

令和元年6月5日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11466

研究課題名(和文) 歯周病原細菌の線毛構築機序の解明から浮かび上がる線毛構造モデルと未知なる機能

研究課題名(英文) The structure model and function of fimbriae from the periodontal pathogen.

研究代表者

長谷川 義明 (Hasegawa, Yoshiaki)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：70460524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* の持つ Mfa1 線毛は Mfa1-Mfa5 タンパク質から構成される。しかし、本線毛の形態形成機序や機能には不明な点が多い。そこで本研究では、Mfa5 の輸送機序、線毛形成との関連、局在について解析し、Mfa1 線毛の形態形成機序の全貌を明らかにすることを目的とした。その結果、Mfa5 が菌体表面での線毛発現に必要なことが明らかになった。また、Mfa5 が線毛の最先端に局在している可能性が示された。さらに Mfa5 は、タイプ IX 分泌装置依存的に細胞外に輸送され線毛に組み込まれること、Mfa3 及び Mfa4 の線毛への組み込みに必要であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Mfa1 線毛の形態形成機序および付随成分の局在を含めた線毛構造の一端が明らかになった。本研究が、Mfa5 などの付随成分の機能を特異的に阻害するような新しい薬剤の開発に繋がることを期待している。

研究成果の概要(英文)：Mfa1 fimbrial forms are composed of five proteins of Mfa1-Mfa5, but there is limited information about their polymerization mechanisms and functions. Here, we evaluated the localization and function of Mfa5 in biogenesis of Mfa1 fimbriae. As a result, Mfa5 was necessary for expression of intact Mfa1 fimbriae on the cells surface. Mfa5 may be localized at the tip of the fimbrial shaft. Moreover, Mfa5 function required T9SS-mediated translocation across the outer membrane, and subsequent incorporation into fibers.

研究分野：微生物学

キーワード：歯周病 *Porphyromonas gingivalis* 線毛 Mfa1

## 1. 研究開始当初の背景

グラム陰性偏性嫌気性桿菌 *Porphyromonas gingivalis* は最重要な歯周病関連細菌と目されている。近年、本菌は心血管疾患や早産などの様々な全身疾患にも関連することが明らかになり注目を集めている。本菌はバイオフィルムの形成に必要な **Mfa1** 線毛をもつことが知られている。本線毛は *mfa1* 遺伝子クラスターから発現する **Mfa1-Mfa5** タンパク質から構成されることが明らかにされているが、その形態形成機序や機能には不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

これまで申請者らは、**Mfa1** 線毛は **Mfa1** タンパク質が重合し繊維状構造を形成すること、線毛先端に付随成分 **Mfa3-Mfa5** が結合している可能性を示してきた。さらに、**Mfa1**、**Mfa3** 及び **Mfa4** がジンジパインにより成熟を受けた後に重合することを示した。本研究では、**Mfa5** の輸送機序、線毛形成との関連、局在について解析し、**Mfa1** 線毛の形態形成機序の全貌を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) *mfa5* 変異株の作製

*Mfa5* タンパク質の C 末端には Type IX 分泌装置 (T9SS) により認識される C-terminal domain (CTD) 及びタンパク質間の相互作用に関わる von Willebrand factor A domain (vWF) と相同な配列を有する。そこで、本研究では、*P. gingivalis* JI-1 株 (もう一方の線毛の欠損株) を親株として、

*mfa5* の CTD 及び vWF 領域を削除した CTD 株及び vWF 株をそれぞれ作製し (図 1)、*Mfa5* の細胞外への輸送及び局在化、線毛形成に及ぼす影響を解析した。コントロール株として薬剤マーカーのみを挿入した *mfa5 tetQ* 株を作製した。さらに、T9SS の破壊株の *porU* 株を作製した。これまでの研究で得られている *mfa5* 欠損株 (*mfa5*) 及び *mfa5* 相補株 (+*mfa5*) も使用した。

