

氏名	いまむらたかこ 今村隆子
学位の種類	博士(歯学)
学位授与番号	岩医大院歯博第262号
学位授与の日付	平成23年3月10日
学位論文題目	Production of Indole from L-Tryptophan and Effects of These Compounds on Biofilm Formation by <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586 — <i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586 におけるトリプトファンからのインドール産生能とそれらのバイオフィーム形成への影響—

論文内容の要旨

I 研究目的

インドールは細菌のトリプトファン加水分解酵素の作用でトリプトファンを基質に産生される物質で大腸菌などにおいて、バイオフィーム形成に影響する因子のひとつであることが示唆されている。しかし、これまでのところ、口腔細菌により産生されるインドールに関しては、口臭の原因の一つとなることが示されているものの、その産生機構、バイオフィーム形成能との関連性については明らかにされていない。本研究では歯周病原性細菌のひとつである *Fusobacterium nucleatum* のトリプトファン分解酵素をコードする遺伝子 *tnaA* を同定し、その遺伝子の発現ならびに TnaA の酵素活性について他の歯周病原性細菌である *Porphyromonas gingivalis* のそれと比較検討した。さらに、*F. nucleatum* のバイオフィーム形成に関わるインドールの役割についても検討した。

II 研究方法

E. coli のトリプトファナーゼをコードする *tnaA* 遺伝子を用いて *F. nucleatum* ATCC 25586 株の全塩基配列と同一性検索を行った。転写単位や転写開始地点は RT-PCR 法および RACE 法により決定した。*F. nucleatum* における精製トリプトファナーゼを大腸菌組み換えタンパクとして抽出し、酵素学的性質を明らかにした。また、HPLC により、精製トリプトファナーゼがインドール産生能を有することを確認した。クリスタルバイオレット法を用いてトリプトファンとインドールによるバイオフィーム形成量を定量し、共焦点レーザー顕微鏡によりバイオフィームの厚みを確認した。また、Kovac 変法によりトリプトファンを添加した時の培養上清中のインドール産生量を定量した。さらに、real-time PCR 法により *tnaA* の発現量を検討した。

III 研究成績

E. coli の *tnaA* と同一性を示した *F. nucleatum* の *fn1943* のサイズは 1,635 bp であり、アミノ酸配列は *E. coli* および *P. gingivalis* とそれぞれ 28% および 34% の同一性を示した。

F. nucleatum の *tnaA* (*fn1943*) 領域において転写単位を検討したところ、下流の遺伝子 *fn1944* とオペロン構造になっており、転写開始地点は開始コドン上流 68 bp および 153 bp の二か所存在した。また、転写開始地点上流 -10 と -35 の領域に共通の配列が存在し、開始コドン上流に SD (シャインダールガルノ) 配列が認められた。*E. coli* では cAMP が発現に関与していると報告があるが、*F. nucleatum* 由来 *tnaA* 領域には cAMP 結合領域は存在せず、*E. coli* および *P. gingivalis* と発現様式は異なることが示唆された。

Fn1943 の大腸菌の組み換えタンパク質を精製し、SDS-PAGE で確認すると 61 kDa であり、予測された分子量であった。HPLC により *fn1943* がトリプトファナーゼをコードする遺伝子 *tnaA* であることを確認した。酵素学的性質を明らかにしたところ、*E. coli* および *P. gingivalis* と比較して k_{cat}/K_m は低い値だったが、類似の性質を示した。

real-time PCR 法により、4, 8, 12, 24 時間培養の各地点で *F. nucleatum* 由来 *tnaA* の発現量を比較すると、8 時間培養および 12 時間培養では 4 時間培養 (early log phase) の発現量と比較して、それぞれ、12 倍および 9.7 倍

多く発現し、24 時間培養 (stationary phase) では 4 時間培養 (early log phase) の発現量と比較してわずか 5% しか発現しなかった。

トリプトファンおよびインドール添加後の *F. nucleatum* ATCC 25586 株のバイオフィーム形成量を検討すると、濃度に依存して増加することが明らかになった。トリプトファン添加後の、培養上清中のインドール産生量も濃度に依存して増加した。また、6 mM トリプトファン添加後の培養上清中のインドール産生量はおおよそ 0.2 mM であった。ところが、6 mM トリプトファン添加後のバイオフィーム形成量は、0.2 mM インドール添加後のバイオフィーム形成量よりも明らかに増加していた。さらに、トリプトファンおよびインドール添加後の *F. nucleatum* 由来 *tnaA* の発現量を検討したところ、トリプトファン存在下において、0, 1, 3, 6 mM で変化が認められなかったがインドール存在下においては、1 mM までは変化が認められないが 4 mM では約 43% 減少することが明らかになった。

IV 考察及び結論

F. nucleatum ATCC 25586 株において、インドールおよびトリプトファンはシグナル分子としてバイオフィーム形成に関与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 加藤 裕久 (口腔病因病態制御学講座 歯科薬理学分野)

副査 教授 木村 重信 (口腔病因病態制御学講座 口腔微生物学免疫学分野)

副査 教授 石崎 明 (口腔機能構造学講座 口腔生化学遺伝学分野)

当論文は、歯周病の病原細菌の一つとされる *Fusobacterium nucleatum* を用いてインドール産生とバイオフィーム形成能を調べたものである。インドールは、従来、口腔細菌において口臭の原因の一つであることが示唆されているが、それ以降の詳しい報告は少ない。

インドールはトリプトファン分解酵素 (TnaA) により産生されるが、著書らは *E. coli* の *tnaA* 遺伝子情報を基に、*F. nucleatum* ATCC 25586 株から相同性のある *tnaA* 遺伝子を単離している。なお、その後当該遺伝子の産物は、本論文で大腸菌組換え蛋白として抽出精製され、トリプトファンからインドールが産生されることが HPLC により確認されている。

また、*F. nucleatum* の *tnaA* 遺伝子の周辺領域において転写単位や転写開始点が調べられ、当該遺伝子の下流にある遺伝子 (*fn1944*) とオペロン構造をなすこと、転写開始点が 2 か所存在し、それぞれにプロモーター相当領域があること、翻訳部分上流には SD (シャインダール) 配列が認められることが判明している。なお、精製組換え蛋白については酵素学的性質がさらに調べられ、 K_m 値や k_{cat} 値が調べられている。

トリプトファンやインドールを添加した後、*F. nucleatum* ATCC 25586 株を観察すると、浮遊細胞数は添加により変化がみられないが、壁面に付着したいわゆるバイオフィーム形成層は添加量に依存して増加することがわかった。トリプトファン添加の場合は培養上清中のインドール量も濃度依存的に上昇した。これらの結果が経時的、濃度依存的に解析されている。

これらのことより、本菌は *tnaA* 遺伝子を有し、インドール産生を行うことが明らかとなり、産生されたインドールはシグナル分子としてバイオフィーム形成に関与することが示唆された。

試験・試問の結果の要旨

本論文の詳細について、審査員から、個々のデータ、その背景や実験系の妥当性について、厳正な質問がおこなわれた。申請者はそれらの事柄に明確に答えた。また今後の展開の可能性について適切な判断と学力を有していると考えられた。その結果、論文の内容についても、また本人の学力に関しても学位にふさわしいと認めるにいたった。