

平成22年 5月24日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19592127

研究課題名（和文） 歯周病原菌のバイオフィーム特異的発現遺伝子の網羅的解析

研究課題名（英文） Global gene expression in periodontopathogenic bacterium biofilm

研究代表者

鎌口 有秀（KAMAGUCHI ARIHIDE）

北海道医療大学・歯学部・准教授

研究者番号：40133235

研究成果の概要（和文）：歯周病の主原因細菌の1つである *Porphyromonas gingivalis* のバイオフィーム形成菌と浮遊菌の遺伝子発現を DNA アレイにて網羅的に解析した。バイオフィーム形成菌において遺伝子発現が増加したものは、物質の取り込みと排出に関与するもの、エネルギー代謝に関与するもの、環境変化に関与するもの等であった。減少したものはストレスに対応するもの、酸化ストレス下で転写に関与するもの、脱リン酸酵素等であった。これらのことより、*P. gingivalis* はバイオフィーム形成菌と浮遊菌において遺伝子発現の相違があることが明らかになり、バイオフィーム形成に関与する遺伝子が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Gene expression analysis between biofilm cells and planktonic cells of *Porphyromonas gingivalis* which is one of the major aetiological agents in advance adult periodontitis was done with DNA microarray. Upregulated genes were gene for uptake of nutrient and secretion of signal molecules, gene for energy metabolism, gene for two component system and so on. Downregulated genes were gene for heat shock protein, gene for transcription under oxidative stress, phosphatase and so on. In this study, it was shown that difference of gene expression occurred between biofilm cells and planktonic cells of *P. gingivalis*. Besides, it implies that that ABC transporters are associated to formation of *P. gingivalis* biofilm.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：*Porphyromonas gingivalis*、バイオフィーム、浮遊菌、DNA アレイ

## 1. 研究開始当初の背景

近年、環境の変化により、通常発現される遺伝子とは異なる遺伝子が発現され、環境の変化に対応することが *Escherichia coli* におい

て示されて以来、多くの細菌において同様なことが示された。また、ゲノミクスやプロテオミクスを駆使して浮遊菌とバイオフィーム形成菌においても遺伝子発現が異なるこ

とが *Pseudomonas aeruginosa*、*E. coli*、*Staphylococcus aureus* 等において報告された。これらのことより、バイオフィーム形成菌の宿主防御機構に対する抵抗性等の性状とバイオフィーム形成菌に特異的な遺伝子発現の関連性が示唆された。Schembri らは *E. coli* におけるバイオフィーム形成菌と浮遊菌間での遺伝子発現の相違を DNA アレイにて解析し、バイオフィーム形成菌においては 79 遺伝子が活性化していることを報告した。Whiteley らによる *P. aeruginosa* のバイオフィーム形成菌と浮遊菌間での DNA アレイによる解析においては、73 の遺伝子発現に相違がみられ、バイオフィームにおいて 34 遺伝子は活性化され、39 の遺伝子は抑制された。これらの解析により、種々の細菌においてバイオフィーム形成に関与する遺伝子が明らかになりつつあり、バイオフィーム形成を阻害し、感染症の予防に向けて有用な手掛かりが得られる可能性が検討されていた。