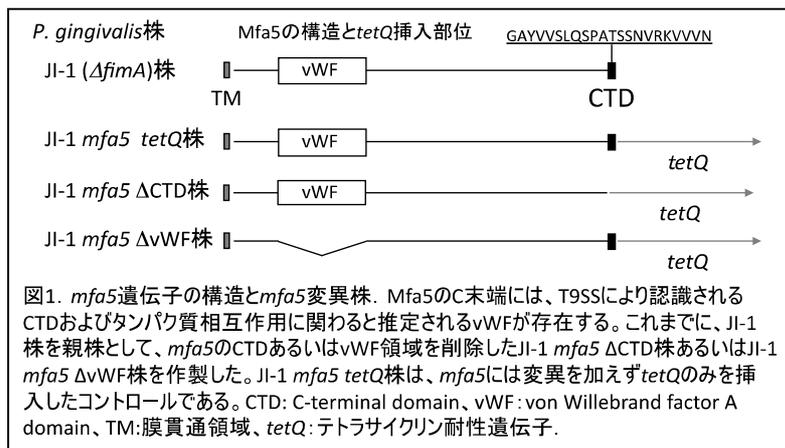


図1. *mfa5* 遺伝子の構造と *mfa5* 変異株. *Mfa5* の C 末端には、T9SS により認識される CTD およびタンパク質相互作用に関わると推定される vWF が存在する。これまでに、JI-1 株を親株として、*mfa5* の CTD あるいは vWF 領域を削除した JI-1 *mfa5* ΔCTD 株あるいは JI-1 *mfa5* ΔvWF 株を作製した。JI-1 *mfa5 tetQ* 株は、*mfa5* には変異を加えず *tetQ* のみを挿入したコントロールである。CTD: C-terminal domain、vWF: von Willebrand factor A domain、TM: 膜貫通領域、*tetQ*: テトラサイクリン耐性遺伝子。

### (2) タンパク質試料の調製

各 *P. gingivalis* の菌株の培養上清及び菌体タンパク質を調製した。さらに、菌体タンパク質を超遠心により細胞質画分、外膜及び内膜画分に画分した。また、イオン交換クロマトグラフィーにより各変異株から *Mfa1* 線毛を単離・精製した。

### (3) *Mfa5* の局在及び輸送機序の解明

得られたタンパク質試料を用いて、抗 *Mfa5* ウサギ抗体を使用したウェスタンブロットを行い、*Mfa5* タンパク質の局在を解析した。

### (4) *Mfa5* の線毛発現における *Mfa5* の役割の検討

各 *P. gingivalis* の菌株の *Mfa1* 線毛の菌体表面での発現を Filtration ELISA により解析した。1×10<sup>7</sup> 菌体をフィルター付きの 96 穴プレートに載せ、抗 *Mfa1* 線毛ウサギ抗体と反応させた。さらに HRP 標識抗ウサギ抗体により反応させ基質を加え OD<sub>490</sub> を測定した。

### (5) 付随成分の線毛への組み込みに及ぼす影響

各 *P. gingivalis* 株より精製した *Mfa1* 線毛を SDS-PAGE にて展開後、CBB 染色を行った。そして、*Mfa3*、*Mfa4* 及び *Mfa5* バンドの有無を判定した。

### (6) *Mfa1* 線毛の糖鎖修飾様式の検討

JI-1 株より *Mfa1* 線毛を精製し、N 型あるいは O 型糖鎖調製キット (住友ベークライト) を用いて糖鎖を精製後、LC-MAS にて解析した (住友ベークライトに委託)。

精製線毛とレクチンとの結合性をレクチンブロットにより解析した。詳細には、JI-1 株から精製した *Mfa1* 線毛を SDS-PAGE により展開後、ニトロセルロース膜に転写し、HRP 標識レクチン (Lectin Set-HRP1、J オイルミルズ) と反応させた。

### (7) 線毛タンパク質の結晶構造解析

スウェーデンのウメオ大学が中心となって進めている。リコンビナントの *Mfa1*、*Mfa2*、*Mfa3* 及び *Mfa5* のタンパク質を精製し、X 線結晶構造解析を行った。得られた結果を基にして、重合に重要と推定されるアミノ酸残基及び領域の変異株を作製し、重合に及ぼす影響を検討した。

## 4. 研究成果

### (1) ウェスタンブロット及び SDS-PAGE による Mfa5 の局在及び輸送機序の解明

Mfa5 は、JI-1 株では細胞質画分及び精製線毛中に検出された。一方、CTD 株では細胞質画分に強く検出されたが、精製線毛では検出されなかった。*porU* 株では、Mfa5 は細胞質画分に蓄積し分解されていた。以上の結果から、Mfa5 は T9SS 依存的に細胞外に輸送され線毛に組み込まれること、Mfa3 及び Mfa4 の線毛への組み込みには Mfa5 が必要であることが考えられた。

