

氏名	大橋 敏雄
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 2175号
学位授与の日付	平成13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	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i> の表層に存在するDNAの性状に関する研究
論文審査委員	教授 古田 裕昭 教授 福井 一博 教授 滝川 正春

学位論文内容の要旨

【緒言】

Actinobacillus actinomycetemcomitans (Aa)はグラム陰性通性嫌気性桿菌で、若年性歯周炎及び成人性歯周炎の原因菌の一つと考えられている。本菌の主たる病原因子の一つと考えられているロイコトキシンは、ヒトの多形核白血球と単球とを特異的に傷害する白血球毒素である。

太田らは、ロイコトキシンは菌体表層に存在するDNAを介して表層に局在していると推察した。本来、細胞内にあって、遺伝情報の担い手となっているDNAが菌体表層に局在することは意外な事実であるが、このことはKirbyらによっても報告されている。

Aa菌体表層に存在するDNA量に関しては、実に全菌体DNAの20%にも及ぶの試算もあるが、現在、この菌体表層に存在するDNAがどのようなDNAであるのかは不明であり、本菌による歯周病の発症および進行において病原因子の一つとして関わるかどうかについても検討されていない。

そこで、本研究ではAaの菌体表層に存在するDNAの存在様態・性状を明らかにし、それをもとに、この菌体表層に存在するDNAの歯周病病原因子としての役割を考察した。

【材料および方法】

1. 菌株と培養： 菌株は臨床分離株 Aa 301-b 株を用いた。0.5% yeast extract および 0.4% NaHCO₃ を含む brain heart infusion 培地で 37℃ 嫌気条件下で培養した。
2. 菌体表層および培養上清からの DNA 標品の調製： Aa 菌体表層からの DNA 標品は太田らの方法を改良して得た。すなわち、10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 7.5) で穏やかに懸濁した培養菌体を遠心し、その上清をセントリコン(分画分子量 10 万以上)で濃縮したものを祖表層抽出標品とし、表層タンパク質の分析に供した。さらに RNase A, Proteinase K で処理し、エタノール沈殿したものを表層 DNA 標品とした。また培養上清はマイクロコンで濃縮し、分析に供した。
3. 免疫電子顕微鏡観察： 菌体に、一次抗体として抗 DNA 抗体(mouse IgM anti DNA), 二次抗体として goat anti-mouse IgM gold conjugates を反応させた後、酢酸ウラニウムで染色し、透過型電子顕微鏡 (H-800, 日立) によって観察した。
4. 電気泳動： 菌体を 1.6% の低融点アガロースで包埋し、溶菌処理後、パルスフィールド電気泳動(CHEF-DR-III, Bio-Rad Laboratories)に供した。また、表層 DNA 標品はその

まま泳動用試料とした。なお、タンパク質組成の分析には SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)を用いた。

5. 表層 DNA の制限酵素消化とサザンハイブリダイゼーション： 表層 DNA 標品を *Hind* III, *Eco*R I で消化し、アガロースゲル電気泳動を行った。また、このゲルから DNA 断片をメンブレンに転写し、Sambrook らの方法に基づき Aa 線毛遺伝子プローブを用いてハイブリダイゼーションを行った。
6. 塩基配列の解析： 表層 DNA 標品を制限酵素 *Alu* I で消化し、その 500 bp 以上の DNA 断片をプラスミド pUC118 にクローン化し、DNA シークエンサー (ABI 377) を用いて塩基配列解析した。また、M13 プライマー を用いて挿入 DNA 断片を増幅したものを PCR 増幅 DNA 断片標品とした。
7. N 末端アミノ酸配列の解析： SDS-PAGE で分離したタンパク質を polyvinylidene difluoride 膜に転写、染色後、目的のバンドを切り出しプロテインシークエンサー (ABI476A) を用いて N 末端アミノ酸配列を決定した。
8. サイトカイン誘導活性測定： 健康な成人の末梢血から Ficoll-paque 比重遠心によって単核球を分離し、これをプレートに付着させ非付着細胞を除いたものをヒト単球として実験に供した。単球に表層 DNA 標品および DNA 断片標品を 5% CO₂ 存在下、37°C で 24 時間作用させ、産生された IL-1 β , IL-6, および TNF- α 量は ELISA kit (ENDOGEN) を用い測定した。

【結果と考察】

1. 免疫電顕

免疫電子顕微鏡法観察結果は Aa 菌体表層全体に DNA が局在する事を示した。

2. 表層 DNA の性状

パルスフィールド電気泳動では表層 DNA のサイズは約 50 kbp であった。また、表層 DNA はその制限酵素消化パターンがスメアーであること、線毛遺伝子とハイブリダイズすること、さらに その塩基配列解析から、染色体の様々な領域を含むことがわかった。以上から、Aa 表層 DNA は特定のファージやプラスミドに由来するのではなく、染色体が約 50 kbp のサイズにランダムに切断されたものと考えられる。

3. 表層 DNA 量と増殖相との関係

表層 DNA 量は対数増殖初期で多く、以後後期まで減少した。表層の 39 kDa と 22 kDa のタンパク質量も同様の傾向を示した。一方、培養上清中の DNA 量は逆に対数増殖初期に少なく後期で増加し、39 kDa および 22 kDa のタンパク質も同様の傾向を示した。N 末端アミノ酸配列分析の結果、両タンパク質は外膜タンパク質であることが示唆され、ベジクルと DNA とが複合体を形成している可能性が推察された。

4. 表層 DNA のヒトの単球に対する作用

Aa 表層 DNA 標品あるいは DNA 断片標品は単球を刺激して TNF- α , IL-1 β , および IL-6 の炎症性サイトカインを産生誘導した。

【結論】

Aa の菌体表面にはサイズ約 50 kbp の染色体由来の DNA が存在し、このものは単球を刺激して、炎症性サイトカインを産生誘導する歯周病因子として働くと考えた。

論文審査結果の要旨

歯周病原性細菌と考えられている *Actinobacillus actinomycetemcomitans*(Aa)の菌体表層には DNA が存在していることがわかってきた。

しかし、Aa 菌体表層に存在する DNA がどのような DNA であるのかは不明であり、本菌による歯周病の発症および進行において病原因子の一つとして関わるかどうかについても検討されていない。

そこで、本研究では Aa の菌体表層に存在する DNA の性状を明らかにし、それをもとに、この菌体表層に存在する DNA の歯周病病原因子としての役割を考察した。

本研究の結果は、Aa の菌体表層には染色体由来のサイズ約 50 kbp の DNA が存在すること、このものが単球を刺激して、炎症性サイトカインを産生誘導することを示した。このことは Aa 菌体表層に存在する DNA のサイズ、由来といった性状を明らかにしたもので、新しい知見である。特に歯周病原因子となり得ることを示した点は、今後この分野の研究に新しい方向性を示した。

従って、本申請論文は学位論文として価値があるものと認める。