

## 学 位 論 文 題 名

*Porphyromonas gingivalis* 主要外膜蛋白質(75-kDa 蛋白質)の  
分子遺伝学のおよび免疫学的解析

## 学位論文内容の要旨

歯周炎の発症・進行には、グラム陰性嫌気性桿菌が深く関与しているとの報告が多数あり、中でも *Porphyromonas gingivalis* は罹患率の最も高い成人性歯周炎や急速進行性歯周炎と関係が深いと報告され、特に注目されてきている。歯周炎を感染症という側面からとらえ、感染の第一段階である宿主への付着および宿主-寄生体間の相互作用の重要性を考慮すると、*P. gingivalis* の菌体表層構造物の性質を解明することは、きわめて重要と考えられる。著者は、*P. gingivalis* 381株の線毛の精製を行っている過程で、時として混入してきた表層成分である75-kDa蛋白質に注目し、この蛋白質を精製し、この蛋白質の性質について研究を行ってきた。これまでの研究結果から、75-kDa蛋白質は、1. *P. gingivalis* の主要外膜蛋白質の一つであり、2. 常温において、SDS存在下でも分子量約200万の複合体を形成し、3. SDSと還元剤の存在下のもとで80℃以上で加熱処理をすると、SDS-PAGEにおいて、約75 kDaに観察された。

そこで、本研究は、*P. gingivalis* の表層成分である75-kDa蛋白質の分子遺伝学のおよび免疫学的な特徴をより明確にする目的で、まず、75-kDa蛋白質の構造遺伝子の同定とクローン化を行って形質発現を試み、次に各種細菌に対する75-kDa蛋白質構造遺伝子の遺伝子相同性を分析した。さらに、75-kDa蛋白質の免疫学的な種特異性を分析するとともに、*P. gingivalis* の抗原性成分の検索を成人性歯周炎患者と急速進行性歯周炎患者の血清を用いたイムノブロット法により試み、75-kDa蛋白質に対する体液性免疫応答を検討した。

## 【材料と方法】

## I. 分子遺伝学的解析

1. 75-kDa蛋白質の構造遺伝子のクローニング： 供試菌として *P. gingivalis* 381株を用いた。まず、(1) 本蛋白質のN末端アミノ酸配列を分析し、その配列より2種類の20量体混合オリゴヌクレオチドプローブを合成した。(2) 381株の染色体DNAと合成プローブを用いたサザンブロット法により、クローン化に適した制限酵素を分析した。(3) pUC19をベクター、*E. coli* JM83株を宿主菌に用い、381株の遺伝子バンクを作製した。(4) 合成プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーション法により、作製した遺伝子バンクをスクリーニングした。
2. 形質発現： (1) クローン化した遺伝子断片をファージT7 RNAポリメラーゼ／プロモーターシステムに組換え直した。(2) 得られたリコンビナントとpUC19をベクターとしたリコンビナントの両者について、形質発現の有無を検討した。
3. 遺伝子相同性の分析： *P. gingivalis* 10株および *P. gingivalis* 以外の細菌14種15株を供試菌とした。本蛋白質遺伝子断片 (1.7 kb *Pst* I 断片) をDNAプローブとして用いたサザンブロット法により、供試菌より抽出した染色体DNAに対して、75-kDa蛋白質遺伝子との相同性を検討した。

## II. 免疫学的解析

1. 上記供試菌と同様の菌株から全菌体抽出液を調製し、抗75-kDa蛋白質モノクローナル抗体を用いたイムノブロット法により、75-kDa蛋白質の免疫学的な種特異性を検討した。
2. 75-kDa蛋白質に対する体液性免疫応答の分析： 被験者として北大歯学部附属病院に来院した成人性歯周炎患者群 (AP群) 32名、急速進行性歯周炎患者群 (RPP群) 16名、歯肉炎患者群 (G群) 14名、および健常者群 (H群) 19名を選んだ。抗原には、(1) 精製75-kDa蛋白質抗原 (75K), (2) 精製線毛抗原 (FIM), (3) 全菌体抽出抗原の可溶性分画 (SUP) と膜分画 (ENV) を用いた。上記の被験者血清と抗原とを用いたイムノブロット法により、抗原性を示す菌体構築成分とそれに対する特異抗体の検索を行った。