### (2) Filtration ELISA による Mfa1 線毛発現の解析

JI-1 株と比較して *mfa5* 株の発現量が有意に減少し、*mfa5* 相補株では発現が回復した。この結果から、Mfa5 が線毛形成に必要なことが明らかとなった。さらに CTD 株では線毛発現量が減少したことから、細胞表面に Mfa5 が輸送されることが線毛形成に重要であることが分かった。

### (3) 精製 Mfa1 線毛に含まれる微量成分の解析

JI-1 株では明瞭に観察される 130kD 及び 150 kDa の Mfa5、40 kDa の Mfa3 及び 30 kDa の Mfa4 バンドが、*mfa5* 及び CTD 株では検出されなかった(図2)。以上の結果より、Mfa5 が Mfa3 及び Mfa4 の線毛への組み込みに必要なことが明らかとなった。さらに、*vWF* 株では Mfa5 は検出されなかったが、Mfa3 及び Mfa4 は検出された。この結果から、Mfa5 の *vWF* が Mfa3 あるいは Mfa4 を介して線毛先端に結合していることが示唆された。

### (4) Mfa1 線毛の糖鎖修飾様式の検討

線毛中に含まれる糖鎖を LC-MAS により解析した結果、O 型としてマンノースやガラクトースが検出された。N 型においても同様の糖鎖が検出された。

一方、レクチンブロットでは、マンノースとの反応性をもつ ConA との反応が認められた。以上の結果から、Mfa1 線毛がマンノースやフルクトースなどの糖鎖により修飾されていることが考えられた。Mfa1 線毛が宿主レクチンと反応する可能性が考えられる。

### (5) 線毛タンパク質の X 線結晶構造解析

Mfa1、Mfa2 および Mfa3 の結晶構造が明らかにされた。これらの立体構造を基にして形態形成機序の解明に取り組んだ。JI-1 株を親株として、線毛タンパク質の重合に関係していると予想される N 末端変異株および C 末端削除株を作製し、線毛形成に及ぼす影響を検討した。*mfa1* の C 末端削除株では Mfa1 の重合は全く認められなかった。以上の結果から、Mfa1 タンパク質の重合には N 末端と C 末端のどちらも関与していることが考えられた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 16 件)

長谷川義明: 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* のもつ Mfa1 線毛の新しい構造モデルと機能. 日本口腔感染症学会雑誌, 25: 3-7, 2018.

Nagano K, Hasegawa Y, Iijima Y, Kikuchi T, Mitani A: Distribution of *Porphyromonas gingivalis* *fimA* and *mfa1* fimbrial genotypes in subgingival plaques PeerJ 6:e5581, 2018.

Konno H, Yoshida Y, Nagano K, Takebe J, Hasegawa Y: Biological and biochemical roles of two distinct cyclic dimeric adenosine 3',5'-monophosphate-associated phosphodiesterases in *Streptococcus mutans*. Front Microbiol, 9: 2347, 2018.

Sato W, Yoshida Y, Komasa S, Hasegawa Y, Okazaki J: Antimicrobial effect of titanium hydroxyapatite in denture base resin. App Sci, 8(6): 963, 2018.

Lee JY, Miller DP, Wu L, Casella CR, Hasegawa Y, Lamont RJ: Maturation of the Mfa1 fimbriae in the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis*. Front Cell Infect Microbiol.9;8:137. 2018.

Hall M, Hasegawa Y, Yoshimura F, Persson K: Structural and functional characterization of shaft, anchor, and tip proteins of the Mfa1 fimbria from the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. Sci Rep. 29;8(1):1793. 2018.

Nagano K, Hasegawa Y, Yoshida Y, Yoshimura F: Comparative analysis of motility and other properties of *Treponema denticola* strains. Microb Pathog, 102:82-88, 2017.

Nagano K, Hasegawa Y, Yoshida Y, Yoshimura F: Novel fimbriin PGN\_1808 in *Porphyromonas gingivalis*. PLoS One, 12(3): e0173541, 2017.

