

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792372

研究課題名(和文) 口腔内バイオフィルム形成及び歯周病原性発現における ECF シグマ因子の役割

研究課題名(英文) Role of ECF sigma factors of Porphyromonas gingivalis on biofilm formation or virulence

研究代表者

菊池 有一郎 (KIKUCHI, YUICHIRO)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：30410418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

研究成果の概要(和文)：歯周病原細菌 Porphyromonas gingivalis は 6 種の ECF シグマ因子を保有する。本研究では、それぞれの ECF シグマ因子の変異株を作製し、病原性との関わりについて検討した。その結果、Rgp、Kgp 活性は PG0162 (PGN_0274) 変異株にて顕著に減少した。阻止円形成法の結果、PG1827 (PGN_1740) 変異株にて酸化ストレスに対する感受性が顕著に増加した。また、PG0162 (PGN_0274)、PG1827 (PGN_1740) 変異株はバイオフィルム形成の増加を認めた。よって、P. gingivalis の病原性発現に ECF シグマ因子は重要な役割を果たすことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Extracytoplasmic function (ECF) sigma factors are known to transmit changes in environmental signals to specific responses in gene expression. In the genome of periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis, six ECF sigma factors were identified. To elucidate the role of ECF sigma factors in this bacterium, chromosomal mutants carrying a disruption in each ECF sigma factor-encoding gene were constructed. Our results indicate that PG0162 (PGN_0274) mutant showed decreased gingipain protease activity. Furthermore, the mutant defective in PG1827 (PGN_1740) was sensitive to hydrogen peroxide compared with the wild-type strain. In addition, the PGN_0274 and PGN_1740-defective mutants had increased biofilm formation compared with the wild type. Collectively, our studies demonstrate that each ECF sigma factor is cooperatively involved in P. gingivalis virulence.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：歯周病原細菌 Porphyromonas gingivalis シグマ因子 ECFシグマ因子 転写因子 環境ストレス バイオフィルム 遺伝子挿入変異株

1. 研究開始当初の背景

細菌の RNA ポリメラーゼは、シグマ因子がプロモーター領域の特異的な配列を認識することで、遺伝子の発現を調節している。通常、細菌はシグマ因子を数種類備えており、環境に応じてその存在比率を変えることでその環境に適した遺伝子群の転写を発現調整している。その中で、ECF (extracytoplasmic function) シグマ因子は細胞外の生活環境変化に应答し、細菌に対する環境ストレスを回避することに重要な役割を果たすと大腸菌をはじめとする幾つかの細菌で報告されている。

歯周ポケットを含め、口腔内の環境は常に変化しており、そこに生息する細菌は様々な環境の変化に対応する機構を持ち備えている。現在まで、慢性歯周炎の代表的な病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) が備える環境ストレス回避タンパクについては数多く報告されているが、その環境ストレス回避タンパクの発現を調節している転写因子に関する報告は数少ない。歯周病の発症および進行を理解するために、歯周疾患を引き起こす細菌の性状解析は不可欠なことである。

P. gingivalis には 6 種類の ECF シグマ因子が存在する (W83:PG0162, PG0214, PG0985, PG1318, PG1660, PG1827 ATCC33277 株:

PGN_0274, PGN_0319, PGN_0450, PGN_0970, PGN_1108, PGN_1740)。我々のグループは、*P. gingivalis* W83 株において、PG1318 遺伝子挿入変異株を作製した。*P. gingivalis* は血液寒天培地上で黒色集落を形成するが、PG1318 変異株は黒色、白色、その中間色とさまざまな集落が認められた。この結果から PG1318 を変異させると黒色集落形成に関する遺伝子に変異が起こりやすくなることが予想された。PG1318 変異株の黒色集落形成に関する遺伝子周辺の塩基配列を解析すると、数株にて遺伝子の欠失を認めた。よって、PG1318 は酸化ストレス回避もしくは DNA 修復に関係するタンパクの遺伝子発現を調整することで遺伝子の突然変異を抑制していることを報告した。

P. gingivalis が慢性的に歯周炎を発症していくには、周囲環境ストレスに富む歯周ポケットにて長期間生存することが可能で、周囲の細菌と混合感染することでバイオフィームを形成・肥大化させることが必須と考える。それゆえ、*P. gingivalis* の周囲環境ストレス調節機構がバイオフィーム形成能または病原性と深く関連するとの予想を行い、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*P. gingivalis* に存在する 5 種類の ECF シグマ因子について、それぞれが

- (1) *P. gingivalis* において環境ストレスを回避する役割を担っているか、
 - (2) 口腔内バイオフィーム形成における ECF シグマ因子の重要性について、
 - (3) *P. gingivalis* の病原性発現に重要な役割を担っているのか、
- 以上 3 点を明らかにすることを目的とする。

