

学位論文題名

*Porphyromonas gingivalis* 線毛蛋白質

(63kDa 蛋白質) の分子生物学的解析

学位論文内容の要旨

[目的] *Porphyromonas gingivalis* は、成人歯周病患者の歯周ポケットから高い頻度で分離されるグラム陰性・黒色色素産生性の嫌気性桿菌で、歯周病の主要な原因菌の一つと考えられている。大多数の *P. gingivalis* の菌株は特有の線毛を持っており多数の歯周病患者の血清中に *P. gingivalis* 線毛に対する抗体が存在することが報告されている。fimbriin は *P. gingivalis* の線毛のサブユニット蛋白質で、337 のアミノ酸からなる分子量35,924Daの蛋白質である。 *P. gingivalis* のほとんどすべての菌株がこのfimbriin をコードした遺伝子 *fimA* を持っている。この遺伝子 *fimA* を含むDNA断片がクローニングされ、発現した蛋白質が分離精製されて、免疫学的研究がなされているが、*fimA* を保有する短いDNA断片 (2.5 kb *SacI* - *SacI* fragment) をもつクローンから発現される蛋白質は、抗線毛血清との交差免疫反応性が低く、精製されたfimbriin と *P. gingivalis* 381株自体の線毛とは免疫学的性質が大きく異なることが判明している。線毛のサブユニット蛋白質が生成されて完全な線毛を形成するためには、いくつかの補助蛋白質が必要であり、一般的にはサブユニットと補助蛋白質をコードしている遺伝子はDNA上で近くに位置しているはずである。また、 *P. gingivalis* の線毛が別の重要な微小構成要素を持つ可能性があり、*fimA* の上流、下流にどのような遺伝子が存在しているかを調べる必要もあることから、 *P. gingivalis* 線毛のDNAの中からほぼ中央に *fimA* 遺伝子を持つ約10.4kbの染色体DNA (10.4kb *PstI* - *PstI* fragment) がバクテリオファージT7RNAポリメラーゼプロモーターシステムにクローニングされ、*fimA* の上流からは63kDa、下流からは50kDa, 80kDaの蛋白質の発現が確認された。本研究では、遺伝子 *fimA* の上流にある *HindIII* サイトから下流の *PstI* サイトまでをシーケンスして、DNA塩基配列並びにこの範囲にコードされている

63KDa 蛋白質のアミノ酸配列を決定し、他の細菌の遺伝子と本蛋白質遺伝子とのホモロジーを分析するとともに、本蛋白質の構造的、機能的特性を検討した。

〔材料・方法〕 本研究で使用したrecombinant のpUC19Bg676は愛知学院大学の吉村教授から恵与されたもので *P. gingivalis*381 株から精製されたDNA の一部 (*fimA*の上流部分) の PstI - PstI 断片約4.4kb がクローニングされている。サブクローニングとシーケンスを効率的に行なうために、制限酵素HindIII、SacI、HincII、ClaI、PstI、BamHI、ApaI、DraI を単独、または組合わせて pUC19Bg676 を切断して、挿入されている PstI-PstI断片の制限酵素地図を作成した。次に挿入されているDNA 断片を適当な制限酵素で切断したものを、M13mp19 およびM13mp18 にサブクローニングした。また、pUC19Bg676のDNA から不必要なDNA 断片(BamHI - BamHI)を取り除いたrecombinant を作製した。これらのrecombinant をアルカリSDS 法によってlarge scale で調製した後、Kilo sequence用 deletion kit(TaKaRa) を用いてdeletion mutant を作製した。

シーケンスはdideoxy sequence法により、 $[\alpha - ^{32}\text{P}]$  dCTPを放射能ラベルとして用いた。M13 プライマーの他に、カスタム合成のDNA もプライマーとして使用した。シーケンスの分析は、Genetic-Mac version 7 のコンピュータプログラムを用い、蛋白質の疎水性・親水性、コドン使用頻度、GC contentについて分析した。ホモロジーの検索はGenetic Mac のコンピュータプログラムを用い、NBRF (National Biomedical Research Foundation) の1995年のDNA データベースとSWISS-PROTのアミノ酸データベース(1995)に登録されているすべてのDNA とアミノ酸配列を対象として行った。

