

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 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：33703

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010 年度～2012 年度

課題番号：22791783

研究課題名（和文）歯周病関連細菌の付着因子と血小板粘着凝集に関する基礎的研究

研究課題名（英文）Study for role of adhesin of periodontal pathogen in platelet aggregation

研究代表者

長谷川 義明（HASEGAWA YOSHIAKI）

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号：70460524

研究成果の概要（和文）：

歯周病原細菌 *P. gingivalis* における Mfa1 線毛の付随成分である von Willebrand factor A 類似蛋白質（PGN0291）と血小板凝集能との関係を明らかにすることを目的とした。PGN0291 タンパク質と血小板凝集能との関連性を示すデータを得ることはできなかったが、以下の知見を得た。1. PGN0291 タンパク質が他の付随成分である PGN0289 及び PGN0290 タンパク質の線毛へのアセンブリに必要な因子であること、2. PGN0291 タンパク質が *P. gingivalis* の自己凝集能とバイオフィルム形成能に関与していること、3. PGN0289 タンパク質が線毛先端に局在していることが明らかになった。これらの結果から、付随成分が線毛先端において複合体を形成し、線毛機能の発揮に重要であることが考えられた。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study was to elucidate the function of von Willebrand factor A domain like protein (PGN0291), the accessory protein of Mfa1 fimbriae of *P. gingivalis*, in platelet aggregation. The following findings were obtained although relationship between PGN0291 protein and platelet aggregation were not found. 1. PGN0291 protein was required for assembly of other accessory proteins of PGN0289 and PGN0290. 2. PGN0291 protein was involved in *P. gingivalis* auto-aggregation. 3. PGN0289 protein was localized at tip of fimbriae. These findings indicate that PGN0289, PGN0290 and PGN0291, the accessory proteins of Mfa1 fimbriae, form the complex at the tip, and are important for function of Mfa1 fimbriae.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	500,000	150,000	650,000
2012 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：形態系基礎歯科学

科研費の分科・細目：

キーワード：Mfa1 線毛、PGN0291、*Porphyromonas gingivalis*、付随成分、歯周病関連菌

1. 研究開始当初の背景

歯周病と血管疾患との関連が示され注目されている。しかし、その分子機序は不明な

点が多い。歯周病関連菌 *Porphyromonas gingivalis* は菌体表層に 2 種の FimA 線毛と Mfa1 線毛を有する。近年、Mfa1 線毛の構成

成分の1つとして von Willebrand factor A (vWFA) 類似蛋白質 (PGN0291) が同定された。vWFA は細胞外基質への付着や血小板凝集に関与することから、PGN0291 タンパク質が、*P. gingivalis* の血小板粘着凝集や血管壁への付着に関わるアドヘジンとして機能している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、1. 血小板粘着凝集過程における PGN0291 タンパク質の機能解析、2. 付随成分の局在の検討により、Mfa1 線毛の機能と構造を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株

P. gingivalis ATCC 33277 株、33277 株由来の *fimA* 変異株、*fimA* 変異株を親株として作製された PGN0289、PGN0290 及び PGN0291 変異株を使用した。

(2) Mfa1 線毛の精製

fimA 変異株及び PGN0291 変異株からイオン交換カラムとゲル濾過により Mfa1 線毛を精製した。

(3) 血小板凝集能の評価

血小板は、歯周疾患が無く抗血小板剤を2週間以内に服用していない健常者から調製した。採取直後の血液にクエン酸ナトリウムを加え、100×g で20分間室温にて遠心分離することにより、platelet-rich-plasma (PRP) を得た。200 µl の PRP をスターラーの入った専用チューブ4本に分注後プレインキュベートを行い、次いで OD₆₀₀ の値を合わせた *fimA* 変異株及び PGN0291 変異株の菌液を添加し、血小板凝集測定器にて血小板凝集の経時変化をモニターした。以上の実験は朝日大学倫理委員会の承認を得て実行した(承認番号: 24133)。

(4) ヘパリンとの相互作用の解析

fimA 変異株及び PGN0291 変異株から精製した Mfa1 線毛をヘパリン固相化カラムに添加し、NaCl を用いたグラジエントにより溶出し、ヘパリンとの結合能の違いを評価した。

