピードが速いほど菌体の毒素量は増加した。しかし、培地のフルクトース濃度を30 mMに増加させて培養（フルクトース過剰培養）すると、増殖速度0.05 h⁻¹では毒素産生がみられたが、増殖速度0.10 h⁻¹以上では毒素産生が起こらなかった。

2. 糖濃度の上昇がもたらす白血球毒素産生への影響：活発な毒素産生がみられるフルクトース制限培養(増殖速度, 0.15 h⁻¹)に、過剰量(>50 mM)のフルクトースを添加すると、毒素産生は直ちに停止した。この毒素産生の停止は培養液中のフルクトースが希釈されて1 mM以下の濃度になるまで続いた。このような毒素産生の抑制はグルコースの添加でもみられたが、グルコースのアナログで代謝されないα-メチル-D-グルコシドの添加ではみられなかった。これらの結果は、発酵代謝可能な糖が高濃度になった場合に毒素産生の抑制が起こることを示している。

3. 白血球毒素の産生制御におけるcAMPの関与：301-b株の菌体内にはcAMPが検出され、その菌体内濃度はフルクトース制限培養で高く、フルクトース過剰培養では低かった。さらに、毒素産生が抑制されているフルクトース過剰培養(希釈速度, 0.15 h⁻¹)に、最終濃度が3mMになるようにcAMPを添加すると、菌体内cAMP濃度の上昇だけでなく毒素産生の開始が観察された。この毒素産生は、菌体内cAMP濃度がフルクトース過剰培養時よりも高い状態にある培養時間中続いた。以上の結果は、菌体内cAMP濃度を介して白血球毒素遺伝子の発現が調節されていることを示唆する。

【考察及び結論】

本研究は、ケモスタットを用いることによって、従来のバッチ培養法では解析できなかった毒素産生の変動性を解明しようとしたものである。*A. actinomycetem comitans*は糖発酵によってエネルギーを獲得して増殖する細菌であり、実際の口腔内でも糖の種類や濃度によって増殖や活動が大きく影響を受けると推察される。本研究で得られた結果から、大腸菌で見られる「カタボライト抑制」に類似した遺伝子発現調節機構が*A. actinomycetem comitans*の白血球毒素遺伝子においても機能していることが示唆された。すなわち、菌体内cAMP濃度が高い場合、cAMPとcAMP受容タンパク質(CRP)の複合体(cAMP-CRP)の形成量が増加し、cAMP-CRPが白血球毒素遺伝子オペロンのプロモーター領域に結合する確率が高くなる。そして、cAMP-CRPのプロモーター領域への結合はRNAポリメラーゼによる転写を促進させる。おそらく、菌体内cAMP濃度の上昇はアデニレートシクラーゼの活性化によって起こり、アデニレートシクラーゼは糖制限の条件で活性化されると思われる。

*A. actinomycetem comitans*の白血球毒素産生が糖濃度のような環境因子で調節されることが、本研究によって初めて明らかにされた。このことは、病原因子の産生が環境因子に依存することを示すものであり、実際の歯周局所の細菌の病原性を理解する上で重要な結果と考える。

論文審査結果の要旨

本論文は、歯周病原性細菌である *Actinobacillus actinomycesetemcomitans* の白血球毒素遺伝子の発現調節の機構を環境因子との関わりにおいて、解明しようとするものである。とりわけ、環境因子の糖基質に着目し、糖基質が白血球毒素産生に与える影響を、ケモスタット培養装置を用いて検討し、白血球毒素遺伝子発現調節のメカニズムを明らかにした。研究結果の要旨は次の通りである。

1) 糖過剰条件でケモスタット培養を行うと、*A. actinomycetemcomitans* の白血球毒素産生は抑制される。2) 菌体内cAMPレベルは糖制限下でケモスタット培養を行ったときより、糖過剰下でケモスタット培養を行ったときの方が低い。3) 白血球毒素産生を抑制した糖過剰のケモスタット培養系にcAMPを加えると白血球毒素産生を亢進させるようになる。

研究の動機、目的、および方法の記載は明解であり、結果には *A. actinomycetemcomitans* の白血球毒素産生制御に関する多数の知見が含まれている。とりわけ、白血球毒素産生が環境因子によって調節されているという新知見は歯周病の病態を考察する上で極めて重要であり、価値がある。

よって、本申請論文を学位論文として認める。