

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 4日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010 ～ 2011

課題番号：22791772

研究課題名（和文）：歯周病原菌表層タンパクの新規病原性因子の同定及び解析

研究課題名（英文）：(Identification and characterization of the surface proteins in periodontal pathogens)

研究代表者：大貝 悠一 (OOGAI YUICHI)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40511259

研究成果の概要（和文）：歯周病原菌の表層タンパクの同定と病原性に着目した性状解析を行った。結果、*Fusobacterium nucleatum* の表層タンパクにおいては、新規病原性を有する因子の同定には至らなかった。しかしながら、*F. nucleatum* の外膜タンパク画分から得られた autotransporter 様タンパクの一部が *F. nucleatum* に特徴的な形態の形成に関与することが示唆されるデータが得られた。また、*Tannerella forsythia* のもつ2種の高分子タンパクから構成される S-layer が補体抵抗性に関与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Our research has been focused on identification and virulence of surface protein in periodontal pathogens. We did not find the novel virulence factor in surface proteins of *Fusobacterium nucleatum*. The cells of *F. nucleatum* are fusiform rods. We found that this morphology formation was involved in two autotransporter proteins found in outer membrane proteins of *F. nucleatum*. We also found that complement resistance of *Tannerella forsythia* was involved in S-layer composed from two high molecular weight proteins.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：細菌学、口腔細菌学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：歯周病原菌・外膜タンパク・補体抵抗性

1. 研究開始当初の背景

歯周病は細菌感染症であり、*Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Tannerella forsythia*,

Treponema denticola など種々の細菌が原因菌として同定されている。歯周病原菌の病原性は線毛の付着活性やヘモリシン、ロイコトキシンなどの外毒素活性及び各種プロテアーゼの酵素活性が知られている。表層抗原としては内毒素である LPS の解析がなされ

ている。しかしながら、菌体の表層タンパクにおいて病原性の詳細な解析がなされた例は少なく、*A. actinomycetemcomitans*の外膜タンパクの一つである Omp100 がヒト歯肉上皮細胞に対する付着・侵入能、炎症性サイトカイン誘導能及び血清抵抗性を示すこと(Asakawa *et al.* Molecular Microbiology 2003 50(4), 1125-1139)、*F. nucleatum*の FadA (Yiping *et al.* Journal of Bacteriology, Aug. 2005, p. 5330-5340) 及び *T. forsythia* の BspA (Ashu *et al.* Infection and Immunity, Dec. 1998, p. 5730-5710) が細胞に対する付着活性をもつこと等が明らかにされているにすぎない。歯周病原菌以外の病原性細菌においては、*Yersinia enterocolitica* の YadA (Hoiczuk *et al.* EMBO Vol. 19 NO. 22 pp. 5989-5999, 2000) や大腸菌の OmpA (Prasadarao *et al.* Infection and Immunity 67, 5575-5783, 1999) など様々な外膜タンパクが細胞に対する付着・侵入能や血清抵抗性といった病原性を示すことが報告されている。また、菌体表層における物質の透過に関与する Porin 様タンパクにおいて、一部で病原性を示す報告がなされている (Minetti *et al.* J. Biol. Chem. 273, 25329-25338, 1998)。上記の学術的背景より、歯周病原菌の表層に局在するタンパクにおいて病原性を示す未知のタンパクが存在する可能性は高いと考えられる。

2. 研究の目的

本研究は、歯周病原菌の表層タンパクから新たな病原因子を同定することを目的とする。研究対象となる歯周病原菌は *F. nucleatum* 及び *T. forsythia* とする。これらの菌は先行研究により歯周病発症に深く関与すると考えられていること、培養法が確立されていること、全ゲノム情報が公開されていること (<http://www.oralgen.lanl.gov>) から本研究の遂行に適切な菌種であると考えられる。本研究では以下に記す点について明らかにする。

上記の歯周病原菌は、公開されている全ゲノム情報から外膜及び菌体表層に発現すると予想される遺伝子の情報を得ることができる。しかしながら、解析プログラムによる発現部位予想と実際に菌体表層に存在するタンパクには差異が見られることが予想される。よって、本研究では *F. nucleatum*, 及び *T. forsythia* から菌体表層タンパク画分を調製し、In-Gel Trypsin digestion 法によるアミノ酸配列解析を行い、菌体表層に発現するタンパクの同定を行う。

