

令和元年6月21日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11465

研究課題名(和文) 口腔トレポネーマのべん毛構造の解析とべん毛を介した定着機構に関する研究

研究課題名(英文) Study for flagellar structure and colonization mechanism via flagella of oral treponema

研究代表者

永野 恵司 (Nagano, Keiji)

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：60367620

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：口腔内に生息する細菌トレポネーマ・デンティコーラの3つのべん毛繊維構成タンパク質FlaB1、FlaB2およびFlaB3をコードする遺伝子の、それぞれ単独、およびすべての組み合わせの欠失変異株を作製した。3つ全部のflaB遺伝子欠損株は、べん毛繊維が消失したが、それ以外の変異株では、親株と同様のべん毛が観察された。運動性は、全flaB遺伝子欠損株は、消失したが、その他の変異株は、運動性が変化しない株、低下する株、向上する株が存在した。歯肉上皮細胞への付着は、菌株間での顕著な相違は認められず、運動性およびべん毛の有無は、宿主組織への定着に重要ではないことが示唆される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔細菌トレポネーマ・デンティコーラは、歯周組織にバイオフィルムを形成して定着し、歯周病の発症や進行に強く関わる。また、歯周病が、糖尿病や動脈硬化症などの多くの全身性疾患に関連することから、本菌の生体内定着(感染)は、人類の健康に対して大きな脅威となっている。本研究では、歯周病の予防および治療法の開発を目的として、本菌の定着機構の解明を試みた。

研究成果の概要(英文)：I constructed mutants deleted genes encoding the three flagellar fiber components proteins FlaB1, FlaB2 and FlaB3 from *Treponema denticola*, which inhabits in the oral cavity. The mutant with all flab genes deleted lost the flagellar structure, however, the other mutant strains showed it as observed in the parent strain. The mutant without all flab genes showed no motility, and others included an unvarying, decrease or increase in their motility. Adhesion of the bacteria to gingival epithelial cells did not differ significantly between strains, suggesting that motility and flagella may not affect colonization in host tissues.

研究分野：微生物学、細菌学、歯学

キーワード：スピロヘータ *Treponema denticola* べん毛 付着 定着 バイオフィルム 歯周病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) *Treponema denticola* と歯周病との関連性および基礎研究の状況

口腔スピロヘータ *Treponema denticola* (グラム陰性嫌気性細菌) は、歯周組織にバイオフィルムを形成して定着し、歯周病の発症や進行に強く関連すると考えられている。また、歯周病が糖尿病や動脈硬化症などの多くの全身性疾患に関連することが明らかになり、本菌の生体内定着(感染)は、人類の健康に対してますます脅威となっている。しかし、本菌の取り扱いには依然として難しく、基本性状や病原性について、十分には解明されていない(引用文献、 )。

### (2) *T. denticola* のべん毛繊維の組成

*T. denticola* のべん毛繊維は、FlaB1、FlaB2 および FlaB3 の3つのタンパク質から構成されていると報告されていた(引用文献)しかし、遺伝学的あるいは分子生物学的手法を用いた検討はされておらず、最終的な証明には至っていなかった。

### (3) べん毛を介した宿主組織への定着

通常、細菌のべん毛は、運動を担うが、宿主組織などへの付着因子として機能することもある(引用文献)。しかし、スピロヘータである *T. denticola* のべん毛は、ペリプラズムにあり、菌体外に露出していない。したがって、構造的に付着因子として機能しないと考えられた。しかし、本菌を電子顕微鏡観察すると、しばしば、菌体外に突出したべん毛が認められる(図1および引用文献)。したがって、本菌においても、べん毛が付着因子として機能する可能性が考えられた。

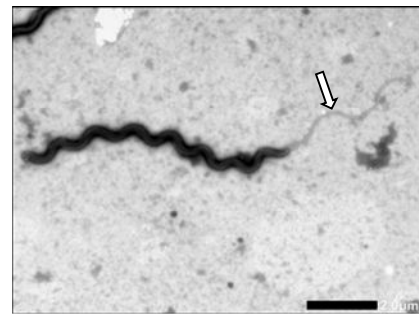


図1 透過型電子顕微鏡写真  
矢印は、突出したべん毛繊維を示す。スケールバーは2 $\mu$ m。

## 2. 研究の目的

### (1) 推定べん毛繊維構成タンパク質 FlaB1、2 および 3 欠損株の作製

推定されるべん毛繊維構成タンパク質 FlaB1、2 および 3 をコードする遺伝子の、それぞれ単独 ( $\Delta$ flaB1、 $\Delta$ flaB2、 $\Delta$ flaB3) およびすべての組み合わせの欠失変異株 ( $\Delta$ flaB1 & 2、 $\Delta$ flaB1 & 3、 $\Delta$ flaB2 & 3、 $\Delta$ flaB1、2 & 3) を作製し、べん毛形成の有無を検討する。

