

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：32703

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K24108

研究課題名(和文) Porphyromonas salivosa線毛の分類と伝播の可能性に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the classification and possible transmission of Porphyromonas salivosa fimbriae.

研究代表者

稲葉 啓太郎 (Inaba, Keitaro)

神奈川県立歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：10847883

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：Porphyromonas gingivalis の線毛は、ヒト細胞への付着・侵入に関わっていることが知られている。動物の歯周病原菌であるPorphyromonas salivosa (macacae) の線毛を精製し、比較した。電子顕微鏡観察により、Porphyromonas macacae ATCC 33141株の菌体表面には線毛様構造が確認できた。DEAE Sepharose CL-6B 陰イオン交換カラムクロマトグラフィーを用いて線毛タンパク質を精製した。精製タンパク質は電子顕微鏡により、糸状構造であることが確認できた。これを抗原としてマウスに免疫し、モノクローナル抗体を作製した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Porphyromonas salivosa (P. salivosa) は、ヒト歯周病患者の歯周ポケットから高頻度に分離される Porphyromonas gingivalis と同属の黒色色素産生グラム陰性嫌気性桿菌である。イヌやネコを含む様々な動物の歯肉溝から分離されることから、イヌやネコの歯周炎との関連性が指摘されている。また、P. salivosa はヒトと同じ霊長類であるサルから分離される P. macacae と同一の菌種であることが知られている。したがって、P. salivosa のヒトへの伝播の可能性を考慮し、P. salivosa の病原性について検討することが重要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Fimbriae are known to be involved in attachment and adhesion of human cells. We purified the fimbriae of Porphyromonas salivosa (macacae), an animal periodontal pathogen. Fimbrial structures were observed on the cell surfaces of P. macacae ATCC 33141 by transmission electron microscopy using the negative staining technique. The fimbrial protein was purified from P. macacae by selective protein precipitation and chromatography on a DEAE CL-6B anion exchange column. The purified protein was confirmed to have a filamentous structure by electron microscopy. Mice were immunized with this protein as an antigen and monoclonal antibodies were produced.

研究分野：細菌学

キーワード：歯周病 線毛 Porphyromonas salivosa Porphyromonas macacae

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、歯周組織の破壊を特徴とする口腔バイオフィルムが原因となる慢性炎症性疾患であり、ヒト歯周病の代表的な原因細菌として *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) などが知られている。また、*P. gingivalis* の伝播については、一般的に家族間での接触によって起こっていることが報告されている。

コンパニオンアニマルの歯周炎は、病因や病態がヒトの場合と同様であり、多くのイヌやネコが歯周炎に罹患し、年齢の増加に伴い歯周炎が増悪することが報告されている。コンパニオンアニマルの歯周炎は、病因や病態がヒトの場合と同様であり、多くのイヌやネコが歯周炎に罹患し、年齢の増加に伴い歯周炎が増悪することが報告されている。イヌの歯肉溝からは *Porphyromonas gulae* (*P. gulae*)、ネコの歯肉溝からは *Porphyromonas salivosa* (*P. salivosa*) などが分離されており、コンパニオンアニマルの歯周炎との関連性が指摘されている。また、*P. salivosa* はヒトと同じ霊長類であるサルから分離される *Porphyromonas macacae* (*P. macacae*) と同一の菌種であることが知られている。

しかし、国内外において、ヒトとコンパニオンアニマルとの歯周病関連細菌の伝播に関する研究は少ない。したがって、*P. salivosa* (*P. macacae*) のヒトへの伝播の可能性を考慮し、病原性状について検討することが重要であると考えられる。

2. 研究の目的

申請者は、細菌の菌体表面に存在する糸状の構造物である線毛に着目した。ヒト歯周病原細菌である *P. gingivalis* の菌体表面に存在する線毛は、口腔上皮細胞への付着と侵入に関与し、ヒト歯周組織の炎症を誘発する。また、*P. gingivalis* 線毛は、唾液タンパク質、共生細菌、細胞外マトリックスや宿主細胞などに特異的に結合することが明らかにされ、歯周組織の破壊を引き起こす主要な病原因子であると考えられている。さらに、線毛は、マクロファージや線維芽細胞からの炎症性サイトカインの産生を誘導し、炎症反応の病原因子として働くことが示されている。また、FimA および Mfa1 という2種類の線毛を発現し、FimA はさらに異なる分子量、性状の5つの型に分類される。

