

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890118

研究課題名(和文)ポルフェロモナス ジンジバリスのバイオフィルム形成に関連する遺伝子の役割解析

研究課題名(英文) Analysis of the role of genes involved in biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis*

研究代表者

山本 れいこ (Yamamoto, Reiko)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・特任研究員

研究者番号：70636133

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円、(間接経費) 630,000円

研究成果の概要(和文)：バイオフィルムの菌体外マトリックスはタンパク質や糖、核酸などから構成され、バイオフィルム構造の安定化や、抗菌薬および免疫細胞からの微生物の保護などの役割を持つ。そのため、既存の抗菌薬を用いても十分な効果が得られず、バイオフィルムの制御には細菌自体ではなく菌体外マトリックスを標的とした戦略が必要である。

本研究では、主要な歯周病原性細菌の1種、*Porphyromonas gingivalis* の転写調節因子の1つ PGN\_0088 に着目し、菌体外マトリックスへの関与について検討した。その結果、PGN\_0088 が本菌の菌体外マトリックス中の糖成分の産生を制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The extracellular matrix of the biofilm comprised of protein, carbohydrate and nucleic acid has been shown to functions such as protector of the microbe against antimicrobial agents and immune cells, and stabilizer of the biofilm structure. Therefore, traditional antimicrobial agents have less effect on suppression of biofilm infection, and the development of a novel strategy that targets extracellular matrix instead of microbial cells is necessary for control of the biofilm. In this study, I focused on a transcription factor PGN\_0088 of *Porphyromonas gingivalis*, that is one of the main pathogen of periodontal disease, and examined how PGN\_0088 works on the extracellular matrix in biofilm.

As a result, it became clear that PGN\_0088 effects on carbohydrate synthesis in the extracellular matrix of *P. gingivalis* biofilm.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：保存治療系歯学

キーワード：歯学 バイオフィルム *Porphyromonas gingivalis* 遺伝子 糖

## 1. 研究開始当初の背景

バイオフィームとは固体と液体の界面に形成される微生物集落のことで、バイオフィーム中の微生物は自ら産生した菌体外マトリックスに被覆されている。歯や口腔軟組織に形成されたバイオフィームは、う蝕や歯周炎などの口腔バイオフィーム感染症の主因であり、口腔疾患と密接な関わりを持つ。また、難治性根尖性歯周炎罹患歯の根尖孔外からは頻りにバイオフィームが検出され、根尖性歯周炎の難治化にはこの根尖孔外バイオフィームが関与していることが明らかとなった (Noiri *et al*, *J Endodon* 28, 679-83, 2002)。そして、偏性嫌気性のグラム陰性桿菌である *Porphyromonas gingivalis* が難治性根尖性歯周炎罹患歯の根尖孔外バイオフィームから高頻度で同定され、根尖性歯周炎の難治化に強く関与することが明らかとなった (Noguchi *et al*, *Appl Environ Microbiol* 71, 8738-43, 2005)。本菌は、重度歯周炎患者の歯周ポケット全域より検出されることが報告されており (Noiri *et al*, *J Dent Res* 80, 1930-34, 2001, *J Dent Res* 83, 941-5, 2004)、辺縁性歯周炎の病原性細菌の1種として病態形成に重要な役割を果たしている。

バイオフィームの菌体外マトリックスはタンパク質や糖、核酸などから構成され、バイオフィーム構造の安定化や、抗菌薬および免疫細胞からの微生物の保護などの役割を持つ。そのため、既存の抗菌薬を用いても十分な効果が得られず、バイオフィームの制御には細菌自体ではなく菌体外マトリックスを標的とした戦略が必要である。

## 2. 研究の目的

近年 *P. gingivalis* の浮遊細菌とバイオフィーム細菌の遺伝子発現を一時点でのみ比較した結果より、様々なバイオフィームに関連遺伝子が報告されたが、申請者らのように、バイオフィーム形成の各過程で経時的に遺伝子発現を解析した結果は国内外共に他に報告はない。バイオフィーム形成・成熟のメカニズムについては未だ不明な点が多いが、バイオフィーム形成、特に菌体外マトリックス産生に関与する可能性の高い遺伝子のバイオフィーム形成における役割を明らかにすることは、機械的除去が困難な部位に形成されたオーラルバイオフィームに対する、遺伝子工学的知見に基づいた新たな制御戦略の確立に大きく貢献することが期待される。