### 【結果および考察】

#### 1. 合成プローブを用いた *P. gingivalis* 381株染色体DNAの分析

ベクターとして用いた pUC19 のマルチクローニングサイトに対応する各制限酵素で、*P. gingivalis* 381株染色体DNAを消化し、合成プローブを用いたサザンブロット法を行った結果、*Bam*H I 消化物に約4.2 kb、*Pst* I 消化物に約1.7 kb の合成プローブと反応したバンドが検出された。

## 2. コロニーハイブリダイゼーション法によるスクリーニング

今回作製した約5,000個の遺伝子バンク (*Bam*HI, *Pst*I) の中から、4.2 kbの*Bam*HI断片を組換えたりコンビナントを、1つ得ることに成功した。このリコンビナントを pUC19BG75 と名付けた。

## 3. pUC19BG75 の分析

1.7 kbの*Pst*I断片は、クローン化できたこの4.2 kbの*Bam*HI断片の中に含まれることが判明した。また、*Bam*HI断片中に75-kDa蛋白質構造遺伝子の大部分が含まれることが明らかになった。

## 4. 形質発現

pUC19プラスミドベクターのリコンビナントは、インサートの方向、および誘導の有無にかかわらず、形質発現を確認することはできなかった。

これに対し、ファージT7のプロモーターに特異的に働いて、強力にメッセンジャーRNA合成を行うことのできるファージT7 RNAポリメラーゼ／プロモーターシステムに組換え直し、形質発現を検討したところ、T7プロモーターに対して、両方向にDNA断片が挿入された2種類のリコンビナントのうち、片方にのみ、約77 kDaの蛋白質の発現を確認できた。この結果から、発現がT7プロモーターに依存していることとクローン化した構造遺伝子の転写方向が明らかになった。また、pUC系プラスミドでは形質発現せず、ファージT7 RNAポリメラーゼ／プロモーターシステムにおいて蛋白質の産生が確認されたことにより、*E. coli* 内では *P. gingivalis* のプロモーターを宿主のRNAポリメラーゼが認識できず、その結果、インサートDNA断片を効果的に転写できないことが示唆された。

## 5. 75-kDa蛋白質の遺伝子相同性と免疫学的な種特異性

サザンブロット法を用いて、*P. gingivalis* 10株および *P. gingivalis* 以外の細菌14種15株のDNAについて、75-kDa蛋白質遺伝子との相同性を検討した。その結果、全ての *P. gingivalis* 菌株にポジティブなバンドが検出されたが、*P. gingivalis* 以外の細菌には、DNAプローブにハイブリダイズしたバンドが認められるものは存在しなかった。同様の菌株の全菌体抽出液に対する、抗75-kDa蛋白質モノクローナル抗体を用いたイムノブロット分析の結果、*P. gingivalis* の5株に、75 kDaに位置する明瞭なバンドを検出できたが、*P. gingivalis* 以外の菌株では反応が認められなかった。これらのことから、75-kDa蛋白質は、381株のみならず、*P. gingivalis* という菌種に広く存在するとともに、分子遺伝学および免疫学的に種特異的であることが確認された。

## 6. 75-kDa蛋白質に対する体液性免疫応答の分析

SUP、ENVを用いたイムノブロット法の結果、歯周炎患者血清によって30～100 kDaにかけて種々のバンドが検出できた。これら反応した様々な分子量の成分のうち、75 kDaに最も頻繁に、かつ強い反応が観察された。75Kを抗原とした結果でも、同様に反応が認められることから、上記の反応バンドは75-kDa蛋白質に対する特異抗体によるものであることが判明した。これは、宿主が *P. gingivalis* の菌体表層構造物である75-kDa蛋白質を強く認識し、体液性免疫応答を行った結果であり、75-kDa蛋白質がきわめて抗原性の強い immunodominant な蛋白質であることが明らかとなった。

