

令和 3 年 5 月 29 日現在

機関番号：32650

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24155

研究課題名(和文) 口腔スピロヘータにおける新規転写調節因子のdysbiosis への役割の解明

研究課題名(英文) Investigating the role of novel transcriptional regulator of oral Spirochete in the process of dysbiosis

研究代表者

山下 慶子 (Yamashita, Keiko)

東京歯科大学・歯学部・レジデント

研究者番号：50843538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：Treponema denticola は、重度の歯周炎病巣から検出されることが多い、主要な歯周病原細菌の一種である。T. denticola の外膜に存在するタンパク質、Major outer sheath protein (Msp) は本菌の主要な病原因子である。

我々は、Msp の発現調節に関わる可能性のある遺伝子の機能解析を行い、この遺伝子がMsp の発現調節に関わる可能性は低いことが分かった。一方、この遺伝子は本菌の運動性に関わる遺伝子群の転写を調節していること、さらにこの遺伝子を欠損したT. denticola は運動性が低下し、運動のパターンも変化することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、歯周病原細菌の一種であるTreponema denticola の機能未知遺伝子が、本菌の運動性の調節に関わることを明らかにした。

T. denticola は鞭毛による活発な運動を特徴としており、組織内への侵入や栄養の獲得に、運動性の調節は重要な役割を果たす。この成果は、歯周炎の発症・進展の仕組みの解明や、細菌因子の制御を目的とした新たな治療ターゲットの発見に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Treponema denticola is one of the predominant bacteria in deep periodontal pockets. T. denticola has various virulence factors, such as major outer sheath protein (Msp). At the beginning of this research, we hypothesized that a DNA binding protein, which gene coding for this protein was significantly upregulated in the Msp gene deletion mutant, regulate the expression of Msp.

To assess the functional role of the protein, we constructed, for the first time, T. denticola gene deletion mutant of the gene coding for the DNA binding protein. Contrary to our expectations, the gene coding for the DNA binding protein did not play a direct role in the regulation of msp or other genes coding for virulence factors. However, it was suggested that the DNA binding protein plays a certain role in the regulation of the genes implicated in the motility of T. denticola and knockout of this gene affects the moving pattern of this bacteria.

研究分野：微生物学

キーワード：歯周病 歯周病原細菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

口腔スピロヘータの一種である *Treponema denticola* は、重度歯周炎病巣から高頻度に検出される菌群、red complex を構成する主要な歯周病原細菌の一種である。*T. denticola* の外膜 (outer sheath) には、本菌の病原性に寄与する種々のタンパク質が存在する。Outer sheath の主要な構成タンパク質は Major outer sheath protein (Msp) である。この Msp は、線維芽細胞や好中球の細胞動態を攪乱したり、*in vitro* で疑似細胞膜を穿孔することから細胞傷害作用を有すること等が示唆されている、本菌の主要な病原因子の一つでもある。

我々は、*T. denticola* Msp 欠損株の transcriptome を解析し、Msp 欠損株において野生株と比較した際、有意に転写量が増減している遺伝子を、Msp の発現調節に関わる可能性のある候補遺伝子として抽出した。この中で、転写調節因子をコードする可能性のある遺伝子 TDE\_0344 に着目した。

TDE\_0344 がコードするタンパク質は、アミノ酸配列に基づく構造予測によれば、looped-hinge-helix DNA 結合モチーフを持つことから、このモチーフにより特定の遺伝子のプロモーター領域に結合し、下流遺伝子の発現を調節する可能性がある。

以上のことから、TDE\_0344 がコードするタンパク質が Msp の発現調節に関わること、或いは、Msp の欠損に伴う外膜およびペリプラズム領域の環境変化に対する応答として、未知の遺伝子群の発現調節に関わることが考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、*T. denticola* の機能未知遺伝子 TDE\_0344 の機能解析を通し、本菌の病原因子発現機構、および膜構造の変化に伴うストレスに対する応答機構の一端を明らかにすることである。これにより、歯肉縁下プラーク細菌叢のシフト、dysbiosis の機序の一部を明らかにすることができる考えた。