本研究では、遺伝子工学的手法を用いてバイオフィーム形成メカニズムの一端を明らかにすることにより、新規のバイオフィームの制御法の開発の緒を探ることを念頭に、難治性根尖性歯周炎や辺縁性歯周炎の主要病

原性細菌の1種、*P. gingivalis* ATCC 33277株のバイオフィーム形成過程において発現量が顕著に変化した遺伝子のうち、転写調節因子をコードし、菌体外マトリックス産生への関与が示唆されている、PGN\_0088のバイオフィーム形成における役割について解析することを目的とした。

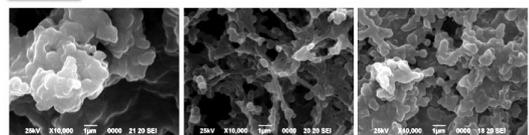
## 3. 研究の方法

*P. gingivalis* ATCC 33277株の PGN\_0088配列にエリスロマイシン耐性カセットを相同組換えにより挿入して PGN\_0088 欠損株を作製した。また、PGN\_0088 配列を挿入したプラスミドを構築後、上記の欠損株に接合伝達法を用いて導入することにより相補株を作製した。野生株と作製した欠損株ならびに相補株のバイオフィームを形成し、走査型電子顕微鏡 (SEM) および共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) を用いたバイオフィームの観察、ならびに糖およびタンパク質の濃度測定により、形成されたバイオフィームを評価した。

## 4. 研究成果

SEM 観察において、欠損株のバイオフィームは野生株および相補株に比べ、起伏に富んだ構造をしていた (下図)。また、CLSM 観察では、欠損株のバイオフィームは網目様の糖構造を示した (下図)。さらに、バイオフィーム中の菌体当りの糖成分の量は欠損株において、野生株および相補株と比べて有意に増加した (下図)。

SEM 像

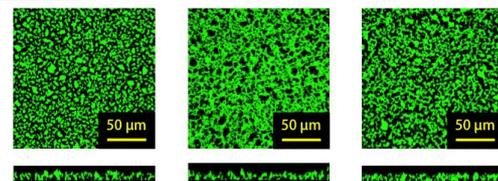


野生株  
(ATCC 33277)

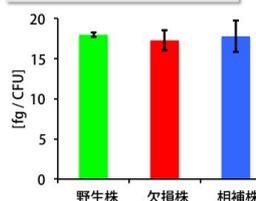
欠損株  
(PGN\_0088::ermF)

相補株  
(PGN\_0088::ermFpTCB-PGN\_0088)

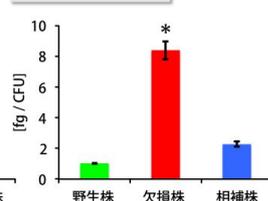
CLSM 像



菌体当たりのタンパク質量



菌体当たりの糖量



\*;  $P < 0.001$ , Welch's t-test

これらの結果より、PGN\_0088 は、バイオフィルムの中で菌体外マトリックス中の糖成分の合成を抑制し、バイオフィルムの立体構造に関与していると示唆された。

## 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 5 件)

1) Hashino E, Kuboniwa M, Alghamdi SA, Yamaguchi M, Yamamoto R, Cho H, Amano A: Erythritol alters microstructure and metabolomic profiles of biofilm composed of *Streptococcus gordonii* and *Porphyromonas gingivalis*. *Mol Oral Microbiol*, 28: 435-451, 2013.

2) Yamaguchi M, Noiri Y, Kuboniwa M, Yamamoto R, Asahi Y, Maezono H, Hayashi M, Ebisu S: *Porphyromonas gingivalis* biofilms persist after chlorhexidine treatment. *Eur J Oral Sci*, 121: 162-168, 2013.

3) Yamamoto R, Noiri Y, Yamaguchi M, Asahi Y, Maezono H, Kuboniwa M, Hayashi M, Ebisu S: The *sinR* ortholog PGN\_0088 encodes a transcriptional regulator that inhibits polysaccharide synthesis in *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 biofilms. *PLoS One*, 8: e56017, 2013.

