

学位論文内容の要約

愛知学院大学

甲 第 号	論文提出者 佐藤 満成
論文題目 <i>Porphyromonas gingivalis</i> における短鎖脂肪酸の 産生機構に関する 3 種の CoA 転移酵素の分子生物 学的研究	

I. 緒言

歯周病は細菌感染による慢性炎症性疾患であり、歯肉の炎症や歯槽骨の破壊を引き起こすだけでなく、重篤な全身疾患にも関与している。

Porphyromonas gingivalis は慢性歯周炎罹患患者から高頻度に検出される菌であり、その培養上清中に多量の酪酸とプロピオン酸を分泌する。両分子は歯周組織に浸潤し、宿主の免疫機構を妨げる。*P. gingivalis* の酪酸産生機構には butyryl-CoA/acetate 補酵素 A (CoA) 転移酵素が関与すると報告されている。PGN_1171 タンパク質が酪酸産生機構の最終反応に関与すると予測されている。

本研究では、産生機構に関与する CoA 転移酵素と推定される PGN_1171、PGN_0725、PGN_1341 および PGN_1888 遺伝子の役割を調べる為に、遺伝子欠損株を作製し、培養上清中の短鎖脂肪酸濃度を測定した。これらの遺伝子がコードするタンパク質を精製し、その酵素学的性質を検討した。さらに、短鎖脂肪酸の産生がジンジパインに及ぼす影響を検討した。

II. 材料および方法

1. 遺伝子欠損株の作製

PGN_1171、PGN_0725、PGN_1341 および PGN_1888 遺伝子を含む領域内に薬剤耐性遺伝子を導入した pUC19 由来の組換えプラスミドを作製した。PCR により増幅した DNA 断片を電気穿孔法にて形質転換し、抗生

物質を含む血液寒天培地で集落を形成した変異株を回収した。薬剤耐性遺伝子を変更することで、二重変異株、三重変異株を作製した。染色体上の遺伝子が薬剤耐性遺伝子に正しく置換されたことを PCR にて確認した。

2. 増殖曲線

各菌株の増殖を 0、6、12、24、36、48、60、72 および 84 時間後に波長 600 nm にて測定した。

3. 粗酵素および組換えタンパク質の作製

各菌株を対数増殖期まで培養し、集菌した。菌体を PBS で洗滌し、プロテアーゼ阻害剤を含む PBS で懸濁した後に、破碎および遠心分離を行い、粗酵素を含む上清を回収した。

PGN_1171、 PGN_0725、 PGN_1341 および PGN_1888 の DNA 断片を PCR にて増幅し、発現ベクタープラスミド pGEX-6P1 に挿入した。得られたプラスミドを、タンパク質発現用の大腸菌に形質転換し、タンパク質を過剰発現させた。菌体を破碎、遠心分離を行った後に、発現タンパク質をアフィニティーカラムに吸着させ、精製した。

4. 比色法を用いた酵素活性の測定

CoA 転移酵素活性を、反応産物の acetyl-CoA を定量することで測定した。最終濃度 40 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0)、 25.0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 粗酵素または精製酵素 (125 ng ml^{-1} PGN_0725、1.25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ PGN_1341 または 125 ng ml^{-1} PGN_1888)、 200 mM 酢酸ナトリウム、 1 mM CoA 誘導体、計 40 μl

の反応液を 37°C で 5 分反応させた後に、4.5% トリクロロ酢酸を 10 μl 添加して、反応を停止させた。400 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0) を 25 μl 添加し、反応液を中和した。4 mM オキサロ酢酸、4 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid、36.8 $\mu\text{g ml}^{-1}$ citrate synthase、計 25 μl の発色反応液を加え 37°C で 30 分反応させ、波長 412 nm で測定した (クエン酸シンターゼ法)。様々な基質濃度条件で酵素を反応させ、得られた反応初速度に対して、Lineweaver-Burk plot を行い、動力学パラメーターを算出した。

次に 4-hydroxybutyrate に対する活性を succinate semialdehyde 還元酵素である PGN_0724 を用いて検討した。最終濃度 40 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0)、0.5 mM succinate semialdehyde、0.5 mM NADH、0.5 mM acetyl-CoA、1 mM MnCl_2 、1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ 精製酵素、計 100 μl の反応液を 37°C で 60 分反応させた。残存 NADH 濃度を波長 340 nm で、残存 acetyl-CoA 濃度をクエン酸シンターゼ法を用いて、波長 412 nm で測定した。

