

平成 22 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008 年～2009 年

課題番号：20890248

研究課題名（和文）*Porphyromonas gingivalis* の Mfa1 線毛の機能に関する研究研究課題名（英文）Functional characterization of *Porphyromonas gingivalis*  
Mfa1 fimbriae

研究代表者

長谷川 義明（HASEGAWA YOSHIKI）

愛知学院大学歯学部微生物学講座・講師

研究者番号：70460524

研究成果の概要（和文）：*Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 の Mfa1 線毛の主要構成成分をコードする *mfa1* の下流にはタンデムに 4 つの遺伝子（*mfa2*、PG0180、PG0181、PG0182）が存在する。本研究では、これらの下流因子の Mfa1 線毛機能・形成機構への関与を明らかにすることを目的とした。*mfa2* が線毛の基部に局在し長さの制御を担う分子であることが分かり、さらに微量成分 PG0182 が PG0180 と PG0181 を線毛に繋ぐアダプター蛋白質として機能する可能性が示唆された。また、Mfa1 線毛機能解析においては、*fimA* と *mfa1* 下流遺伝子の両方を破壊した二重変異株は、*fimA* 変異株と比較して高い自己凝集活性を示した。これらの結果から、*mfa1* の下流因子が Mfa1 線毛機能・形態形成に関与している可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：In this study we focused on the four ORFs (*mfa2*, PG0180, PG0181, and PG0182) downstream of the *mfa1* gene encoding the major fimbriin Mfa1. We demonstrated that *mfa2* is involved in the length regulation of the Mfa1 fimbriae. Neither PG0180 nor PG0181 were present in the purified Mfa1 fimbriae from the PG0182 mutant, suggesting that PG0182 is required for the assembly of PG0180 and PG0181 into fiber. The mutants of downstream genes increased autoaggregation activity compared with the parent strain. These data indicates that downstream products of the *mfa1* gene are involved in function and structure of Mfa1 fimbriae.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,310,000	393,000	1,703,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,110,000	633,000	2,743,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯学

キーワード：細菌、歯周病、*Porphyromonas gingivalis*、Mfa1 線毛、微量成分

## 1. 研究開始当初の背景

グラム陰性偏性嫌気性細菌 *Porphyromonas gingivalis* は慢性歯周炎の最も有力な原因菌と考えられている。*P. gingivalis* の標準株である ATCC 33277 は、異なるサブユニットにより構成される FimA 線毛と Mfa1 線毛の2種類の線毛を持つことが知られている。FimA 線毛についての研究は進んでおり、細胞外基質との結合やバイオフィルム形成、上皮細胞への付着・侵入に必須であることなどが明らかになっている。一方、Mfa1 線毛に関する研究は散見するにすぎず、Mfa1 線毛の主要成分が Mfa1 蛋白質であること、長さが約 103 nm の短い構造を呈すること、自己凝集や口腔共生細菌 *Straptococcus gordonii* との共凝集に関与することが明らかになっているが、その構成成分や機能については未だ不明な点が多い。

これまでの我々の研究により、主要構成成分をコードする遺伝子 *mfa1* のすぐ下流にある *mfa2* の変異株は Mfa1 線毛が親株と比較して長いことを報告している。また、精製 Mfa1 線毛中に含まれる微量成分として、*mfa1* の下流に位置する遺伝子からの転写産物 PG0180、PG0181、PG0182 (いずれも TIGR の遺伝子番号に対応する遺伝子番号) が同定されている。これら *mfa1* 遺伝子の下流因子が、Mfa1 線毛の機能の発揮や構造維持に関与していることが考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、*P. gingivalis* ATCC 33277 の Mfa1 線毛の下流因子 *mfa2*、PG0180、PG0181、PG0182 の線毛機能と形態形成への関与を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### (1) 変異株の作製

*P. gingivalis* ATCC 33277 を親株として PG0180、PG0181、PG0182 遺伝子変異株をそれぞれ作製した。詳細には、PG0181、PG0182 遺伝子にエリスロマイシン耐性遺伝子を挿入した変異株、あるいは PG0180 遺伝子をクラムフェニコール耐性遺伝子に置換した変異株を作製した。さらに、*fimA* 変異株を親株としてそれぞれ3つの遺伝子を欠失させた二重変異株を構築した。得られたエリスロマイシンおよびクラムフェニコール耐性株から染色体 DNA を抽出し、PCR およびサザンブロット法により、目的の遺伝子座で変異が起きていることを確認した。