(5) 細胞外基質との結合の検討

I 型あるいはフィブロネクチンと PGN0291 タンパク質との結合を ELISA により検討した。I 型、III 型コラーゲンにてコートされた96穴プレートを BSA にてブロッキング後、*fimA* 変異株及び PGN0291 変異株から精製した線毛を加えインキュベートした。PBS にて3回洗浄後、一次抗体として抗 Mfa1 線毛ウサギ抗血清、二次抗体としてペルオキシダーゼ標識抗ウサギ抗体を用い、結合した Mfa1 線毛を TMB peroxidase EIA substrate kit で検出した。

(6) PGN0291 変異株における精製 Mfa1 線毛の構成成分の解析

精製線毛を SDS-PAGE により展開し、CBB 染色を行った。また、抗 PGN0289、抗 PGN0290 あるいは抗 PGN0291 ウサギ抗血清を用いたウェスタンブロットを行った。

(7) 精製 Mfa1 線毛の形態学的検討

精製線毛をメッシュに載せ、1%モリブデン酸アンモニウムによるネガティブ染色を施し、電子顕微鏡による観察を行った。

(8) 自己凝集能の評価

fimA 変異株あるいは PGN0291 変異株の懸濁液を入れた試験管を室温で振盪し OD₆₆₀ を経時的に測定した。相対的濁度は測定開始時の OD₆₆₀ に対する%で示した。

(9) バイオフィーム形成能の評価

fimA 変異株あるいは PGN0291 変異株の懸濁液を96穴プレートに添加し、37°C で24時間嫌氣的に培養した。形成されたバイオフィームをクリスタルバイオレット法にて評価した。

(10) 免疫電顕二重染色法

免疫電顕二重染色法にて、Mfa1 タンパク質と PGN0289、PGN0290 あるいは PGN0291 タンパク質との共局在を検討した。*fimA* 変異株の菌体あるいは精製 Mfa1 線毛をメッシュに載せ、BSA でブロッキング後、抗 Mfa1 ニワトリ抗血清と抗 PGN0289、抗 PGN0290 あるいは抗 PGN0291 ウサギ抗血清にて反応させた。膜を PBS で2回洗浄後、6 nm の金コロイドで標識した抗ニワトリ Ig 抗体および 20 nm の金コロイドで標識した抗ウサギ抗体にて反応後、PBS にて膜を2回洗浄した。さらに、1%モリブデン酸アンモニウムでネガティブ染色後、透過型電子顕微鏡にて観察した。ネガティブコントロールとして PGN0289、PGN0290 あるいは PGN0291 変異株を供した。

4. 研究成果

(1) PGN0291 変異株の血小板凝集能

PGN0291 変異株の血小板凝集能は *fimA* 変異株と同程度であり、菌株間における差は認められなかった。

(2) ヘパリンとの相互作用

fimA 変異株及び PGN0291 変異株の Mfa1 線毛が、Tris-HCl pH 8.0 の条件でヘパリン固相化カラムに吸着することが分かったが、菌株間におけるアフィニティーの差異は認められなかった。

(3) 細胞外マトリックスとの結合性

fimA 変異株及び PGN0291 変異株の精製 Mfa1 線毛及び菌体と I 型コラーゲンあるいはフィブロネクチンとの結合性は認められず、菌株間での差も認められなかった。

(4) 精製 Mfa1 線毛の構成成分の解析

精製線毛を用いた SDS-PAGE において、*fimA* 変異株において検出される 130 kDa 及び 150 kDa の PGN0291 タンパク質バンドが PGN0291 変異株では完全に消失した。40 kDa の

PGN0289 及び 30 kDa の PGN0291 タンパク質バンドも認められなかった。さらに、ウェスタンブロットによる解析により、PGN0291 変異株における PGN0289 及び PGN0290 タンパク質の消失が確認された。以上の結果から、PGN0291 タンパク質が PGN0289 及び PGN0290 タンパク質の線毛へのアセンブリに必要な因子であることが明らかになった。

(5) 電子顕微鏡による形態学的検討

fimA 株と PGN0291 変異株の精製線毛は約 100 nm の線毛として観察され、両株間における構造の違いを見出すことはできなかった。

(6) 自己凝集能の評価

PGN0291 変異株では、*fimA* 変異株と比較して OD₆₆₀ の経時的な減少が顕著に認められ、強い凝集傾向を示した(図 1)。この結果から、PGN0291 遺伝子が *P. gingivalis* の自己凝集能に関与していることが明らかになった。