### (2) べん毛繊維欠損株の形態、運動性および宿主定着性に関する比較解析

各変異株の菌体およびべん毛の形態、運動性およびヒト歯肉上皮細胞への付着性を比較解析し、各べん毛構成タンパク質の機能の相違について考察する。

## 3. 研究の方法

### (1) *T. denticola* 株および培養法

*T. denticola* ATCC 35405 株を理化学研究所バイオリソースセンターから入手した。変法 GAM ブイヨン培地(ニッスイ)に0.001%チアミノピロリン酸および5%非働化ウサギ血清を添加した培地を用い、嫌気条件下、37°Cで培養した。各実験には、初期対数増殖期まで培養した菌液を用いた。また、必要に応じて、40  $\mu$ g/ml エリスロマイシンあるいは2  $\mu$ g/ml ゲンタマイシンを添加した。また、培地の粘性を上げるために、高純度寒天を添加した。

### (2) flaB1、2 および 3 遺伝子欠失変異株の作製

引用文献で述べた方法で、変異株作製を行った。簡単に述べると、flaB1 および flaB3 遺伝子はエリスロマイシン耐性遺伝子に、flaB2 遺伝子はゲンタマイシン耐性遺伝子に置換して標的遺伝子を欠失させた。また、flaB1 および flaB3 は、隣接しているため、両遺伝子欠失変異株を作製する場合は、両遺伝子領域全体をエリスロマイシン耐性遺伝子に置換した。その他の変異株は、flaB2 欠失変異株から、flaB1、flaB3 あるいは flaB1 と flaB3 の両方を欠失させて作製した。

(3) 定量的(リアルタイム)逆転写PCR、二次元電気泳動およびウェスタンブロット解析  
詳細は省略するが、いずれの検討も、定法に従って行った。

### (4) 形態学的検討

培養菌をリン酸緩衝生理食塩水(pH 7.4)で洗浄後、電子顕微鏡観察用被膜付きグリットに滴下し、細菌体を付着させた。1%モリブデン酸(pH 7.0)で陰性染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。菌体の長さは、撮影した写真の細菌体をトレースして計測した。

### (5) 運動性の検討

#### 軟寒天培地内の拡散による評価

0.5%寒天含有培地に、各菌株を1  $\mu$ l 滴下し、5日間培養した。細菌の拡散と増殖によって生じた白濁環の直径を測定し、運動性を評価した。

位相差顕微鏡観察による評価  
スライドグラスに菌液を滴下し、37°Cに保温し、位相差顕微鏡下で、運動性（回転速度あるいは屈曲運動）を評価した（引用文献）。

（6）歯肉上皮細胞への付着  
引用文献 に詳述してあるように、歯肉上皮細胞 Ca9-22 に付着した菌数を顕微鏡下で計数した。

#### 4．研究成果

本研究の成果は、現在、論文投稿準備中で、未公表データである。そのため、数値や図表の提示を控えさせて頂いた。

##### （1）FlaB1、2 および 3 欠損株の作製

###### 遺伝子欠失の確認

エリスロマイシンおよびゲンタマイシン耐性となったコロニーを分離し、次に、PCR 法にて、各変異株の目的の遺伝子が欠失していることを確認した。

###### 遺伝子発現およびタンパク質発現解析

定量的逆転写 PCR 法にて、各変異株の *flaB1*、*flaB2* および *flaB3* 遺伝子発現を検討した。各変異株で、残存する *flaBs* 遺伝子は、いずれも、親株と同程度の発現がみられ、極性効果等による、発現量の変化はみられなかった。

次に、FlaBs タンパク質の発現を検討するために、各変異株の菌体破砕物を抗原にして、二次元電気泳動および FlaB1~3 を特異的に認識する抗体を用いたウェスタンブロット解析を行った。遺伝子発現の結果と同様に、タンパク質発現においても、各変異株で、残存する *flaBs* 遺伝子がコードするタンパク質は、いずれも、親株と同程度の発現がみられた。