### (2) 自己凝集能

*fimA* 変異株と *mfa2*、PG0180、PG0181、および PG0182 二重変異株の菌体を遠心処理により集菌後、PBS (pH 6.0) にて洗浄した。菌液を OD<sub>660</sub> 1.0 に調製し、2 ml の菌液を直径 13 mm の試験管に入れ 37°C で振盪し、OD<sub>660</sub> を経時的に測定した。自己凝集能は、(各時間の菌液の OD<sub>660</sub>) / (最初に調製した菌液の OD<sub>660</sub>) × 100% で表した。

### (3) *S. gordonii* との共凝集

OD<sub>660</sub> を 1.0 に調製した *P. gingivalis* の菌液 1 ml と OD<sub>660</sub> 0.3 に調製した *S. gordonii* の菌液 1 ml を試験管中で混合し 37°C で振盪し、OD<sub>660</sub> を経時的に測定し評価した。

### (4) *S. gordonii* との付着

*P. gingivalis* の *S. gordonii* との付着は Nitrocellulose membrane blot assay にて評価した。ドットブロット用装置 (バイオドット, BIO-RAD) にて 10<sup>8</sup> の *P. gingivalis* 菌体をニトロセルロース膜に吸着させ、膜を 1.5% の BSA を含んだ PBS にてブロッキングした。そしてビオチン化した *S. gordonii* を加え 12 時間反応させた。膜を PBS にて 3 回洗浄後、アルカリフォスファターゼ標識ストレプトアビジンとアルカリフォスファターゼの基質 (BCIP/NBT, Sigma) を加え発色させた。

### (5) Mfa1 線毛の精製

親株である *fimA* 欠損株、および各二重変異株の菌体をフレンチプレスにて破碎し遠心により未破碎菌体を除去した。上清を硫酸アンモニウム分画後、イオン交換カラムにて Mfa1 線毛を分離・精製した。*mfa2* 変異株については、ホモジナイザーによる洗浄により菌体から線毛を剥ぎ取り、その洗浄液から分離・精製した。

### (6) ネガティブ染色による形態学的検討

各株の菌体あるいは精製線毛試料をハイブリッドカーボン支持膜かコロジオン膜に載せ、1% モリブデン酸アンモニウムでネガティブ染色後、透過型電子顕微鏡 (Carl Zeiss LEO LIBRA120 か JEM-1210) により観察した。また、必要に応じて東海電子顕微鏡解析に撮影を依頼した。

### (7) 抗血清の作製

精製 Mfa1 を SDS-PAGE により展開後、75 kDa の Mfa1 蛋白質および 150 kDa の PG0182 を切り出し、切り出したゲルから電氣的に溶出した。得られた Mfa1 を抗原としてニワトリに免役し抗 Mfa1 ニワトリ抗血清を得た (日生研に委託)。また、PG0182 をウサギに免役し PG0182 抗血清を得た (シグマに委託)。

精製 Mfa1 線毛を抗原としてウサギに免疫

し、抗 Mfa1 線毛抗体を作製した。精製 Mfa1 線毛と完全アジュバンドを混和したものをウサギの皮下に 2 週間おきに 3 回免疫することにより抗血清を作製した。

#### (8) 免疫電顕二重染色法

*fimA* 変異株を包埋後、超薄切片を作製しメッシュに載せた。試料を抗 Mfa1 ニワトリ抗体と抗 Mfa2 ウサギ抗体にて反応させ、6 nm の金コロイド粒子で標識した抗ニワトリ抗体と 20 nm の抗ウサギ抗体を用い Mfa1 と Mfa2 を同時に検出した。

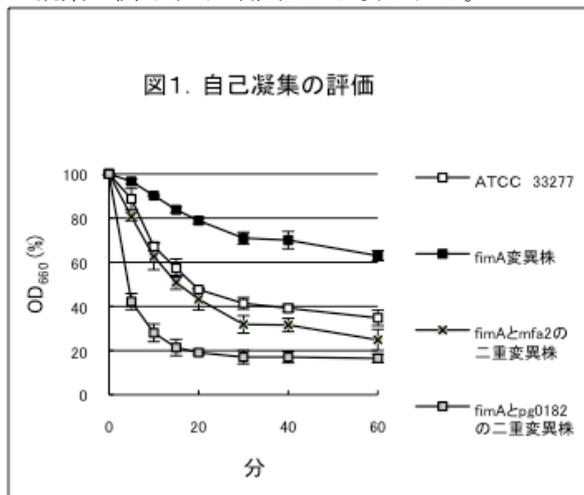
#### (9) ウェスタンブロットティング

精製 Mfa1 線毛を本法に従い SDS-PAGE にて展開後、ミニトランスブロットセル (BIO-RAD) にて PVDF 膜に転写し、抗精製 Mfa1 線毛抗血清、あるいは、抗 PG0182 抗血清を用いてウェスタンブロットティングを行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 変異株の自己凝集能