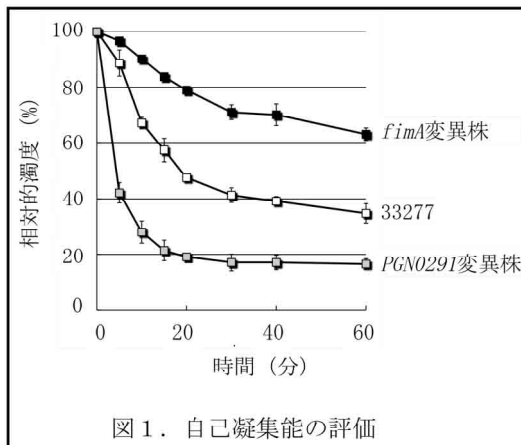


図 1. 自己凝集能の評価

(7) バイオフィーム形成能の評価

fimA 変異株と比較して PGN0291 変異株では有意に増加した。この結果から、PGN0291 遺伝子がバイオフィームの制御に関与していることが明らかになった。

(8) 免疫電顕二重染色法による局在の検討

抗 PGN0289 抗血清を使用した場合において、20 nm の金コロイド粒子の特異的な結合が観察され、PGN0289 タンパク質が、菌体から約 100 nm 離れた位置に局在することが明らかになった(図 2、白矢印)。一方、PGN0290 及び

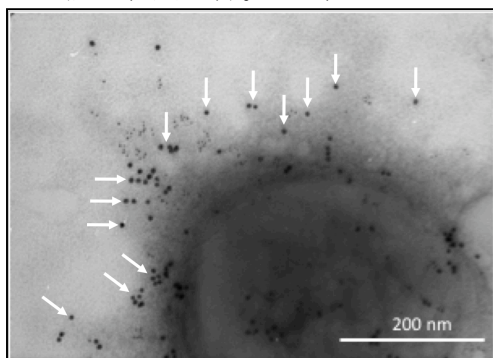


図 2. PGN0289 タンパク質の局在

PGN0291 タンパク質の局在を明らかにすることはできなかった。

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 6 件)

- ① 岸美和子、長谷川義明、村上幸孝、中村洋、吉村文信. *Porphyromonas gingivalis* の糖蛋白質の同定とそれらの欠失による自己凝集能の検討. Bacterial Adherence and Biofilm. 査読無. 2011 年. 24 巻. 57-63.
- ② Toshiharu Abe, Yukitaka Murakami, Keiji Nagano, Yoshiaki Hasegawa, Keiichi Moriguchi, Norikazu Ohno, Kazuo Shimozato, Fuminobu Yoshimura. OmpA-like protein influences cell shape and adhesive activity of *Tannerella forsythia*. Molecular Oral Microbiology. 査読有. 2011 年. 26 巻. 374-387.
- ③ Miwako Kishi, Yoshiaki Hasegawa, Keiji Nagano, Hiroshi Nakamura, Yukitaka Murakami, Fuminobu Yoshimura. Identification and characterization of novel glycoproteins involved in growth and biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis*. Molecular Oral Microbiology. 査読有. 2012 年. 27 巻. 458-470.
- ④ Keiichi Moriguchi, Yuka Mitamura, Jun Iwami, Yoshiaki Hasegawa, Naoya Higuchi, Yukitaka Murakami, Hatsuhiko Maeda, Fuminobu Yoshimura, Hiroshi Nakamura, Norikazu Ohno. Biotechnic & Histochemistry. 査読有. 2012 年. 87 巻. 485-493.
- ⑤ Keiji Nagano, Yoshiaki Hasegawa, Yuki Abiko, Yasuo Yoshida, Yukitaka Murakami, Fuminobu Yoshimura. *Porphyromonas gingivalis* FimA fimbriae: fimbrial assembly by *fimA* alone in the *fim* gene cluster and differential antigenicity among *fimA* genotypes. Plos One. 査読有. 2012. 7 (9):e43722.
- ⑥ 長谷川義明、井貝亮太、出水川雅司、永野恵司、川端淳司、北井則行、吉村文信、村上幸孝. *Porphyromonas gingivalis* における von Willebrand factor A ドメイン類似タンパク質の機能に関する研究. 日本嫌気性菌感染症研究会雑誌. 査読無. 2012 年 42 巻. 43-47.

