

氏名	小野 晋太郎		
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6152号		
学位授与の日付	令和2年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)		
学位論文の題目	Construction and characterization of a PGN_0297 mutant of <i>Porphyromonas gingivalis</i> : evidence of the contribution of PGN_0297 to gingipain activity (<i>Porphyromonas gingivalis</i> の PGN_0297 変異株の作製とその性状解析: PGN_0297 がジンジパイン活性に寄与している証拠)		
論文審査委員	久保田 聡 教授	島田 康史 准教授	江國 大輔 准教授

学位論文内容の要旨

【諸言】

グラム陰性偏性嫌気性桿菌 *Porphyromonas gingivalis* は歯周病原細菌のひとつである。*P. gingivalis* は、主要な病原因子として、強力なプロテアーゼ活性を有するジンジパインを分泌する。本菌のジンジパインには、*kgp* によってコードされるリジン特異的ジンジパイン *Kgp* と、*rgpA* および *rgpB* によってコードされるアルギニン特異的ジンジパイン *RgpA* と *RgpB* の3種類がある。ジンジパインは、9型分泌装置 (Type 9 Secretion System: T9SS) を介して、菌体表面へ輸送され、修飾を受けて成熟することでプロテアーゼ活性を獲得する。

申請者の所属グループは以前に、*P. gingivalis* の PGN_0300 蛋白質は T9SS の正常な機能に必須であることを明らかにした。PGN_0300 遺伝子は、PGN_0296 遺伝子から PGN_0301 遺伝子までの6個の遺伝子から構成されるオペロンに含まれており、PGN_0297 遺伝子もそのひとつである。PGN_0297 蛋白質は T9SS の構成蛋白質である PorK と複合体を形成することが報告されているが、その詳細な役割は明らかになっていない。そのため、本研究では PGN_0297 蛋白質の機能を解析することを目的とし、*P. gingivalis* ATCC33277 株を親株とした PGN_0297 遺伝子変異株を作製して、その性状を解析した。

【材料・方法】

1. *P. gingivalis* の PGN_0297 遺伝子変異株の作製

P. gingivalis ATCC33277株を親株とした。PGN_0297遺伝子を欠損させるためのスーサイドベクターを電気穿孔法にて親株内に導入し、相同組換え法により PGN_0297 遺伝子欠損株 (Δ PGN_0297) を作製した。さらに、 Δ PGN_0297に PGN_0297 遺伝子の発現プラスミドベクターを導入した PGN_0297 遺伝子相補株 (Δ PGN_0297::pPGN_0297) を作製した。

2. 血液寒天培地上での培養

親株、 Δ PGN_0297、そして Δ PGN_0297::pPGN_0297 の各菌株を血液寒天培地上で 37°C、嫌気条件下で培養し、コロニーの表面性状を観察した。

3. RNA精製と逆転写反応，リアルタイム定量PCR法

各菌株から全RNAを抽出し，DNase処理を行った後，RNA精製キットを用いて精製した。ランダムヘキサプライマーを用いた逆転写反応にて各菌株の精製RNAからcDNAを作製した。各菌株のcDNAを用いたリアルタイム定量PCR法にて，各ジンジパイン遺伝子 (*kgp*, *rgpA*, *rgpB*) の発現量を計測し， $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて各菌株間で比較した。

4. プロテアーゼ活性の測定

各菌株を，栄養付加Brain Heart Infusion液体培地で37°C，嫌気条件下にて24時間培養した。培養液を，10,000 × g，4°Cで10分間の遠心分離によって，培養上清と菌体に分画した。その後，菌体を元の容量のリン酸緩衝食塩水に懸濁したものと，培養上清をそれぞれ試料とした。プロテアーゼ活性測定用蛍光基質であるZ-His-Glu-Lys-MCA (Kgp用) もしくはZ-Phe-Arg-MCA (Rgp用) と試料を混和し，40°Cで10分間反応させた後に蛍光強度を測定し，各菌株のKgpおよびRgpのプロテアーゼ活性を比較した。

5. Ca9-22 細胞におけるセリン・スレオニンキナーゼ Akt のリン酸化レベルの測定

親株， ΔPGN_0297 ， $\Delta PGN_0297::pPGN_0297$ ，そしてジンジパイン阻害剤を加えた親株を，Ca9-22細胞（ヒト歯肉上皮細胞株）に対する感染多重度（MOI）を100で感染させ，37°Cで2時間静置培養した。各感染細胞を溶解した蛋白質試料をSDS-PAGEにて展開後，ウサギ抗ヒト（リン酸化）Akt抗体を用いたウェスタンブロット法を行い，Ca9-22細胞の生存・免疫に参与するAktのリン酸化を調べた。

