

ふりがな 氏名	ほりいけ しゅうじ 堀池 周司
学位の種類	博士（歯学）
学位記番号	乙 第 1580 号
学位授与の日付	平成 25 年 9 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項に該当
学位論文題目	<i>Prevotella intermedia</i> の GroEL と DnaK がバイオフィルム形成に及ぼす影響
学位論文掲載誌	歯科医学 第 76 巻 第 2 号 平成 25 年 9 月 25 日
論文調査委員	主査 福島 久典 教授 副査 池尾 隆 教授 副査 清水谷 公成 教授

論文内容要旨

細菌の heat shock proteins (HSPs)は、細胞内で分子シャペロンとして働くのみならず、細胞外では接着分子として、あるいは宿主免疫細胞のレセプターに結合し、様々な反応を引き起こすことも明らかにされている。今回、*Prevotella intermedia*(*P. intermedia*)が菌体外多糖を産生してバイオフィルムを形成する際の HSPs の役割について検討するため、まず、リコンビナント GroEL (rGroEL)を用いて家兎抗 GroEL 抗体を作製し、*P. intermedia* GroEL が菌体外に放出されていることをウェスタンブロットニングにて確認した。バイオフィルム形成に及ぼす影響については、rGroEL、リコンビナント DnaK (rDnaK) タンパクを用いて、crystal violet microplate assay で検討した。また、*P. intermedia* のバイオフィルム形成調節遺伝子を明らかにするため、バイオフィルム形成株と非形成株間で、GS-Junior system 次世代シーケンサーを用いた変異解析もあわせて行った。

特異抗体を用いたウェスタンブロットニングの結果、*P. intermedia* strain 17 の培養上清には GroEL が含まれることが確認された。バイオフィルムアッセイでは、培地に加えた rGroEL、rDnaK は、バイオフィルムを形成する strain 17 のバイオフィルム形成を完全に抑制した。逆に、バイオフィルムを形成しない strain 17-2 と ATCC 25611 株は、これらの HSPs 添加培地中で明瞭なバイオフィルム形成性を示した。rGroEL、rDnaK でコートしたプレート上では、strain 17-2 のみがバイオフィルムを形成し、strain 17、ATCC 25611 はバイオフィルムを形成しなかった。Strain 17-2 のゲノム配列の変異解析を行った結果、chromosome I 上の TaqI-like C-terminal specificity domain protein とアノテーションされた PIN17_0430 遺伝子と、glucose/galactose transporter 遺伝子 (PIN17_A1569) に変異が確認された。

今回の研究では、*P. intermedia* の GroEL、DnaK が strain 17 のバイオフィルム形成を抑制し、バイオフィルム非形成株のポリスチレンプレートへの接着を促進したことから、これら HSPs が *P.*

intermedia の外部環境への定着とバイオフィーム形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。ゲノム比較により変異が確認された 2 遺伝子については、*P. intermedia* のバイオフィーム形成調節に関与すると推定され、今後さらなる詳細な機能解析が必要と考えられる。

論文審査結果要旨

細菌の heat shock proteins (HSPs) は、細胞内で分子シャペロンとして働くのみならず、細胞外では接着分子として、あるいは宿主免疫細胞のレセプターに結合し、様々な反応を引き起こすことが近年明らかにされている。本研究では、*Prevotella intermedia* (*P. intermedia*) が菌体外多糖を産生してバイオフィームを形成する際に、GroEL と DnaK の転写亢進が見られることに注目し、これら HSPs のリコンビナントタンパク (rGroEL, rDnaK) を用いて、*P. intermedia* のバイオフィーム形成における GroEL と DnaK の影響について検討を行っている。また、*P. intermedia* のバイオフィーム形成調節遺伝子を明らかにするため、バイオフィーム形成株と非形成株間で、454 pyrosequencing technology を用いた変異解析も併せて行っている。

まず、GroEL に対する特異抗体を用いたウェスタンブロットティングにより、*P. intermedia* strain 17 の GroEL が菌体外に放出されていることを確認し、マルチプレートバイオフィーム形成試験では、培地に加えた rGroEL, rDnaK が、バイオフィーム形成株である strain 17 のバイオフィーム形成を完全に抑制すること、逆に、通常の培養環境ではバイオフィームを形成しない strain 17-2 と ATCC 25611 株が、これらの HSPs 添加培地中で明瞭なバイオフィーム形成性を示すこと、rGroEL, rDnaK でコートしたプレート上では、strain 17-2 のみがバイオフィームを形成することを明らかにしている。Strain 17-2 のゲノム配列の変異解析の結果、chromosome I 上の TaqI-like C-terminal specificity domain protein 遺伝子と、glucose/galactose transporter 遺伝子に変異が存在することを突き止めている。

本論文は、*P. intermedia* の外部環境への定着とバイオフィーム形成に、GroEL, DnaK を介した機構が存在することを明確に示し、さらに、ゲノム比較により変異が確認された 2 遺伝子については、今後の詳細な機能解析により *P. intermedia* のバイオフィーム形成機構の全容解明に繋がる糸口と成り得る点で、博士 (歯学) の学位を授与するに値すると判定した。

なお、外国語 1 か国語 (英語) について試問を行った結果、合格と認定した。