〔結果・考察〕 HindIII - PstIの長さは2,242bp であり、5'末端から数えて348bから1,475bまでのopen reading frame(ORF) が含まれていた。

Shine Dalgarno 配列に類似したシーケンスはORF の上流60b の位置に認められたが、プロモーター、オペレーター領域に類似した塩基配列は本来の位置には存在していなかった。63kDa 蛋白質のN 末端アミノ酸シーケンスは Onoe, Yoshimura によってその最初のメチオニンからトレオニンまでの17残基が分析されているが、本研究で得られたDNA 塩基配列から導かれたアミノ酸配列と比較したところ、16残基までが一致していた。この配列から計算されるポリペプチドの

分子量は、Yoshimura らがSDS PAGEで得た63kDa という推定分子量よりも少ない42,301.91Da であった。本実験で決定したHindIII - PstI fragment 全体のGC content は49.9% であり、ORF 内のGC contentは51.8% であった。これは、1988年にMayland らが報告した*P. gingivalis*の遺伝子DNA のGC含有率と近似していた。63kDa 蛋白質のアミノ酸の頻度とコドンの使用頻度をグラム陰性菌のそれらの頻度と比較したところ、アミノ酸の頻度では他のグラム陰性菌に比べてロイシンが多くアラニンが少なく現れていることを除けば、ほぼ類似していた。

ホモロジーの検索は ORF内のDNA 塩基配列と、その中にコードされている蛋白質のアミノ酸配列について行った。検索で得られた相同性の最高値は、塩基配列では44.0%、アミノ酸配列では41.2% であった。ホモロジー分析からはこの蛋白質の機能を推定する有力な手掛かりは得られなかったが、この蛋白質の遺伝子の下流にコードされている蛋白質fimbilin と、さらに下流の50kDa, 80kDa 蛋白質はホモロジーの検索が行われており、いずれの配列についても他の遺伝子との有意な相同性はなかったと報告されている。これらの事実、*P. gingivalis*の線毛がこれまでに記述されていない独特のタイプのサブユニットから構成されていることを示している。

63kDa 蛋白質の親水性度を表すグラフでは疎水性、親水性のどちらにも特に大きな偏りは出でおらず、膜蛋白質のグラフに近い形であったが、アミノ酸残基数のパーセンテージでは疎水性基が親水性基を14.36 ポイント上回っていた。したがって、この蛋白質全体としては疎水性がやや強いと考えられる。*fimA*の下流域にコードされている50kDa と80kDa の蛋白質は、疎水性度の分析もなされており、いずれも親水性であると判断されている。これらのことから推測して、63kDa 蛋白質がどちらかといえば線毛よりも細胞膜の方に深く関わっている可能性、あるいは線毛と細胞膜との結合部分の形成に関わっている可能性が考えられる。

63kDa 蛋白質の遺伝子が*fimA*のすぐ上流にあり転写の方向が一致している事、またこの上流の約4kb にまで溯っても発現ベクター系で発現されるORF が見つからない事から、本遺伝子を含む下流域に線毛の形態形成に関与する遺伝子群が存在する事は確実と思われる。今後は、63kDa 蛋白質またはこの遺伝子の一部を欠損させたクローンによって発現される蛋白質から直接得られる情報、あるいはpVAL-7などのsuicide vectorによって*fimA*およびその近傍のORF の一部をknock out した場合の、線毛の形態や機能の変化というような具体的な情報によって遺伝子の機能を追及していくことが必要と考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 谷 宏  
副 査 教 授 松 本 章  
副 査 教 授 渡 邊 継 男

