

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21684

研究課題名（和文）歯周病細菌叢の病原性抑制と宿主生体防御因子の探索

研究課題名（英文）Suppression of periodontal pathogenic flora and search for host biological defense factors

研究代表者

内藤 真理子（Naito, Mariko）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・教授

研究者番号：20244072

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：歯周病原菌と同じく、バクテロイデーテス門に属する滑走能をもつ魚病細菌に存在する9型分泌装置（T9SS）の滑走運動、バイオフィーム形成に果たす役割を解析した。電子顕微鏡観察によりT9SS依存性に形成されるファイバー様構造物からなる細胞間マトリックスが重要であることを明らかにできた。また河川での冷水病罹患アユから未報告の原因菌の分離、同定に成功した。同定した病原菌群は滑走運動性を示し、ゲノム配列解析からT9SS遺伝子群とT9SS依存性に輸送される滑走に必須である接着分子等を保持していた。これらの成果はT9SS機能を抑制することで歯周病だけでなく多様な魚病の制御を行える可能性を示すものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々のグループが発見した9型分泌機構は歯周病だけでなく、冷水病などの魚病の病原菌も保有している。これらの菌でこの分泌機構は患部でのバイオフィーム形成と病原性に必須であると考えられている。しかしバイオフィームの形成と拡張機序、微細構造は未解明であった。本研究はこれらを解明することで、本機構を標的とした創薬研究の足掛かりとなる成果を得た。また日本の河川で発生した冷水病の原因菌を複数菌種新たに分離同定できた。更にこれらの菌のゲノム解析から9型分泌機構が高度に保存されていることを明らかにした。歯周病だけでなく実際に蔓延している魚病における9型分泌機構の重要性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：We analyzed the role of the type 9 secretion system (T9SS) in the oral gliding bacteria belonging to the phylum Bacteroidetes in the gliding movement and biofilm formation, as in the case of periodontal pathogens. Electron microscopy revealed the importance of the extracellular matrix consisting of fiber-like structures formed in a T9SS-dependent manner. We also succeeded in isolating and identifying unreported causative bacteria from sweetfish affected by cold water disease in rivers. The identified pathogens showed gliding motility and retained the T9SS gene cluster and adhesion molecules essential for gliding that were transported in a T9SS-dependent manner from genomic sequence analysis. These results show the possibility of controlling not only periodontal disease but also various fish diseases by suppressing T9SS function.

研究分野：口腔病原微生物学

キーワード：歯周病 病原性 9型分泌機構

1. 研究開始当初の背景

歯周病は現在でも日本人の歯牙の喪失の最大の原因であるだけでなく、糖尿病、心血管疾患等の様々な全身疾患の増悪因子であることが明らかになってきている。原因は歯周組織でバイオフィーム(歯垢)を形成する口腔細菌叢である。この菌叢の中で、特に歯周病の増悪、進行に関与する菌群として、歯周病原菌が同定されている。歯周病は歯周病原菌が菌叢全体に与える変化と生体側防御とのバランスが崩れた時に発症・進行すると考えられる。我々のグループは歯周病原菌の病原因子の解析に始まり、全ゲノム解析に基づく全遺伝子の網羅的解析から新規の分泌装置、9型分泌装置(Type IX Secretion System :T9SS)を発見した。T9SSは、バクテロイデーテス門細菌の *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*等の歯周病細菌に保存され、病原性の発揮、バイオフィーム形成に関与すると考えられている。これらの菌種ではT9SSにより数十種類のタンパク質が菌体表面へ輸送や培養上清へ分泌されている。*P. gingivalis*では、この分泌装置によって、組織障害性プロテアーゼ、赤血球凝集因子など、少なくとも30弱程のタンパク質が分泌される(Sato *et al.* 2013)。T9SSの高次構造と個々の構成分子の機能の解析を進めているが、形成されるバイオフィームの微細構造や構成分子の同定は十分ではない。またT9SSは歯周病細菌と同属のバクテロイデーテス門細菌の魚病細菌にも保存されている。魚病細菌の中で *Flavobacterium psychrophilum*と *Flavobacterium columnare* T9SS欠損株では病原性が著しく低下することが報告されている。しかし実際に魚に罹患している菌の分離同定、病原性の解明は十分に行われていない。