[学会発表] (計 12 件)

- ① 永野恵司、長谷川義明、村上幸孝、吉村文信. 歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* の FimA 線毛関連因子 FimB に関する研究. 第 56 回日本薬学会東海支部総会. 2010 年 7 月. 岐阜.

- ② 永野恵司、長谷川義明、村上幸孝、吉村文信。 *Porphyromonas gingivalis* の FimA 線毛形成に及ぼす FimB の役割に関する研究。第 52 回歯科基礎医学会学術大会・総会。2010 年 9 月。東京。
- ③ 長谷川義明、永野恵司、村上幸孝、吉村文信。 *Porphyromonas gingivalis* における von Willebrand factor type A domain protein の変異株作製と表現型の解析。第 47 回日本細菌学会中部支部総会。2010 年 10 月。新潟。
- ④ Fuminobu Yoshimura, Keiji Nagano, Yoshiaki Hasegawa, Yukitaka Murakami. A recent advance on the fimbrial morphogenesis of *Porphyromonas gingivalis*. 第 84 回日本細菌学会総会。2011 年 9 月。札幌。
- ⑤ 長谷川義明、永野恵司、村上幸孝、吉村文信。 *Porphyromonas gingivalis* の Mfa1 線毛における微量成分の役割に関する研究。第 53 回歯科基礎医学会。2011 年 10 月。岐阜。
- ⑥ 井貝亮太、長谷川義明、出水川雅司、永野恵司、川端淳司、北井則之、吉村文信、村上幸孝。 *Porphyromonas gingivalis* の Mfa1 線毛微量成分の欠失におけるバイオフィルム形成能の検討。第 48 回日本細菌学会中部支部会。2011 年 10 月。名古屋。
- ⑦ 長谷川義明、井貝亮太、出水川雅司、永野恵司、川端淳司、北井則行、吉村文信、村上幸孝。 *Porphyromonas gingivalis* における von Willebrand factor A ドメイン類似タンパク質の機能に関する研究。第 42 回日本嫌気性菌感染症研究会。2012 年 3 月。大分。
- ⑦ 井貝亮太、長谷川義明、出水川雅司、永野恵司、川端淳司、北井則行、吉村文信、村上幸孝。 *Porphyromonas gingivalis* Mfa1 線毛の付随成分に対する抗血清の作製と相補株の構築。第 85 回日本細菌学会総会。2012 年 3 月。長崎。
- ⑧ 井貝亮太、長谷川義明、出水川雅司、川端淳司、北井則行、村上幸孝。歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* に存在するリン酸化蛋白質の同定。第 54 回歯科基礎医学会学術大会・総会。2012 年 9 月。郡山。
- ⑨ 長谷川義明、井貝亮太、出水川雅司、永野恵司、川端淳司、吉田康夫、北井則行、村上幸孝、吉村文信。 *Porphyromonas gingivalis* の Mfa1 線毛における付随成分 Mfa3 の局在。第 49 回日本細菌学会中部支部総会。2012 年 9 月。金沢。
- ⑩ Yoshiaki Hasegawa, Ryota Ikai, Masashi Izumigawa, Keiji Nagano, Atsushi Kawabata, Noriyuki Kitai, Yasuo Yoshida, Yukitaka Murakami, Fuminobu Yoshimura. Characterization of Mfa3 in Mfa1

fimbriae of *Porphyromonas gingivalis*. The 60th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (JADR). 2012 年 12 月。新潟。

- ⑩ 長谷川義明、井貝亮太、出水川雅司、永野恵司、川端淳司、吉田康夫、北井則行、村上幸孝、吉村文信。 *Porphyromonas gingivalis* のもつ Mfa1 線毛における付随成分 Mfa3 の局在と機能に関する研究。第 86 回日本細菌学会総会。2013 年 3 月。幕張。

- ⑫ 出水川雅司、井貝亮太、堀江俊、長谷川義明、北井則行、村上幸孝。歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* に存在するリン酸化蛋白質の分離。第 86 回日本細菌学会総会。2013 年 3 月。幕張。

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 義明 (HASEGAWA YOSHIAKI)

研究者番号：70460524

(2) 研究分担者

なし

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：