これまでの研究で、*P. salivosa* ATCC 49407 株において、*P. gingivalis* の線毛とは異なるが菌体表面に線毛を持ち、破骨細胞分化誘導能、吸収窩の形成能と炎症性サイトカイン産生能を有する事を報告している。*P. macacae* ATCC 33141 株から線毛を精製し、*P. salivosa* ATCC 49407 株および *P. gingivalis* ATCC 33277 株の線毛と比較することにより、分子量や抗原性の違いによる相違を検討、ヒト口腔内細胞への定着、ヒト口腔への伝播の可能性および歯周疾患発症原因を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 供試菌株及び培養条件

供試菌は、神奈川歯科大学口腔科学講座微生物感染学分野保有の *P. gingivalis* ATCC 33277 株、*P. salivosa* ATCC 49407 株、*P. macacae* ATCC 33141 株を用いた。培養にはブレインハートインフュージョンプロスにイーストエキストラクト、ヘミンおよびビタミン K₁ を添加した BHI 培地 (BHI 液体培地) もしくは 5% ヒツジ脱繊維血を含む BHI 血液寒天培地 (BHI 血液平板) を用いて嫌気条件下 (15% CO₂、15% H₂、70% N₂)、37°C で培養した。

(2) SDS-PAGE

Porphyromonas 属 4 菌種を SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) により確認した。SDS サンプルバッファー (62.5 mM トリス塩酸、2%メルカプトエタノール、10%グリセロール、0.002% ブロムフェノールブルー (pH 6.8) に懸濁し、5 分間 100 °C で煮沸したものを試料とした。試料は、12% ポリアクリルアミドスラブゲルを用いて、1 時間、30 mA の定電流で電気泳動した。その後、クーマシーブリリアントブルー-R-250 と銀染色 II キットワコーを用いて染色を行った。分子量マーカーは、precision plus protein™ standards dual color を使用した。

(3) 線毛の精製

線毛の分離精製は、Yoshimura らの方法に従って行った。*P. macacae* ATCC 33141 株を BHI 液体培地で 37°C、18 時間嫌気培養した。その後、細菌を 8,000 rpm、30 分間の遠心操作を行って集菌し、20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に懸濁し、繰り返しのピペティング操作により線毛を菌体表面から剥離した。さらに、INSONATOR 201 M を用いて 200 W の出力で 1 分間超音波処理により菌体表面から線毛を機械的に剥離した。菌体から線毛を剥離した分画を 10,000 rpm 4°C で 30 分間遠心分離して未破壊の菌体を除き、上清に硫酸アンモニウムを段階的に添加することによって、40% の飽和硫酸アンモニウム塩析操作を行った。沈殿したタンパク質を 20 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に懸濁し未破壊の菌体を除去する目的で、10,000 rpm 4°C で 30 分間遠心操作を行い、上清を同緩衝液により 2 日間透析した。粗線毛分画を含有する透析液を 20

mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) で平衡化した DEAE Sepharose CL-6B 陰イオン交換カラムクロマトグラフィーにより精製した (GE Healthcare, CT, USA) (20 cm by 1.5 cm)。まず、透析操作で硫酸アンモニウムを除去したサンプルを DEAE Sepharose CL-6B カラムに添加後、20 mM トリス塩酸緩衝液で洗浄し、次いで 0 M から 0.3 M の NaCl の直線濃度勾配で溶出した。

(4) 電子顕微鏡観察

P. macacae 菌体表層と精製タンパク質の線毛構造物の確認は、透過型電子顕微鏡で行った。すなわち、18 時間培養後 *P. macacae* 菌体をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS: pH 7.4) で洗浄し、カーボンコートしたコロジオン膜のグリッド上で 2% 酢酸ウラニルでネガティブ染色後、透過型電子顕微鏡で観察した。また、精製タンパク質も同様の操作を行って観察した。

(5) ポリクロナール抗体の作製

ポリクロナール抗体の作製は、精製タンパク質を抗原として BALB/c マウスを用いて行った。フロイント不完全アジュバントを混合した精製タンパク質 50 μ g を複数の部位に皮下接種した。1 週間ごとに複数回接種を行った。最終接種後に麻酔下で全採血し、遠心操作により血清を分離し、 -20°C で保管した。尚、本研究は、神奈川歯科大学実験動物倫理委員会によって承認を得て実施した (実験承認番号 No. 19-027, 2021-017)。