2. 研究の目的

(1) 「細菌叢の病原性制御」を異なる生物種から理解する。

歯周病原菌と魚病細菌に共通して重要なT9SSの機構の解明を行う。T9SSの分泌高次構造体の中で内膜と外膜側をつなげると予測される必須分子であるporMの構造解析を行う。さらにT9SS依存性に形成されるバイオフィーム形成についての解析を行う。これまでに未解明であるバイオフィーム内の微細構造、構成分子について詳細な解析を行う。また魚病細菌の滑走運動の経時的観察により、個々の細菌のバイオフィーム内での動きを解明する。

(2) バクテロイデーテス門細菌に対する、「ヒト」と「魚類」に共通する病原機構の探索

実際の河川環境で発生した魚病の原因菌が既報の菌種のみか、または他の菌種も関与するか解明する。多くの河川および水産試験場で発生したアユ冷水病から原因菌を集めている。これらの菌について滑走性の確認と16S rRNA配列解析により菌種の同定を行う。新たに分離された菌種については全ゲノム解析を行い、既知の菌種も含めた比較ゲノム解析を行う。これにより魚病細菌に共通する病原性に重要な遺伝子の探索を行う。

3. 研究の方法

(1) 歯周病原菌 *P. gingivalis* の porM の構造解析

これまでPorMタンパク質の全長のリコンビナントタンパク質を用いた立体構造の解析は行われていなかった。そこでPorMタンパク質の全長のリコンビナントタンパク質を調製、実験条件を検討することで解析に適した結晶を得る。得られた結晶を用いPorMタンパク質全長の正確な構造解析を行う。

(2) T9SS依存性のバイオフィーム構造の解析

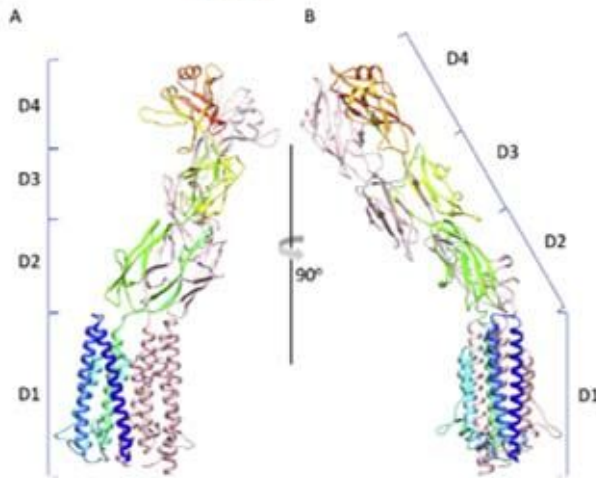
タイムラプス撮影に対応可能な魚病細菌 *Flavobacterium johnsoniae* を用い、寒天培地上でのバイオフィーム=コロニーの高次構造の解析を行った。大気圧電子顕微鏡、透過型電子顕微鏡、更に蛍光標識した菌を用いたタイムラプス撮影により、滑走細菌の集団の微細な構造の変化を明らかにする。

(3) 河川環境で発生する魚病の原因菌の分離同定と解析

多くの河川および水産試験場で発生した魚病のサンプルを集める。個々の病巣部位から改変サイトファーが培地で培養できる菌株を分離、16S rRNA解析により菌種の同定を行う。新たに同定した菌種は全ゲノム配列を決定、既知の病原遺伝子、T9SS関連遺伝子の保有について比較ゲノム解析を行う。

