

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

論文提出者	井貝 亮太
論文審査委員	(主 査) 朝日大学歯学部 教授 北井 則行 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 村上 幸孝 (副 査) 朝日大学歯学部 教授 田沼 順一
論文題目	<i>Porphyromonas gingivalis</i> が有する Mfa1 線毛の付随成分に関する研究
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>[目的]</p> <p><i>Porphyromonas gingivalis</i> は、慢性歯周炎の発症や増悪に関わる最重要細菌である。本菌は FimA および Mfa1 線毛の2種類の線毛を有し、線毛は感染成立の第一段階である歯周組織への定着に必要な因子であることから、疾患の発症、進行および予防を考える上で最も重要な病原因子と目されている。本菌が有する線毛の構造、構築機序および機能に関する理解は、研究が進んでいる他の病原性細菌と比べると未だ不十分であり、線毛の付随成分に関する研究は、その解明の一助になると考えられる。そこで、本研究では Mfa1 線毛の付随成分である Mfa4 タンパク質の成熟化過程および Mfa4 タンパク質が他の付随成分に与える影響を検討した。</p> <p>[方法]</p> <p>1. 使用菌株および培養条件</p> <p><i>P. gingivalis</i> ATCC 33277 株を親株として <i>fimA</i> 遺伝子を欠損させた JI-1 株、<i>fimA</i> と <i>mfa4</i> 遺伝子を欠損させた <i>mfa4</i> 変異株および <i>rgpA</i> と <i>rgpB</i> 遺伝子を欠損させた KDP112 株を sTSB を用いて 37°C、嫌気条件下にて 24 時間培養した。</p> <p>2. <i>mfa4</i> 変異株の作製</p> <p>Mfa4 タンパク質をコードする遺伝子に Em^r カセットを挿入して <i>mfa4</i> 変異株を作製した。</p> <p>3. タンパク質試料の調製</p> <p>菌体を超音波にて破碎し、全菌体抽出液を調製した。通法に従い、全菌体抽出液から、可溶性画分、膜画分、内膜画分および外膜画分に分画した。</p> <p>4. Mfa1 線毛の精製</p> <p>陰イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過を用いて、可溶性画分から Mfa1 線毛を精製した。</p> <p>5. ウェスタンブロット</p> <p>SDS-PAGE により展開したタンパク質試料を PVDF 膜に転写し、ブロッキングを行った。一次抗体には抗 Mfa3、抗 Mfa4 あるいは抗 Mfa5 抗血清を、二次抗体にはヤギ抗ウサギ IgG ペルオキシダーゼ標識抗体を使用した。シグナルの検出には ECL Prime を用いた。</p> <p>6. N 末端アミノ酸配列分析</p> <p>N 末端アミノ酸配列をエドマン分解法により決定した。</p>	

[結果および考察]

1. Mfa4 および Mfa3 タンパク質の成熟化過程

精製 Mfa1 線毛に存在する 30 kDa の成熟型 Mfa4 タンパク質の N 末端アミノ酸配列分析を行った結果、推定アミノ酸配列の第 54 番目から 63 番目までの 10 アミノ酸残基と完全に一致し、直前の第 53 番目がアルギニンであった。JI-1 株 および Rgp (アルギニン特異的プロテアーゼ) が欠失している KDP112 株の全菌体抽出液を、抗 Mfa4 抗血清を用いたウェスタンブロットにより解析した結果、JI-1 株では 30 kDa のバンドが検出された。一方、KDP112 株では 34 kDa のバンドが検出された。これらの結果から、Mfa4 タンパク質は Rgp によりプロセシングされて成熟化することが明らかになった。

精製 Mfa1 線毛に存在する 40 kDa の成熟型 Mfa3 タンパク質の N 末端アミノ酸配列分析を行った結果、推定アミノ酸配列の第 44 番目から 51 番目までの 8 アミノ酸残基と完全に一致し、直前の第 43 番目がアルギニンであった。JI-1 株および KDP112 株の全菌体抽出液を、抗 Mfa3 抗血清を用いたウェスタンブロットにより解析した結果、JI-1 株では 43、42 および 40 kDa のバンドが検出された。一方、KDP112 株では 43 および 42 kDa のバンドのみが検出された。これらの結果から、Mfa3 タンパク質は Rgp によりプロセシングされて成熟化することが明らかになった。

2. Mfa4 タンパク質が Mfa3 タンパク質に与える影響

mfa4 変異株の各画分を、抗 Mfa3 抗血清を用いたウェスタンブロットにより解析した結果、全菌体抽出液において 43 および 42 kDa のバンドは検出されたが、成熟型である 40 kDa のバンドは検出されなかった。精製 Mfa1 線毛においてはいずれのバンドも検出されなかった。これらの結果から、Mfa4 タンパク質は、Mfa3 タンパク質が Rgp によりプロセシングされて成熟化するために必要なだけでなく、Mfa3 タンパク質の線毛へのアセンブリにも必要であることが明らかになった。

3. Mfa4 タンパク質が Mfa5 タンパク質に与える影響

JI-1 株および *mfa4* 変異株の各画分を、抗 Mfa5 抗血清を用いたウェスタンブロットにより解析した結果、JI-1 株では可溶性画分と外膜画分において 130 kDa のバンドのみが、精製 Mfa1 線毛においては 150 および 130 kDa のバンドが検出された。一方、*mfa4* 変異株では可溶性画分において 130 kDa よりも小さい分子量に分解産物と考えられる数本のバンドが、培養上清においては 130 kDa のバンドのみが検出された。精製 Mfa1 線毛においてはいずれのバンドも検出されなかった。これらの結果から、Mfa4 タンパク質は、Mfa5 タンパク質の安定化および高分子化に関与するだけでなく、Mfa5 タンパク質の線毛へのアセンブリにも必要であることが明らかになった。

[結論]

本研究では、Mfa1 線毛の付随成分である Mfa4 タンパク質の成熟化過程および Mfa4 タンパク質が他の付随成分に与える影響を検討した。その結果、以下の結論を得た。

- 1) Mfa4 タンパク質は Rgp によりプロセシングされて成熟化する。
- 2) Mfa4 タンパク質は、Mfa3 タンパク質が Rgp によりプロセシングされて成熟化するために必要である。
- 3) Mfa4 タンパク質は Mfa5 タンパク質の安定化および高分子化に関与する。
- 4) Mfa4 タンパク質は Mfa3 および Mfa5 タンパク質の線毛へのアセンブリに必要である。