

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：33902

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21050

研究課題名（和文）歯周病原細菌*P.gingivalis*の線毛における新たな遺伝子型解析研究課題名（英文）Novel genotypic analysis of fimbriae in the periodontal pathogenic bacterium *P. gingivalis*

研究代表者

榮 宏太郎（Sakae, Kotaro）

愛知学院大学・歯学部・歯学部研究員

研究者番号：60962818

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）：歯周病関連菌*Porphyromonas gingivalis*はFimAおよびMfa1線毛を保有する。これらの線毛の構成成分をコードする遺伝子群には多様性が認められる。本研究では、*P. gingivalis*の線毛因子の多様性と病原性との関連を明らかにすることを目的とし、全ての線毛成分の遺伝子型分類を可能とする手法、線毛遺伝子型と歯周病における臨床症状との関連性、及び線毛機能と遺伝子型との関連性の検討を行った。その結果、の成果として、FimA線毛と結合する134個の候補タンパク質を同定することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病原細菌*Porphyromonas gingivalis*の持つ付着因子であるMfa1線毛の主要成分mfa1遺伝子型をPCRにより分類する手法を考案した。今後は、mfa1遺伝子型と病原性との関連を調査したい。本方法の開発は、患者のプラーク中に生息する*P.gingivalis*線毛遺伝子型を判定し、病原性判定や予後の推定への利用を可能とする。

研究成果の概要（英文）：The periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* possesses FimA and Mfa1 fimbriae. The genes coding for these fimbrial components exhibit diversity. This study aims to elucidate the relationship between the diversity of *P. gingivalis* fimbrial factors and pathogenicity by: 1) developing a method for genotyping all fimbrial components, 2) investigating the correlation between fimbrial genotypes and clinical symptoms in periodontal disease, and 3) analyzing the relationship between fimbrial function and genotypes. As a result of the third objective, we identified 134 candidate proteins that bind to FimA fimbriae.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：Porphyromonas gingivalis 線毛 遺伝子型 歯周病

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病関連菌 *Porphyromonas gingivalis* は付着因子として二種の異なる線毛である FimA および Mfa1 線毛を保有する。FimA 線毛および Mfa1 線毛は主要成分である FimA および Mfa1 タンパク質により構成されるが、その他に 4 つの微量成分 FimB ~ FimE 及び Mfa2 ~ Mfa5 が含まれる。主要成分をコードする *fimA* はその遺伝子配列の違いにより I ~ V 型に分類され、II 型および IV 型を持つ株の病原性が高いことが報告されている。一方、*mfa1* 型については不明な点が多いが、近年我々は、*mfa1* が 53、70A および 70B 型に分類され、それらの抗原性が異なることを明らかにした^{1,2)}。さらに、*fimA* および *mfa1* の下流に位置する微量成分の遺伝子型解析にも着手し、*mfa2* ~ *mfa5* 及び *fimB* ~ *fimE* においても異なる遺伝子型が存在することも報告した。

2. 研究の目的

本研究では、*P. gingivalis* の全ての線毛成分の遺伝子型分類を可能とする手法を確立すると共に、開発した方法により線毛因子の遺伝子型分類を試み、線毛遺伝子型と歯周病における臨床症状との関連性を調査すること、さらに遺伝子型と線毛機能との関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 染色体 DNA の抽出

当該講座が保有する *P. gingivalis* 84 株を通常に従い Tryptone soya broth にて培養後、遠心により集菌した。菌体から染色体 DNA を DNA purification Kit (Promega) により精製した。試料中に含まれる DNA 濃度を NanoDrop 分光光度計 (Thermo Scientific) にて測定した。

(2) ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR)

表 1 に示す既報及び新規に設計したプライマーセットを用いて PCR を行った (TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice Touch)。DNA ポリメラーゼは Tks Gflex DNA polymerase (TaKaRa) を使用した。増幅産物をアガロースゲル (1.0%) による電気泳動を行い、SYBR Safe DNA Gel Stain (Thermo Scientific) にて増幅バンドを標識した。*mfa1*, *mfa2*, *mfa3*, *mfa4*, *mfa5*, *fimB*, *fimC*, *fimD*, *fimE* の PCR 産物については、特異的なバンドが得られるか否かによって判定することとした。*fimA* については、universal primer を用いて *fimA* を増幅後、DNA シークエンシングにより遺伝子型を決定した。