4. 研究成果

図1. *P. gingivalis* の9型分泌装置のコア構成タンパク質PorM分子の構造



(1) 歯周病原菌 *P. gingivalis* の porM の構造解析

高品位の全長リコンビナント PorM タンパク質を精製、結晶を作成することに成功した。得られた結晶から 3.7Å の分解能で PorM (PorMp) のペリプラズム領域の構造を決定することができた(図1)。全体の構造から PorMp は4つのドメイン(D1 D2 D3 D4) で構成され、非対称のねじれたロッド形状を持つ独自の二量体構造を形成することを明らかにした。D1, D2 間のねじれ構造を維持するのに重要なアミノ酸残基に点変異を導入すると T9SS 機能が失われた。つまり PorM 分子のねじれが T9SS 機能には必須の構造であることを明らかにできた。このねじれ構造は PorM 分子を標的とした創薬開発の際の標的候補になると考える。

(2) T9SS 依存性のバイオフィーム構造の解析

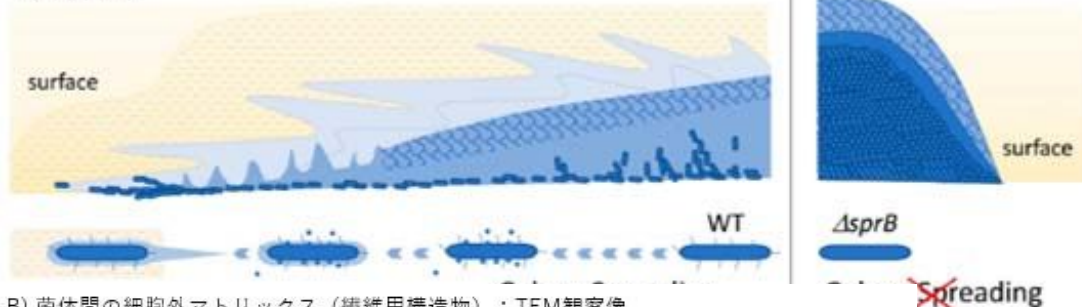
モデル滑走細菌 *Flavobacterium johnsoniae* は、少なくとも2つのコロニー拡張様式をもつことがわかった。1つは集団運動によるコロニー拡張で、これには菌体表層接着分子が関わる。コロニー先端では多くのベジクルを菌体表層につけ、菌同士が前後左右に接着した状態で集団運動をしながらコロニーを拡張させていく。一方、グルコース含有軟寒天培地では、個々の運動によるコロニー拡張が観察される。両条件ともに、コロニー内部ではベジクルやファイバー様構造物で満たされた細胞間マトリックスのなかに菌体が点在しており、バイオフィーム形態となっている。コロニー拡張を示さない変異株では、菌体が密集しており細胞間マトリックスがほとんど見られないことから、滑走運動はバイオフィーム拡張に関わることが示唆された。

更に詳細な構造を解析することで、バイオフィーム=コロニー内の菌体、マトリックスの関係を明らかにした。得られた結果を図2に示す。

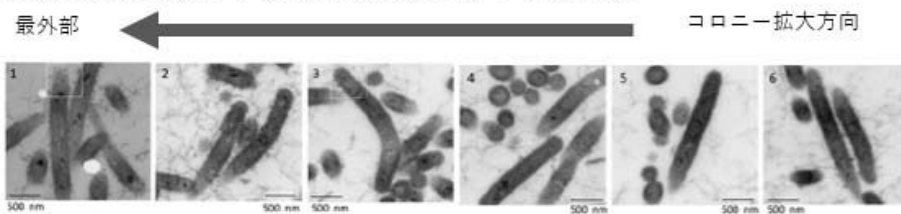
図2Aの左図に示すように、拡張するコロニーの最外端では単一の細菌が滑走することでその経