4) 山本 れいこ, 野村由一郎, 山口幹代, 朝日陽子, 前園葉月, 呉本勝隆, 林美加子, 恵比須繁之: *Porphyromonas gingivalis* の PGN\_0088 遺伝子の役割解析 -バイオフィルム形成とマクロライド系抗生物質の抗バイオフィルム作用について-. *Bacterial Adherence & Biofilm*, 26: 65-71, 2012.

5) Itoh S, Matsushita K, Ikeda S, Yamamoto Y, Yamauchi Y, Yoshioka S, Yamamoto R, Ebisu S, Hayashi M, Aubin JE: Bone Marrow-Derived HipOP Cell Population Is Markedly Enriched in Osteoprogenitors. *Int J Mol Sci*, 13: 10229-10235, 2012.

[学会発表](計 9 件)

1) 山本 れいこ, 野村由一郎, 山口幹代, 朝日陽子, 前園葉月, 呉本勝隆, 林美加子, 恵比須繁之、*Porphyromonas gingivalis* の PGN\_0088 遺伝子はバイオフィルム形成に関与する、日本歯科保存学会 2013 年度秋期学術大会(第 139 回)、秋田市、2013 年 10 月。

2) Yamamoto R, Noiri Y, Yamaguchi M, Asahi Y, Maezono H, Kuboniwa M, Hayashi M, Ebisu S、Role of PGN\_0088 of *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation、2<sup>nd</sup> IADR-APR 2013、Bangkok, Thailand (August 2013).

3) 呉本 勝隆, 野村 由一郎, 石本 卓也, 永山 智崇, 騎馬 和歌子, 前園 葉月, 山本 れいこ, 米田 直道, 中野 貴由, 林 美加子, 恵比須 繁之、根尖孔外バイオフィルムモデルにおけるラット根尖病巣のマイクロ CT 解析、日本歯科保存学会 2012 年度秋期学術大会(第 137 回)、広島市、2012 年 10 月。

4) Yamamoto R, Noiri Y, Yamaguchi M, Asahi Y, Maezono H, Kuremoto K, Hayashi M and Ebisu S、Role of PGN\_0088 of *Porphyromonas gingivalis* - Biofilm Formation and Antibiofilm Effect of Macrolide Antibiotics -、6th ASM Conference on Biofilms、Miami, USA (October 2012).

5) Yamaguchi M, Noiri Y, Asahi Y, Maezono H, Yamamoto R, Kuremoto K, Hayashi M, Ebisu S、Dispersal of *Porphyromonas gingivalis* Biofilm Induced by Environmental Factors and Proteases、6th ASM Conference on Biofilms、Miami, USA (October 2012).

6) Maezono H, Noiri Y, Asahi Y, Yamaguchi M, Yamamoto R, Kuremoto K, Hayashi M, Ebisu S、Altered Protein Expressions by Sub - Minimum Inhibitory Concentrations of Azithromycin on *Porphyromonas gingivalis* Biofilms、6th ASM Conference on Biofilms、Miami, USA (October 2012).

7) 山本 れいこ, 野村 由一郎, 山口 幹代, 朝日 陽子, 前園 葉月, 呉本 勝隆, 林 美加子, 恵比須 繁之、*Porphyromonas gingivalis* の PGN\_0088 遺伝子の役割解析 -バイオフィルム形成とマクロライド系抗生物質の抗バイオフィルム作用について-、第 26 回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会、大阪市、2012 年 7 月。

8) 薮根 敏晃, 野村 由一郎, 山本 れいこ, 山口 幹代, 朝日 陽子, 前園 葉月, 永山 智崇, 呉本 勝隆, 騎馬 和歌子, 林 美加子, 恵比須 繁之、難治性根尖性歯周炎に関わるバイオフィルム構成細菌種と臨床症状との関係、日本歯科保存学会 2012 年春季学術大会(第 136 回)、宜野湾市、2012 年 5 月。

9) 山口 幹代, 野村 由一郎, 朝日 陽子, 前園 葉月, 山本 れいこ, 呉本 勝隆, 林 美加子, 恵比須 繁之、*Porphyromonas gingivalis* のバイオフィルム形成におけるプロテアーゼの役割、日本歯科保存学会 2012

年春季学术大会(第 136 回)、宜野湾市、2012  
年 5 月.

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

山本れいこ (Yamamoto, Reiko)

大阪大学・歯学研究科・特任研究員

研究者番号 : 70636133