表 1. 本研究に使用したプライマー

Name	Target	Sequence (5' to 3')
fimA universal-F	fimA	AAGTTTTTCTTGTTGGGACTTGC
fimA universal-R		AACCCCGCTCCCTGTATTCCGA
mfa1-F	mfa153	GAGCATTGCTCTCATTTGGGCTTTG
mfa1 53-R		CATCAGAAAAGGCAGCGTAAGCTG
mfa1-F	mfa170A	GAGCATTGCTCTCATTTGGGCTTTG
mfa1 70A-R		TTAGGTATTGGCGACGTTCTCCTTG
mfa1-F	mfa170B	GAGCATTGCTCTCATTTGGGCTTTG
mfa1 70B-R		TCGTCTCAGAAAGGGCATTAG

(3) DNA シークエンシング

universal primer を用いた PCR により増幅された *fimA* 断片を BigDye Terminator v.3.1 にて反応後、BigDye XTerminator™ Purification Kit により DNA を精製した。得られた試料を DNA シークエンサーにより解析した (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystems)。

(4) 線毛遺伝子型と歯周病における臨床症状との関連性の検討

後述するが、全ての遺伝子型を分類できるプライマーセットを発見することができなかったため、本研究では臨床研究は実施しなかった。

(5) 線毛の精製

I 型 *fimA* 線毛の機能を明らかにするために、ATCC 33277 由来 *mfa1* 欠損株である SMF1 株から *FimA* 線毛を精製した。詳細には、菌株の培養上清からタンパク質を硫酸アンモニウム沈殿にて分画後、イオン交換クロマトグラフィーにより *FimA* 線毛を単離・精製した。

(6) プロテインマイクロアレイ

精製 *FimA* 線毛を The Alexa Fluor™ 647 NHS Ester にて蛍光標識後、HuProt™ Human Proteome Microarray により、*FimA* 線毛と相互作用を示すタンパク質を網羅的に解析した。

4. 研究成果

(1) PCR による遺伝子型解析及び遺伝子型間の関連

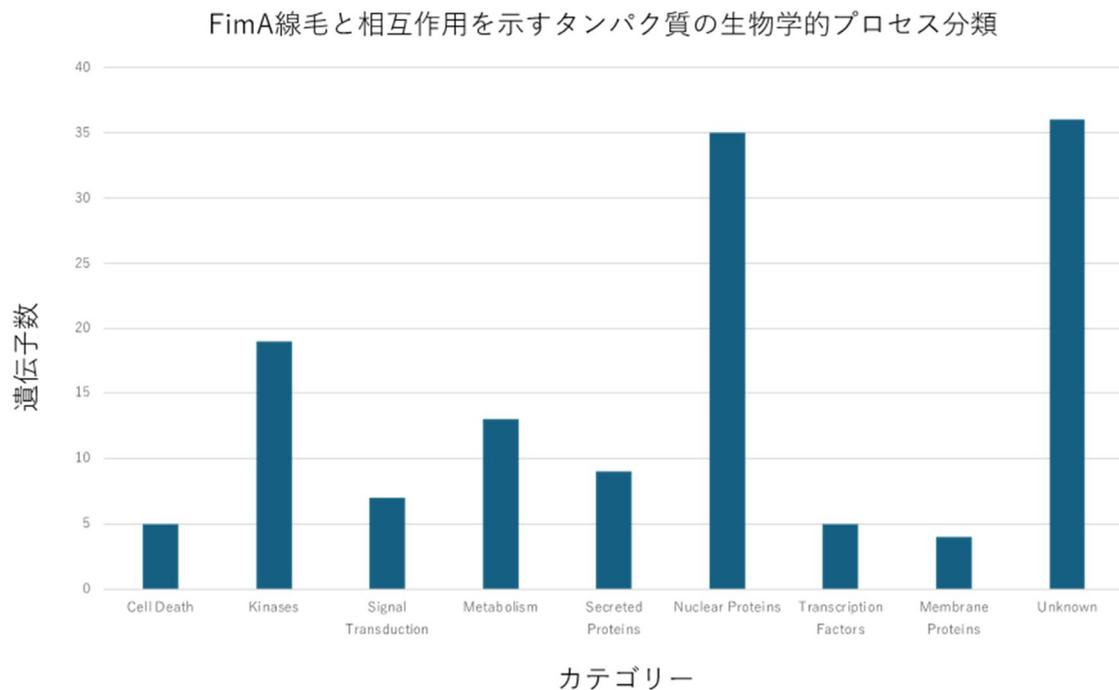
表 1 に示す *mfa1* 遺伝子型を分けるプライマーのセットにおいて、それぞれ *mfa170A*、*mfa170B*、及び *mfa153* を保有する *P. gingivalis* 株において、特異的に増幅することが確認された。また、新規に設計した *mfa2-mfa4* のプライマーでは、*mfa2* ~ *mfa4* は 70 と 53 型の遺伝子型に分られることが示された。さらに、その *mfa2-mfa4* 遺伝子型は、*mfa1* 型と一致することが分かった。*mfa5* は A-E 型に分類されるが、それらを特異的に検出するプライマーのセットを見いだすことはできなかった。

fimA については、universal primer による PCR 後に DNA シークエンシングを行うことにより、全ての菌株の遺伝子型を決定することができた。しかし、*fimA* の下流因子の遺伝子型を特異的に検出するためのプライマーセットおよび PCR 条件を見いだすことはできなかった。