## 2. 研究の目的

*Porphyromonas gingivalis* は歯周病の主原因細菌の 1 つとされ、内毒素、線毛、アルギニン特異的システインプロテアーゼ (Rgp) やリジン特異的システインプロテアーゼ (Kgp) 等の病原因子が報告されている。さらに、*P. gingivalis* は歯肉溝バイオフィーム形成菌の一員としてバイオフィームを形成し、歯肉溝バイオフィーム内に長期存在すると考えられている。バイオフィーム形成菌は生体防御機構や抗菌薬に抵抗することが歯周病の治療の大きな障害になっている。これまで、*in vitro* での実験は殆どが浮遊菌を対象としてきた。しかし、近年、バイオフィーム形成菌は浮遊菌と異なる遺伝子を発現していることが *E. coli* 等多くの細菌において報告され、浮遊菌での実験のみではバイオフィーム形成菌の性状を把握することが不十分と考えられる。さらに、これらの菌においてはバイオフィーム形成等に関与する遺伝子についても明になりつつある。*P. gingivalis* においてもバイオフィームを形成することが口腔内で病原性を発揮する上で 1 つの大きな要因となることより、バイオフィーム形成菌において発現が増加または減少する遺伝子を明らかにし、バイオフィーム形成に関与する遺伝子について検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 供試菌株と培養方法：*P. gingivalis* ATCC 33277 株、np11 株、KDP112 株 (*rgpA*, *rgpB* 変異株)、KDP129 株 (*kgp* 変異株)、KDP136 株 (*rgpA*, *rgpB*, *kgp* 変異株)、*luxS* 変異株を Tryptic soy broth、Yeast extract、Hemin、Menadione より構成される TYHM 培地にて嫌気培養した。*P. gingivalis* KDP112 株、KDP129 株、

KDP136 株は長崎大学歯学部・中山浩次教授より分与を受けた。

## (2) バイオフィーム形成性の測定方法:

O'Toole と Kolter の方法にほぼ準じ、以下のごとく行った。

① *P. gingivalis* の各菌株を TYHM 培地にて前培養後、新 TYHM 培地に 1/10 量添加した菌液を 96 well plate に 200  $\mu$ l 添加し、嫌気培養した。

② 各 well の培養上清の吸光度と各 well を生理食塩水にて洗浄後、バイオフィームを剥離し、バイオフィーム菌液の吸光度を測定した。

③ ((バイオフィーム菌液の吸光度) / (上清菌液の吸光度 + バイオフィーム菌液の吸光度)) x100 をバイオフィーム形成比率とした。

④ バイオフィーム形成性を肉眼で観察するために、各 well に形成されたバイオフィームをクリスタルバイオレットにて染色し観察した。また、クリスタルバイオレット染色バイオフィームを生理食塩水で洗浄後、エチルアルコールで色素を溶出し、その吸光度 (OD<sub>540nm</sub>) も測定した。

(3) DNA アレイの方法：*P. gingivalis* を TYHM 培地で培養後、新 TYHM 培地に 1/10 量添加した菌液を 96 well plate の 5 枚に接種し、2 日培養した。これらの plate より、浮遊菌とバイオフィーム形成菌を得た。これらの菌より RNeasy Protect Bacteria Kit を用いて RNA を抽出した。ついで、cDNA 合成、DNA ラベリング、ハイブリダイゼーション、スキャニング、ノーマリゼーションは Nimble Gene により行われた。DNA アレイのデータソースは *P. gingivalis* W83 の Gene Bank のデータを使用した。遺伝子は 1,909 遺伝子を対象とした。プローブ長は 60 mer で、1 遺伝子あたり 18x2 プローブを使用した。

(4) *P. gingivalis* の変異株の作成方法：目的の遺伝子を含む領域の primer を用いて、*P. gingivalis* DNA を template として PCR を行った。PCR 産物を pGEM T-easy vector に ligation し、これを *E. coli* DH5 $\alpha$  に形質転換し、プラスミドを得た。このプラスミドを Bam I で処理し、Bam H 1 リンカーを ligation し、*E. coli* DH5 $\alpha$  に形質転換後、同様にプラスミドを得た。このプラスミドを BamH1 で処理後、プラスミド pKD355 を BamH1 と BglII で切断した *ermF-ermAM* に ligation した。これを *E. coli* DH5 $\alpha$  に形質転換しプラスミドを得た。このプラスミドを Not1 で切断後、*P. gingivalis* にエレクトロポレーションにより挿入し、エリスロマイシン含有 GAM 寒天培地に摂取し、得られたコロニーを目的の変異株とした。