バイオフィーム形成における Mfa1 線毛の機能を明らかにするための一助として、変異株の自己凝集能を検討した。親株である *fimA* 変異株では ATCC 33277 と比較して顕著に低い活性を示した (図 1)。一方、*fimA* と *mfa2* 変異株、および *fimA* と PG0182 二重変異株では ATCC 33277 株より強い凝集を示した (図 1)。データは示さないが、*fimA* と PG0180 二重変異株および *fimA* と PG0181 二重変異株においても同様に強い凝集傾向を示した。これらの結果から下流因子が、Mfa1 線毛の機能の一つと考えられる自己凝集に関与する可能性が示唆された。



#### (2) *S. gordonii* との結合

口腔内共生細菌 *S. gordonii* との共凝集を評価した。今回行った方法では、変異株の強い自己凝集能が影響してしまい共凝集との関連を明確にすることはできなかった。

*P. gingivalis* と *S. gordonii* との付着を Nitrocellulose membrane blot assay にて評価したが、親株と比して顕著な差は検出さ

れなかった。今後は、フローセルと共焦点電子顕微鏡を用いる方法による検討を加える予定である。

#### (3) Mfa1 線毛の精製と微量構成成分の解析

SDS-PAGE により精製 Mfa1 線毛のバンドパターンを比較した。PG0182 変異株では全ての微量成分が欠損していることが分かった (図 2)。このことから、PG0182 が PG0180 と PG0181 とを Mfa1 へ繋ぐアダプター蛋白質として機能している可能性が考えられる。

#### (4) Mfa1 線毛の形態学的検討

親株の菌体表層の Mfa1 線毛は 100 nm の短い構造として観察されたが、*mfa2* 変異株においては、長い構造を呈していることが分かった。親株から精製した Mfa1 線毛はおよそ 100 nm の短い線毛として観察されたのに対し、*fimA* と *mfa2* 二重変異株から精製した Mfa1 線毛は、1  $\mu\text{m}$  以上の構造を呈していた (Microbiology, 2009, 155, 3333-3347 に報告)。これらの結果から *mfa2* が Mfa1 線毛の長さの制御に関与していることが明らかになった。

*fimA* と PG0182 二重変異株の精製線毛の構造解析では、親株と変異株との間で顕著な違いは見出されず、親株と同様の約 100 nm の短いファイバーとして観察された (図 3)。この結果から、PG0182 は Mfa1 線毛の構成因子であるものの、Mfa1 の重合や構造維持には関与しないことが考えられる。

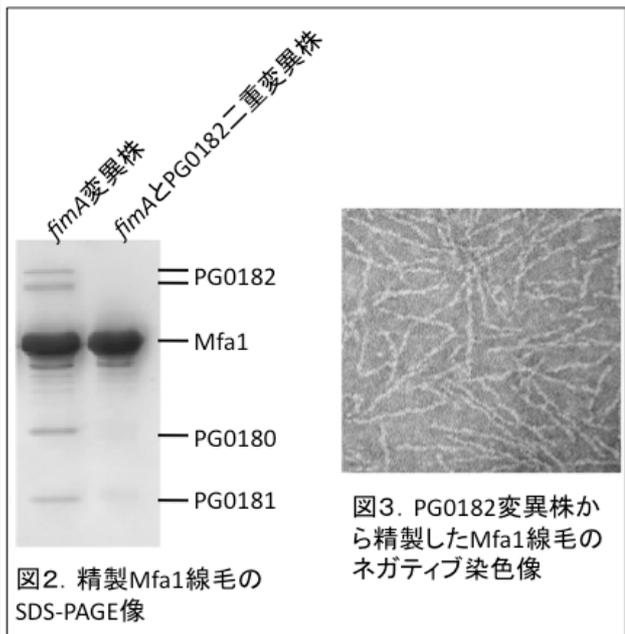


図2. 精製Mfa1線毛の SDS-PAGE像

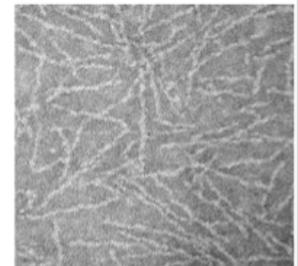


図3. PG0182変異株から精製したMfa1線毛のネガティブ染色像

#### (5) 免疫電顕二重染色法とウェスタンブロットティング

得られた抗 Mfa1 ニワトリ抗血清と抗 Mfa2 抗体を用い、Mfa1 と Mfa2 共局在を免疫電顕二重染色法で検討した。Mfa2 が Mfa1 線毛の基部に位置する様子が観察された (Microbiology, 2009, 155, 3333-3347 に