研究期間内で明らかとすることは、

(1) 5 種類の ECF シグマ因子が関係する細胞外環境ストレスの同定

それぞれの ECF シグマ因子と関連する環境ストレス (温度、酸素、pH 変化、栄養飢餓) を同定する。

(2) 5 種類の ECF シグマ因子とバイオフィーム形成能・歯周病原性発現との関連性の有無の検討

P. gingivalis の病原性 (バイオフィーム形成能、プロテアーゼ活性) の発現に ECF シグマ因子が関与するか検討する。

3. 研究の方法

本研究は、最初に *P. gingivalis* の 5 種類の ECF シグマ因子変異株を作製した。次に、野生株と変異株を用いて、ECF シグマ因子を変異させることにより歯周病原性の一つであるプロテアーゼ活性の発現に差が認められるか検討した。また、酸化ストレス環境下にて、野生株と変異株に感受性の差が認められるか阻止円形成法にて検討した。最後に野生株と変異株および相補株のバイオフィーム形成能に ECF シグマ因子の影響が認められるか検討した。

4. 研究成果

5 つの ECF シグマ因子遺伝子 (PG0162, PG0214, PG0985, PG1660, PG1827) 及びその周辺を *P. gingivalis* W83 株のゲノムをもとに PCR 法で増幅し、クローニングベクターに組み込みターゲットベクターとした。*P. gingivalis* の株間により各 ECF シグマ因子が支配している遺伝子に差が認められる可能性もあるので、全ゲノム配列がすでに発表されている W83 株と代表的な株である 33277 株の両方において ECF シグマ因子変異株を作製した。DNA シークエンサーにて塩基配列を確認後、目的遺伝子内にエリスロマイシンカセットを挿入したターゲットベクターを構築し、その後エレクトロポレーターによりターゲットベクターを 33277 株と W83 株に導入し、相同組換えを起こさせることにより変異株を得た。変異株にてそれぞれの ECF シグマ因子遺伝子の転写が行われていないことを reverse transcription PCR 法にて確認した (図 1)。

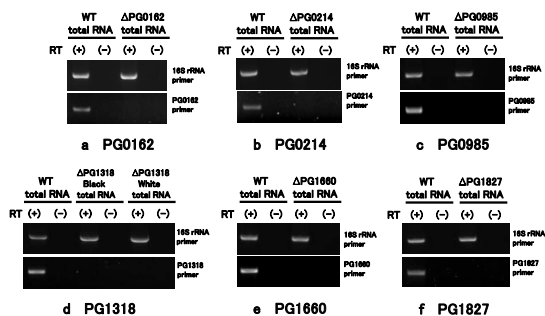


図1. ECF シグマ因子変異株の reverse transcription PCR
RT: reverse transcriptase

次に野生株と ECF シグマ因子変異株を用いて、プロテアーゼ活性 (Kgp, Rgp) 活性を測定した。その結果、Kgp, Rgp 活性ともに、162 変異株にて顕著な減少を認めた (図2)。また、*P. gingivalis* は血液寒天培地上にて黒色集落を形成することが特徴であるが、162 変異株の独立集落は白色であった。

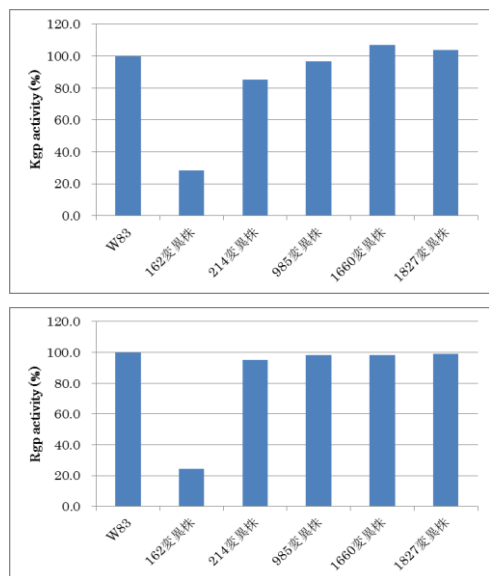


図2. プロテアーゼ (Kgp, Rgp) 活性

次に野生株と ECF シグマ因子変異株を用いて、0.75% H_2O_2 に対する感受性を阻止円形成法にて測定した。その結果、1827 変異株は過酸化水素に対する感受性の顕著な増加を認めた (図3)。

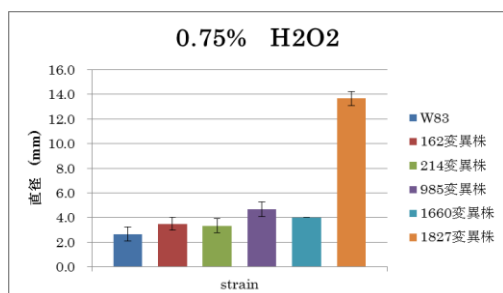


図3. 過酸化水素に対する感受性試験

次に、野生株と5種類の ECF シグマ因子それぞれの変異株を用いて、*P. gingivalis* のバイオフィーム形成能に差が認められるか検討した。この実験系における ECF シグマ因子変異株は ATCC 33277 株を親株とした変異株を用いた。方法は、12well プラスチックプレートに菌液を接種し、二日間嫌気培養後、洗浄後クリスタルバイオレット染色性で評価を行った。その結果、PGN_0274 と PGN_1740 変異株にて、バイオフィーム量の顕著な増加を認めた (図4)。