## 4. 研究成果

(1) *P. gingivalis* のバイオフィーム形成性：*P. gingivalis* は血液寒天培地上で黒色のコロニー

一を形成する性質を有するが、半流動培地で長期間継代することにより、突然変異により血液寒天培地で無色のコロニーを形成するコロニーが得られた。この無色突然変異株の中に親株と比較して 96 well plate においてバイオフィーム形成性が約 2 倍多い菌株(np11 株)が存在した (図 1)。この無色突然変異株を用いることにより、バイオフィーム形成菌を必要量得ることが可能となった。

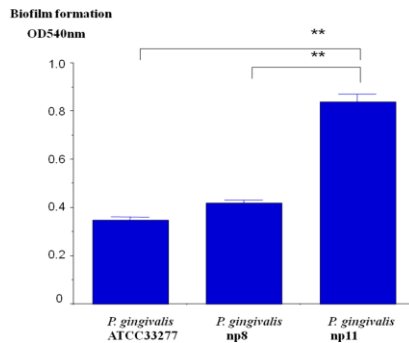


図 1. *P. gingivalis* のバイオフィーム形成性

(2) *P. gingivalis* のバイオフィーム形成菌と浮遊菌の遺伝子発現の相違について：*P. gingivalis* のバイオフィーム形成菌と浮遊菌との遺伝子発現の相違を DNA マイクロアレイにて検討した。図 2 はバイオフィーム形成菌と浮遊菌の遺伝子発現の相違のスクリーンショットである。これよりバイオフィーム形成菌と浮遊菌間において遺伝子発現に 2 倍以上の差異がある遺伝子が存在することが確認できた。2 倍以上の遺伝子発現に差異のみられた遺伝子の合計は 74 遺伝子あり、バイオフィーム形成菌において遺伝子発現が増加した遺伝子は 32 遺伝子あった。バイオフィーム形成菌において遺伝子発現が減少した遺伝子は 42 遺伝子あった。これは全

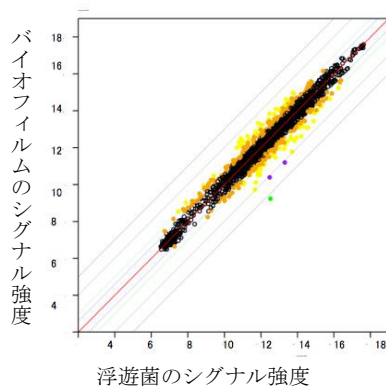


図 2. *P. gingivalis* の遺伝子発現の Scatter plot 図

遺伝子中(1,909)、1.7%の遺伝子がバイオフィーム内で発現を増加し、2.2%がバイオフィーム中で発現が減少したことがわかった。バイ

オフィーム内で遺伝子発現が増加した遺伝子を表 1 に示す。膜の物質輸送に關与する 5

表 1. バイオフィーム内遺伝子発現変化(1)

<i>P. gingivalis</i> ORF	Fold Change
ABC transporter, ATP binding protein(PG1663)	+2.2
ABC transporter, permease protein(PG1664)	+2.0
ABC transporter, permease protein(PG1665)	+2.3
ABC transporter, ATP binding protein(PG1010)	+2.5
Efflux transporter, MFP component, RND family(PG1666)	+2.0
Ion transporter(PG2036)	+2.4
Transporter(PG1898)	+2.1
Transpositional regulator, tetR family(PG1240)	+2.4
Transcriptional regulator, putative(PG1063)	+2.1
DNA-binding protein HU (PG1258)	+2.0
DNA-binding response regulator, LuxR family (PG1431)	+2.0
Sensor histidine kinase(PG1432)	+2.1
Thiamin pyrophosphokinase catalytic domain protein(PG1897)	+2.8
Thioredoxin family protein(PG1084)	+2.8
TonB-dependent receptor, putative(PG1899)	+2.1
Thiamine biosynthesis protein ThiC(PG2110)	+2.5
NADH:ubiquinone oxidoreductase, E subunit(PG2178)	+2.1
NADH:ubiquinone oxidoreductase(PG2179)	+2.2
Na translocating NADH quione reductase subunit A(PG2182)	+2.2
Prolyl oligopeptidase family protein(PG724)	+2.8
tRNA(guanine-(N1))-methyltransferase (PG2035)	+2.1
N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase(PG2038)	+2.1
(Hypothetical protein): PG3(+2.4), PG770(+2.1), PG1008(+2.0), PG1662(+2.4), PG1817(+2.6), PG1818(+2.1), PG1908(+3.0), PG2037(+2.2), PG2220(+2.1)	

