

氏名	本 行 博
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与番号	博乙第 3329号
学位授与の日付	平成11年3月25日
学位授与の要件	博士の学位論文提出者(学位規則第4条第2項該当)
学位論文題名	Porphyromonas gingivalisの2つの特異的外膜蛋白遺伝子の性状とそれら遺伝子を用いた歯周ポケットにおける感染分布の研究
論文審査委員	教授 福井一博 教授 滝川正春 教授 村山洋二

学位論文内容の要旨

【緒言】

申請者の研究班は歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg) に特異的な 53 kDa および 67 kDa の外膜蛋白 (Ag53 および Ag67) を発見した。これまでの研究から次のことを明らかにした。① Ag53 および Ag67 は強い抗原性を示す。② Pg のほとんどの菌株は Ag53 あるいは Ag67 のどちらかを有する。③ 歯周病患者は Ag53 単独, Ag67 単独あるいはその両方に強く感作されている。したがって, Ag53 および Ag67 は Pg の感染の指標として有用であると考えられた。そこで, 本研究は以下のことを目的とした。① Ag53 および Ag67 をコードする遺伝子 (*pga53* および *pga67*) の塩基配列を決定し, 両外膜蛋白の遺伝子レベルの性状を調べる。② Polymerase chain reaction (PCR) 法を用いて外膜蛋白遺伝子を増幅することによって Pg を検出および型別する方法を確立する。③ 歯周病患者における Pg の感染分布を外膜蛋白遺伝子の型別を指標に調べる。

【材料および方法】

1. 試験菌株

Pg を 15 株, および Pg の近縁菌種である *Porphyromonas* 属を 2 株並びに *Prevotella* 属を 5 株用いた。

2. *pga53* のクローニング

Ag53 を有する FDC381 株の染色体 DNA から蛋白発現ファージライブラリーを作製し, Ag53 に対する家兎抗血清を用いて陽性クローンを選択した。

3. *pga67* のクローニング

サザンハイブリダイゼーション解析により Ag67 を有する株も *pga53* に相同する遺伝子を保有していることがわかった。さらにアミノ酸解析から Ag67 は Ag53 に相同している部分もあることがわかったため, *pga67* は *pga53* に相同性があると想定された。そこで, Ag67 を有する ATCC 33277 株の染色体 DNA からプラスミドライブラリーを作製し, サザンハイブリダイゼーション法によって *pga53* にハイブリダイズする陽性クローンを選択した。

4. *pga53* と *pga67* の遺伝子解析

自動 DNA シーケンサーを使用して *pga53* および *pga67* の全塩基配列のシーケンスを行ない、それらの塩基配列と推定アミノ酸配列を解析した。

5. 外膜蛋白遺伝子特異的 PCR プライマー

歯周ポケットから Pg を特異的に検出し型別するため、*pga53* と *pga67* の相方に共通な塩基配列から両外膜蛋白遺伝子を増幅できる PCR プライマーを作製した。

6. 被験患者と被験ブランク

歯周炎患者 31 人を被験者とし、被験者の複数のポケットから被験ブランクを採取した。尚、被験ブランクは予め Pg の棲息を確認したものとした。

7. 被験ブランクにおける *pga53* および *pga67* の検出

上記 5 で作製したプライマーを用いて、被験ブランクから抽出した DNA をテンプレートとして PCR を行ない、*pga53* および *pga67* を検出した。

8. 抗 Pg 外膜蛋白の血清 IgG 抗体の検出

Ag53 あるいは Ag67 に対する被験患者血清 IgG 抗体の有無をイムノプロット法で調べた。

【結果および考察】

1. *pga53* と *pga67* の遺伝子解析

FDC381 株から *pga53* を含むプラスミド pMO15 を、ATCC33277 株から *pga67* を含むプラスミド pAO45 および pAO46 を得て、それらの塩基配列を決定した結果、次のことが明らかとなった。① *pga53* は 1,494 bp そして *pga67* は 1,692 bp の塩基対から構成されていた。② Ag53 と Ag67 とはアミノ酸配列に約 30% の相同性があった。③ 両蛋白には、相同性の高いシグナルペプチドおよび C 末端側にプロリンに富む領域が共通して存在した。④ *pga67* は、Pg の 72 kDa 短線毛遺伝子 (小川ら, 1994) と塩基配列が類似していた。

2. Pg 試験菌株からの *pga53* と *pga67* の検出

作製したプライマーを用いて試験菌株から PCR を行なったところ、Pg 試験菌株のみから *pga53* あるいは *pga67* が特異的に増幅された。得られた増幅遺伝子断片長から、Pg は 2 株の例外を除き、*pga53* を保有する株あるいは *pga67* を保有する株に型別することができた。

3. 歯周病患者における 2 つの外膜遺伝子型 Pg の感染実態

被験患者は、ほぼ *pga53* あるいは *pga67* のどちらか一方の外膜遺伝子型 Pg に感染していた。被験患者 31 人中 23 人のブランクから *pga67* を、12 人から *pga53* を、そして 4 人から両方を検出した。また、被験患者 31 人中 25 人の血清から抗 Ag67 抗体を、14 人の血清から抗 Ag53 抗体を、そして 8 人の血清からは両方の抗体を検出した。被験患者は、感染している Pg の外膜蛋白型と対応する抗外膜蛋白抗体血清を有していた。Pg の外膜遺伝子に基づく型別は、Pg の歯周病の発症と進行における関わりを調べる上でのマーカーとして有用であろう。

【結論】

- 2 つの Pg 特異的外膜蛋白 Ag53 および Ag67 をコードする遺伝子 *pga53* および *pga67* の全塩基配列を決定した。
- 2 つの外膜蛋白遺伝子に共通な塩基配列から PCR プライマーを設計し、Pg を特異的に検出および型別できる PCR 法を確立した。
- 歯周病患者は主としてどちらか一方の外膜遺伝子型の Pg の感染を受け、その患者は歯周ポケット部位ごとに異なる遺伝子型の Pg を有することは少ない。

論文審査結果の要旨

第1編と第2編の申請論文は、歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg) の抗原性の強い 53 kDa あるいは 67 kDa の外膜蛋白 (Ag53 あるいは Ag67) の遺伝子をクローニングし、その塩基配列を決定し、2つの外膜蛋白のアミノ酸配列を比較したものである。第3編では、その塩基配列を利用して設計したプライマーを調製し、それをを用いた PCR 法によって、歯周病患者の Pg 感染様態を調べたものである。

その結果、以下のことを明らかにした。1) *pga53* および *pga67* をクローニングし、塩基配列を決定した。その塩基配列から想定されるアミノ酸配列から Ag53 と Ag67 は、アミノ酸配列において約 30 % の相同性を認めた。両蛋白には相同性の高いシグナルペプチドおよび C 末端側にプロリンに富む領域が存在した。2) *pga53* と *pga67* に共通する塩基配列から設計したプライマーを用いた PCR 法により得られた増幅遺伝子断片長から、Pg を W50 および W83 株以外では、*pga53* を保有する株および *pga67* を保有する株の2つに型別することができた。3) PCR 法を用いて、歯周病患者における外膜蛋白遺伝子型の Pg の感染を判別でき、歯周病患者は、口腔内全体にわたり主としてどちらか一方の外膜蛋白遺伝子型の Pg に感染していた。

以上の内容は、Pg の2つの外膜蛋白遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列の相同性および相違性を示し、そして、これら遺伝子を用いた歯周病の臨床的病態の研究への道を開いた研究として評価される。

従って、本申請論文は学位論文の価値があるものと認めた。