

氏名	前 田 武 将
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与の番号	博 甲 第 号
学位授与の日付	平 成 1 6 年 3 月 2 5 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	ラフ型のコロニー形態をとる <i>Actinobacillus actinomyetemcomitans</i> に特異的に発現している遺伝子の同定
論文審査委員	教授 渡邊 達夫 教授 福井 一博 教授 高柴 正悟

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

病原微生物は、宿主内での環境ストレスや免疫応答による攻撃に反応して、一連のタンパク質を発現するようになる。これらの分子には、毒素や抗原性が高いタンパク質など、菌の病原性と深く関連するものが多い。歯周病細菌である *Actinobacillus actinomyetemcomitans* (Aa) の感染においても、宿主内で発現が増強される病原因子が重要な役割を果たしていると思われる。ロイコトキシンや線毛などは代表的な病原因子であるが、他にも多くの因子が本菌の感染に関与していると推測される。Aa の病原性や歯周病の病態解明のために、これら因子の同定は重要な課題である。

Aa は、口腔内からの分離直後には線毛を形成して試験管に付着する増殖様式をとるが、継代培養によってその形態を変化させ、線毛を形成しない浮遊状態での増殖様式をとるようになる。これは、口腔内（生体内）から *in vitro* での培養への環境変化に対して、発現する分子の構成を Aa が大きく変化させた結果と捉えることができる。本研究では、二つの異なった増殖様式をとる Aa の cDNA サブトラクション (CSH) を行うことによって、生体内で発現量が増加して Aa の感染や病原性に関与する分子の同定を試みた。

【材料および方法】

1. 供試菌株：Aa 304 株のうち、線毛発現能を維持している 304-a 株を CSH のテスターとして、また、継代培養によって線毛を発現しなくなった 304-b 株をドライバーとして供試した。培養には、tryptic soy broth (0.4% NaHCO₃ 含有) を用い、嫌気条件下 37°C の条件で培養した。
2. CSH：CSH は、PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit (Clontech) を用いて行った。cDNA 合成にはランダムプライマーを用い、他の操作は添付の説明書に従って行った。
3. 304a 株に特異的に発現する遺伝子のスクリーニング：サブトラクション後の cDNA は pCR2.1 plasmid vector に組み込み、cDNA ライブラリーを構築した。特異的に発現する遺伝子のスクリーニングはライブラリーからランダムに選択してクローン化したプラスミド (105 個) と α-³²P 標識した 304-a ならびに 304-b 株の全 cDNA プロンプを用いたリバースノーザン法で行った。スクリーニングで選択された遺伝子の 304-a と 304-b 株間での発現量の比較は、ノーザンプロット法によって調べた。そして、304-a 株で発現量が増加しているものを、304-a 株に特異的に発現する遺伝子として同定した。
4. 塩基配列の決定および既知遺伝子との相同性の解析：クローニングした遺伝子断片の塩基配列は、Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit と 377A DNA Sequencer (ABI) を用いて決定した。相同性分子の検索は、決定した塩基配列を基に遺伝子断片の構造を GENETYX software (GENETYX Corp.) で解析し、想定される open reading frame の塩基配列とアミノ酸配列を GenBank および NCBI Genomes Database に登録されているデータと照合することによって行った。

5. 組み換えタンパク質の精製と患者血清との反応：データベース検索の結果から、同定した遺伝子の中から病原因子としての役割が疑われる一つの分子に着目した。この分子が歯周炎局所で発現しているかどうかを調べるため、組み換えタンパク質を作成して歯周病患者血清との反応をウエスタンブロット法によって調べた。組み換えタンパク質は、同定した遺伝子断片を pET101 (Invitrogen) に挿入後、大腸菌 XL1-Blue を形質転換することで発現させ、Ni-NTA カラムを用いて精製した。歯周病患者血清は、Aa に対して高い血清抗体価を示す 8 人から分離した。
6. 変異株の構築と機能解析：着目した分子の欠損株を作成し、この分子の役割を調べた。変異株の作成は Suzuki らの方法 (Biochim Biophys Acta, 2000) に準じて行なった。すなわち、標的となる遺伝子断片の open reading frame 中に spectinomycin 耐性遺伝子を挿入し、Gene Pulser® (BIO RAD) を用いてこの遺伝子断片を Aa に導入した。相同性組み換えによって作成された変異株は spectinomycin 培地でスクリーニングし、サザンハイブリダイゼーション法によって染色体遺伝子上の変異を確認した。野生株と、変異株の上皮細胞内侵入性の違いを Fives-Taylor らの方法 (Infect Immun, 1994) に準じて調べ、この分子の宿主細胞付着と進入における役割を調べた。

