

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 27 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463171

研究課題名(和文) 歯周病原細菌のECFシグマ因子を利用した新たな歯周病予防法の開発

研究課題名(英文) Development of new periodontal disease prevention method using ECF sigma factors of periodontal pathogenic bacteria

研究代表者

菊池 有一郎 (KIKUCHI, YUICHIRO)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：30410418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277株における5種類のECFシグマ因子と病原性について検討した。野生株と比較し、PGN_0274変異株は赤血球凝集能を認めず、自己凝集能の低下を認めた。さらに透過型電子顕微鏡による菌体表層構造の観察では、PGN_0274変異株においてvesicle形成の増加と、細胞壁部分の厚みの低下が認められた。これらの実験結果を考慮すると、*P. gingivalis* ECFシグマ因子PGN_0274の働きを阻害することにより *P. gingivalis* の歯周病原性を弱め、歯周病の予防へと繋がる事が期待できる。

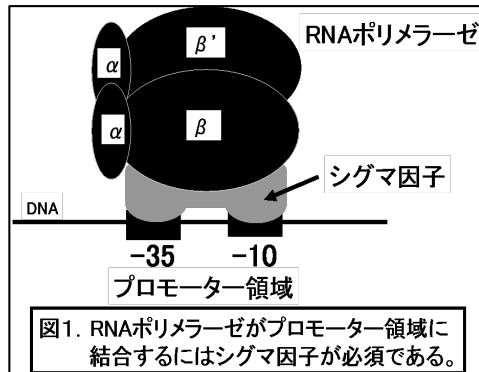
研究成果の概要(英文)： *Porphyromonas gingivalis* has been recognized as a major pathogen in chronic periodontitis. Some bacteria utilize sigma factor proteins of the extracytoplasmic function (ECF) subfamily. In this study, we have investigated the ECF sigma factors in *P. gingivalis* to determine their roles in this bacterium. Insertional mutagenesis was used to create *P. gingivalis* mutants lacking ECF sigma factors of strain ATCC 33277. The PGN_0274 mutant showed no hemagglutination activity and much less aggregation. The PGN_0274 mutant displayed an increase susceptibility to ampicillin compared with the wild type strain. TEM images revealed that PGN_0274 mutant formed numerous outer membrane vesicles at the cell surface. These results indicated that PGN_0274 ECF sigma factor is important for bacterial surface-associated activities, including autoaggregation, hemagglutination, vesicle formation and ampicillin susceptibility.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* 環境ストレス シグマ因子 ECFシグマ因子 自己凝集能
赤血球凝集能 ベジクル

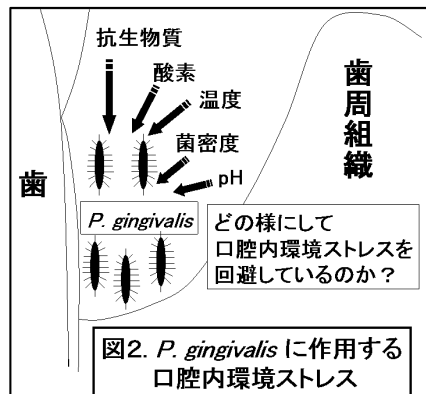
1. 研究開始当初の背景

細菌の RNA ポリメラーゼは、シグマ因子がプロモーター領域の特異的な配列を認識することで、遺伝子の発現を調節している(図 1)。



通常、細菌はシグマ因子を数種類備えており、環境に応じてその存在比率を変えることでその環境に適した遺伝子群の転写を発現調整している。その中で、ECF (extracytoplasmic function)シグマ因子は細胞外の生活環境変化に応答し、細菌に対する環境ストレスを回避することに重要な役割を果たすと大腸菌をはじめとする幾つかの細菌で報告されている¹⁾。

歯周ポケットを含め、口腔内環境は常に変化しており、そこに生息する細菌は様々な環境の変化に対応する機構を持ち備えている(図 2)。現在まで、慢性歯周炎の代表的な病原



細菌である *Porphyromonas gingivalis* が備える環境ストレス回避タンパクについては数多く報告されているが、その環境ストレス回避タンパクの発現を調節している転写因子に関する報告は数少ない。このメカニズムを解明することは、*P. gingivalis* の慢性感染の阻害につながり、その結果新たな歯周病予防薬の開発へと発展する可能性がある。

P. gingivalis ATCC 33277 株には 6 種類 (PGN_0274, PGN_0319, PGN_0450, PGN_0970, PGN_1108, PGN_1740) の ECF シグマ因子が存在する。我々は、*P. gingivalis* W83 株において、ECF シグマ因子である PG1318 (33277 株では PGN_1108 に相当) は染色体の突然変異の発生を抑制していることを報告した²⁾。*P. gingivalis* W83 株における他の ECF シグマ因子については、PG0985 (PGN_0970)、

PG1660 (PGN_0450), PG1827 (PGN_1740) は過酸化水素による酸化ストレスの除去、PG0162 (PGN_0274), PG1660 は *P. gingivalis* の病原因子であるプロテアーゼ (ジンジパイン) の成熟化に関与するとの報告がある³⁾。しかし、ECF シグマ因子と菌体表層性状との関連についての報告は現時点で存在しないので、本研究にてそれぞれの ECF シグマ因子変異株を用いて解析を行った。

