

氏名	はら が ひろし 原 賀 裕
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	岩医大院歯博第243号
学位授与の日付	平成21年3月11日
学位論文題目	<i>Porphyromonas endodontalis</i> が産生する新規のアスパラギン酸特異的ジペプチジルペプチダーゼの解析

## 論文内容の要旨

### I 研究目的

*Porphyromonas endodontalis* は、1984年、van Winkelhoffらの研究グループによりヒトの歯根膿瘍病巣部から分離・同定された細菌で、特異的に急性症状をともなう感染根管/根尖性歯周炎から分離されることから、根尖性歯周炎の主要な原因菌の一つと考えられている。しかし、慢性(成人性)歯周炎の原因菌である *P. gingivalis* とは異なり、*P. endodontalis* の病原特異性と直接的に関連する病原因子の解明はほとんど進んでいない。我々はこれまでに *P. endodontalis* の病原因子について検討を行ってきており、*P. endodontalis* が産生するプロテアーゼの活性スペクトラムが *P. gingivalis* のそれとは大きく異なることを報告してきた。本研究では、これまでの研究成果をもとに、*P. endodontalis* が特異的に産生するプロテアーゼの同定を試みた。

### II 研究方法

*P. endodontalis* ATCC 35406 株を嫌気条件下で透析膜上培養し、得られた菌体を PBS で回収後遠心し、その上清を *P. endodontalis* 菌体外粗プロテアーゼ画分とした。さらに、DEAE-Sephacel クロマトグラフィーにより、*P. endodontalis* DEAE 精製プロテアーゼ画分を調製した。プロテアーゼ活性は、MCA ペプチド合成基質に対する加水分解活性から測定した。また、プロテアーゼ阻害剤の効果は、プロテアーゼ阻害剤による前処理後のプロテアーゼ活性の変動から検討した。MALDI-TOF MS 分析では、neuromedin B および変異型合成 neuromedin B (1 アミノ酸を Asp に置換した合成ペプチド; Asp<sub>1</sub>-, Asp<sub>2</sub>-, Asp<sub>3</sub> および Asp<sub>5</sub>-neuromedin B) を基質として *P. endodontalis* DEAE 精製プロテアーゼ画分を添加し、反応後のペプチド基質断片の分子量を Voyager DE-PRO を用いて測定した。

### III 研究成績

1. *P. endodontalis* 粗プロテアーゼ画分の基質特異性の検討では、アラニン特異的プロテアーゼは *P. gingivalis* で報告されているジペプチジルペプチダーゼ VII 類似の酵素で、アスパラギン酸特異的プロテアーゼ活性はジペプチド X-Asp を真の基質とする新規のジペプチジルペプチダーゼである可能性が強く示唆された。
2. *P. endodontalis* 粗プロテアーゼ画分の部分精製では、アスパラギン酸特異的プロテアーゼ活性とアラニン特異的プロテアーゼ活性を示すピークが認められ、前者のフラクションを *P. endodontalis* DEAE 精製プロテアーゼ画分として以下の実験に供した。
3. *P. endodontalis* DEAE 精製プロテアーゼ画分のアスパラギン酸特異的プロテアーゼ活性に対する種々のプロテアーゼ阻害剤の効果を検討した結果、EDTA では抑制されなかったが、PMSF, TLCK, TPCK, leupeptin および E-64 で抑制されることが明らかとなった。
4. *P. endodontalis* DEAE 精製プロテアーゼ画分中のアスパラギン酸特異的プロテアーゼの飛行時間型質量分析による解析では、野生型 neuromedin B (Asn<sub>2</sub>) を基質とした場合には弱い活性が、Asp<sub>2</sub>-neuromedin B では強い分解活性が認められた。また、Asp<sub>1</sub>-, Asp<sub>3</sub>- および Asp<sub>5</sub>-neuromedin B では活性は認められなかった。

#### IV 考察及び結論

*P. endodontalis* は菌体外画分中に、*P. gingivalis* とは異なる複数のプロテアーゼを産生することが明らかとなり、それらがヒト根尖性歯周炎における *P. endodontalis* の病原特異性を担う重要なビルレンス因子である可能性が強く示唆された。さらに、*P. endodontalis* の主要プロテアーゼの一つとして、これまでに報告のない新規のアスパラギン酸特異的ジペプチジルペプチダーゼが存在することが明らかとなった。

#### 論文審査の結果の要旨

##### 論文審査担当者

主査 教授 木村重信 (口腔微生物学講座)

副査 教授 石崎明 (口腔生化学講座)

副査 教授 久保田稔 (歯科保存学第一講座)

*Porphyromonas endodontalis* はヒトの根尖性歯周炎、特に強い臨床症状をともなう根尖性歯周炎の原因細菌として挙げられているが、その病原特異性を担うビルレンス因子についてはほとんど解明が進んでいない。本研究で著者は *P. endodontalis* のビルレンス因子として本菌の産生するプロテアーゼに注目した。それは、慢性（成人性）歯周炎の病原菌である *P. gingivalis* 同様、糖非発酵性である *P. endodontalis* にとって、プロテアーゼは宿主由来のタンパク質をペプチドやアミノ酸に分解し、これらを菌体内に取り込んで栄養源として利用するための重要な因子であり、同時に、本菌の病原特異性を担うビルレンス因子となるとの考えに基づくものである。著者はまず、培地由来の夾雑物をできる限り排除する培養手法により菌体外プロテアーゼ画分を調製し、*P. gingivalis* のそれと比較しながら、（その時点で）入手可能なすべての合成ペプチド基質を用いて *P. endodontalis* 特異的プロテアーゼの探索を行った。その結果、少なくとも2つの *P. endodontalis* 特異的プロテアーゼの存在が推定され、DEAE-Sepharose クロマトグラフィーにより部分精製を行った。そのうち一つはアスパラギン酸特異的ジペプチジルペプチダーゼと推定され、これは本菌のみならず他菌種においても報告のないプロテアーゼであることから、著者はこの画分について、さらにプロテアーゼ阻害剤による抑制効果の特異性、ならびに neuromedin B およびその変異型合成ペプチドを用いた MALDI-TOF MS 分析による検討を進め、*P. endodontalis* の菌体外画分中に新規のアスパラギン酸特異的ジペプチジルペプチダーゼが存在することを明確に示した。

本研究はこれまでに報告のない *P. endodontalis* の新規のアスパラギン酸特異的ジペプチジルペプチダーゼを同定したもので、得られた知見は *P. endodontalis* のビルレンス因子および病原特異性の解明に寄与するばかりか、根尖性歯周炎の病理発症機序の解明につながるものと期待されることから、学位に値するものと評価した。

#### 試験・試問の結果の要旨

本研究の目的、概要について説明がなされ、研究結果および関連事項についての試問を行った結果、的確な解答が得られた。また、今後の研究にも意欲を示すとともに幅広い経験と知識を有し後輩への指導能力も備えていることから、学位に値する十分な学識と研究能力を有するものと判断した。