

158 歯周病による腸管バリア破綻がもたらす認知障害の機序	野中 さおり
-------------------------------	--------

【目的】 近年、唾液と共に飲み込まれて腸内に達した歯周病菌が腸内細菌の組成を変え、異常な組成の腸内細菌由来の分子が脳に移行してアルツハイマー病を発症させると予想されている。それには、腸内細菌由来の分子が強固な腸管バリアを通過して全身循環系に移行する必要があるが、その機構は不明である。本研究は、歯周病菌による腸管バリアの破綻機構を解明し、そのマウスの認知機能障害に対する関与を調べることを目的とした。我々の研究グループは、代表的な歯周病菌であるジンジバリス菌が分泌する歯周組織破壊酵素「ジンジパイン」がミクログリアの protease-activated receptor2 (PAR2) を活性化することを報告している。さらに、PAR2 の活性化により腸上皮細胞や腎糸球体の血管内皮細胞の透過性が増大することが知られていた。このことから、我々は「飲み込まれて腸内に移行したジンジバリス菌が産生するジンジパインが PAR2 を活性化して、腸上皮細胞の密着結合の構造的変容を促し、透過性を高める」という着想に至った。本研究では、この検証とそのアルツハイマー病様の認知障害に対する関与を調べることを目的とした。

【方法】 研究当初は PAR2 の関与を予想していたが、「ジンジパインによる脳バリア破綻の仕組み」を調べている過程で、ジンジパインは PAR2 を介さず密着結合タンパク質の ZO-1 やオクルディンを直接分解することが示唆された。そこで、ジンジパインによる腸上皮バリア破綻も同じ仕組みである可能性が高いと予想し、それを検証する方針に切り替えた。具体的には、分泌性のジンジパインを含むジンジバリス菌の培養上清からタンパク質を硫酸沈殿により濃縮し、それを ZO-1 及びオクルディンの組換えタンパク質とインキュベート後、これらタンパク質の減少が見られるか、及びそれがジンジパインの阻害剤 (KYT1 及び KYT36) で阻害されるかを、反応産物に対する抗 ZO-1 抗体及び抗オクルディン抗体を用いたウェスタンブロッティングにより調べた。

【結果】 ZO-1 及びオクルディンの組換えタンパク質は、ジンジバリス菌の培養上清由来タンパク質 (*Pg* 培養上清 protein) との混合で分解された。ジンジパインには、切断認識配列の異なる 2 種類があり、Arg-ジンジパインはアルギニンの後、Lys-ジンジパインはリジンの後のペプチド結合をそれぞれ切断する。これらタンパク質の分解に対する Arg-ジンジパイン阻害剤の KYT1 及び、Lys-ジンジパイン阻害剤の KYT36 の効果を調べた結果、ZO-1 は Arg-ジンジパインと Lys-ジンジパインの両方が協調して、また、オクルディンについては、主に Lys-ジンジパインが直接分解すると考えられた (下図)。ZO-1 やオクルディンのアミノ酸配列を調べたところ、ジンジパインによる切断認識配列はすべて細胞質内にあった。よって、ジンジパインは腸上皮細胞の細胞質内に侵入してこれらの密着結合構成タンパク質を分解し、腸バリアの透過性を上げていると考えられた。ジンジバリス菌のようなグラム陰性細菌は、outer membrane vesicles (OMVs) と呼ばれる小胞を外膜から切り出すような形で分泌し、様々な病原性因子を宿主細胞へと運ぶことが知られている。今後は、ジンジパインが OMV に結合した形で腸上皮細胞内に侵入して腸上皮バリアの破綻を促すかを *in vitro* 及び *in vivo* の実験系で調べると共に、OMV 上のジンジパインがジンジバリス菌の経口投与時にマウスで引き起こされるアルツハイマー病様の認知機能障害を促進するかを検証していく。

ジンジパインによる ZO-1 及びオクルディンの直接分解