グラム陰性菌において、様々な菌体表層タンパクが宿主への定着性や炎症性サイトカイン誘導能、宿主免疫力に対する抵抗性といった病原性を示すことが知られているが、歯

周病原菌において病原性が示された菌体表層タンパクの報告は少ない。しかしながら、歯周病原菌外膜タンパクのアミノ酸配列相同性解析の結果、様々な菌種に存在しその多くは細胞に対する付着活性をもつ *YadA* ファミリー外膜タンパク、ほぼすべてのグラム陰性菌において保持されており一部病原性が報告されている OmpA ファミリー外膜タンパク、そして膜上の物質の透過に関与し病原性の報告もなされている Porin 様外膜タンパクと相同性の高いものがいくつか見られた。よって、歯周病原菌の病原性に外膜タンパクが関与する可能性は高いと考えられる。本研究では、歯周病原菌の表層に局在するタンパクの病原性を解析する。

3. 研究の方法

(1) 歯周病原菌表層タンパクの同定

歯周病原菌の超音波破碎を行い、サルコシル不溶性画分を 1% SDS で可溶化したものを菌体表層タンパク画分とする。当方法は、グラム陰性菌外膜タンパク画分調製法の一つであるが、*P. gingivalis* の Arg-gingipain や *T. forsythensis* の Surface layer protein といった菌体の膜上に存在するタンパクも得られることが知られている。得られた菌体表層タンパクは SDS-PAGE により分離し、In-Gel Trypsin digestion 後の MALDI-TOF MS による質量分析により同定する。菌体表層タンパクの数が多い菌株においては個々のタンパクの分離が困難なことが予想されるため、二次元電気泳動による分離を検討する。

(2) 歯周病原菌表層タンパクの大腸菌発現株の作成

歯周病原菌の表層に局在するタンパクの性状解析を行うため大腸菌の外膜上に発現させる変異株の作成を行う。歯周病原菌の全ゲノム情報から該当タンパクの遺伝子情報を獲得し、ORF 全体を増幅する PCR を行い、大腸菌用のタンパク発現ベクターを用いて形質転換を行う。得られた大腸菌発現株から菌体表層タンパク画分を調製し、SDS-PAGE を行うことにより、大腸菌表層における該当タンパクの発現を確認する。また、該当タンパクの His-Tag 融合組換えタンパクを作成し、ウサギに免疫することで得られる抗血清を用い、電子顕微鏡観察及び共焦点レーザー顕微鏡観察により菌体表層における発現を確認する。

(3) 歯周病原菌表層タンパクの病原性解析

作成された歯周病原菌表層タンパクの大腸菌発現株及び欠損株を用いて、菌体表層タンパク個別の病原性解析を行う。(付着・

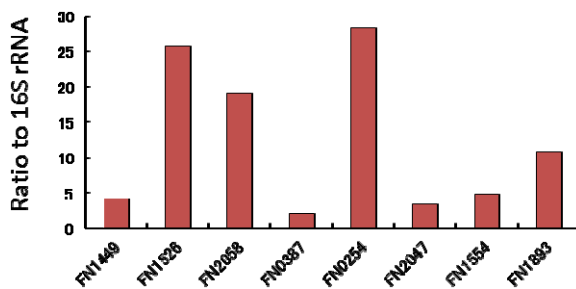
侵入能解析) ヒト歯肉上皮培養細胞に被検株を接触させた後、細胞の洗浄を行う。その後、付着活性を解析する場合は細胞を破碎することで遊離した菌の CFU を測定することにより求める。侵入活性の場合は細胞を抗菌剤で処理することにより細胞内へ侵入した菌以外を殺菌した後、細胞破碎を行い遊離した菌の数を CFU の測定をすることにより求める。(炎症性サイトカイン誘導能解析) 歯肉上皮培養細胞に被検株を感染させることにより mRNA レベルで発現量の上昇する炎症性サイトカインを Real-Time RT-PCR により解析する。(赤血球凝集能試験) 血球と被検株を丸底プレート上で混合し、放置後血球の状態を観察することにより行う(共凝集能試験) 被検株を他の口腔内細菌と混合し、その後の濁度を経時的に測定することにより行う。(唾液凝集能試験) 被検株に唾液を加え、その後の濁度を経時的に測定することにより行う。(抗菌性ペプチド感受性試験) 被検株を一定時間抗菌性ペプチドで処理し CFU を測定することにより求める。(血清抵抗性試験) 被検株を一定時間希釈したヒト血清に浸し生存率を測定することにより求める。また、歯周病原菌表層タンパクと IgG の Fc 領域及び補体 H 因子の親和性を解析する。

4. 研究成果

歯周病原菌の表層タンパク画分の SDS-PAGE を行った結果、*F. nucleatum* において 6 種、*T. forsythia* において 2 種の 100 kDA 以上の高分子なバンドが認められた。本研究においてはこれらの高分子表層タンパクに特に着目し解析を行った。