5. ガスクロマトグラフ質量分析計を用いた酵素活性と短鎖脂肪酸濃度の測定

酵素反応液および培養上清中の短鎖脂肪酸濃度をガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) にて測定した。酵素反応液は、最終濃度 40 mM potassium phosphate buffer (pH 8.0)、500 ng ml^{-1} 精製酵素、200 mM 酢酸ナ

トリウム、1 mM butyryl-CoA または propionyl-CoA、計 100 μ l を 37°C で 1 時間反応させた。培養上清は各菌株を定常期まで培養し、希釈により菌数を合わせた後に、遠心分離により菌体と培養上清を分離し、回収した。各試料からタンパク質を除去し、GC-MS にて解析した。

6. プロテアーゼ活性の測定

各菌株を対数増殖期まで培養し、希釈により菌数を合わせた後に、遠心分離により菌体と培養上清を分離した。菌体は PBS で洗滌し、Tris-HCl buffer (pH 7.6) で懸濁した。Arg-ジンジパイン (Rgp) と Lys-ジンジパイン (Kgp) の活性測定には、発色基質である *N*_α-benzoyl-L-arginine 4-nitroanilide hydrochloride と *N*-(*p*-tosyl)-Gly-Pro-Lys 4-nitroanilide を用いた。懸濁した菌体または培養上清、最終濃度 200 mM Tris-HCl buffer (pH 7.6)、2 mM 発色基質、100 mM NaCl、5 mM CaCl₂、10 mM L-cystein、計 100 μ l の反応液を 37°C で 10 分間反応させた。25% 酢酸を 25 μ l 添加して、反応を停止させ、波長 410 nm で測定した。

Ⅲ. 結果

1. 遺伝子欠損株の作製

PCR により、変異株において薬剤耐性遺伝子断片が増幅され、野生株では増幅されなかったことから目的の遺伝子の分断が確認された。

2. 変異株の増殖曲線

PGN_1888 遺伝子欠損株を除く全ての変異株で、増殖の有意な低下が認め

られた。

3. 粗酵素の酵素学的検討

各粗酵素の butyryl-CoA/acetate CoA 転移酵素活性を測定すると、PGN_0725、 PGN_1341 および PGN_1888 いずれかの遺伝子を欠損する株で反応速度が有意に低下していた。 propionyl-CoA/acetate CoA 転移酵素活性を測定すると、 PGN_0725 および PGN_1888 いずれかの遺伝子を欠損する株で、反応速度の有意な低下が認められた。

4. 精製酵素の酵素学的検討

各精製酵素を butyryl-CoA と酢酸ナトリウム存在下で反応させると、PGN_0725、 PGN_1341 および PGN_1888 において、酪酸が産生された。 propionyl-CoA と酢酸ナトリウム存在下で反応させると、 PGN_0725 および PGN_1888 においてプロピオン酸が産生された。 PGN_1171 では酪酸とプロピオン酸のいずれも産生されなかった。また、動力学パラメーターを算出すると、 butyryl-CoA または propionyl-CoA を基質とした場合、二つの基質が同時に酵素と反応する三重複合体機構にて反応が進むことが示された。 k_{cat} 値を比較すると、 butyryl-CoA に対しては PGN_0725 (557.26 s^{-1}) が他の酵素より高い値を示し (PGN_1341, 23.53 s^{-1} ; PGN_1888, 258.88 s^{-1})、 propionyl-CoA に対しては PGN_1888 (1373.8 s^{-1}) が高い値を示した (PGN_0725, 533.29 s^{-1})。いずれの精製酵素も butyryl-CoA および propionyl-CoA を除く CoA 誘導体には活性を示さなかった。また、

4-hydroxybutyrate に対する活性を検討する為に、succinate semialdehyde と NADH を精製酵素 PGN_0724 と反応させ 4-hydroxybutyrate を産生した。

4-hydroxybutyrate と acetyl-CoA を、各精製酵素と反応させたが、いずれの精製酵素においても基質の消費は認められなかった。

5. 培養上清における短鎖脂肪酸の定量

全ての変異株において、酪酸およびプロピオン酸濃度が有意に減少していた。酪酸は PGN_0725 遺伝子を、プロピオン酸は PGN_1888 遺伝子を欠損する株で著明に減少していた。加えて、イソ酪酸とイソ吉草酸濃度も有意に減少していた。三重変異体において、酪酸とプロピオン酸の産生は完全には消失しなかった。

6. プロテアーゼ活性の比較

全ての変異株において、菌体の Rgp と Kgp 活性が有意に低下していた。培養上清中の酪酸濃度と菌体のプロテアーゼ活性との間には有意な正の相関が見られた。

IV. 考察

主要な歯周病原細菌である *P. ginigvalis* が産生する短鎖脂肪酸は、口腔内で有害性を示すため、その産生機構に関与する分子を解明することは、有害性を制御することに繋がる。本研究では、CoA 転移酵素である *Roseburia hominis* RHOM_13820 に高い相同性を示す、PGN_0725、PGN_1341 および PGN_1888 を同定した。これらの遺伝子由来の全ての精

