

## 論文要旨等報告書

氏	山部 ころ
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3 8 2 4 号
学位授与の日付	平成 2 1 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科病態制御科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	Methanobrevibacter oralisが保有するシャペロニン分子の同定と抗原性の解析

論文審査委員 教授 滝川 正春 准教授 苔口 進 教授 高柴 正悟

### 学位論文内容の要旨

#### 【緒言】

古細菌は真核生物とも真正細菌とも異なる第3の生物グループとして分類され、ヒトの腸や口腔内にも広く分布している。これまで、古細菌は病原微生物として、疾患に関与することはないと考えられていた。ところが近年、重度な歯周病変部ほど、検出される古細菌数の多いことが報告され、古細菌が歯周病の病態に関与している事が示唆された (Lepp *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci., 2004)。著者の研究グループは、この報告に基づき、日本人歯周病患者における古細菌の分布状態を調べた。その結果、日本人歯周病患者においても *Methanobrevibacter oralis* を主体とした古細菌が歯周ポケットの深い部位から高頻度に検出されること、そして *M. oralis* の菌体成分には、歯周病患者血清と反応する抗原分子の存在することが明らかとなった (Yamabe *et al.*, FEMS Microbiol. Lett., 2008)。

シャペロニン (Cpn) は蛋白質の高次構造形成を補助する分子であり、グループ I とグループ II に大別される。そのアミノ酸配列は同一グループ内では種を超えて保存されており、細菌種はグループ I を、古細菌種は主にグループ II を、そしてヒトはグループ I と II の両 Cpn を保有している。細菌の Cpn は本来の機能とは別に、抗原性が高く、ヒト・グループ I Cpn の交差反応抗原であることが知られている。リウマチの様な自己免疫疾患患者では、両 Cpn 分子に対する自己免疫応答が惹起されているが、グループ I Cpn に対する自己免疫応答は、細菌 Cpn に対する交差反応によって惹起されると考えられている。しかしながら、グループ II Cpn に対する自己免疫応答の発症機序に関する報告は殆どない。これはグループ II Cpn を保有している感染性微生物 (古細菌) の報告がなく、感染症に起因する交差反応から、自己免疫応答の発症機序を説明することができなかったためと推察できる。そこで、本研究では、*M. oralis* が歯周病の病原因子であり、その Cpn 分子がヒト・グループ II Cpn (CCT) の交差反応抗原であるという仮説を提唱し、*M. oralis* が保有する Cpn 分子を同定し、その抗原性について解析することを目的とした。

#### 【材料および方法】

1. 供試菌：*M. oralis* DSM 7256 を、DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany) から購入し、使用した。

2. Cpn 遺伝子のクローニング： *M. oralis* のゲノム DNA を鋳型とし、PCR 法ならびに Genome Walker 法によって Cpn 遺伝子断片を増幅した。増幅した遺伝子断片は TA クローニングベクターに組み込み、塩基配列を決定した。なお、PCR のプライマーは Cpn 遺伝子の保存配列、ならびに近縁種古細菌の塩基配列をもとに、group I と group II Cpn のそれぞれに対して設計した。
3. 組み換え蛋白質 (rCpn) の精製： pET Directional TOPO<sup>®</sup> Expression Kit (Invitrogen) ならびに Ni-NTA Fast Start Kit (Qiagen) を用いて rCpn を構築し、精製した。
4. *M. oralis* Cpn の抗原性の解析： rCpn と歯周病患者血清 (IgG 抗体) の反応性、rCpn と抗ヒト CCT 抗体との反応性、そして *M. oralis* の全菌体抗原と抗ヒト CCT 抗体との反応を Western blot 法で調べた。なお、ヒト CCT は 8 種類のサブユニット蛋白質 (CCT1-8) で構成されるが、本実験には抗 CCT1, CCT3, CCT5, CCT6, CCT8 ポリクロナール抗体を使用した。