【結果】

1. コロニー性状の変化

血液寒天培地上で培養したコロニーの表面性状は，親株および $\Delta PGN_0297::pPGN_0297$ では黒色を呈し， ΔPGN_0297 のコロニーは色素沈着を示さなかった。

2. ジンジパイン遺伝子の転写レベルの変化

ジンジパイン遺伝子 *kgp*，*rgpA*，そして *rgpB* の転写レベルは，親株および $\Delta PGN_0297::pPGN_0297$ と比較して， ΔPGN_0297 で低下するなどの変化はなかった。

3. プロテアーゼ活性の変化

培養上清および菌体表面上における Kgp と Rgp のプロテアーゼ活性は，親株および $\Delta PGN_0297::pPGN_0297$ と比較して， ΔPGN_0297 で有意に低下していた。

4. 各菌株を感染させた Ca9-22 細胞の Akt リン酸化レベルの変化

親株あるいは $\Delta PGN_0297::pPGN_0297$ を感染させた Ca9-22 細胞の Akt リン酸化レベルは，非感染の場合と比較して，著しく低下していた。一方，ジンジパイン阻害剤存在下で親株を感染させた場合は，Akt のリン酸化レベルは変化しなかった。また， ΔPGN_0297 を感染させた場合も，Akt のリン酸化レベルは変化しなかった。

【考察・結論】

本研究から， ΔPGN_0297 では血液寒天培地上で色素沈着が起こらず，KgpとRgpの転写量は低下していなかった。さらに， ΔPGN_0297 は，プロテアーゼ活性が低く，ジンジパインによるAktシグナル伝達経路の障害を起こさなかった。これらの事実から，PGN_0297蛋白質はジンジパインの分泌あるいは成熟に必須であると考えられる。

以上のことから，PGN_0297蛋白質はT9SSのタンパク分泌機能に重要な役割を果たし，その結果として*P. gingivalis*の病原性に参与することが示された。

論文審査結果の要旨

グラム陰性偏性嫌気性桿菌*Porphyromonas gingivalis*は歯周病原細菌のひとつであり、主要な病原因子として、強力なプロテアーゼ活性を有するジンジパインを分泌する。本菌のジンジパインには、*kgp*によってコードされるリジン特異的ジンジパインKgpと、*rgpA*および*rgpB*によってコードされるアルギニン特異的ジンジパインRgpAとRgpBの3種類がある。ジンジパインは、9型分泌装置（Type 9 Secretion System:T9SS）を介して、菌体表面へ輸送され、修飾を受けて成熟することでプロテアーゼ活性を獲得する。

PGN_0297 遺伝子および、T9SS の機能に必要な PGN_0300 遺伝子は、PGN_0296 遺伝子から PGN_0301 遺伝子で構成されるオペロンに含まれている。PGN_0297 タンパク質は T9SS の構成タンパク質である PorK と複合体を形成することが報告されているが、その詳細な役割は明らかになっていない。そのため、本研究では *P. gingivalis* ATCC 33277 株を親株とした PGN_0297 遺伝子欠損株、および同株に同遺伝子発現ベクターを組み込んだ相補株を作製して、PGN_0297 タンパク質の機能を解析した。得られた結果は以下の通りである。

- 1) 血液寒天培地上で培養したコロニーの表面性状は、親株および相補株では黒色を呈し、欠損株のコロニーは色素沈着を示さなかった。
- 2) ジンジパイン遺伝子 *kgp*, *rgpA*, そして *rgpB* の転写レベルは、親株および相補株と比較して、欠損株で低下するなどの変化はなかった。
- 3) 培養上清および菌体表面上における Kgp と Rgp のプロテアーゼ活性は、親株および相補株と比較して、欠損株で有意に低下していた。
- 4) 親株あるいは相補株の菌液を加えた Ca9-22 細胞の Akt リン酸化レベルは、菌液を加えなかった場合と比較して、著しく低下していた。一方、ジンジパイン阻害剤存在下で親株の菌液を加えた場合は、Akt のリン酸化レベルは変化しなかった。また、欠損株の菌液を加えた場合も、Akt のリン酸化レベルは変化しなかった。

以上のことから、PGN_0297タンパク質はジンジパインの生産、分泌に重要な役割を果たし、その結果として*P. gingivalis*の病原性に関与することが示された。

本研究は*P. gingivalis*のPGN_0297タンパク質の機能について新しい知見を示すとともに、*P. gingivalis*の主要な病原因子であるジンジパインの分泌機構及び成熟機構の解明に貢献するものである。また本論文はすでにActa Medica Okayamaに受理（掲載）されており、国際的水準でも一定の評価を得ている。

よって、本審査委員会は、本申請論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。