ECF変異株のバイオフィーム形成量 (クリスタルバイオレット染色)

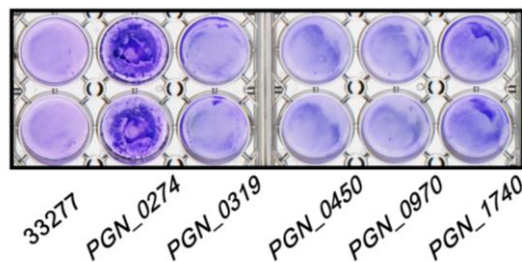


図4. バイオフィーム形成試験

次に、PGN_0274 と PGN_1740 について相補株を作製することとした。方法は、pT-COW ベクターに相補させたい遺伝子をクローニングし、そのベクターをエレクトロポレーション法にて ECF シグマ因子変異株に組み込んだ。寒天培地にテトラサイクリンを混ぜ、セレクトションを行った。その、相補株と変異株、野生株を用い再度バイオフィーム形成実験を試みたところ、PGN_0274 と PGN_1740 変異株におけるバイオフィーム形成量の増加は、当該遺伝子を相補することにより野生株と同程度に回復した (図5, 図6)。

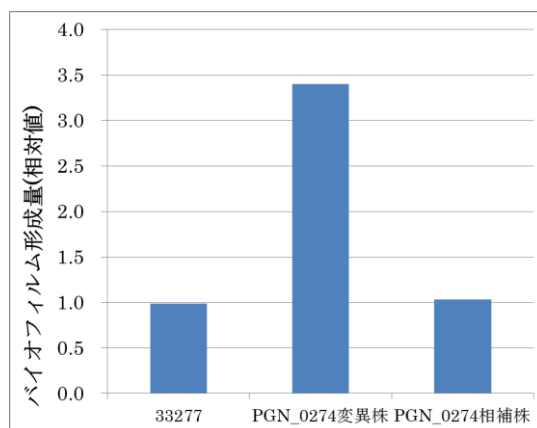


図5. PGN_0274 変異株および相補株のバイオフィーム形成量

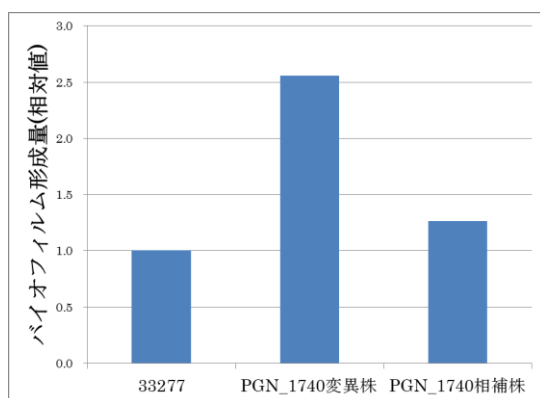


図 6. PGN_1740 変異株および相補株のバイオフィルム形成量

以上の結果より、PG0162 (PGN_0274) は、*P. gingivalis* の病原性に関わる Rgp, Kgp 活性の発現に関与していることが明らかとなった。また、PG1827 (PGN_1740) は、酸化ストレス消去に関わるタンパクの発現を調整していること示唆された。また、PG0162 (PGN_0274) と PG1827 (PGN_1740) は、*P. gingivalis* のバイオフィルム形成に関与するタンパク質の遺伝子発現を調整していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕 (計 3 件)

①菊池有一郎, 柴山和子, 国分栄仁, 大原直也, 中山浩次, 石原和幸.

バイオフィルム形成における *Porphyromonas gingivalis* ECF シグマ因子の役割.

第 55 回歯科基礎医学会学術大会.

2013 年 9 月 20~22 日, 岡山コンベンションセンター.

②菊池有一郎.

歯周病原細菌のバイオフィルム形成因子の探索.

日本細菌学会 第 7 回若手研究者育成のためのワークショップ: 若手研究者によるバイオフィルム研究ワークショップ.

2013 年 6 月 2 日, 国立感染研究所.

③菊池有一郎, 柴山和子, 国分栄仁, 大原直也, 中山浩次, 石原和幸.

P. gingivais の ECF シグマ因子 PG1318 変異株はミューテーター形質を示す.

第 86 回日本細菌学会総会.

2013 年 3 月 18~20 日, 幕張メッセ国際会議場.

6. 研究組織

研究代表者

菊池 有一郎 (KIKUCHI YUICHIRO)

東京歯科大学・微生物学講座・助教

研究者番号: 30410418