(1) *F. nucleatum* の autotransporter 様外膜タンパク

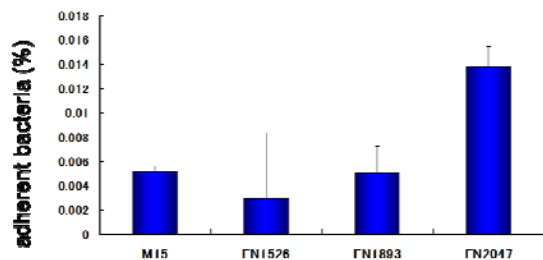
F. nucleatum の高分子表層タンパクの一部は autotransporter 様外膜タンパクであることが表層タンパク画分の TOF-MS 解析により明らかとなった。得られた autotransporter 様外膜タンパクのアミノ酸配列を用いた相同性検索を行った結果、*F. nucleatum* ATCC 25586 株のゲノム内に 8 種の autotransporter 様タンパクが存在することが明らかとなった。定量性 PCR によりこれらの発現を確認した(図 1)。



(図 1) *F. nucleatum* autotransporter の遺伝子

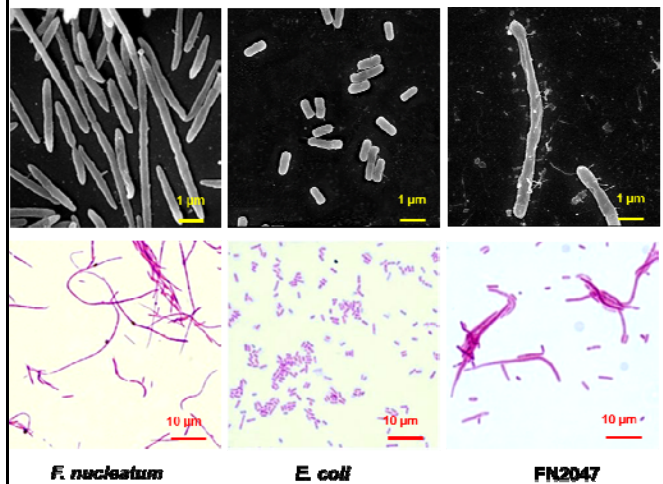
発現量

Autotransporter 様外膜タンパクの病原性解析のため大腸菌発現株の作成を行いその病原性について解析した。Hela 細胞に対する付着能を調べた結果、FN2047 の付着性がわずかに上昇したが、その他の autotransporter において変化は認められなかった。(図 2)



(図 2) Autotransporter 発現大腸菌の hela 細胞に対する付着率。M15: empty vector コントロール

Autotransporter 発現大腸菌のうち、FN1893 及び FN2047 発現株はその形態が *F. nucleatum* と同様の形状に変化することを見出した(図 3)。この結果は、*F. nucleatum* の autotransporter の一部が形態形成に関与することを示唆する。



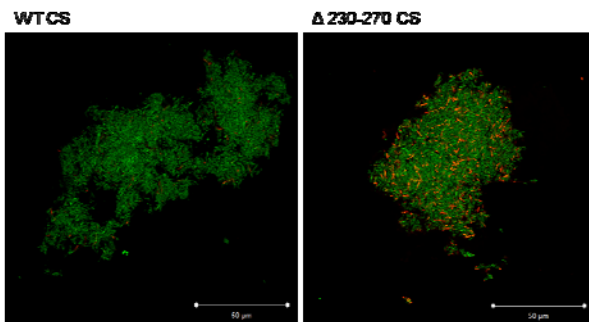
(図 3) FN2047 発現大腸菌の走査型電子顕微鏡像及びグラム染色像

(1) *T. forsythia* の S-layer タンパク

T. forsythia の高分子の 2 種類の表層タンパクは S-layer の構造タンパク (TfsA 及び TfsB) であることが TOF-MS 解析により明らかとなった。TfsA と TfsB の大腸菌発現株作成は失

敗したため、TfsA 及び TfsB の 2 重欠損株(Δ230-270)を用い病原性解析を行った。

Δ230-270 の血清感受性を死細胞特異的な色素 (propidium iodide) により染色し、共焦点顕微鏡観察により解析したところ、野生型と比べて顕著な感受性増加が認められた(図 4)。しかしながら、TfsA 及び B に対する補体制御因子 Factor-H の特異的な結合は認められなかった。



(図 4) 血清処理した *T. forsythia* の死細胞の染色像。緑：全菌、オレンジ：死菌。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (1 件)

① *Fusobacterium nucleatum* 外膜タンパクの性状解析

大貝悠一、下田平直大、野口和行、小松澤均

第 83 回日本細菌学会総会

2010 年 3 月 27～29 日パシフィコ横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大貝 悠一 (OOGAI YUICHI)

鹿児島大学大学院・医歯学・助教

研究者番号：40511259