

# 春山 晃毅 論文内容の要旨

主 論 文

## Identification of a Gingipain-Sensitive Surface Ligand of *Porphyromonas gingivalis* that Induces TLR2- and TLR4-Independent NF- $\kappa$ B Activation in CHO Cells

TLR2 および TLR4 非依存性に CHO 細胞の NF- $\kappa$ B 活性化を誘導する  
gingipain 感受性 *Porphyromonas gingivalis* 表面リガンドの同定

春山晃毅 吉村篤利 内藤真理子 岸本真実  
庄子幹郎 安孫子宜光 原宜興 中山浩次

Infection and Immunity (印刷中)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻  
(主任指導教員：原宜興教授)

### 緒 言

主要な歯周病原細菌の一つである *Porphyromonas gingivalis* は、菌体表面に病原因子である強力な蛋白分解酵素、gingipain を保有している。私達は以前の報告で、*P. gingivalis* の菌体表面分子が 7.19 レポーター細胞 (CHO 細胞由来 MD-2 突然変異株で、Toll-like receptor (TLR) 2 および TLR4 のシグナル伝達経路を欠く) の NF- $\kappa$ B 活性化を誘導するとともに、野生株では gingipain によって分解されることを見出した。本研究では、*P. gingivalis* gingipain 欠損株を用いて gingipain 感受性 7.19 細胞 NF- $\kappa$ B 活性化因子の精製、同定を試みた。

### 対象と方法

*P. gingivalis* gingipain 欠損株 KDP136 を界面活性剤 Triton-X114 にて処理し、得られた菌体表層画分を陰イオン交換クロマトグラフィーによって分画した。得られた画分のうち、7.19 細胞の NF- $\kappa$ B 活性化能のみられた画分を更にゲル濾過クロマトグラフィーによって分画し、目的の蛋白性因子を含む画分を精製した。精製によって得られた画分中の蛋白を質量分析により解析し、その結果を *P. gingivalis* ATCC33277 株ゲノム配列のデータと照合して、蛋白を同定した。この蛋白をコードする遺伝子が 7.19 細胞の NF- $\kappa$ B 活性化に必須であるかを解析する為、標的遺伝子をアンピシリン耐性遺伝子 *cepA* に置き換えた変異株を作製した。作製した変異株、KDP136 株、そして ATCC33277 野生株の凍結乾燥菌体で 7.19 細胞を刺激し、7.19 細胞 NF- $\kappa$ B 活性化を、そのレポーター遺伝子 CD25 の発現量をフローサイトメトリー法にて測定して判定した。また、同定された蛋白の部分組換え蛋白を大腸菌にて発現、精製しそれを免疫したウサギの血清からポリクローナル抗体を得た。KDP136 株凍結乾燥菌体の NF- $\kappa$ B 活性化作用がこの抗体によって抑制されるか検討した。また、同定された蛋白をコー

ドする遺伝子の ATCC33277 株以外の *P. gingivalis* における存在様式を、ATCC33277、W83、TDC60、TDC117、TDC275、SU63、GAI-7802 の 7 菌種についてサザンブロット法で解析した。

## 結 果

KDP136 株の菌体表面分子の NF- $\kappa$ B 活性画分の精製により、分子量 43kDa、123kDa の 2 つの候補蛋白を得た。MALDI-TOF/MS 解析により、これらの蛋白は *P. gingivalis* ATCC33277 株ゲノム配列中の PGN\_0728 (*pgm6*)、PGN\_0748 にそれぞれコードされていることが明らかとなった。このうち PGN\_0748 にコードされる 123kDa 蛋白はウェスタンブロット解析において、KDP136 株の部分精製標品で免疫したマウスの血清（この血清は KDP136 凍結乾燥菌体による 7.19 細胞 NF- $\kappa$ B 活性化能を著しく抑制する）と反応したことから、この 123kDa 蛋白を *gingipain-sensitive-ligand A* (*GslA*) と命名した。*gslA*、*pgm6*、*pgm6/7* 変異株を KDP136 株より作製し、7.19 細胞 NF- $\kappa$ B 活性化能の変化について解析した（*pgm6/7* 変異株は、*Pgm6* は *Pgm7* とヘテロ三量体を形成するという報告があることより作製した）。それぞれの凍結乾燥菌体で 7.19 細胞を刺激した結果、*pgm6* 変異株、*pgm6/7* 変異株凍結乾燥菌体は、KDP136 株凍結乾燥菌体と同程度に 7.19 細胞 NF- $\kappa$ B 活性化を示したのに対し、*gslA* 変異株凍結乾燥菌体の NF- $\kappa$ B 活性化能は、野生株凍結乾燥菌体と同程度まで減弱していた。更に *gslA* の N 末側 1/3 にコードされる部分組換え蛋白で免疫したウサギ血清から精製した抗体により、KDP136 株による 7.19 細胞 NF- $\kappa$ B 活性化能は部分的に抑制された。また、*gslA* は *P. gingivalis* W83 株ゲノム配列には存在しないことから、*gslA* の存在様式をサザンブロット解析で調査した。その結果、ATCC33277、TDC117、TDC275、SU63 の 4 種のゲノム DNA に *gslA* の存在が認められたが、W83、TDC60、GAI-7802 の 3 種では認められなかった。

## 考 察

これらの結果は、*GslA* が CHO 細胞における TLR2、TLR4 非依存性 NF- $\kappa$ B 活性化の主要な因子の 1 つであることを示すものである。また、*gslA* 遺伝子の菌株間の存在様式の違いは、菌株の毒性に影響を与えているかもしれない。なお、*GslA* 蛋白はデータベース上では類似蛋白が存在せず、生理学的な機能も未知な蛋白である。これらの点と歯周病との関わりを解明すべく更なる解析が今後必要である。

（備考）※日本語に限る。2000 字以内で記述。A4 版。