

令和 5 年 6 月 17 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18518

研究課題名(和文) 口腔スピロヘータの酸化ストレス応答における新規転写調節因子の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of hte novel transcriptional regulator in response to oxidative stress of oral spirochetes

研究代表者

山下 慶子 (Yamashita, Keiko)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：50843538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：TDE_0260欠損株のトランスクリプトーム解析の結果、18遺伝子の発現上昇と12遺伝子の発現低下を認めた(カットオフ値:2.0-fold, $p < 0.05$)。発現上昇を認めた遺伝子の中には、Thiol-specific peroxidase、および膜輸送タンパク質があった。うちEfflux型の輸送タンパク質は、酸化ストレス環境下で細胞内の Fe^{2+} とのフェントン反応によるフリーラジカル発生を防ぐため、 Fe^{2+} の排出に寄与する可能性がある。

以上より、*T. denticola* TDE_0260は、ペルオキシダーゼや膜輸送タンパク質と協調して、本菌の酸化ストレス応答の一端を担うことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は世界的に蔓延している口腔の細菌感染症である。歯周病原細菌の多くは嫌気性であり、外環境からの酸化ストレスに効果的に対応する必要がある。これまで種々の歯周病原細菌において、酸化ストレス応答に関わる酵素や転写調節因子が明らかにされてきたが、主要な歯周病原細菌の一種である*Treponema denticola*の酸化ストレス応答機構は不明であった。

本研究で、機能未知遺伝子TDE_0260がペルオキシダーゼや種々の膜輸送タンパク質と協調して本菌の酸化ストレス応答に関わることを示唆された。本研究では、細菌因子の制御を目的とした歯周治療における、新たな標的分子に関する基礎的な知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Transcriptome analysis of TDE_0260 deficient mutant strain revealed that up-regulation of 18 genes and down-regulation of 12 genes (cut-off value: 2.0-fold, $p < 0.05$).

Among the up-regulated genes, Thiol-specific peroxidase and membrane transporter proteins were found. Efflux-type transport proteins may contribute to Fe^{2+} efflux to prevent free radical generation by the Fenton reaction with intracellular Fe^{2+} under oxidative stress conditions.

These results suggest that *T. denticola* TDE_0260 may play a role in the oxidative stress response of this bacterium, in cooperation with peroxidase and membrane transport proteins.

研究分野：微生物学

キーワード：歯周病原細菌 *Treponema denticola* ストレス応答

1. 研究開始当初の背景

歯周病は世界的に蔓延している口腔の細菌感染症である。歯周病原細菌の多くは嫌気性であり、酸化還元電位の低い歯周ポケット内に定着するまでには、外環境からの酸化ストレスに効果的に対応する必要がある。これまで種々の歯周病原細菌において、酸化ストレス応答に関わる酵素や転写調節因子が明らかにされている。

口腔スピロヘータの一種である *Treponema denticola* は、その存在比率が歯周炎の重症度と正の相関を示すなど、歯周炎の病態と深く関わる細菌である。*T. denticola* は、微好気性または嫌気性であるが、実験室における培養では完全な嫌気条件が適用される。更に培地中の溶存酸素濃度が 0.3% 以上では増殖できず、これは *T. denticola* にとって、溶存酸素による酸化が強い環境ストレスであることを示している。

これまでに、*T. denticola* が酸化還元酵素活性を持ち、本菌のゲノム DNA には NOX をはじめとした活性酸素代謝酵素をコードする遺伝子が存在することが示されている。しかし *T. denticola* のゲノム DNA には、*oxyR* 等、既知の酸化ストレス応答に関わる転写調節因子と配列類似性の高い遺伝子は存在しない。従って、本菌の酸化ストレス応答においては、未知の転写調節因子がマスターレギュレーターとして機能している可能性がある。

我々の研究グループでは、*T. denticola* の環境ストレス応答機構について遺伝子発現レベルの解析を進めてきた。これまでに、栄養制限、低浸透圧、そして酸素暴露時における本菌の遺伝子発現を網羅的に解析することにより、これらのストレス応答に関わる可能性のある候補遺伝子を抽出した。この中で、アノテーション情報に基づき iron-sulfur cluster-binding protein をコードする可能性のある遺伝子、TDE_0260 に着目した。iron-sulfur cluster-binding protein は酸素暴露時の応答に関わることが報告されているタンパク質であるが、*T. denticola* におけるこのタンパク質の機能やストレス応答への関与は不明である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*T. denticola* のストレス応答に関与すると考えられる TDE_0260 の機能解析により、本菌のストレス応答、主に酸化ストレス応答機構の一端を明らかにすることである。