75-kDa蛋白質に対する血清IgG抗体を調べた結果、特異抗体が検出された被験者は、AP群32名中21名で65.6%、RPP群16名中16名で100%であった。これに対して、G群とH群からは、75-kDa蛋白質に対する特異抗体は検出されなかった。既に述べたように、75-kDa蛋白質が *P. gingivalis* に特異的な主要外膜蛋白質であることを考慮すると、これらの結果は、*P. gingivalis* が高度な辺縁性歯周炎、特に急速進行性歯周炎に強く関与していることを示すものと考えられる。

### 【結論】

以上の結果より、*P. gingivalis* 75-kDa蛋白質遺伝子断片は特異性の高いDNAプローブとして、また、75-kDa蛋白質は種特異的で immunodominant な菌体表層抗原として有用であることが示唆された。

今後、さらに研究を進め、遺伝子の塩基配列を決定し、75-kDa蛋白質の構造と機能を解明していきたいと思う。また、今回クローン化した遺伝子断片を種特異性の高いDNAプローブとして用い、歯周ポケット内の *P. gingivalis* を検出・定量するとともに、75-kDa蛋白質に対する全身系および歯周組織局所の体液性免疫応答を分析し、歯周炎における *P. gingivalis* の役割をより明確にしていきたいと考えている。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 熙  
副 査 教 授 渡 邊 継 男  
副 査 教 授 松 本 章

## 学 位 論 文 題 名

### *Porphyromonas gingivalis* 主要外膜蛋白質(75-kDa 蛋白質)の 分子遺伝学のおよび免疫学的解析

審査は、主査および副査全員の出席のもとで、申請者に対して口頭試問により提出論文の内容と関連分野について行われた。

歯周炎の発症・進行には、グラム陰性嫌気性桿菌が深く関与しているとの報告が多数あり、中でも *Porphyromonas gingivalis* は罹患率の最も高い成人性歯周炎や急速進行性歯周炎と関係が深いと報告され、特に注目されてきている。また、歯周炎を感染症という側面からとらえ、感染の第一段階である宿主への付着および宿主-寄生体間の相互作用の重要性を考慮すると、*P. gingivalis* の菌体表層構造物の性質を解明することは、きわめて重要と考えられる。

そこで、本研究は、*P. gingivalis* 381株の主要外膜蛋白質である75-kDa蛋白質の分子遺伝学のおよび免疫学的な特徴をより明確にする目的で、まず、75-kDa蛋白質の構造遺伝子の同定とクローン化を行って形質発現を試み、次に各種細菌に対する75-kDa蛋白質遺伝子の相同性を分析した。さらに、75-kDa蛋白質の免疫学的な種特異性を分析するとともに、*P. gingivalis* の抗原性成分の検索を成人性歯周炎患者と急速進行性歯周炎患者の血清を用いたイムノブロット法により試み、75-kDa蛋白質に対する体液性免疫応答を検討した。

#### I. 分子遺伝学的解析

1. 75-kDa蛋白質の構造遺伝子のクローニング： 供試菌として *P. ging-*

- ivalis* 381株を用いた。まず、(1) 本蛋白質のN末端アミノ酸配列を分析し、その配列より2種類の20量体混合オリゴヌクレオチドプローブを合成した。(2) pUC19をベクター、*E. coli* JM83株を宿主菌に用い、381株の遺伝子バンクを作製した。(3) 合成プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーション法により、作製した遺伝子バンクをスクリーニングした。
2. 形質発現：(1) クローン化した遺伝子断片をファージT7 RNAポリメラーゼ／プロモーターシステムに組換え直した。(2) 得られたリコンビナントとpUC19をベクターとしたリコンビナントの両者について、形質発現の有無を検討した。
3. 遺伝子相同性の分析： *P. gingivalis* 10株および *P. gingivalis* 以外の細菌14種15株を供試菌とした。本蛋白質遺伝子断片 (1.7 kb *Pst* I断片) をDNAプローブとして用いたサザンブロット法により、供試菌より抽出した染色体DNAに対して、75-kDa蛋白質遺伝子との相同性を検討した。

