

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24791973

研究課題名(和文) *Treponema denticola* の歯周病原性外膜タンパク質の機能解析研究課題名(英文) Major membrane protein TDE2508 regulates adhesive potency in *Treponema denticola*.

研究代表者

安彦 友希 (ABIKO, YUKI)

東北大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00470170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)： *T. denticola* の主要な膜画分タンパク質を解析したところ、機能未知のTDE2508が検出された。そこで本研究では、TDE2508の性状および機能解析を試みた。その結果、TDE2508は外膜に局在し、また複合体を形成している可能性が示された。欠失株は、ポリスチレンプレートおよび歯肉上皮細胞への付着性が有意に上昇した。しかし、自己凝集性および疎水性には変化が見られなかった。TDE2508は付着制御に関与していることが推察された。しかし、TDE2508の菌体表面への露出については不明であり、本タンパク質による付着制御機構については、直接的あるいは間接的かを含めてさらなる検討が必要である。

研究成果の概要(英文)： In this study, We then analyzed proteins in a membrane fraction in *T. denticola* and identified 16 major membrane-associated proteins, and characterized one of them, TDE2508, whose biological function was not yet known. Although this protein, which exhibited a complex conformation, was presumably localized in the outer membrane, we did not find conclusive evidence that it was exposed on the cell surface. Intriguingly, a TDE2508-deficient mutant exhibited significantly increased biofilm formation and adherent activity on human gingival epithelial cells. However, the protein deficiency did not alter autoaggregation, coaggregation with *Porphyromonas gingivalis*, hemagglutination, cell surface hydrophobicity, motility, or expression of Msp which was reported to be an adherent molecule in this bacteria. In conclusion, the major membrane protein TDE2508 regulates biofilm formation and the adhesive potency of *T. denticola*, although the underlying mechanism remains unclear.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：*Treponema denticola*

1. 研究開始当初の背景

歯周炎は齲蝕と並んで口腔の二大疾患と言われ、いずれも口腔内の細菌が関与する疾患である。

健康な口腔では、常在菌によっていわゆる正常な細菌叢の形成および、宿主-パラサイト(細菌)間における均衡がとられている。

しかし、ひとたび環境が変わり、歯周炎に関連する細菌群が歯肉溝内で増加し、歯周病原性プラークバイオフィルムが形成されると、宿主-細菌間の均衡が崩れ、歯周炎が惹起される。つまり、歯周ポケット内におけるプラークバイオフィルムの質的ならびに量的変化が、歯周炎の発症や進展と深く関係する (Abiko et al. 2010)。

特に、*Porphyromonas gingivalis*、*Tannerella forsythia* および *Treponema denticola* の3菌種は、慢性歯周炎患者の歯周ポケット内で顕著な増加が認められることから、歯周炎の発症および進行に深く関与すると考えられている (Socransky et al. 1998)。

中でも、*T. denticola* はマクロファージの抗原提示を阻害する免疫応答抑制因子を有しているため、歯周炎患者血清中において *T. denticola* に対する抗体価の上昇がみられない。したがって、宿主の免疫応答を回避して歯周病巣局所で増殖し続けることができるといふ、他の歯周炎関連細菌と比べ極めて特殊な性質を持った細菌である。

また、本菌は細胞附着活性や宿主組織細胞への侵入能があるという報告や、動脈硬化症患者の血栓部から検出されるという報告があり、血管系慢性疾患においても重要な細菌である (Okuda et al. 2001)。

以上のことから、*T. denticola* は、歯周炎の発症や進展に深く関与すると考えられており、これまでに本菌の病原因子として、菌体表層のタンパク質分解酵素 prolyl-phenylalanine specific protease (Dentilisin) や附着因子 major outer sheath protein (Msp) などが報告されている。

しかし、その他の病原因子に関する報告は少なく、同じく代表的な歯周病原細菌である *P. gingivalis* に比べ研究が進んでいないのが現状である。

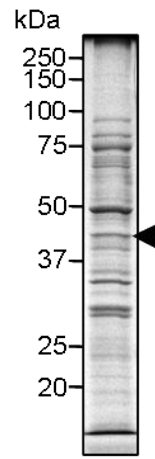
これは、*T. denticola* は栄養要求性が厳しく、動物の血清や、数十種類の試薬を添加した複雑な培地を調整しなければならない上、培養には嫌気的条件下で 1~2 週間を要するためである。