製酵素が butyryl-CoA に活性を示した。また、 PGN_0725、 PGN_1888 のみが propionyl-CoA に活性を示した。butyryl-CoA/acetate CoA 転移酵素と予測されていた PGN_1171 は両基質に対して活性を示さなかった。

PGN_1171 は succinyl-CoA/ β -keto adipate CoA 転移酵素の一端を構成する PcaJ に高いアミノ酸相同性を示すため、他の CoA 誘導体に機能する可能性が考えられる。

培養上清中の短鎖脂肪酸濃度を測定すると、酪酸濃度が PGN_0725 を欠損する株で著明に減少していた。同菌株の粗酵素の butyryl-CoA/acetate CoA 転移酵素活性は他の株よりも有意に低かった。加えて、精製酵素 PGN_0725 は他の酵素より高い butyryl-CoA/acetate CoA 転移酵素活性を示した。以上の結果から、 PGN_0725 が最も強く酪酸産生に寄与していると考えられる。一方、プロピオン酸濃度は PGN_1888 を欠損する株で著明に低下しており、同菌株由来の粗酵素の propionyl-CoA/acetate CoA 転移酵素活性は、他の株よりも有意に低かった。精製酵素 PGN_1888 の propionyl-CoA/acetate CoA 転移酵素活性は、他の酵素より強かった。したがって、 PGN_1888 が最も強くプロピオン酸産生に寄与すると考えられる。全ての変異株において、イソ酪酸とイソ吉草酸濃度もまた有意に減少しており、未だ明らかでないイソ酪酸とイソ吉草酸の産生経路の中間産物が酪酸産生経路のものと共通していると示唆された。また、三重変異株の粗酵素の CoA 転移酵素活性は、野生株の 20% 程度であり、更なる CoA 転移酵素の存在が示唆される。

PGN_0725 は 4-hydroxybutyrate/acetyl-CoA CoA 転移酵素である *Clostridium aminobutyricum* AbfT に高いアミノ酸相同性を示す。しかし、PGN_0725 を含め、いずれの精製酵素も 4-hydroxybutyrate に対して活性を示さなかった。従って、他に 4-hydroxybutyrate/acetyl-CoA CoA 転移酵素が存在すると考えられる。PGN_1341 の butyryl-CoA に対する活性は弱く、また propionyl-CoA に対して活性を示さないが、変異株の培養上清中の酪酸およびプロピオン酸濃度は減少していた。以上のことから PGN_1341 は両物質の産生経路に直接および間接的に関与する CoA 転移酵素であると予測される。

R. hominis RHOM_13820 と *C. aminobutyricum* AbfT の butyryl-CoA に対する k_{cat} 値はそれぞれ、 91.5 s^{-1} および 119 s^{-1} であり、PGN_1341 (23.53 s^{-1}) より高く、PGN_0725 (557.26 s^{-1}) と PGN_1888 (258.88 s^{-1}) より低かった。一方で、propionyl-CoA に対する k_{cat} 値はそれぞれ 42.7 s^{-1} および 120 s^{-1} であり、PGN_0725 (533.29 s^{-1}) および PGN_1888 (1378.8 s^{-1}) より低かった。加えて、PGN_0725、PGN_1341 および PGN_1888 は三重複合体機構にて活性を示すが、RHOM_13820 は、基質が順に酵素と反応するピンポンバイバイ機構にて活性を示す。したがって、これら3つの精製酵素は、基質特異性が AbfT と異なり、反応様式が RHOM_13820 と異なる。

また、全ての変異株において、菌体におけるジンジパイン活性が有意に低下していた。加えて、菌体におけるジンジパイン活性と培養上清中の酪酸

濃度との間には正の相関が認められた。この結果から、培養上清中の酪酸が菌体のジンジパイン活性に対して正の調節因子として作用すると推測される。

V. 結論

本研究により、以下の結論を得た。

1. *P. ginigvalis* の短鎖脂肪酸産生機構において、 PGN_0725、 PGN_1341 および PGN_1888 は CoA 転移酵素として働き、酪酸産生反応の最終段階に関与していた。加えて、PGN_0725 および PGN_1888 はプロピオン酸産生反応の最終反応にも関与していた。

2. *P. gingivalis* において、培養上清中に分泌された酪酸が、菌体におけるジンジパインの活性を制御している可能性が示唆された。