### 3. 研究の方法

#### (1) *T. denticola* TDE\_0344 欠損株の遺伝子転写産物の解析

我々が作出した、*T. denticola* TDE\_0344 欠損株の total RNA をサンプルとし、DNA マイクロアレイ解析にて transcriptome を解析した。野生株と比較し転写量が変動していた遺伝子の中から、fold 値  $\pm 2.0$  をカットオフ値と設定し、TDE\_0344 が転写調節に関わる遺伝子の候補として抽出した。抽出した遺伝子の転写量は、qRT-PCR にて更に確認を行った。

#### (2) TDE\_0344 欠損が表現型に与える影響の解析

TDE\_0344 欠損株の表現型を、野生株と比較した。まず増殖能を、液体培地における 660 nm 波長の濁度を継時的に計測することにより評価した。更に、(1)において実施した遺伝子転写産物の解析結果から、解析する表現型を運動能・運動性に関連するものとした。研究開始当初に発現変動が予測された Msp の発現に関しては、(1)において転写レベルでの変動を認めなかったため、解析対象から外した。

#### (3) TDE\_0344 の欠損が本菌の運動性に与える影響の解析

(2)において、TDE\_0344 の欠損は、本菌の軟寒天培地内におけるコロニーの広がりを小さくすることが明らかとなったため、菌体ごとの運動性を動画撮影および ImageJ を用いた解析により詳細に検討した。

#### (4) TDE\_0344 がコードするタンパク質が付着するプロモーター領域の検討

TDE\_0344 合成タンパク質を作製し、(1)で解析した遺伝子の情報に基づき選択した遺伝子のプロモーター候補領域との結合の有無を、Electro mobility shift assay にて検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) TDE\_0344 の欠損は、本菌の鞭毛の構成や機能に関わる遺伝子の転写量を増加させた

DNA マイクロアレイの結果、TDE\_0344 欠損株において複数の遺伝子転写量の変化を認められた。これらのうち、鞭毛の構成・回転等に関わる可能性のあるタンパク質をコードする遺伝子群の転写量は、欠損株において野生株よりも有意に多いことが qRT-PCR によっても確認できた ( $n=9, p < 0.05$ )。

#### (2) TDE\_0344 の欠損は、本菌の運動性を低下させた

軟寒天培地内のコロニーの広がり、菌の運動性の指標となる。欠損株が形成したコロニーの直径は、野生株よりも有意に小さかった ( $n=30, p < 0.05$ )。更に、欠損株の増殖能は野生株と近似していたことから、この培地内での広がりの減少は、本菌の運動性に起因すると考えられた。

(3) TDE\_0344 欠損株は、運動のパターンが野生株と異なる

前述(2)の結果を踏まえ、菌体ごとの運動軌跡を解析したところ、欠損株の運動パターンは野生株とやや異なり、円弧を描くような運動パターンを示す菌体が多い傾向にあった。

(4) TDE\_0344 合成タンパク作製により DNA との相互作用の検討が可能となった

特定の遺伝子のプロモーター領域と TDE\_0344 がコードするタンパク質の相互作用を検討するため、TDE\_0344 合成タンパクを作製した。Transcriptome 解析の結果を踏まえ、EMSA にて DNA との結合の有無を検討したが、明らかな結合を示す結果が得られなかった。今後、ChIP-seq にてゲノム DNA 全体を対象とし、合成タンパク質の結合部位を検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 山下慶子, 北村友里恵, 国分栄仁, 菊池有一郎, 齋藤淳, 石原和幸.
2. 発表標題 An investigation of the functional role of a gene coding for a transcriptional regulator in <i>Treponema denticola</i>
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keiko Yamashita, Yurie Kitamura, Y. Kikuchi, Atsushi Saito, Kazuyuki Ishihara
2. 発表標題 Functional analysis of a DNA binding protein-coding gene in <i>Treponema denticola</i>
3. 学会等名 The 106th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------