

氏名	田口 裕子		
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5121号		
学位授与の日付	平成27年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合学研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	<i>Porphyromons gingivalis</i> における菌体外のジンジパインの酵素活性に関わる新規遺伝子について		
論文審査委員	仲野 道代 教授	久保田 聡 教授	大原 直也 教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* はグラム陰性嫌気性球桿菌であり、プロテアーゼであるジンジパインは本菌の代表的な病原因子である。*P. gingivalis* のジンジパインには、リジンジンジパイン (Kgp) とアルギニンジンジパイン (RgpA と RgpB) が存在する。いずれも C 末端に C-terminal domain (CTD) をもち、Type IX (T9SS) 分泌系を介して外膜表面、すなわち菌体表層に分泌される。

ところで、大腸菌をはじめとする複数のグラム陰性細菌では、外膜蛋白質が内膜から外膜へ輸送される際に、SurA, DegP (HtrA), Skp (OmpH) を始めとするシャペロンの助けを必要とする。Pg も SurA, HtrA, OmpH を有する。しかし、HtrA の機能に関する報告はあるが、SurA と OmpH に関する報告はない。

本研究では、*P. gingivalis* に存在する OmpH ホモログ PGN_0300 が、CTD 蛋白質の成熟と修飾に関与している可能性を考え、研究を行った。

【材料・方法】

1. PGN_0300 欠損株と PGN_0300 相補株の作製

PGN_0300 の欠損株およびその相補株の作製は、*P. gingivalis* ATCC33277 株を親株とし、相同性組換え法により行った。

2. 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

親株、欠損株、相補株から抽出した全 RNA をもとに作製した cDNA を鋳型として PCR 法を行い、PGN_0299, PGN_0300, および PGN_0301 の遺伝子発現を調べた。

3. ジンジパインの活性の測定

菌体と上清中における Kgp と Rgp の活性の測定は Sato らの方法に準じて行った。それぞれに特異的な蛍光基質である Z-Phe-Arg-MCA と Z-His-Glu-Lys-MCA を使用し、測定波長 460 nm (励起波長 380 nm) の数値を測定した。

4. 抗体

A-LPS を認識するマウスモノクローナル抗体 1B5, 抗 Kgp ウサギポリクローナル抗体, および抗 Rgp マウスポリクローナル抗体を使用した。抗 PGN_0300 蛋白質ポリクローナル抗体は, PGN_0300 蛋白質の部分ペプチドを作製し, モルモットに免疫することで得た。

5. ウェスタンブロット法

サンプルを SDS-PAGE 法にて分画し, 各蛋白質に対する特異抗体を用いて検出した。

【結果】

1. PGN_0300 蛋白質の局在

ウェスタンブロット法により PGN_0300 蛋白質の局在を調べたところ, 外膜画分に約 17 kDa の蛋白質が検出された。

2. PGN_0300 欠損株の作製

相同性組換えにより作製した欠損株と相補株の遺伝子発現を RT-PCR 法で調べたところ, 後者では PGN_0300 は発現していたが, 前者では検出できなかった。PGN_0299 と PGN_0301 は両株で発現していた。このことより相補株と欠損株は正しく構築されていることが確認された。欠損株は, 血液寒天培地上で白色コロニーを形成した。また相補株は親株と同様に黒色コロニーを形成した。

3. ジンジパインの活性

欠損株の Kgp と Rgp の活性は親株と比較し, 菌体と培養上清のいずれにおいても顕著に低下していた。また相補株の Kgp と Rgp の活性は部分的に回復していた。

4. 菌体および培養上清における Kgp と Rgp の存在様式

親株と欠損株を比較したところ, Rgp の蛋白質量は両者に顕著な差はなかったが, Kgp の蛋白質量は欠損株で減少していた。また, 欠損株では培養上清中に Kgp と Rgp の成熟型蛋白質はほとんど検出されず, 未成熟型が蓄積していた。

5. 菌体内における Kgp と Rgp の局在

親株では, 成熟型 Kgp が外膜画分に検出されるのに対し, 欠損株では外膜画分には検出されず, 細胞質・ペリプラズム画分に未成熟型が蓄積していた。また, 親株では成熟型 RgpB と糖鎖修飾された成熟型 RgpA が外膜画分に検出されたのに対し, 欠損株ではそれらの成熟型は外膜画分には検出されず, 細胞質・ペリプラズム画分に未成熟型が検出された。