3. 研究の方法

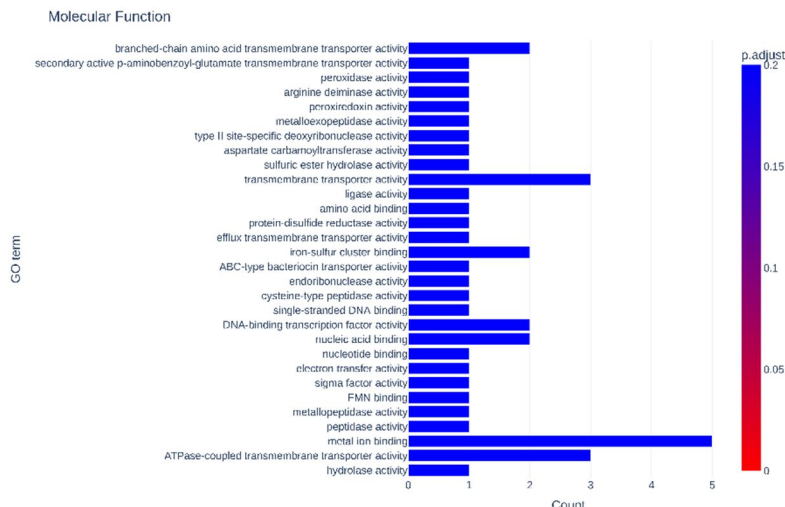
TDE_0260 の機能を解析するため *T. denticola* ATCC 35405 株から 相同組み換えにて TDE_0260 欠損株を作出した。本遺伝子の欠損が *T. denticola* に与える影響を遺伝子レベルで明らかにするため、作出した欠損株のトランスクリプトーム解析を RNA-seq にて行った。

4. 研究成果

まず、*T. denticola* TDE_0260 欠損株の作出により、機能未知遺伝子である TDE_0260 の機能解析が可能となった。

TDE_0260 欠損株のトランスクリプトーム解析の結果、18 遺伝子の up regulation と 12 遺伝子の down regulation を認めた (カットオフ値: 2.0-fold, $p < 0.05$)。野生株と比較し、欠損株において最も発現が上昇していたのは、hypothetical protein (4.59 倍)、最も発現が低下していたのは、toxin (-4.45 倍) であった。

発現上昇を認めた遺伝子の中には、過酸化物を分解することにより酸化ストレスから細胞を保護する役割を果たす、Thiol-specific peroxidase (3.78 倍) が含まれていた。また、HlyD family efflux transporter periplasmic adaptor subunit や他の ABC transporter など、種々の膜輸送タンパク質の発現が変化していた。



Efflux 型の膜輸送タンパク質は、金属イオンの細胞外への排出に関わる。酸化ストレス環境下で細胞内に Fe^{2+} が存在する場合、周囲環境からの過酸化物質と細胞内の Fe^{2+} によるフェントン反応が起こり、細胞内にはフリーラジカルが発生する。欠損株において HlyD efflux transporter の発現変動が認められたことから、TDE_0260 がコードするタンパク質が、酸化ストレス環境下での細胞内でのフリーラジカル発生を防ぐべく、*T. denticola* の Fe^{2+} 排出に寄与することが示唆された。更に、種々の膜輸送タンパク質の発現変動が認められた。これらに関しては今後、酸化ストレスのみならず他のストレスとの関連についても検討する必要がある。

以上より、*T. denticola* TDE_0260 は、Thiol-specific peroxidase や Efflux 型の膜輸送タンパク質をコードする遺伝子と協調して、本菌の酸化ストレス応答の一端を担うことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Keiko Yamashita, Yurie Kitamura, Rio Hisanaga, Yuichiro Kikuchi, Eitoyo Kokubu, Takashi Namba, Kazuyuki Ishihara, and Atsushi Saito
2. 発表標題 Characterization of the genes associated with stress response in <i>Treponema denticola</i>
3. 学会等名 第108回アメリカ歯周病学会共催日本臨床歯周病学会・日本歯周病学会2022大会（国際学会）
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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