報告)。

得られた抗精製 Mfa1 抗血清および抗 PG0182 抗血清の特異性と抗体価をウェスタンブロッティングで確認した。抗 Mfa1 線毛抗血清は Mfa1 の 75 kDa のバンドおよび 74-50 kDa のラダー状のバンドを 1/25,000 の希釈度で検出した。さらに、不完全な熱変性条件においては、高分子側に Mfa1 の重合を示すラダー状のバンドが検出された。今後、この抗血清を用いて下流因子変異株における Mfa1 の重合状態を検討する予定である。また、この抗血清は精製 Mfa1 線毛と様々な候補因子との結合を ELISA で解析する際の一次抗体として利用可能と思われる。

抗 PG0182 抗血清は、Mfa1 蛋白質と交差反応が認められるものの、1/2,500 の希釈度で 150 kDa の PG0182 のバンドが検出された。また、PG0182 変異株から精製した線毛試料において、150 kDa のバンドは全く検出されなかった。以上の結果から、PG0182 を認識する抗血清が得られたこと、作製した PG0182 変異株は PG0182 蛋白質が欠損していることが確認された。今後、本抗血清を用い Mfa1 線毛繊維中における PG0182 の局在について免疫電顕的検討を加える予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Yoshiaki Hasegawa, Jun Iwami, Keiko Sato, Yoonsuk Park, Tatsuo Atsumi, Keiichi Moriguchi, Yukitaka Murakami, Richard J. Lamont, Hiroshi Nakamura, Norikazu, Ohno, and Fuminobu Yoshimura, Anchoring and length regulation of *Porphyromonas gingivalis* Mfa1 fimbriae by the down stream gene product Mfa2. vol.155, 2009, p.3333-3347, 査読有
- ② 長谷川義明, 尾関万里奈, 西川清, 村上幸孝, 永野恵司, 吉村文信, *Porphyromonas gingivalis* の Mfa1 線毛の微量成分遺伝子 *mfa2* の機能解析. Bacterial Adherence and Biofilm, 22 巻 2009, p.95~101, 査読無

[学会発表] (計 8 件)

- ① 長谷川義明, 永野恵司, 村上幸孝, 吉村文信, Localization of Mfa2, a length regulator of *Porphyromonas gingivalis* Mfa1 fimbriae. 第83回日本細菌学会総会, 2010年3月27日, パシフィコ横浜 (横浜)
- ② 永野恵司, 長谷川義明, 村上幸孝, 吉村文信, Roles of FimB for FimA fimbriae expression in *Porphyromonas gingivalis*. 第83回日本細菌学会総会, 2010年3月27日, パシフィコ横浜 (横浜)

- ③ 吉村文信, 長谷川義明, 永野恵司, 村上幸孝, 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* の Mfa1 線毛の長さの制御を担う Mfa2 の局在と機能に関する研究. 第39回東海乳酸菌研究会, 2010年2月6日, 中日ビル (名古屋)
- ④ 永野恵司, 長谷川義明, 村上幸孝, 西山宗一郎, 吉村文信, *Porphyromonas gingivalis* の FimA 線毛の形態および機能に及ぼす FimB の役割に関する研究. 第74回愛知学院大学歯学会学術大会 2009年6月14日 (名古屋)
- ⑤ 永野恵司, 長谷川義明, 村上幸孝, 吉村文信, 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* の FimA 線毛の形態および機能に及ぼす FimB の役割に関する研究. 第46回日本細菌学会中部支部総会, 2009年10月24日, 名城大学薬学部 (名古屋)
- ⑥ Yoshiaki Hasegawa, Jun Iwami, Keiichi Moriguchi, Yukitaka Murakami, Norikazu Ohno, Hiroshi Nakamura, Richard J. Lamont, and Fuminobu Yoshimura, Role of *mfa2* in *Porphyromonas gingivalis* Mfa1 fimbriae. 87<sup>th</sup> General session and Exhibition of the IADR, 2009年4月3日, Miami Beach Convention Center (Miami)
- ⑦ 長谷川義明, 尾関万里奈, 村上幸孝, 吉村文信, *Porphyromonas gingivalis* の Mfa1 線毛微量成分遺伝子の解析と変異株の作製. 2008年9月25日, 第50回歯科基礎医学会学術大会 (東京)
- ⑧ 長谷川義明, 尾関万里奈, 西川清, 村上幸孝, 永野恵司, 吉村文信, *Porphyromonas gingivalis* の Mfa1 線毛の微量成分遺伝子 *mfa2* の機能解析. Bacterial Adherence and Biofilm, 2008年7月4日, 兵庫県立淡路夢舞台国際会議場 (兵庫)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権] (計 0 件)

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川義明 (HASEGAWA YOSHIAKI)

研究者番号: 70460524