表 2. バイオフィーム内遺伝子発現の変化(2)

<i>P. gingivalis</i> ORF	Fold Change
heat shock protein 90(PG45)	-2.1
Outer membrane efflux protein(PG538)	-2.5
Efflux transporter, MFP component, RND family(PG539)	-3.0
AcrB/AcrD/AcrF family protein(PG540)	-2.8
Efflux transporter, MFP component, RND family(PG680)	-2.1
Redox-sensitive transcriptional activator OxyR(PG270)	-2.1
Cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit II(PG899)	-2.2
Cytochrome d ubiquinol oxidase, subunit(PG900)	-2.1
S4 domain protein(PG1156)	-2.0
TPR domain protein(PG1212)	-2.1
Carboxyl-terminal protease-related protein(PG1620)	-2.3
Phosphatidyrosine protein phosphatase(PG1641)	-2.3
D-alanyl-D-alanine dipeptidase(PG16549)	-2.3
Acetyltransferase, GNAT family(PG1761)	-2.1
Lipoprotein, putative(PG2134)	-2.7
UDP-N-acetylglucosamine acyltransferase(PG70)	-2.1
Glycosyl transferase, group 4 family(PG106)	-2.7
Lipoprotein, putative(PG180)	-3.8
Von Willebrand factor type A domain protein(PG182)	-2.6
DNA mismatch repair protein MutL(PG412)	-2.1
Phosphatase, YrbI family(PG658)	-2.1
Immunoreactive 32 kDa antigen PG49(PG181)	-4.3
CRISPR-associated protein Cas 1(PG2014)	-2.0
CRISPR-associated TM1814 family protein(PG2021)	-2.1
CRISPR-associated protein Cas 4(PG2015)	-4.3
(Hypothetical protein): PG179(-2.7), PG259(-2.1), PG325(-2.5), PG327(-2.5), PG414(-2.3), PG541(-3.8), PG659(-2.3), PG1621(-2.3), PG1778(-2.0), PG1779(-2.2), PG1861(-2.1), PG1980(-3.0), PG2212(-9.8)	

種の ABC transporter に關与する遺伝子の発現増加がみられた。ABC transporter は栄養物の

取り込み、シグナル分子の分泌、多剤耐性に関与することが知られている。さらに、ABC transporter は cell to surface、cell to cell interaction やバイオフィーム形成にも関与することが *P. aeruginosa* において報告されていることより、*P. gingivalis* のバイオフィーム形成への関与が示唆された。Thioredoxin は酸化還元に関与することと、さらに *ustA* 遺伝子の変異により増加することより、Thioredoxin はバイオフィーム内の環境の変化に適合するために関与していると示唆されている。tonB dependent receptor はヘミンとヘモグロビンとの結合および輸送に関与し、sensor histidin kinase は外部環境を感知する 2 成分系に関与し、luxR family は positive transcription regulator として働き、Tet R family は transcription に関与することが知られている。この様に物質の輸送に関与する物質の遺伝子や遺伝子発現調節に関与する物質の遺伝子、代謝に関与する物質の遺伝子発現が増加していることがわかった。

