

論文審査の要旨および担当者

愛知学院大学

報告番号	① 乙 第 号	論文提出者名	佐藤 満成
論文審査 委員氏名	主査 武部 純 副査 吉村文信 三谷章雄		
論文題名	<i>Porphyromonas gingivalis</i> における短鎖脂 肪酸の産生機構に関する 3 種の CoA 転移酵素 の分子生物学的研究		

インターネットの利用による公表用

本研究は、歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の短鎖脂肪酸産生機構に関与する補酵素 A (CoA) 転移酵素と推測される遺伝子を同定し、その機能を検討したものである。

超高齢社会を迎えた現代において、高齢者の健康増進における歯科医療の重要性が高まっている。その中でも、部分欠損歯列修復に伴う口腔内のメンテナンスがより必要になってきている。しかし、高齢期は身体機能全般の変調を伴うことが多く、口腔内環境の悪化を招き易く、支台歯における齶蝕や歯周病のリスクが増大する。特に歯周病は、8020 推進財団による永久歯の抜歯原因調査によれば、抜歯原因の 42% を占め、歯を失う最も大きな原因とされている。この疾患は細菌の混合感染により引き起こされる慢性炎症性疾患であり、歯肉の炎症や歯槽骨の破壊を引き起こすだけでなく、様々な重篤な全身疾患に関与している。

P. gingivalis は慢性歯周炎罹患患者から高頻度に検出され、歯周病の発症と進行に関与している。同菌が多量に分泌する酪酸およびプロピオン酸は歯周組織に浸潤し、宿主の免疫機構を妨げる。歯肉溝内の酪酸やプロピオン酸濃度と歯周病の重篤度との間には強い相関性が認められる。加えて、酪酸は歯肉上皮細胞や免疫細胞にアポトーシスを惹起する、口腔内において最も有害性を示す代謝産物のひとつである。同菌の酪酸産生機構には butyryl-CoA/acetate CoA 転移酵素が関与すると報告されている。また、PGN_1171 遺伝子がコードするタンパク質が酪酸産生機構の最終反応に関

与すると予測されている。

そこで申請者は、本研究において PGN_1171 遺伝子、CoA 転移酵素である *Roseburia hominis* RHOM_13820 に対して高い相同性を示す PGN_0725、PGN_1341 および PGN_1888 遺伝子に着目し、遺伝子欠損株の作製、増殖曲線、ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた培養上清中の短鎖脂肪酸の測定、組換えタンパク質の精製および粗酵素の抽出、比色法による酵素学的性質の検討、発色基質を用いたプロテアーゼ活性の比較を行った。

その結果、以下の所見を得たとしている。

全ての変異株において、培養上清中の酪酸およびプロピオン酸濃度が野生株と比較して低下しており、酪酸は PGN_0725 遺伝子を、プロピオン酸は PGN_1888 遺伝子を欠損する株で著明に減少していた。精製酵素 PGN_0725、PGN_1341 および PGN_1888 に butyryl-CoA/acetate CoA 転移酵素活性が確認され、その動力学パラメーターを比較すると、PGN_0725 が他のものより強い活性を示していた。また、PGN_0725 および PGN_1888 に propionyl-CoA/acetate CoA 転移酵素活性が認められ、同様に動力学パラメーターを比較すると PGN_1888 がより強い活性を示していた。一方で、PGN_1171 に両基質に対する活性は認められなかった。加えて、いずれの精製酵素も butyryl-CoA および propionyl-CoA 以外の CoA 誘導体に活性を示していなかった。各菌株から抽出した粗酵素の butyryl-CoA/acetate CoA 転移酵素活性を測定すると、PGN_0725、

PGN_1341 および PGN_1888 いずれかの遺伝子を欠損する株で有意な低下が認められ、特に PGN_0725 遺伝子を欠損する株で著明な低下が見られた。一方で、propionyl-CoA/acetate CoA 転移酵素活性は、PGN_0725 および PGN_1888 いずれかの遺伝子を欠損する株で有意に低下しており、PGN_1888 遺伝子を欠損する株で著明に低下していた。以上の結果から、PGN_0725、PGN_1341 および PGN_1888 のいずれも酪酸産生に寄与する CoA 転移酵素であり、PGN_0725 が最も強く寄与していると考えられていた。同様に、PGN_0725、PGN_1888 はプロピオン酸産生に寄与する CoA 転移酵素であり、PGN_1888 が最も強く寄与すると考えられる。全ての変異株において、培養上清のイソ酪酸とイソ吉草酸の濃度もまた有意に減少していたことから、未だ解明されていないイソ酪酸とイソ吉草酸の産生経路の中間産物が酪酸産生経路のものと共通していると考えられる。また、PGN_0725、PGN_1341、PGN_1888 遺伝子三重変異株から抽出した粗酵素の CoA 転移酵素活性は野生株の 20% 程度であったことから、更なる CoA 転移酵素の存在することが示唆された。

全ての変異株において、菌体における Arg-ジンジパインと Lys-ジンジパインの活性が野生株と比較して、有意に低下していた。加えて、培養上清中の酪酸濃度と菌体のジンジパイン活性との間に有意な正の相関が認められた。この結果から、培養上清中の酪酸が菌体のジンジパイン活性に対して正の調節因子として作用すると推測される。

(論文審査の要旨)

No. 4

(2000字以内のこと)

愛知学院大学

このように本研究は、*P. gingivalis* の病原因子である短鎖脂肪酸産生機構の分子的解明およびジンジパインの活性に対する新たな知見を提供したものであり、歯科補綴学、微生物学、歯科保存学ならびに関連諸学科に寄与するところが大きい。よって、本論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと判定した。