

論文要旨等報告書

氏 園井教裕
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 3570号
学位授与の日付 平成20年3月25日
学位授与の要件 医歯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)
学位論文題名 Porphyromonas gingivalisの膿瘍形成能へ与えるnrdD様遺伝子の病原性

論文審査委員 教授 福井 一博 教授 高柴 正悟 准教授 久保田聡

学位論文内容の要旨

【緒言】

Porphyromonas gingivalis (Pg) の膿瘍形成能は、歯周病の病態形成と関連性が高いことが広く知られている。これまでの研究によって、膿瘍形成株に特異的な遺伝子としてインサーションシーケンスである IS1598 が単離された。その周辺領域が解析された結果、膿瘍形成株には共通した IS の挿入部位が存在し、その上流には *E. coli* のリボヌクレオチドリダクターゼをコードする遺伝子 (*nrdD*) と相同性を示す遺伝子 (*nrdD* 様遺伝子) が存在することが示された。さらに、膿瘍形成株では *nrdD* 様遺伝子の mRNA 量が非膿瘍形成株に比べて数倍高いので、IS 挿入によって発現量の増加した *nrdD* 様遺伝子が膿瘍形成能に関与していると考えられた。そこで本研究では、*nrdD* 様遺伝子の膿瘍形成への関与を明らかにすることを目的とし、*nrdD* 様遺伝子の欠損株を作製して、Pg の増殖と膿瘍形成能の変化を調べた。

【材料および方法】

- 1. 供試菌株：**膿瘍形成能をもつ菌株としてPgW83を用いた。菌株は、Huntらの方法に従い、0.5% yeast extract (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA), 0.05%塩酸システイン, 0.0005%ヘミン (和光純薬, Osaka, Japan), および0.0001%ビタミンKを含むBrain Heart Infusion Broth (Difco Laboratories) を用いて培養した。なお、W83株以外に、膿瘍形成株としてW50とFDC381を、非膿瘍形成株としてATCC 33277, SU63, およびSUNY 1021も用いた。
- 2. *nrdD*様遺伝子欠損株の作製：**以下の2段階の操作で行った。
遺伝子組み換え操作：膿瘍形成株であるPgW83株からゲノムDNAを抽出し、これに含まれる*nrdD*様遺伝子をPCR法によって増幅し、プラスミドベクター (pUC18) にクローン化した。この*nrdD*様遺伝子内の制限酵素*Kpn*I切断部位にエリスロマイシン耐性カセットを挿入し、プラスミドを線形化後、エレクトロポーション法にてPgW83株に導入した。
変異株の同定：組み換え遺伝子を導入したPgは、エリスロマイシン (10 µg/ml) を含むBHI寒天培地に播種し、37°Cの嫌気条件下で5日間培養した。相同性組み換えによる*nrdD*様遺伝子の変異はPCR法ならびにサザンハイブリダイゼーション法によって確認し、*nrdD*様遺伝子欠損株を樹立した。
- 3. サザンハイブリダイゼーション法：**Pg菌体からフェノール・クロロホルム法を用いてゲノムDNAを抽出し、これを制限酵素*Sph*I (宝酒造) で消化し、DNA断片を1%アガロース上で電気泳動して展開した。ゲル中に展開されたDNA断片は、ナイロン膜 (Hybond-N⁺: Amersham Bioscience) に0.4M NaOHを用いて転写し、*nrdD*様遺伝子とハイブリダイゼーション反応を行った。

4. **増殖能の比較**：*nrdD*様遺伝子欠損株とW83親株を対数増殖後期 ($OD_{660} = 0.8$) まで前培養した培養液の0.6 mlを10 mlのBHI液体培地に添加して継代培養し、培養液の吸光度を非色計 (MiniPhoto518R, TAITEC ; 波長 : 660 nm) を用いて測定することで、培養液中の細菌数を間接的に表した。そして、これを両者の増殖能として比較した。
5. **膿瘍形成能の比較**：*nrdD*様遺伝子欠損株とW83親株を37°C、嫌気条件下で対数増殖後期 ($OD_{660} = 0.8$) まで培養後に集菌して、 2.5×10^8 個/mlとなるようにBHI液体培地中に懸濁した。この懸濁液の100 μ lをBalb/cマウス (♂, 7週齢) の背側部皮下に接種し、膿瘍形成を経時的に観察した。Pgが形成する膿瘍は潰瘍を形成する特徴を持つので、Pgの膿瘍形成能は一般的に潰瘍面積で表現される。そのため、形成された膿瘍の面積をOkayamaらの記載に従って経時的に測定した (接種後1日は約4時間毎、その後の面積は1日毎)。
6. **酸素感受性試験**：*nrdD*の発現量が菌体の酸素感受性に影響を与えるかどうかを、*nrdD*様遺伝子欠損株ならびに*nrdD*様遺伝子の発現が多い膿瘍形成株とその発現が少ない非膿瘍形成株を用いた酸素感受性試験によって評価した。各Pg株を対数増殖後期 ($OD_{660} = 0.8$) まで前培養した培養液の0.6 mlを10 mlのBHI液体培地に添加して継代培養し、吸光度が0.3になるまで培養した。その後、通常の嫌気培養群と過酸化水素水2.5mMを添加して震盪 (125 rpm/min) を行った偽好気状態群の2群に分け、2時間追った。