6. A-LPS の検出

親株と相補株では 1B5 抗体で検出されるスメアなバンドは高分子側に存在していたのに対し, 欠損株では低分子側にとどまっていた。

【考察】

PGN_0300 欠損株が, 血液寒天培地上で白色コロニーを形成し, Kgp と Rgp の活性が低下していたことから, PGN_0300 蛋白質はジンジパインの活性に関与していることが強く示唆された。欠損株では成熟型の Kgp と Rgp が, 菌体表層に検出されず, 未成熟型の蛋白質として細胞質あるいはペリプラズムに蓄積されるとともに菌体外に放出されていた。この理由として, CTD が切断されていないか, 合成された A-LPS の輸送が行われていないことが推測された。

PGN_0300 は外膜蛋白質として、T9SS から分泌された Kgp と Rgp を正しくフォールディングし、それらの形状を正常に保つこと、CTD を切断する PorU の機能を正常に保つこと、あるいは A-LPS の輸送と修飾に関わる装置の働きを助けていることが考えられる。今後は、PGN_0300 がシャペロンとして機能をしている可能性を含め、PGN_0300 がどのようなメカニズムで、ジンジパインの分泌およびプロセッシングに関与しているかを明らかにしていく必要がある。

【結論】

P. gingivalis の OmpH 様蛋白質 PGN_0300 蛋白質は、ジンジパインの分泌、プロセッシング、あるいは糖鎖修飾に関与することが示唆された。

論文審査結果の要旨

*Porphyromonas gingivalis*は、代表的な歯周病原細菌であり、プロテアーゼであるジンジパインは本菌の代表的な病原因子である。*P. gingivalis*のジンジパインにはリジンジンジパイン (Kgp) とアルギニンジンジパイン (RgpAとRgpB) が存在しており、いずれもC末端にC-terminal domain (CTD) をもち、CTD蛋白質 (CTD-containing protein) として分類される。CTD蛋白質はType IX 分泌系 (T9SS) を介して菌体表層に分泌された後、CTDが切断されるとともに陰イオンに荷電したりポ多糖であるanionic-LPS (A-LPS) の修飾を受け、外膜にアンカーされる。

大腸菌をはじめとする複数のグラム陰性細菌では、外膜蛋白質が内膜から外膜へ輸送される際に、SurA, DegP (HtrA), Skp (OmpH) を始めとするシャペロンの助けを必要とし、*P. gingivalis* もSurA, HtrA, OmpHを有する。しかし、HtrAの機能に関する報告はあるが、SurAとOmpHに関する報告はない。

本研究では、*P. gingivalis*に存在するOmpHホモログPGN_0300蛋白質 (Omp17) が、ジンジパインの成熟と修飾に関与している可能性を考え、研究を行った。

P. gingivalis ATCC33277株を親株としてPGN_0300遺伝子 (*omp17*) 欠損株 (以下欠損株) およびその相補株 (以下相補株) を作製し、それを実験に用いることで以下の結果が得られた。

1. ウエスタンブロット法 (WB法) によりPGN_0300蛋白質の局在を調べたところ、外膜画分に抗PGN_0300蛋白質抗体と強く反応する単一のバンドが検出された。
2. PGN_0300欠損株は血液寒天培地上に白色コロニーを形成した。
3. 欠損株のKgpおよびRgp活性は、菌体と培養上清のいずれにおいても親株および相補株と比較して顕著に低下した。
4. 菌体および培養上清におけるKgpとRgpの存在様式について比較したところ、いずれも成熟型蛋白質が欠損株において減少していた。
5. 菌体内におけるKgpとRgpの局在を検討したところ、親株と相補株ではいずれも成熟型蛋白質が外膜画分に検出されるのに対し、欠損株では外膜画分に検出されず、未成熟型が細胞質・ペリプラズム画分に検出された。
6. WB法により菌体抽出物に対して抗A-LPS抗体を反応させたところ、欠損株では親株に比べ低分子側に、スメア状のシグナルが検出された。

以上のことから、PGN_0300蛋白質 (Omp17) はCTD蛋白質であるジンジパインの成熟、修飾と輸送に関与し、ジンジパインが活性型として機能することに貢献していることが示された。

本論文は歯周病原細菌の代表的な病原因子に関与する新規の遺伝子について明らかにしたものであり、歯周病の病態を考える上で大変意義のあるものと評価できる。

よって、審査委員会は本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。
