

雪竹英治 論文内容の要旨

主 論 文

Effects of Non-Iron Metalloporphyrins on Growth and Gene Expression of
Porphyromonas gingivalis

(ポルフィロモナス・ジンジバリスの増殖および遺伝子発現への
非鉄金属ポルフィリンの影響)

雪竹英治、内藤真理子、佐藤啓子、庄子幹郎、大原直也、吉村満美子、
坂井詠子、中山浩次

(Microbiology and Immunology in press)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員：中山浩次教授)

緒 言

口腔偏性嫌気性細菌 *Porphyromonas gingivalis* は慢性歯周炎の最も重要な原因菌の一つと考えられている。国内で分離される本菌は依然として化学療法剤に対して感受性を示すが、海外においては各種の抗生物質に抵抗性を示す菌株の出現が報告されてきていることからこれまでにない抗菌作用をもつ化学物質の探索が求められる。*P. gingivalis* の発育にはヘムを必要とする。ヘムはプロトポルフィリン IX 骨格内に鉄を配位している物質であるが、鉄の代わりにインジウムを配位するプロトポルフィリン IX (In-PPIX) やガリウムを配位するプロトポルフィリン IX (Ga-PPIX) は *Yersinia enterocolitica* や黄色ブドウ球菌などの病原細菌に対して抗菌活性があること、またその取込みにヘム取込み機構を利用していることが報告されている。そこで本研究では In-PPIX および Ga-PPIX の *P. gingivalis* に対する抗菌活性を測定するとともに、In-PPIX の菌体内取込み機構をヘム取込み機構の変異株を用いて検討した。また In-PPIX の *P. gingivalis* の遺伝子発現への影響および生体細胞への傷害性について検討した。

対象と方法

供試菌：*P. gingivalis* ATCC 33277 (野生株) と *ihfA*, *ihfB*, *hmuR* および *tlr* の各変異株

供試細胞：ヒト口腔癌細胞 (HSC2) と健常人末梢血単核細胞 (PBMC) 由来モノサイト

検討項目：

1) In-PPIX と Ga-PPIX の *P. gingivalis* 増殖への影響：*P. gingivalis* 野生株をヘミン含有 BHI 液体培地で一晩嫌気培養し、In-PPIX および Ga-PPIX をいろいろな濃度

で添加したヘミン含有およびヘミン非含有 BHI 液体培地に一夜培養液を濃度 2 % で加え、嫌氣的に培養し、最小発育阻止濃度 (MIC) を決定した。

2) In-PPIX の *P. gingivalis* 変異株の増殖への影響 : *P. gingivalis* は少なくとも 3 つのヘム取込み機構 (Iht 経路、Hmu 経路および Tlr 経路) を有している。In-PPIX の取込みがどのヘム取込み機構に依存しているのかを調べるために *ihtA*, *ihtB*, *hmuR* および *tlr* の変異株を作製し、それらの変異株に対する In-PPIX の MIC を決定した。

3) In-PPIX の取込みに関わるタンパク質の局在解析 : In-PPIX の取込みに関わる候補タンパク質 IhtA の組換えタンパク質を大腸菌で発現し、精製した。精製した組換えタンパク質をマウスに免疫し抗体を作製した。この抗体を用いたイムノブロット法により IhtA タンパク質の細菌細胞内局在を解析した。

4) *P. gingivalis* の遺伝子発現への In-PPIX の影響 : In-PPIX 添加および非添加ヘミン含有 BHI 液体培地で培養した *P. gingivalis* (野生株) より全 RNA を抽出し cDNA を合成した。タイリングマイクロアレイ解析にて In-PPIX 添加群と非添加群の間で転写量の異なる遺伝子を同定した。

5) In-PPIX の生体細胞への傷害性 : HSC2 細胞と PBMC 由来モノサイトに In-PPIX をいろいろな濃度で添加し、24 時間培養後の生細胞数を Cell Counting Kit を用いて測定した。

結 果

1) In-PPIX と Ga-PPIX はヘミン含有および非含有の両方の培養条件下とも *P. gingivalis* の増殖を抑制した。また変異株の中で *ihtA* および *ihtB* 変異株は両培養条件下とも野生株と比較して In-PPIX に対して抵抗性を示した。一方 *hmuR* と *tlr* の変異株は野生株とほぼ同様な In-PPIX 感受性を示した。*ihtB* 変異株からの *ihtB* 復帰株では In-PPIX 感受性の部分的な回復がみられた。

2) IhtA 抗体を用いたイムノブロット法により IhtA タンパク質は外膜に局在することが示唆された。

3) タイリングマイクロアレイ解析の結果、Clp ファミリータンパク質の ClpB および ClpC の遺伝子とリボヌクレオチド還元システムに関与するタンパク質の遺伝子の発現が In-PPIX 添加群で有意に上昇した。

4) In-PPIX の PBMC 由来モノサイトに対する MIC は 34 μ M であった。

考 察

本研究により In-PPIX と Ga-PPIX は *P. gingivalis* の増殖を効果的に抑制する作用があることがわかった。またヘム取込み機構の変異株に対する In-PPIX の MIC から In-PPIX は Iht 経路のヘム取込み機構にて菌体内に取込まれることが示唆された。In-PPIX 処理により *P. gingivalis* 内のタンパク質の品質管理に関わる遺伝子とヌクレオチド代謝に関わる遺伝子の発現が上昇することから In-PPIX による増殖抑制には菌体内タンパク質の傷害やヌクレオチド代謝の不全化が関係している可能性が示唆された。これらのことから In-PPIX は *P. gingivalis* のヘム取込み機構やヌクレオチド代謝の研究に有用な試薬であると思われる。また PBMC 由来モノサイトに対する In-PPIX の MIC は *P. gingivalis* に対する MIC の 20 倍程度であることから抗菌剤としての使用にはさらなる研究が必要と思われる。