【結果】

1. *nrdD*様遺伝子欠損株では、膿瘍形成株であるW83親株と比較して、平均世代時間が約3倍になり、形成される膿瘍面積が約1/14になった。
2. *nrdD*様遺伝子欠損株と*nrdD*様遺伝子の発現量が少ない非膿瘍形成株は、偽好気状態において、膿瘍形成株に比べ増殖能が低下していた (Student's t-test, $p < 0.05$)。

【考察】

大腸菌の*nrdD* は嫌気性菌に特異的なclass IIIのRBRをコードする遺伝子であり、この産物である酵素は嫌気性条件下でDNAを合成するためにデオキシリボヌクレオチドをビルディングブロックとして供給する分子である。Pgに存在する*nrdD*様遺伝子は、*nrdD*と同一性があるうえにC-末端保存領域を保有しているため、大腸菌の*nrdD*と同様の機能を持っている可能性が高い。これまでに、この*nrdD*様遺伝子の発現量がIS1598の挿入によって増加するので、*nrdD*様遺伝子はPgが生体内で分裂・増殖する際に有利に働き、このことが膿瘍形成能の獲得に結びついている可能性が提唱されていた。

本研究では、IS1598を保有して*nrdD*様遺伝子の発現量が増加しているPgW83株を親株とした*nrdD*様遺伝子欠損株を作成して、*nrdD*様遺伝子の有無がPgの増殖能と膿瘍形成能を調べた。その結果、*nrdD*様遺伝子を欠損させると、これらの能力が明らかに低下することが示された。一方、*NrdD*は、酸素分圧が高い条件では、その活性を失うことがわかっている。宿主生体内は酸素分圧の高い条件にあり、*nrdD*様遺伝子の発現量が少ない非膿瘍形成株ではその活性がほとんど失われてしまうのかもしれない。そこで、*nrdD*様遺伝子の発現量の違いがPgの酸素感受性に影響するという仮説を立て、酸素感受性試験を行った。試験では、予測どおりに*nrdD*様遺伝子の発現量が少ない非膿瘍形成株と*nrdD*様遺伝子欠損株の酸素感受性が、膿瘍形成株に比べて高いことが明らかとなった。*nrdD*様遺伝子の発現量の増加は、宿主内での酸化ストレスに対して抵抗性に働き、菌の増殖、ひいては膿瘍形成に深く関与しているようである。

今後は、以上の事象の分子機構を解明するとともに、臨床データとの関連を調べることで、IS1598を細菌学的診断の遺伝子マーカーとして応用することや、新しい治療法の開発が可能となるかもしれない。

【結論】

Pgの*nrdD*様遺伝子はその増殖能や酸素感受性に影響を与え、膿瘍形成能に関与していることが示唆された。

論文審査結果の要旨

歯周病は口腔内の常在細菌による感染症であり、その病態は複雑である。*Porphyromonas gingivalis* (Pg) の膿瘍形成能は、歯周病の病態形成と関連性が高いことが広く知られている。これまでの研究によって、膿瘍形成株に特異的な遺伝子としてインサーションシーケンスである IS1598 が単離された。その周辺領域が解析された結果、膿瘍形成株には共通した IS の挿入部位が存在し、その上流には *E. coli* のリボヌクレオチドリダクターゼをコードする遺伝子 (NrdD) と相同性を示す遺伝子 (*nrdD* 様遺伝子) が存在することが示された。さらに、膿瘍形成株では *nrdD* 様遺伝子の mRNA 量が非膿瘍形成株に比べて約 5 倍高いことがわかっている。以上より、IS 挿入によって発現量の増加した *nrdD* 様遺伝子が膿瘍形成能に関与していると推察された。

そこで本研究では、膿瘍形成株 W83 を親株に *nrdD* 様遺伝子の欠損株を作製し、増殖能や膿瘍形成能の変化を評価した。その結果、*nrdD* 様遺伝子の膿瘍形成への関与を明らかにすることができた。

申請論文は以下の内容を示すものであった。

1. *nrdD* 様遺伝子欠損株は、親株である膿瘍形成株に比して低い増殖能及び膿瘍形成能を示した。
2. *nrdD* 様遺伝子欠損株と *nrdD* 様遺伝子の発現量の少ない非膿瘍形成株では、偽好気状態において、膿瘍形成株に比して明確な増殖能の低下がみられた。

以上の知見から、Pg のゲノム上に存在する *nrdD* 様遺伝子の膿瘍形成への関与が明らかになった。さらに、*nrdD* 様遺伝子欠損株と *nrdD* 様遺伝子の発現量の少ない非膿瘍形成株では、膿瘍形成株に比して酸素感受性が高いことも示された。この点については、*nrdD* 様遺伝子の高発現が宿主内での酸化ストレスに対して抵抗因子として働く結果、菌の増殖、膿瘍形成能を賦活すると考察されている。