バイオフィーム形成菌において遺伝子発現が減少して遺伝子を表 2 に示した。heat shock protein 90 のストレスに関与する遺伝子、efflux transport 等の輸送に関与する遺伝子、酸化や還元に関与する OxyR の発現調節に関与する遺伝子等であった。また、phosphotyrosine protein phosphatase の *P. gingivalis* における変異株は *P. gingivalis* と *Streptococcus gordonii* によるバイオフィーム形成に関与するとの報告があることより、*P. gingivalis* 単独でのバイオフィーム形成に関与することが示唆された。また、遺伝子発現の相違が 2 倍以下であるが、遺伝子発現の低下がみられたもので重要なものもあった。ATP-dependent clp protease(PG0010)はストレスとビルレンスの調節に関与しており、*clp* と *clpXP* の変異はバイオフィーム形成を増加するとされている。*clpB* protein の変異株は細胞への侵入が低下することより、細胞内での増殖とサバイバルに必要なとされている。*porT* protein は *P. gingivalis* の主要な病原因子の 1 つであるアルギニン特異的システインプロテアーゼ(Rgp)とリジン特異的システインプロテアーゼ(Kgp)をペリズラズマから外膜を通過し膜表面まで輸送するのに重要な作用をすると報告されている。

これまで、*P. gingivalis* の単独の遺伝子の変異株によるバイオフィーム形成性の比較や 2 次元電気泳動によるスポットの解析による関与するタンパク質の解析等についての報告は国外ではあったが、*P. gingivalis* のバイオフィーム形成菌と浮遊菌の菌間における発現遺伝子の網羅的な解析は国内外でも報告がなく、*P. gingivalis* のバイオフィームの性状を知る上で、バイオフィームと浮遊菌間の遺伝子発現の相違を知ることは意義のある

ものと思われた。今後はこれら変化の見られた遺伝子が相互にどの様に関連しているか検討を行いたいと考えている。

(3) *P. gingivalis* のバイオフィーム形成性とクオラムセンシング(QS)について：*P. gingivalis* の QS がバイオフィーム形成への影響をみるために AI-2 産生に関与する *luxS* 遺伝子の変異株を作製し、検討した。*P. gingivalis* の親株と *luxS* 変異株のバイオフィーム形成性をみたところ、親株に比較し、*luxS* 変異株の方がバイオフィーム形成量も多く、バイオフィーム形成比率も高いことが分かった。(表 3)

表 3. 親株と *luxS* 変異株のバイオフィーム形成量とバイオフィーム形成比率

菌株	バイオフィーム形成量 (OD600nm)	バイオフィーム形成比率 (%)
親株	0.057 ± 0.001	7.0 ± 0.2
N3株	0.112 ± 0.005	13.4 ± 0.6

このことは *P. aeruginosa* 等での報告と逆の現象であった。このことより、*P. gingivalis* では AI-2 は単独でのバイオフィームの成熟に働くのではなく、バイオフィーム形成菌の結合を弱め、一部の菌を遊離させ、他の菌との共凝集を促進し、口腔バイオフィームへの参入することに働くことが示唆された。そこで、*P. gingivalis* の *luxS* 遺伝子を pGEX6P-3 に組み込み、*E. coli* DH5α に挿入した *E. coli* DH5α/pGEXpg-luxS 株にて AI-2 を産生させた。AI-2 産生は *Vibrio harveyi* BB170 をレポーターストレインとして確認した。*P. gingivalis* *luxS* 変異株に *E. coli* DH5α または *E. coli* DH5α/pGEXpg-luxS 株の培養上清を加え培養したが、バイオフィーム形成性に違いがみられず、バイオフィームの遊離は確認できなかった。このことは LuxS が AI-2 の前駆物質の生成のみならず、RNA、DNA、多くのタンパク質等に対するメチル基供与に関与する homocysteine の生成 (activated methyl cycle) にも関与することが報告されていることより、*luxS* 変異により activated methyl cycle にも変化が生じ、その結果多くの遺伝子発現に変化が生じた可能性が考えられた。*P. gingivalis* の *luxS* 変異株は親株に比較して幾つかのタンパク質発現に差異がみられることを 2 次元電気泳動により確認している。