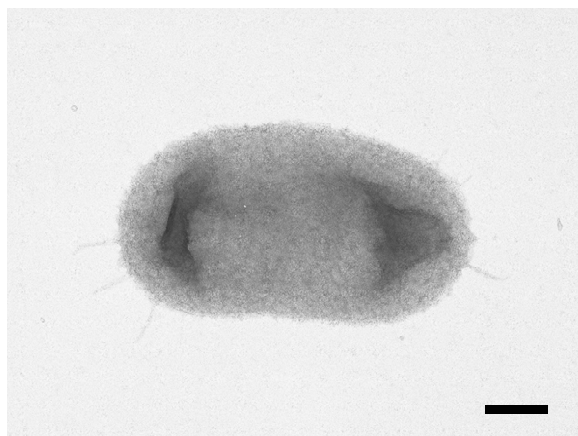
(6) ウエスタンブロッティング

精製タンパク質の確認のため、12% SDS-PAGE によって分離されたタンパク質をゲルから、PVDF Membranes for Protein Blotting (PVDF メンブレン) に 200 mA の定電流 1 時間処理により転写後、非特異性吸着反応を起こさないように 1% ウシ血清アルブミン (BSA) を含む Tris Buffered Saline (TBS 溶液: 20 mM トリス塩酸 pH 7.4, 0.5 M NaCl) を用いて、1 時間ブロッキング操作を行った。このメンブレンに血清を一昼夜 4°C で作用させた。その後、TBS 溶液で洗浄操作を行い、西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG 抗体を 37°C で 1 時間作用させた後、余剰の抗体を TBS-Tween 溶液 (20 mM トリス塩酸 pH 7.4, 0.5 M NaCl, 0.05% Tween) で洗浄し、4-クロロ-1-ナフトール溶液を用いて検出した。

4. 研究成果

(1) *P. macacae* の電子顕微鏡観察

P. macacae ATCC 33141 株をネガティブ染色し電子顕微鏡観察した結果、菌体周囲に線毛様の構造が確認された。また、精製タンパク質を観察した結果、糸状構造物が確認された。



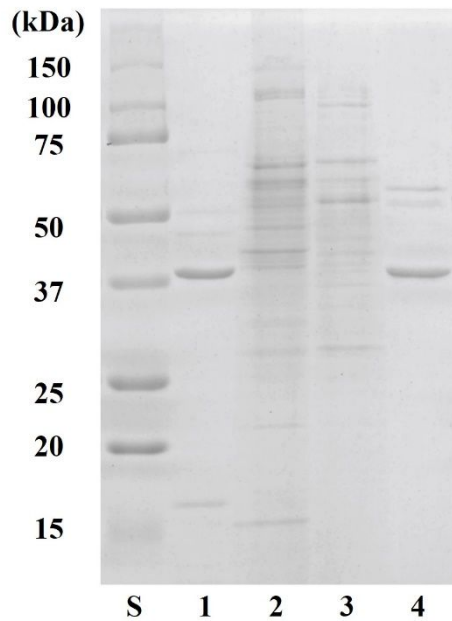
P. macacae ATCC 33141 株の電子顕微鏡像
スケールバー: 200 nm。

(2) 線毛の精製

P. macacae の線毛タンパク質を含む分画をセファロース CL-6B 陰イオン交換カラムを用いて、粗線毛精製物を分離、精製を行った。その結果、0.15 M NaCl 濃度で溶出するタンパク質が確認された。硫酸塩析で得られたタンパク質と精製タンパク質を 12% SDS-PAGE で確認したところ、単一バンドとして確認された。銀染色を行った結果においても同様に単一のバンドとして確認され、他に混入物は認められなかった。この精製タンパク質を電子顕微鏡観察したところ、糸状の構造が確認された。

(3) SDS-PAGE

Porphyromonas 属 4 菌種を比較した。*P. macacae* は、*P. salivosa* と類似した位置にバンドが確認されたが、60kDa 付近や 100 kDa 付近などに異なるバンドが確認された。



レーン: S, マーカー; 1, *P. gingivalis* ATCC 33277; 2, *P. salivosa* ATCC 49407; 3, *P. macacae* ATCC 33141; 4, *P. gulae* ATCC 51700.

(4) ポリクロナール抗体

P. macacae の線毛の存在を確認するため、精製タンパク質の抗体を作製した。作成した抗体を、ウエスタンブロット法にて *P. macacae* への反応性を確認したところ、単一バンドとして確認できた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------