Okada K, Fujimura T, Kikuchi T, Aino M, Kamiya Y, Izawa A, Iwamura Y, Goto H, Okabe I, Miyake E, Hasegawa Y, Mogi M, Mitani A: Effect of interleukin (IL)-35 on IL-17

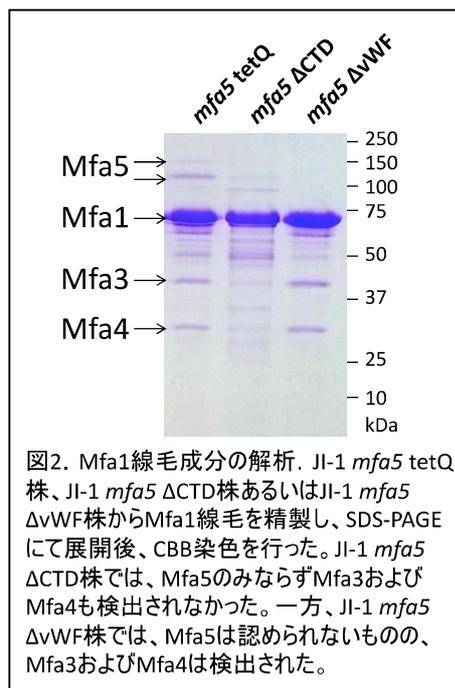


図2. Mfa1線毛成分の解析. JI-1 *mfa5* tetQ 株、JI-1 *mfa5* ΔCTD株あるいはJI-1 *mfa5* ΔvWF株からMfa1線毛を精製し、SDS-PAGEにて展開後、CBB染色を行った。JI-1 *mfa5* ΔCTD株では、Mfa5のみならずMfa3およびMfa4も検出されなかった。一方、JI-1 *mfa5* ΔvWF株では、Mfa5は認められないものの、Mfa3およびMfa4は検出された。

expression and production by human CD4+ T cells. PeerJ, 15;5:e2999, 2017.

Moriguchi K, Hasegawa Y, Higuchi N, Murakami Y, Yoshimura F, Nakata K, Honda M: Energy dispersive spectroscopy-scanning transmission electron microscope observations of free radical production in human polymorphonuclear leukocytes phagocytosing non-opsonized *Tannerella forsythia*. Microsc Res Tech, 80(6):555-562, 2017.

Ohno T, Yamamoto G, Hayashi JI, Nishida E, Goto H, Sasaki Y, Kikuchi T, Fukuda M, Hasegawa Y, Mogi M, Mitani A: Angiopoietin-like protein 2 regulates *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human gingival epithelial cells. PLoS One, 12(9):e0184825, 2017.

Izumigawa M, Hasegawa Y, Ikai R, Horie T, Inomata M, Into T, Kitai N, Yoshimura F, Murakami Y: Separation of novel phosphoproteins of *Porphyromonas gingivalis* using phosphate-affinity chromatography. Microbiol Immunol, 60(10): 702-707. 2016.

Horie T, Inomata M, Into T, Hasegawa Y, Kitai N, Yoshimura F, Murakami Y: Identification of OmpA-like protein of *Tannerella forsythia* as an O-linked glycoprotein and its binding capability to lectins. PLoS One, 11(10): e0163974. 2016.

Nishida E, Aino M, Kobayashi S, Okada K, Ohno T, Kikuchi T, Hayashi J, Yamamoto G, Hasegawa Y, Mitani A: Serum amyloid A promotes E-selectin expression via toll-like receptor 2 in human aortic endothelial cells. Mediators Inflamm, 2016: 7150509. 2016.

Sato M, Yoshida Y, Nagano K, Hasegawa Y, Takebe J, Yoshimura F: Three CoA transferases involved in the production of short chain fatty acids in *Porphyromonas gingivalis*. Front Microbiol. 7: 1146, 2016.

Hasegawa Y, Iijima Y, Persson K, Nagano K, Yoshida Y, Lamont RJ, Kikuchi T, Mitani A, Yoshimura F. Role of Mfa5 in expression of Mfa1 fimbriae in *Porphyromonas gingivalis*. J Dent Res, 95(11): 1291-1297, 2016.

#### 〔学会発表〕(計 19 件)

村上正洋, 永野恵司, 長谷川義明, 古田弘樹, 吉田弦希, 河村 玲, 加藤大輔, 村上 弘: オゾン水のバイオフィルムに対する殺菌効果に関する検討. 日本口腔インプラント学会第 39 回中部支部 (名古屋), 2018. 11. 10.

近藤智裕, 林 潤一郎, 大野 祐, 佐々木康行, 長谷川義明, 三谷章雄: 咽頭上皮細胞における歯周病原細菌刺激による炎症性サイトカイン発現に対する咽頭常在菌の役割. 第 159 回日本歯科保存学会総会 (京都), 2018. 11. 1.

Yoshida Y, Kezuka Y, Hasegawa Y: Genetic and enzymatic characterization of phosphotransacetylase (Pta) and acetate kinase (Ack) for ATP biosynthesis in *Porphyromonas gingivalis*. 第 60 回日本歯科基礎医学会総会 (福岡), 2018. 9. 5.