以上のことより、*P. gingivalis* において *luxS* 遺伝子が正常に働くと単独の菌によるバイオフィーム形成が弱まり、菌の遊離が促進される傾向がみられたが、AI-2 が関与するのではなく、activated methyl cycle 系が関与するものと思われた。これまで、*Staphylococcus epidermidis*, *Helicobacter pylori* において *luxS*



変異株においてバイオフィーム形成性が増加することが国外で報告されている。これらの菌における *luxS* 遺伝子からの AI-2 はこれらの菌のバイオフィームから遊離にはたらく可能性が示唆されている。*P. gingivalis* においても *luxS* 変異株が親株よりバイオフィーム形成性において相違があることは、これまで報告がない。*P. gingivalis* のバイオフィーム形成性の違いは AI-2 によっては説明できなかったが、*luxS* 遺伝子が関与する機構である可能性が示唆されたことは、これまで国内外で報告がなされていない。今後、LuxS がどのように *P. gingivalis* のバイオフィーム形成に関与するかを明らかにしたいと考えている。

(4) *P. gingivalis* の遊離とアルギニン特異的システインプロテアーゼとリジン特異的システインプロテアーゼについて：*P. gingivalis* は先行バイオフィームに結合し、そこで増殖しバイオフィームに参入していくと考えられる。先行バイオフィームとして *S. gordonii* のバイオフィームを well に形成させ、そこに *P. gingivalis* の菌液を添加し培養すると *S. gordonii* のバイオフィームの剥離が観察された。この *S. gordonii* のバイオフィームが剥離した現象はバイオフィームの遊離した現象と同様であると考えられた。ついで、*S. gordonii* のバイオフィームに *P. gingivalis* の培養上清を添加し、1 時間静置することにより同様に *S. gordonii* のバイオフィームの遊離がみられた。このことより、培養上清中の何らかの因子が *S. gordonii* のバイオフィームの遊離に関与していると想定された。*P. gingivalis* の培養上清を加熱(100 °C, 10 分)することにより *S. gordonii* のバイオフィームの遊離は減少したことより、タンパク質性の因子と考えられた。そこで、*P. gingivalis* が産生するプロテアーゼのアルギニン特異的システインプロテアーゼ(Rgp)とリジン特異的プロテアーゼ(Kgp)の影響をこれらの変異株を用いて検討した。*P. gingivalis* 112 株(*rgpA*, *rgpB* の変異株)、*P. gingivalis* KDP129 株(*kgp* 変異株)の培養上清を *S. gordonii* のバイオフィームに添加してもバイオフィームの遊離は生じたが、*P. gingivalis* KDP136 株(*rgpA*, *rgpB*, *kgp*)の変異株の培養上清を添加すると *S. gordonii* のバイオフィームの遊離は著しく低下した。(図 3)

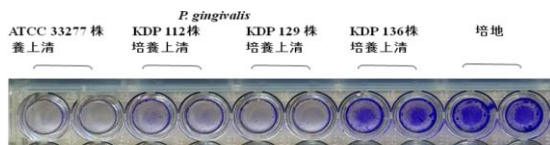


図 3. *S. gordonii* ATCC 10558 株のバイオフィームに対する *P. gingivalis* ATCC 33277, KDP112 株、KDP129 株、KDP136 株培養上清の影響

また、*P. gingivalis* の培養上清を Rgp の特異的阻害剤である KYT-1 単独処理培養上清、Kgp の特異的阻害剤である KYT-36 単独処理培養上清では *S. gordonii* のバイオフィームの遊離は阻害できなかったが、KYT-1 と KYT-36 での処理した培養上清では *S. gordonii* のバイオフィームの遊離は阻害された。(図 4)