### 【結果】

1. *M. oralis* から 2 種類の group II Cpn (Cpn-1, Cpn-2) 遺伝子をクローニングし、塩基配列を明らかにした。Cpn-1 ならびに Cpn-2 遺伝子は全長がそれぞれ 1,641 bp (546 アミノ酸) と 1,614 bp (537 アミノ酸) であり、両遺伝子ともに Cpn に特異的な ATP binding motif を含んでいた。また、塩基配列から推測される *M. oralis* Cpn のアミノ酸配列は、ヒト各 CCT サブユニット蛋白質と 28.8~40.0 % の相同性を示した。*M. oralis* から group I Cpn 遺伝子は検出されなかった。
2. Cpn-1 と Cpn-2 それぞれの組み換え蛋白質 (rCpn-1, rCpn-2) を構築・精製し、歯周病患者血清ならびに抗 CCT 抗体との反応に使用した。rCpn-1 に対しては 36 名中 30 名分の歯周病患者血清が反応性を示し、rCpn-2 に対しては 36 人中、29 名が反応性を示した。
3. rCpn と抗ヒト CCT 抗体の反応性を調べた結果では、抗ヒト CCT3 抗体、そして抗 CCT8 抗体が rCpn-1 に対して反応性を示した。これに対して rCpn-2 に対してはいずれの抗体も反応性を示さなかった。
4. *M. oralis* 全菌体抗原と抗ヒト CCT 抗体との反応性を調べた結果では、抗 CCT1, CCT3, CCT6, CCT8 抗体が *M. oralis* の分子量 60 kDa 付近の抗原バンドに反応性を示した。

### 【考察】

古細菌が歯周病の病原因子のひとつであるかどうかについては議論の余地を残しているが、患者血清の反応から、歯周病患者は古細菌 (*M. oralis*) の Cpn に反応する IgG 抗体を保有していることが明らかとなった。さらに、*M. oralis* の Cpn はヒト Cpn (CCT) と交差反応する可能性が示された。これらの結果は、歯周炎局所において、*M. oralis* に対する免疫応答が惹起されていることを示唆するものであり、古細菌の Cpn に対する免疫応答は、その交差反応性からヒト CCT に対する自己免疫応答のトリガーとなる可能性を示唆するものと考えられる。

### 【結論】

*M. oralis* の保有する 2 種類のグループ II Cpn 分子を同定した。*M. oralis* の Cpn は抗原性の高い分子であり、ヒト CCT の交差反応抗原として、歯周局所に存在し、自己免疫応答を誘導することで、歯周病の病態を修飾している可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

古細菌は、細菌とも真核生物とも異なる第三のグループとして分類される微生物であり、自然界そして動植物の生体内に広く分布している。しかしながら、これまでのところ病原性を示す古細菌種の報告はない。

歯周病は、歯肉縁下プラーク中に存在する複数の口腔微生物種の感染（混合感染）によって発症する炎症性疾患である。近年、歯周病の重度な病変部位から古細菌の一種である *Methanobrevibacter oralis* とその類縁菌種が、高頻度に検出されることが明らかとなり、古細菌が歯周病の病原因子であることが示唆されるようになった。これまでに、古細菌がプラーク細菌叢の構成に影響を与えることや、歯周病患者が *M. oralis* の菌体成分に免疫応答を起こしていることが報告されている。

シャペロニン (Cpn) は、蛋白質の合成や変性した蛋白質の高次構造形成を補助する分子量約60 kDaの蛋白質であり、グループ I と II に分類される。Cpn のアミノ酸配列は同一グループ内では種を超えて保存されており、細菌種はグループ I の Cpn を、ヒトは両グループの Cpn を保有する。細菌の Cpn は抗原性が高く、ヒト Cpn の交差反応抗原として自己免疫応答を誘導すると考えられている。一方、古細菌はグループ II の Cpn を保有するが、その抗原性は不明である。

本研究では、古細菌 (*M. oralis*) のグループ II Cpn が抗原性をもち、ヒトのグループ II Cpn (CCT) と交差反応することで自己免疫応答を誘導し、歯周病や自己免疫疾患の病態を修飾するという仮説に基づいて、*M. oralis* からグループ II Cpn を検出・同定し、その抗原性（交差反応性）について解析することを目的とした。

申請論文は以下の研究結果を示すものであった。

- 1) *M. oralis* から2種類のグループ II Cpn (Cpn-1, Cpn-2) を同定し、それらの全塩基配列を解析した。
- 2) *M. oralis* の Cpn は、アミノ酸配列がヒト CCT と30-40%の相同性を示す分子であった。
- 3) *M. oralis* の組み換え Cpn (rCpn-1, rCpn-2) を構築・精製した。rCpn は歯周病患者血清と反応性を示し、rCpn-1は CCT サブユニット3と8に交差反応性を示した。抗 CCT1, 3, 6, 8抗体は分子量約60 kDa の *M. oralis* 抗原と反応した。

これらの結果から、*M. oralis* が2種類のグループ II Cpn 分子を保有していること、そして *M. oralis* の Cpn が抗原性をもち分子であることが明らかとなった。さらに、*M. oralis* の Cpn はヒト CCT の交差反応抗原として歯周炎病変部に存在し、歯周病の病態を修飾している可能性が示唆された。

以上のことから、本申請論文は博士（歯学）の学位論文として価値があるものと判断した。