【結果】

1. 304-a 株に特異的に発現する遺伝子の同定

CSH 後のリバースノーザン法によって 304-a 株の全 cDNA プローブにハイブリダイズし、かつ、304-b 株の全 cDNA プローブにはハイブリダイズしない遺伝子断片を含む 23 個のクローンを得た。この 23 種の遺伝子断片の塩基配列を解析し、重複する遺伝子は除外してノーザンブロット法によって株間での発現量の違いを調べた。その結果、3 種の遺伝子の発現が 304-a 株で増大していることが確認できた。リバースノーザン法の結果と異なり、残りの遺伝子の発現量には両株間での差を見出せなかった。

2. クローンの塩基配列の解析と相同性の検索

304-a 株に特異的に発現する遺伝子として同定した 3 クローンのうちの一つは、*Legionella* の宿主細胞への付着・侵入に深く関わっていると考えられる Macrophage infectivity potentiator (MIP) とアミノ酸配列で 32.2 % の相同性をした。他の 2 クローンについては、outer membrane protein と peroxiredoxin と高い相同性を示す分子であった。

3. MIP 様組み換えタンパク質の精製と患者血清との反応

mip 様遺伝子を大腸菌に導入して 32kDa の組み換えタンパク質を発現させ、これを精製した。歯周病患者血清と組み換えタンパク質の反応を調べた結果、8 人中 6 人の患者血清が反応を示した。

5. 変異株の上皮細胞侵入試験

mip 様遺伝子の欠損変異株を作成し、上皮細胞への侵入能を評価した。野生株に比べ、変異株の上皮細胞侵入数は約 4 分の 1 に減少していた。また、野生株と変異株の増殖能を調べた結果、両者の間に差はなかった。

【考察および結論】

サブトラクティブハイブリダイゼーションによって、生体内で Aa が発現量を増加させている可能性が高い 3 種の遺伝子をクローニングした。Aa は *Legionella* の *mip* に相同性のある *mip* 様遺伝子を上皮細胞への侵入時に発現し、歯周炎局所での組織への付着や進入を行っている可能性が示唆された。

論文審査結果の要旨

病原微生物は宿主内での環境ストレスや免疫応答による攻撃に反応して一連のタンパク質を発現するようになる。これらの分子は、毒素や細菌の抗原性と深く関連するものが多い。歯周病原性細菌である *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (Aa) においても、宿主内で発現が増強される病原因子が歯周病の病態に大きく影響している可能性が高い。ロイコトキシンや線毛などは代表的な病原因子であるが、Aa の病原性や歯周病の病態解明のためにこれらの発現因子を同定することは重要な課題である。

Aa は口腔内からの分離直後には線毛を形成し、試験管に付着する増殖形態をとるが、継代培養によりその形態を変化させ、線毛を形成しない浮遊状態での増殖形態をとるようになる。これは、口腔内（生体内）から培養への環境変化に Aa が反応し、発現する分子の構成を大きく変化させた結果と捉えることができる。本研究は、この二つの異なった増殖形態をとる Aa の cDNA サブトラクション (CSH) を行うことによって、Aa の感染や病原性に関与する分子の同定を試みたものである。

申請論文は次の内容を示すものであった。 1) 線毛形成能を持つ Aa 304-a 株で特異的に mRNA 蓄積量が増加している 3 遺伝子を CSH によって同定できた。 2) その 3 遺伝子の 1 つである *mip* 様遺伝子は各菌株に存在し、その mRNA が発現していることを確認した。 3) *mip* 様遺伝子から作製したりコンビナント蛋白は、歯周病患者血清と反応し、抗原性があることを確認した。 4) *mip* 様遺伝子を変異させることによって、野生株に比べ変異株の上皮細胞への進入数が約 1/4 に減少した。

これらの結果は、*mip* 遺伝子が Aa の宿主上皮細胞への侵入機構の一端を担うことを示唆するものである。

本申請論文は学位論文として価値があると認めた。