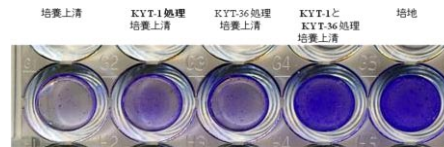


図 4. *S. gordonii* ATCC 10558 株のバイオフィームに対する KYT-1(Rgp 阻害剤)と KYT-36(Kgp 阻害剤)処理 *P. gingivalis* ATCC 33277 株の培養上清の影響

このように、*S. gordonii* のバイオフィームの well からの遊離に関与する *P. gingivalis* の因子は Rgp と Kgp であることが明らかとなった。*P. gingivalis* は *S. gordonii* と共凝集することより、*P. gingivalis* は先行バイオフィームである *S. gordonii* に結合し、増殖後、Rgp と Kgp を産生し *S. gordonii* と共に遊離する可能性が考えられた。このことより、*P. gingivalis* はバイオフィームに参入し、増殖後、単独での遊離もあると思われるが、他の菌と共に遊離し、新たな菌の供給源になることも示唆された。

これまで、国外で他の菌において、バイオフィームからの菌の遊離についての報告がなされているが、今回の実験のように菌が自己のバイオフィームからの遊離ではなく、他の共凝集している菌を遊離させることにより自己もそれとともない遊離するとの考え方はこれまで海外でも報告はなく、新しい考え方であり、*in vivo* においてもこのような遊離の可能性もあるものと思われる。この様にバイオフィームからの菌の遊離において他の菌と共に遊離する可能性を示唆した新しい知見であると思われる。

(5) *P. gingivalis* の発育因子を産生する *Veillonella* 属について：*P. gingivalis* が発育するには周囲からヘミンとメナジオンの発育因子を得る必要がある。*V. atypica*, *V. parvula*, *V. dispar* の培養上清をメナジオン非添加の培地に添加することにより *P. gingivalis* の発育促進効果がみられた。*Veillonella* sp. の産生するメナジオン量は 0.03 µg/ml 以下であった。近年、口腔 *Veillonella* 属は先に示した 3 菌種に加え、新しく 2 菌種が報告されたが、*Veillonella* 属の各菌種間の生化学的性状や 16S rDNA の類似性より、各菌種を同定することは困難であった。そこで、*rpoB* 遺伝子より 5 菌種を PCR で容易に同定可能なフォワードプライマーを作製した。設計した菌種特異的フォワードプライマーを

括弧内に記載する。( *V. parvula* 用は G A A G C A T T G G A A G C G A A A G T T T C G、*V. atypical* 用は T C T C T T T G G G A A G A A T T A G A A C G、*V. dispar* 用は A A C G C G T T G A A T T C G T C A T G A A C、*V. denticariosi* 用は G A A A G A A G C G C G C A C C G A C A G T、*V. rogosae* 用は A T T G C A G A A G A G T G A A C A T G A A G C ) 口腔 *Veillonella* 菌種の同定にはこれまで簡易に迅速にできる方法がなく、*rpoB* 遺伝子をターゲットした PCR による方法は国内外でも報告がなく、口腔 *Veillonella* 菌種の迅速同定において非常に有用な方法である。また、今回のプライマーで検出できない口腔 *Veillonella* 菌種が検出される可能性もあり、さらに新しい口腔 *Veillonella* 菌種の発見の一助になる可能性も考えられた。

#### 5. 主な発表論文

(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 4 件)