図2. 滑走運動による細菌バイオフィーム拡大

A) 概略図

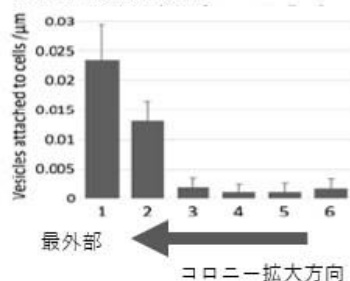


B) 菌体間の細胞外マトリックス (繊維用構造物) : TEM観察像



路にフィラメントと小胞を残していく(図2BC)。その内側では存在する細菌の多くが頭から尾および/または左右に接触し、多くの分泌小胞と共に存在する。コロニーの厚みを増すとほとんどの細菌がコロニー底面近くに適度な密度で分布しており、残りの領域は一部の細菌が中間層の細胞外マトリックスにまばらに存在する。また図2Aの右図に示すように、T9SSによって菌体表層に輸送される接着分子 SprBの変異株では変異株菌体が密に詰まり、野生株のようなコロニーの広がりは認められない。またコロニー表面はほとんど無細胞で、繊維と小胞で覆われていた。この表面構造は野生株と類似していた。

C) 菌体付着の小胞数



路にフィラメントと小胞を残していく(図2BC)。その内側では存在する細菌の多くが頭から尾および/または左右に接触し、多くの分泌小胞と共に存在する。コロニーの厚みを増すとほとんどの細菌がコロニー底面近くに適度な密度で分布しており、残りの領域は一部の細菌が中間層の細胞外マトリックスにまばらに存在する。また図2Aの右図に示すように、T9SSによって菌体表層に輸送される接着分子 SprBの変異株では変異株菌体が密に詰まり、野生株のようなコロニーの広がりは認められない。またコロニー表面はほとんど無細胞で、繊維と小胞で覆われていた。この表面構造は野生株と類似していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sato Keiko, Okada Kodai, Nakayama Koji, Imada Katsumi	4. 巻 532
2. 論文標題 PorM, a core component of bacterial type IX secretion system, forms a dimer with a unique kinked-rod shape	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 114 ~ 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.08.018	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sato Keiko, Naya Masami, Hatano Yuri, Kondo Yoshio, Sato Mari, Narita Yuka, Nagano Keiji, Naito Mariko, Nakayama Koji, Sato Chikara	4. 巻 11
2. 論文標題 Colony spreading of the gliding bacterium <i>Flavobacterium johnsoniae</i> in the absence of the motility adhesin SprB	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 967
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-79762-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sato Keiko, Naya Masami, Hatano Yuri, Kondo Yoshio, Sato Mari, Nagano Keiji, Chen Shicheng, Naito Mariko, Sato Chikara	4. 巻 22
2. 論文標題 Biofilm Spreading by the Adhesin-Dependent Gliding Motility of <i>Flavobacterium johnsoniae</i> . 1. Internal Structure of the Biofilm	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1894 ~ 1894
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22041894	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Sato Keiko, Naya Masami, Hatano Yuri, Kasahata Naoki, Kondo Yoshio, Sato Mari, Takebe Katsuki, Naito Mariko, Sato Chikara	4. 巻 22
2. 論文標題 Biofilm Spreading by the Adhesin-Dependent Gliding Motility of <i>Flavobacterium johnsoniae</i> : 2. Role of Filamentous Extracellular Network and Cell-to-Cell Connections at the Biofilm Surface	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6911 ~ 6911
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22136911	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤啓子、納屋昌実、近藤好夫、武部克希、内藤真理子、鈴木守、今田勝巳、石川岳志、佐藤主税、
2. 発表標題 歯周病細菌叢の病原性を抑える試み
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔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
研究分担者	鵜飼 孝 (Ukai Takashi) (20295091)	長崎大学・病院（歯学系）・教授 (17301)	
研究分担者	佐藤 啓子 (Sato Keiko) (70410579)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・准教授 (17301)	
研究分担者	近藤 好夫 (Kondo Yoshio) (30581954)	長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・助教 (17301)	

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
---------	---------

米国	Oakland University			
----	--------------------	--	--	--