学 位 論 文 題 名

## Porphyromonas gingivalis 線毛蛋白質 ( 63kDa 蛋白質 ) の分子生物学的解析

審査は、主査および副査全員の出席のもとで、口頭試問によって提出論文の内容と関連分野について行われた。

Porphyromonas gingivalisは、成人性歯周炎の主要な原因菌とされているが、その病原因子の一つと考えられる線毛の構造と機能についてはまだほとんど解明されていない。P. gingivalisのほとんどすべての菌株が線毛のサブユニット蛋白質fimbriin をコードした遺伝子fimAを保有している。線毛のサブユニット蛋白質が生成されて完全な線毛を形成するためには、いくつかの補助蛋白質が必要であり、一般的にはサブユニットと補助蛋白質をコードしている遺伝子はDNA 上で近くに位置しているはずである。また、P. gingivalisの線毛が別の重要な微小構成要素を持つ可能性があり、fimAの上流、下流にどのような遺伝子が存在するかを調べる必要もあることから、P. gingivalis線毛のDNA の中からほぼ中央にfimA遺伝子を持つ約10.4kbのDNA 断片がクローニングされ、fimAの上流からは63kDa、下流からは50kDa, 80kDa の蛋白質の発現が確認されている。本研究では、遺伝子fimAの上流にあるHindIII サイトから次の PstI サイトまでのDNA 塩基配列並びにこの範囲にコードされている63kDa 蛋白質のアミノ酸配列を決定し、本蛋白質の構造的、機能的特性を検討した。

recombinant のpUC19Bg676はP. gingivalis381 株から精製されたDNA の一部 (fimAの上流部分) の PstI - PstI 断片約4.4kb がクローニングされている。

この断片の制限酵素地図を作成し、挿入DNA断片を適当な制限酵素で切断したものを、M13mp19, mp18 にサブクローニングした。また、pUC19Bg676から不必要なDNA断片を取り除いたrecombinantを作製し、これらをlarge scaleで調製した後、deletion mutantを作製した。

シーケンスはdideoxy sequence法により、 $[\alpha - ^{32}\text{P}]$  dCTPを放射能ラベルとして用いた。得られた塩基配列はGenetic-Macのコンピュータプログラムを用いて、蛋白質の親水性・疎水性、コドン使用頻度、GC content等について分析した。ホモロジーの検索はNBRFの1995年のDNAデータベースとSWISS-PROTのアミノ酸データベースに登録されているDNAとアミノ酸配列を対象として行った。

HindIII - PstIの長さは2,242bpであり、5'末端から数えて348bから1,475bまでのopen reading frame(ORF)が含まれていた。この配列から計算されるポリペプチドの分子量は、YoshimuraらがSDS PAGEで得た63kDaという推定分子量よりも少ない42,301.91Daであった。HindIII - PstI fragment全体のGC contentは49.9%であった。ホモロジー分析ではこの蛋白質と有意な相同性を持つものは存在しなかったが、この遺伝子の下流にコードされているfimbriin、さらに下流の50kDa, 80kDa蛋白質のいずれも他の遺伝子との有意な相同性のない事が報告されている。これらの事実から、P. gingivalisの線毛がこれまでに記述されていない独特のタイプのサブユニットから構成されていることが推測される。

63kDa蛋白質の親水性度を表すグラフは親水性、疎水性のどちらにも特に大きな偏りはなかったが、アミノ酸残基数のパーセンテージでは疎水性基が親水性基を14.36ポイント上回っていた。従って、この蛋白質全体としては疎水性がやや強いと考えられる。またfimAの下流域の50kDaと80kDaの蛋白質が、いずれも親水性であると報告されていることなどから推測して、63kDa蛋白質が線毛よりも細胞膜の方に関わっている可能性、あるいは線毛と細胞膜との結合部分の形成に関わっている可能性が考えられる。本蛋白質の遺伝子がfimAのすぐ上流にあり転写の方向が一致している事、この上流の約4kbにまで溯っても発現ベクター系で発現されるORFがない事から、本遺伝子を含む下流域に線毛の形態形成に関与する遺伝子群が存在する事は確実と思われる。今後は、pVAL

-7などのsuicide vectorによって63kDa 蛋白質をknock out した場合の、線毛の形態や機能の変化というような具体的な情報によって遺伝子の機能を追及していくことが必要と考えられる。

本研究によって、P. gingivalisの63kDa 蛋白質をコードする遺伝子DNA の塩基配列ならびに63kDa 蛋白質のアミノ酸配列などの基礎的な情報が提供された。さらに本蛋白質のSDS PAGEによる推定分子量と実際の分子量との相違が指摘され、疎水性度等の分析から本蛋白質の細胞膜との関連が示唆された。以上の事は、歯科医学の発展に寄与するものであり高く評価される。

審査にあたって、本論文の内容の説明、本研究の意義、および関連分野に関する質問にも明確で満足すべき解答が得られた。

本論文は予防歯科の分野はもとより、微生物学の進歩に寄与するところ大であり、本学位申請者は博士（歯学）の学位を授与されるに十分値するものと認めた。