このような点から、難培養性細菌とされ、歯学および医学的に重要な細菌であるにも拘らず、その病原性の研究は遅れがちであった。したがって、より迅速で簡便な培養方法を確立することは、本菌の研究を進展させる上で極めて重要である。

そこで、歯周炎の発症・進展メカニズムを解明するためには、簡便な培養方法の確立と、病原性に関わる外膜タンパク質の機能解析

により、*T. denticola* の性質を明らかにすることが必要と考えられる。

2. 研究の目的



(図1)

T. denticola の外膜画分を SDS-PAGE にて分離し、クマシーブリリアントブルー染色を行い、これらのバンドを質量分析にて解析したところ、矢印()で示すバンドのタンパク質は TDE2508 と同定したものの、アミノ酸配列の BLAST 検索結果では機能が推測できなかった (図1)。

そこで、Phyre (タンパク質構造予測プログラム) にて解析したところ、ポーリンに相同性を有することが示された。

ポーリンとは、グラム陰性細菌の細胞壁にあり、外部から物質を取込む小さな孔のことで三量体を形成している。

さらに詳細に疎水性、親水性傾向を解析すると、バレル構造により、数回の膜貫通領域を有しており、これより、TDE2508 は大腸菌の OmpA ポーリン様タンパク質であることが推察された。

OmpA ポーリンは大腸菌の主要外膜タンパク質で、外膜安定性、形態維持、物質透過孔、ファージレセプター、上皮細胞への附着等に関わることが報告されている。

そこで、TDE2508 も *T. denticola* において同様の機能を有しているのではないかと仮定し、本タンパク質の機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では *T. denticola* の主要外膜タンパク質 TDE2508 の機能を明らかにし、病原性への関与について検討する。

また、本菌の研究の進展にとって困難な面となっている培養方法の改良も試みる。

具体的には以下の項目について行った。

(1) *T. denticola* の培養方法の確立および TDE2508 遺伝子欠失変異株の作製

簡便な培養方法の確立

抗 TDE2508 菌体内局在の確認

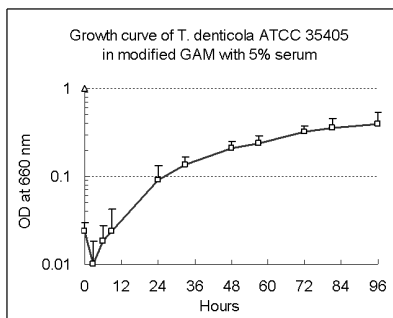
TDE2508 遺伝子欠失変異株の作製

(2) TDE2508 の機能解析: TDE2508 欠失変異株と親株 (*T. denticola* ATCC35405) との比較

形態・上皮細胞への附着能・疎水性・自己凝集性の比較

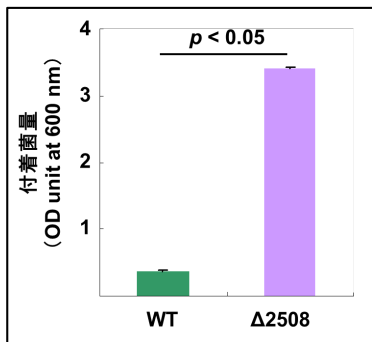
4. 研究成果

従来、*T. denticola* の培養には数十種の脂肪酸やアミノ酸、および血清を添加した複雑な培地 (TYGVS 培地) が用いられているが、本研究では市販培地 (変法 GAM 培地) の利用を試みた。その結果、変法 GAM 培地に血清とチアミンを添加することで培養可能であった (図 2)。

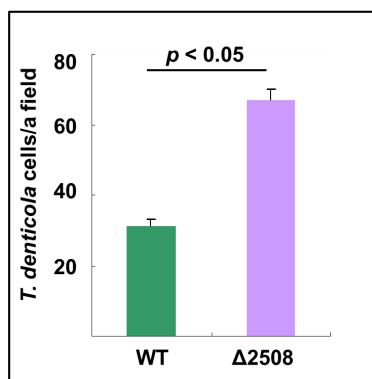


(図 2)

TDE2508 は外膜に局在し、また複合体を形成している可能性が示された。TDE2508 欠失変異株と親株 (*T. denticola* ATCC35405) とを比較したところ、欠失株は、ポリスチレンプレート (図 3) および歯肉上皮細胞 (図 4) への付着性が有意に上昇した。