以上の結果から、臨床研究を行うことは難しいと判断し、(2) I型 FimA 線毛と相互作用するタンパク質の網羅的解析を行うこととした。

(2) I型 FimA 線毛と相互作用を示すタンパク質の網羅的解析

FimA 線毛および Mfa1 線毛の定着における役割を明らかにするために、*P. gingivalis* SMF1 株から FimA 線毛を精製し、プロテインマイクロアレイを実施した。その結果、FimA 線毛と相互作用を示す 134 個の候補タンパク質を同定することができた。それらの機能を生物学的プロセスにより分類した結果を図 1 に示すが、今後は、I型 FimA 線毛とこれらのタンパク質との相互作用を詳細に調べ、線毛機能と遺伝子型との関連を調査したい。



引用文献

1. Porphyromonas gingivalis FimA and Mfa1 fimbriae: Current insights on localization, function, biogenesis, and genotype. Hasegawa Y, Nagano K. Jpn Dent Sci Rev. 2021 Nov;57:190-200.
2. Structural and antigenic characterization of a novel genotype of Mfa1 fimbriae in Porphyromonas gingivalis. Fujimoto M, Naiki Y, Sakae K, Iwase T, Miwa N, Nagano K, Nawa H, Hasegawa Y. J Oral Microbiol. 2023 May 21;15(1):2215551.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 藤本 実結菜, 内記 良一, 榮 宏太郎, 岩瀬 智彦, 三輪 尚慶, 名和 弘幸, 長谷川 義明	4. 巻 60
2. 論文標題 歯周病原細菌Porphyromonas gingivalis D83T3株におけるMfa1線毛の性状解析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 愛知学院大学歯学会誌	6. 最初と最後の頁 284 ~ 293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Fujimoto Miyuna, Naiki Yoshikazu, Sakae Kotaro, Iwase Tomohiko, Miwa Naoyoshi, Nagano Keiji, Nawa Hiroyuki, Hasegawa Yoshiaki	4. 巻 15
2. 論文標題 Structural and antigenic characterization of a novel genotype of Mfa1 fimbriae in <i>Porphyromonas gingivalis</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Oral Microbiology	6. 最初と最後の頁 2215551
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/20002297.2023.2215551	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwase Tomohiko, Naiki Yoshikazu, Miwa Naoyoshi, Kato Ayaka, Nakanishi Shogo, Arai Ryo, Fujimoto Miyuna, Sakae Kotaro, Abe Toshiharu, Sugita Yoshihiko, Mitani Akio, Hasegawa Yoshiaki	4. 巻 33
2. 論文標題 Development of a Novel Aspiration Pneumonia Mouse Model Using <i>Porphyromonas gingivalis</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 99 ~ 104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2485/jhtb.33.99	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 榮 宏太郎, 永野 恵司, 藤本 実結菜, 長谷川 義明
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisのmfa1下流因子の遺伝子型解析
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会 (徳島)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大石 明広, 内記 良一, 岩瀬 智彦, 榮 宏太郎, 長谷川 義明
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisにおけるmfa1部位特異的変異導入による線毛形成に及ぼす影響の検討
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会(徳島)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoyoshi Miwa, Miyuna Fujimoto, Yoshikazu Naiki, Kotaro Sakae, Tomohiko Iwase, Shintaro Sakatoku, Yuki Hayashi, Yoshiaki Hasegawa, Hiroyuki Nawa
2. 発表標題 Characterization and functional analysis of Mfa1 fimbriae of the periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis D83T3 strain.
3. 学会等名 第61回日本小児歯科学会(長崎)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Naoyoshi Miwa, Miyuna Fujimoto, Yoshikazu Naiki, Kotaro Sakae, Tomohiko Iwase, Kiyoshi Nisikawa, Yoshiaki Hasegawa
2. 発表標題 歯周病原菌D83T株のMfa1線毛の特性解析
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会(東京)
4. 発表年 2023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
---------	---------