## II. 免疫学的解析

1. 上記供試菌と同様の菌株から全菌体抽出液を調製し、抗75-kDa蛋白質モノクローナル抗体を用いたイムノブロット法により、75-kDa蛋白質の免疫学的な種特異性を検討した。
2. 75-kDa蛋白質に対する体液性免疫応答の分析： 被験者として北大歯学部附属病院に来院した成人性歯周炎患者群 (AP群) 32名、急速進行性歯周炎患者群 (RPP群) 16名、歯肉炎患者群 (G群) 14名、および健常者群 (H群) 19名を選んだ。抗原には、(1) 精製75-kDa蛋白質抗原 (75K), (2) 精製線毛抗原 (FIM), (3) 全菌体抽出抗原の可溶性分画 (SUP) と膜分画 (ENV) を用いた。上記の被験者血清と抗原とを用いたイムノブロット法により、抗原性を示す菌体構築成分とそれに対する特異抗体の検索を行った。

その結果、1. クローン化した遺伝子断片 (4.2 kb *Bam*HI断片) 中に75-kDa蛋白質構造遺伝子の大部分が含まれることが判明した。 2. pUC系プラスミドでは形質発現せず、ファージT7 RNAポリメラーゼ／プロモーターシステムにおいて蛋白質の産生が確認されたことにより、宿主 *E. coli* のRNAポリメラーゼは *P. gingivalis* のプロモーターを効果的に認識できないことが示唆された。3. 検討した *P. gingiva*-

lis 菌株のすべてに本蛋白質の遺伝子が存在したが、*P. gingivalis* 以外の細菌では、DNAプローブにハイブリダイズしたバンドが認められたものは存在しなかった。4. 本蛋白質は、他菌種と免疫学的に交叉反応しない *P. gingivalis* に特異的な表層成分であることが判明した。5. SUP、ENVを用いたイムノブロット法の結果、歯周炎患者血清によって多数のバンドが検出できたが、75 kDaに最も高頻度に、かつ強い反応が観察された。6. AP群の65.6%・RPP群全員の血清中から、本蛋白質に対する特異抗体が検出された。7. G群やH群の血清からは、本蛋白質に対する特異抗体は検出されなかった。

以上より、*P. gingivalis* 75-kDa蛋白質遺伝子断片は特異性の高いDNAプローブとして、また、75-kDa蛋白質は種特異的で immunodominantな菌体表層抗原として有用であることが示唆された。

以上の研究内容について、主査および副査全員で審査した結果、*P. gingivalis* の主要外膜蛋白質である75-kDa蛋白質の遺伝子をクローン化し、形質発現に成功したこと、75-kDa蛋白質遺伝子が *P. gingivalis* という菌種に特有であることを示したこと、75-kDa蛋白質が免疫学的に種特異的であることを明確にしたこと、75-kDa蛋白質に対する特異抗体が歯周炎患者、特に急速進行性歯周炎患者の血清中から高頻度に検出され、75-kDa蛋白質が immunodominant な菌体表層蛋白質であることを明確に示したことはいずれも高く評価できた。さらに、今回クローン化した遺伝子断片を種特異性の高いDNAプローブとして用い、歯周ポケット内の *P. gingivalis* を検出・定量するとともに、75-kDa蛋白質に対する全身および歯周組織局所の体液性免疫応答を分析することにより、歯周炎における *P. gingivalis* の役割をより明確にし、歯周病の診断、治療効果の判定、メンテナンス期における病態の把握などの臨床応用が可能なことも高く評価でき、本研究は歯学博士の学位を授与されるに値するものと認めた。