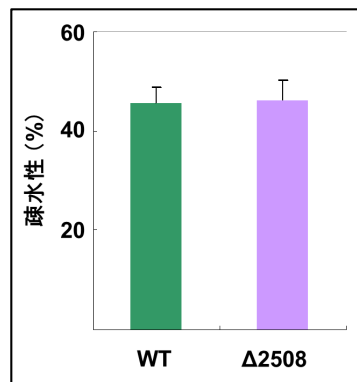
(図 3)



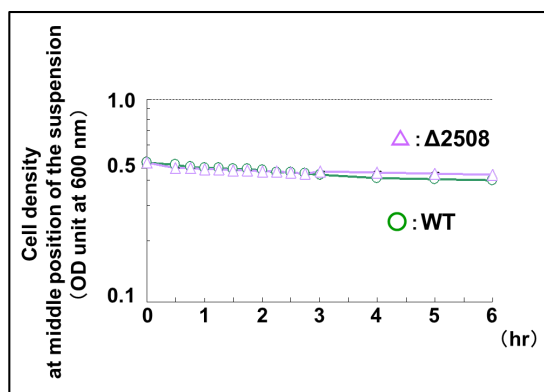
(図 4)

しかし、疎水性および自己凝集性には変化が見られなかった (図 5, 6)。また、Msp の発現にも変化はみられなかった (図 7a, b)。TDE2508 は付着制御に関与していることが推察された。しかし、TDE2508 の菌体表面への露出につい

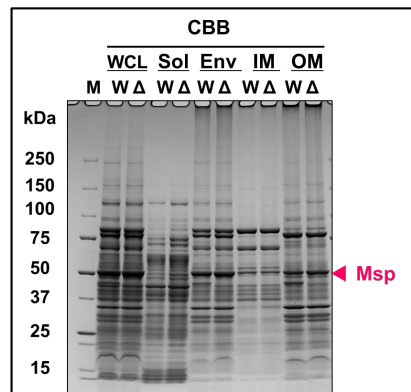
ては不明であり、本タンパク質による付着制御機構については、直接的あるいは間接的かを含めてさらなる検討が必要である。



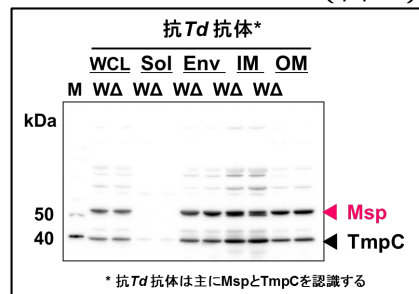
(図 5)



(図 6)



(図 7a)



* 抗 *Td* 抗体は主に Msp と TmpC を認識する

(図 7b)

全菌体: Whole cell lysate (WCL)
可溶性: Soluble (cytosol, Sol)
不溶性膜: Envelope (membrane, Env)
内膜: Inner membrane (IM)
外膜: Outer membrane (OM)

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)

Abiko Y, Nagano K, Yoshida Y, Yoshimura F. Characterization of *Treponema denticola* mutants defective in the major antigenic proteins, Msp and TmpC. PLoS One. 2014 Nov 17;9(11):e113565. doi: 10.1371/journal.pone.0113565. 査読有り.

Abiko Y, Nagano K, Yoshida Y, Yoshimura F. Major membrane protein TDE2508 regulates adhesive potency in *Treponema denticola*. PLoS One. 2014 Feb 21;9(2):e89051. doi: 10.1371/journal.pone.0089051. 査読有り.

〔学会発表〕(計4件)

安彦友希, 永野恵司, 吉田康夫, 吉村文信: 歯周病関連細菌 *Treponema denticola* の主要膜タンパク質の性状解析. 第55回歯科基礎医学会学術大会・総会(岡山), 2013.9.21.

Abiko Y, Nagano K, Yoshida Y, Yoshimura F: Analysis of major outer membrane protein TDE2508 of *Treponema denticola*. 第2回IADR Asia Pacific Region 学術大会(Thai, Bangkok), 2013.8.21.

安彦友希, 永野恵司, 吉田康夫, 吉村文信: 歯周病関連細菌 *Treponema denticola* の主要膜タンパク質 TDE2508 の性状および機能解析. 第82回学術大会愛知学院大学歯学会(名古屋), 2013.6.2.

5 . 研究組織

(1)研究代表者

安彦 友希 (ABIKO, Yuki)
東北大学大学院・歯学研究科・助教
研究者番号: 00470170