以上のように、各 *flaBs* 遺伝子の欠失変異株は作製でき、また、残存する *flaBs* 遺伝子の発現も親株と同程度に維持されていた。

##### （2）形態

###### 菌体の長さ

透過型電子顕微鏡観察で撮影した菌体の長さを測定したところ、ある 2 つの変異株は、親株に比して、若干ではあるが、しかし、統計学的に有意に菌体が長くなっていた。

###### べん毛形態（本数）

*T. denticola* のべん毛は菌体内にあるが、透過型電子顕微鏡で観察すると、菌体表層を透過して、べん毛を観察することができる。*flaBs* の全遺伝子欠損株は、べん毛が消失していた。しかし、それ以外の変異株は、べん毛を発現しており、親株との相違はみられなかった。

##### （3）運動性

###### 軟寒天培地の拡散

*flaBs* の全遺伝子欠損株は、0.5%寒天含有培地中をまったく拡散しなかった。他の変異株は、拡散が認められたが、再現性が悪く、統計学的考証ができていない。実験法を改善し、さらに検討する必要があると考えている。

###### 位相差顕微鏡観察で回転運動の分類

*flaBs* の全遺伝子欠損株は、運動性が消失していた。他の変異株の多くは、親株と同程度の運動性を示したが、しかし、親株よりも明らかに運動性が向上していた変異株がみられた。

##### （4）歯肉上皮細胞への付着

歯肉上皮細胞 Ca9-22 への付着性に、菌株間の差異は認められなかった。

以前の検討では、由来の異なる 4 つの *T. denticola* 株を用いた検討で、運動性が低いと、上皮細胞への付着性が亢進することが示唆された（引用文献）。しかし、今回のアイソジェニックな株を用いた検討から、運動性（べん毛の有無）は、上皮細胞への付着性に、大きな影響を及ぼさないことが明確に示された。

#### < 引用文献 >

Yuki Abiko, Keiji Nagano, Yasuo Yoshida, Fuminobu Yoshimura, Major membrane protein TDE2508 regulates adhesive potency in *Treponema denticola*, PLoS One, Vol. 9, No. 2, 2014, pp. e89051

Yuki Abiko, Keiji Nagano, Yasuo Yoshida, Fuminobu Yoshimura, Characterization of *Treponema denticola* mutants defective in the major antigenic proteins, Msp and TmpC, PLoS One, Vol. 9,

No. 11、2014、pp. e113565

John D. Ruby, Hong Li, Howard Kuramitsu, Steven J. Norris, Stuart F. Goldstein, Karolyn F. Buttle, Nyles W. Charon、Relationship of *Treponema denticola* periplasmic flagella to irregular cell morphology、J Bacteriol、Vol. 179、No. 5、1997、pp. 1628-35.

Johanna Haiko, Benita Westerlund-Wikström、The role of the bacterial flagellum in adhesion and virulence、Biology (Basel)、Vol. 2、No. 4、2013、pp.1242-67

Keiji Nagano, Yoshiaki Hasegawa, Yasuo Yoshida, Fuminobu Yoshimura、Comparative analysis of motility and other properties of *Treponema denticola* strains、Microbial Pathogenesis、査読有、Vol. 102、2017、pp.82 - 88

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Keiji Nagano, Yoshiaki Hasegawa, Yasuo Yoshida, Fuminobu Yoshimura、Comparative analysis of motility and other properties of *Treponema denticola* strains、Microbial Pathogenesis、査読有、Vol. 102、2017、pp.82 - 88

〔学会発表〕(計 5 件)

Keiji Nagano、Miscellaneous studies on the human oral spirochete *Treponema denticola*、第 91 回日本細菌学会総会、2018.3.29 (福岡)

Keiji Nagano, Yoshiaki Hasegawa, Yasuo Yoshida, Fuminobu Yoshimura、Comparative analysis of motility and other properties of the periodontal-pathogen *Treponema denticola* strains、第 28 回微生物シンポジウム、2016.9.2 (名古屋)

永野恵司、長谷川義明、吉田康夫、吉村文信、歯周病関連細菌 *Treponema denticola* の株間性状比較解析、第 58 回歯科基礎医学会学術大会、2016.8.25 (札幌)

永野恵司、長谷川義明、吉田康夫、吉村文信、歯周病原性細菌 *Treponema denticola* の株間性状比較解析、第 62 回日本薬学会東海支部大会、2016.7.9 (名古屋)

Keiji Nagano, Yoshiaki Hasegawa, Yasuo Yoshida, Fuminobu Yoshimura、Comparative analysis of the motility, protease and adherence activity of *Treponema denticola* strains、第 89 回日本細菌学会総会、2016.3.23 (大阪)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：村上 正洋

ローマ字氏名：MURAKAMI, masahiro

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。