

氏名	小野沢 諭
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	第177号
学位授与の日付	2014年3月6日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当(博士課程修了)
学位論文題目	Role of ECF sigma factors in biofilm formation of <i>Porphyromonas gingivalis</i> (歯周病原細菌 <i>Porphyromonas gingivalis</i> のバイオフィルム形成における ECF シグマ因子の役割)
指導教員	(主) 教授 長谷川 博雅 (副) 教授 川上 敏行 (副) 准教授 中野 敬介
論文審査委員	主査 教授 吉成 伸夫 副査 教授 高橋 直之 副査 教授 大須賀 直人

学位論文の内容の要旨

【背景と目的】

歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (以下 *P. gingivalis*) は偏性嫌気性グラム陰性桿菌であり、歯周ポケット底部の嫌気度の高い部位にバイオフィルムを形成、感染し、病原性を発現する。しかし、口腔内は外界に開かれた環境で、温度、酸素、pH、栄養状態、他の細菌や宿主細胞など周囲環境からの影響を受けやすい。よって、*P. gingivalis* は、周囲環境ストレスに対して何らかの回避機構を備えていることが予測される。

そこで本研究では、周囲環境ストレスを回避するうえで重要な ECF(extra cytoplasmic function)シグマ因子に注目し、*P. gingivalis* の ECF シグマ因子と周囲環境ストレス回避機構としてのバイオフィルム形成との関連性について検討した。

【材料と方法】

用いた細菌株は *P. gingivalis* ATCC33277 と、それを親株とした ECF シグマ因子変異株、および相補株であった。まず 5 種類の ECF シグマ因子遺伝子のクローニングを行い、その後ベクターに組み込み、親株に導入し、ECF シグマ因子変異株を得た。また、PGN_0274 と PGN_1740 については、両遺伝子とその周辺部をベクターに組み込み、各々の変異株に導入して相補株を得た。次に、デジタル比色計にて増殖速度を測定した。バイオフィルムの形成については、濁度を揃え、クリスタルバイオレット染色後、その吸光度を測定した。

【結果】

- (1) 親株と比較し、PGN_1740 変異株が著明に増殖速度の低い値を示した。
- (2) 野生株と比較し、PGN_0274 変異株、PGN_0319 変異株、PGN_1740 変異株はバイオフィルム形成能の有意な増加を認めた。中でも、PGN_0274 と PGN_1740 変異株にて著明な増加を認めた。
- (3) PGN_0274 と PGN_1740 変異株におけるバイオフィルム形成量の増加は、それぞれの相補株にて野生株と同程度に回復した。

【考察と結論】

PGN_0274 と PGN_1740 は, *P. gingivalis* のバイオフィルム形成に関わるタンパク質の遺伝子発現を調節している可能性が示唆された. よって, これらの ECF シグマ因子を標的とした抗菌薬を創薬することが実現すれば, 選択毒性の高い優れた薬剤となることが示唆された.

学位論文審査の結果の要旨

本論文は, *P. gingivalis* の周囲環境ストレス回避機構としてのバイオフィルム形成に関連する遺伝子として, ECF シグマ因子に注目し検討したものである. なお, ECF シグマ因子については大腸菌においてはその存在が確認され, 性状が解析されているが, 歯周病原細菌の ECF シグマ因子に関する報告はわずかしかない.

本研究では, 材料として, バイオフィルム形成能をもつ *P. gingivalis* ATCC33277 株, ECF シグマ因子変異株, 相補株を作製している. タンパク発現を阻止したノックアウト的な変異株群, 遺伝子変異が原因であることを証明するためのリカバリー的な相補株を作製しており, 研究を遂行するための群分けは論理的である. また, ECF シグマ因子遺伝子のクローニング, ベクター構築, エレクトロポレーターによる導入による変異株, 相補株の作製, 増殖速度測定法, バイオフィルム形成量の測定法の研究手技は妥当なものである. その結果, クローニングした 2 つの ECF シグマ因子遺伝子においてバイオフィルム形成に関わるタンパク質の遺伝子発現を調節している可能性が示唆された.

本論文は簡潔, 明瞭で, 得られた結果は新規の知見である. 特に本研究で作製された PGN_0274 と PGN_1740 の ECF シグマ因子を標的とした抗菌薬を創薬することが実現すれば, 選択毒性の高い優れた薬剤となる可能性を示唆する優れた論文である.

以上から, 本審査会は全員一致してこの申請論文は博士(歯学)の学位論文に値すると判断した.

最終試験の結果の要旨

申請者の学位申請論文「*Porphyromonas gingivalis* のバイオフィルム形成における ECF シグマ因子の役割」を中心に, 本研究に関する基礎知識, 論文内容に関わる事項, および研究成果の今後の展開について口頭による試験を行った.

主な質問事項は次の通りである.

- (1)野生株と比較し PGN_1740 と PGN_0274 はどのように変異しているのか, アミノ酸変異を具体的に述べてください.
- (2)相補株とはどのようなものか, 述べてください. 塩基配列を少し変えた相補株をコントロールとしたのですか.
- (3)増殖を調べたのはなぜですか. また, PGN_1740 の増殖抑制効果とバイオフィルム形成促進効果についての関連性を述べてください.
- (4)バイオフィルム形成能の測定に使用したクリスタルバイオレット染色の機序を説明してください.
- (5)*P. gingivalis* 単独培養が, in vivo を想定したバイオフィルム形成モデルといえるのですか.

- (6)ECF シグマ因子が調節する代表的な遺伝子を挙げて、その作用を述べてください。
(7)PGN_1740 は *P. gingivalis* の酸化ストレス回避機構にどのように関わっているのですか。
(8)本研究の今後の展開について述べてください。

これらのすべての質問項目に対して、申請者からは明確かつ正確な回答が得られた。
また、申請者は本研究を遂行するために必要な実験操作に熟練し、実験より得られた結果に対して適切な考察が行える十分な専門的知識を有していた。

以上より、本審査会は申請者が博士（歯学）として十分な学力及び見識を有するものと認め、最終試験を合格と判断した。