

氏名	Shahriar Abu Saleh MUHAMMAD		
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5946号		
学位授与の日付	平成31年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科社会環境生命科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	The role of PGN_0296 in <i>Porphyromonas gingivalis</i> . (<i>Porphyromonas gingivalis</i> における PGN_0296 遺伝子の役割の探求)		
論文審査委員	大原 直也 教授	仲野 道代 教授	江國 大輔 准教授

学位論文内容の要旨

論文内容の要旨（2000字程度）

Periodontal disease is a chronic inflammatory disease that causes the destruction of periodontal tissues and alveolar bone, is one of major infectious diseases in oral cavity. *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*), known as one of major pathogens on periodontal diseases. It possesses Type IX secretion system (T9SS). The C-terminal domain (CTD) proteins including gingipains are secreted via T9SS. We previously reported that Omp17, which is an Skp-like protein (also known as OmpH), encoded by PGN_0300 gene, is involved in the function of T9SS to transport CTD-proteins, and the deficiency of PGN_0300 gene shows loss of the protease activity of gingipains in this mutant. Moreover, according to a tiling microarray analysis, it is likely that the genes from PGN_296 gene to PGN_301 gene form an operon on *Pg* genome. PGN_0296 gene is the first gene on the operon and its characteristics and functions have not been clarified. In this study, we attempted to delete the PGN_0296 gene on the *Pg* genome to clarify the role of PGN_0296. First, we constructed the suicide plasmid for deletion of the PGN_0296 gene to replace the PGN_0296 gene with the *ermF* gene. After linearization of this plasmid by restriction enzymes, we performed the transformation by electroporation, and then the PGN_0296-deficient strain (Δ PGN_296) was generated. Next, we transformed PGN_0296 gene into *Pg* genome to establish the complementary strain of PGN_0296 (CPGN_0296). Direct PCR and reverse transcription-PCR indicated the location of PGN_0296 gene and its expression in *Pg* wild type (WT) and CPGN_0296, but Δ PGN_296 certainly lose the gene and its expression. We found the black pigmented colonies for all the strains and further we investigated the role of all the strains gingipain and found no significant change. Which is suggesting that the PGN_0296 neither linked with

hemoglobin protein nor with activities of gingipain. These results are also suggesting that the PGN_0296 has not any involvement in T9SS as well.

論文審査結果の要旨

Porphyromonas gingivalis は主要な歯周病菌のひとつであり、強力なタンパク質分解酵素活性をもつシステインプロテアーゼである3種類のジンジパイン Kgp、RgpA、および RgpB を代表的な病原因子として保有する。ジンジパインはドメインタンパク質として産生されたのち、IX型分泌装置 (T9SS) を通して菌体外に分泌され、最終的に A-LPS を介して細胞壁に繋ぎ留められる。*P. gingivalis* は血液寒天培地上に黒色の集落を形成するが、ジンジパイン活性を消失すると集落は白色となる。T9SS の機能が阻害された場合にも、ジンジパインの正常な成熟が失われるために、集落が黒色化せず白色となることが知られている。申請者の所属研究室では *P. gingivalis* の PGN_0300 遺伝子を欠失させると血液寒天培地上で白色集落を形成することや、PGN_0300 タンパク質が T9SS の正常に機能するために必要であることを示している。また、PGN_0296 遺伝子から PGN_0301 遺伝子まではオペロンを形成しており、この中の PGN_0297 も T9SS に関係することが示されていることから、このオペロン中の他の遺伝子も T9SS に関係することが示唆される。本研究ではこのオペロンの最も上流に位置している機能未知の PGN_0296 の機能を明らかにすることを目的として行われた。

本研究では *P. gingivalis* ATCC33277 株を親株に、相同組換え法により PGN_0296 遺伝子欠損株 Δ PGN_0296 とその相補株 CPGN_0296 を作製して、それらの性状を調べることが検討され、以下の結果が得られた。

- ・ Δ PGN_0296 では PGN_0296 遺伝子の下流の PGN_0297 遺伝子の発現は確認され、PGN_0296 遺伝子の発現のみが消失した変異株が作製されたことが示された。また CPGN_0296 では PGN_0296 遺伝子の発現が回復されており、相補株も目的どおり作製されていた。
- ・ Δ PGN_0296 は親株である ATCC33277 株と CPGN_0296 株同様に、血液寒天培地上に黒色集落を形成した。
- ・ Δ PGN_0296 の菌体と培養上清中における Kgp と Rgp の活性は、ATCC33277 株と CPGN_0296 株のそれらにおける活性との間に統計学的に有意な差がなかった。

以上の結果から、PGN_0296 タンパク質はジンジパインの産生や成熟には関与せず、また、T9SS の機能にも関与していないことが示唆された。

本論文は、主要な歯周病菌 *P. gingivalis* の病原因子の分泌に関わる可能性のある遺伝子のうち、PGN_0296 遺伝子欠損株とその相補株を作製して、その性状の一部を明確にしたものであり、当該オペロンの役割を考えるうえで重要な知見を提供するものであった。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。