- ① Igarashi E, Kamaguchi A, Fujita M, Miyakawa H, Nakazawa F. Identification of oral species of the genus *Veillonella* by polymerase chain reaction. *Oral Microbiology Immunology*. 査読有. 24. 310-313. 2009.
- ② Yasuda Y, Kamaguchi A, Saito T. In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a new resinbased endodontic sealer against endodontic pathogens. *Journal of Oral Science*. 査読有. 50. 309-313. 2008.
- ③ 鎌口有秀、岡本公彰、五十嵐英次、藤田真理、宮川博史、中澤太、*Porphyromonas gingivalis* 無色突然変異株のバイオフィルム形成性、北医療大歯誌、査読有、27、85-92、2008.
- ④ Sakai E, Naito M, Sato K, Hotokezaka H, Kadowaki T, Kamaguchi A, Yamamoto K, Nakayama K. Construction of recombinant hemagglutinin derived from the gingipain-encoding gene of *Porphyromonas gingivalis*, identification of its target protein on erythrocytes, and inhibition of hemagglutination by an interdomain regional peptide. *Journal of Bacteriology*. 査読有, 189, 2007.

[学会発表] (計 30 件)

- ① 鎌口有秀 他、*Streptococcus gordonii* のバイオフィルムに対する *Porphyromonas gingivalis* 培養上清の影響、第 83 回日本細菌学会、2010 年 3 月 27 日、横浜
- ② 鎌口有秀 他、コーヒーの *Porphyromonas gingivalis* のシステインプロテアーゼの阻害効果、第 28 回北海道医療大学歯学会、

2010 年、3 月 6 日、札幌

- ③ 鎌口有秀 他、*Streptococcus gordonii* 菌体に対する *Porphyromonas gingivalis* 培養上清の影響、第 51 回歯科基礎医学会、2009 年 9 月 9 日、新潟
- ④ 鎌口有秀 他、*Porphyromonas gingivalis* のバイオフィルムについての検討、第 81 回日本細菌学会、2009 年 3 月 12 日、名古屋
- ⑤ 鎌口有秀 他、*Porphyromonas gingivalis* の *relA/spoT* 変異株の性状とバイオフィルム形成性、第 27 回北海道医療大学歯学会、2009 年 2 月 28 日、札幌
- ⑥ 鎌口有秀 他、バイオフィルムへの *Porphyromonas gingivalis* の参入とその後の動向の検討の為の基礎的研究、第 50 回歯科基礎医学会、2008 年 9 月 23 日、東京
- ⑦ 鎌口有秀 他、*Porphyromonas gingivalis* のバイオフィルム形成菌と浮遊菌の遺伝子発現について、第 76 回日本細菌学会北海道支部会、2008 年 9 月 6 日、札幌
- ⑧ Kamaguchi A et al. Gene expression of *Porphyromonas gingivalis* biofilm. 86<sup>th</sup> General session and exhibition of IADR. 2008, 6, 2. Toront
- ⑨ 鎌口有秀 他、*Porphyromonas gingivalis* 親株と *luxS* 変異株のバイオフィルム形成性、第 81 回日本細菌学会、2008 年 3 月 26 日、京都
- ⑩ 鎌口有秀 他、*Porphyromonas gingivalis* の浮遊菌とバイオフィルム形成菌の遺伝子発現の比較、第 26 回北海道医療大学歯学会、2008 年 3 月 1 日、札幌
- ⑪ 鎌口有秀 他、*Porphyromonas gingivalis* のバイオフィルム形成に対する Quorum sensing の影響、第 75 回日本細菌学会北海道支部会、2007 年 9 月 8 日、札幌
- ⑫ 鎌口有秀 他、*Porphyromonas gingivalis* の *relA/spoT* 変異株の発育とバイオフィルム形成性、第 49 回歯科基礎医学会、2007 年 8 月 31 日、札幌  
その他 18 件

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

鎌口 有秀 ( KAMAGUCHI ARIHIDE )  
北海道医療大学・歯学部・准教授  
研究者番号：40133235

##### (2) 研究分担者

中澤 太 ( NAKAZAWA FUTOSHI )  
北海道医療大学・歯学部・教授  
研究者番号：60115053