永野恵司, 長谷川義明, 菊池 毅, 三谷章雄: 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* の主要な 2 つの線毛のサブタイプの分布. 愛知学院大学歯学会第 92 回学術大会 (名古屋), 2018.7.8.

Sato A, Nagano K, Hasegawa Y, Kazuya Sobue K, Harada J. Benzalkonium chloride can be used to create a hygienic nasotracheal intubation environment with sustained sterilizing effects. Euroanaesthesia 2018 Congress (Copenhagen), 2018. 5. 7.

Yoshida Y, Nagano K, Hasegawa Y: Oral streptococcal fimbriae related to coaggregation with other oral streptococci. 第 91 回日本細菌学会総会 (福岡), 2018. 3. 27.

飯島由羅, 吉田 康夫, 菊池 毅, 三谷 章雄, 長谷川義明: *Porphyromonas gingivalis* における Mfa5 の機能と IX 型分泌系の関係性. 第 91 回日本細菌学会総会 (福岡), 2018. 3. 27.

西川 清, 藤波和華子, 尾澤昌悟, 長谷川義明, 武部 純: 次世代シーケンサーを用いたデンチャープラーク細菌叢の解析. 日本義歯ケア学会第 10 回学術大会 (徳島), 2018.1.27.

大野 祐, 山本弦太, 林 潤一郎, 西田英作, 後藤久嗣, 佐々木康行, 菊池 毅, 長谷川義明, 茂木眞希雄, 福田光男, 三谷章雄: アンジオポエチン様タンパク 2 は歯肉上皮細胞において炎症反応を遷延化させる. 日本歯周病学会 60 周年記念京都大会 (京都), 2017.12.16.

飯島由羅, 長谷川義明, 菊池 毅, 三谷章雄: 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* における Mfa5 の Mfa1 線毛形成における役割. 日本歯周病学会 60 周年記念京都大会 (京都), 2017.12.16.

永野恵司, 長谷川義明, 吉田康夫, 吉村文信: 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* の新規線毛タンパク質の解析. 第 89 回愛知学院大学歯学会 (名古屋), 2016. 12. 4.

長谷川義明, 永野恵司, 吉田康夫, 吉村文信: 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* の Mfa1 線毛構成タンパク質 Mfa4 のプロセッシングに関する研究. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会 (札幌), 2016. 8. 26.

吉田康夫, 佐藤満成, 毛塚雄一郎, 長谷川義明, 永野恵司, 吉村文信: *Porphyromonas gingivalis* における ATP 産生に關与する phosphotransacetylase および acetate kinase の酵素学的解析. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会 (札幌), 2016. 8. 26.

永野恵司, 長谷川義明, 吉田康夫, 吉村文信: 歯周病関連細菌 *Treponema denticola* の株間性状比較解析. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会 (札幌), 2016. 8. 25.

佐藤満成, 吉田康夫, 永野恵司, 長谷川義明, 武部 純, 吉村文信: 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* における短鎖脂肪酸分泌とジンジパイン産生機構の関連. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会 (札幌), 2016. 8. 25.

永野恵司, 長谷川義明, 吉田康夫, 吉村文信: 歯周病原性細菌 *Treponema denticola* の株間の性状比較解析. 第 62 回日本薬学会東海支部大会 (名古屋), 2016. 7. 9.

岡部猪一郎, 菊池毅, 相野 誠, 神谷洋介, 藤村岳樹, 後藤久嗣, 岡田康佑, 長谷川義明, 野口俊英, 三谷章雄: IL-15 and RANKL play a synergistically important role in osteoclastogenesis. 第 88 回愛知学院大学歯学会 (名古屋), 2016. 6. 5.

長谷川義明, 永野恵司, 吉田康夫, 吉村文信: 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* における Mfa1 線毛の形態形成に関する研究-アクセサリー成分 Mfa4 の翻訳後修飾ついて-. 第 88 回愛知学院大学歯学会 (名古屋), 2016. 6. 5.

永野恵司, 長谷川義明, 吉田康夫, 吉村文信: 歯周病関連細菌 *Treponema denticola* の株間の性状比較解析. 第 88 回愛知学院大学歯学会 (名古屋), 2016. 6. 5.

〔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:  
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:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

研究協力者

〔主たる渡航先の主たる海外共同研究者〕

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

〔その他の研究協力者〕

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。