2. 研究の目的

P. gingivalis が慢性的に歯周炎を発症していくうえで、菌体表層性状は重要な役割を果たす。例えば、菌体表層には強力なタンパク分解酵素であるジンジパイン (Rgp, Kgp) が存在し、赤血球凝集活性やベジクル分泌なども認められる。これらの菌体表層性状において *P. gingivalis* ATCC 33277 株の 5 種類 (PGN_0274, PGN_0319, PGN_0450, PGN_0970, PGN_1740) の ECF シグマ因子が重要な役割を担っているのか、もしそうであればそのメカニズムを解明し明らかにすること、次にその結果を応用し歯周病予防薬への開発が可能か検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 自己凝集試験

P. gingivalis ATCC 33277 株と 5 種類 (PGN_0274, PGN_0319, PGN_0450, PGN_0970, PGN_1740) の ECF シグマ因子変異株を嫌気培養 2 日間行った。培養液を集菌後、20 mM PBS (pH 6) にて洗浄後、同液にて OD₆₆₀=1.0 に調整した。その後シェーカーにて振盪させつつ、経時的に OD 測定を行った。

(2) 疎水性実験

P. gingivalis ATCC 33277 株と PGN_0274 変異株およびその相補株を嫌気培養 2 日間行った。培養液を集菌、PUM Buffer にて洗浄後、同液にて OD₅₅₀=0.6 に調整した。3 ml の調整液にヘキサデカン 400 ul を加え攪拌 1 分後、室温にて静置した。15 分後、液相の OD 値を測定した。

(3) 赤血球凝集試験

P. gingivalis ATCC 33277 株と 5 種類 ((PGN_0274, PGN_0319, PGN_0450, PGN_0970, PGN_1740) の ECF シグマ因子変異株を嫌気培養 2 日間行った。培養液を集菌、PBS にて洗浄後、同液にて OD₆₀₀=1.8 に調整した。丸底の 96 穴プレートに 100 ul 菌液と 100 ul の 1% ウマ赤血球液を混合、室温 3 時間静置した。

(4) Rgp, Kgp 活性測定

P. gingivalis ATCC 33277 株と 5 種類 (PGN_0274, PGN_0319, PGN_0450, PGN_0970, PGN_1740) の ECF シグマ因子変異株を嫌気培養 2 日間行った。培養液を集菌後、菌体画分

と上清画分に調整した。トリプシン様酵素基質 N-(*p*-tosyl)-Gly-Pro-Lys 4-nitroanilide acetate salt (Kgp 基質) と benzoyl-L-arginine *p*-nitroanilide monohydrochloride (Rgp 基質) と調整液をそれぞれ混合し、37 30 分間反応させた。その後吸光度 A₄₁₀ を測定した。

(5) 薬剤感受性試験

P. gingivalis ATCC 33277 株と 5 種類 (PGN_0274, PGN_0319, PGN_0450, PGN_0970, PGN_1740) の ECF シグマ因子変異株を嫌気培養 2 日間行った。それぞれの薬剤を含ませた血液寒天培地を用意し、培養液 2 ul を寒天培地上に滴下し、嫌気培養 1 週間行った。

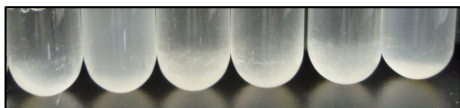
(6) 透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察

P. gingivalis ATCC 33277 株と 5 種類 ((PGN_0274, PGN_0319, PGN_0450, PGN_0970, PGN_1740) の ECF シグマ因子変異株を嫌気培養 2 日間行った。培養液を集菌、グルタルアルデヒドおよび四酸化オスmiumにて固定し脱水したのち、樹脂包埋しサンプルとした。そのサンプルを透過電子顕微鏡 (日立 H-7650) にて観察した。

4. 研究成果

(1) 自己凝集試験

P. gingivalis ATCC 33277 株と 4 種類 (PGN_0319, PGN_0450, PGN_0970, PGN_1740) の ECF シグマ因子変異株に著明な変化は認められなかったが、PGN_0274 変異株は自己凝集活性の顕著な低下を認めた。



ATCC	PGN_	PGN_	PGN_	PGN_	PGN_
33277	0274	0319	0450	0970	1740
	MT	MT	MT	MT	MT

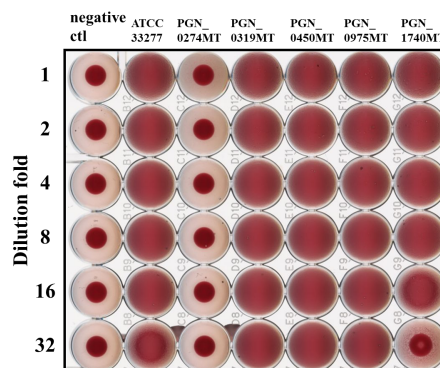
(2) 疎水性実験

P. gingivalis ATCC 33277 株と PGN_0274 変異株およびその相補株の疎水性を解析したところ、変異株にて疎水性の低下が認められ、相補株にて野生株とほぼ同等程度にまで疎水性が回復していることが認められた。

(3) 赤血球凝集試験

PGN_0274 変異株は赤血球凝集能を認めず、自己凝集能の低下を認めた。また相補株は野生株と同等に赤血球凝集の回復が認められた。

strains



(4) Rgp, Kgp 活性測定

P. gingivalis の病原性に深く関与するジンジバイン(システインプロテアーゼ)Rgp, Kgp と ECF シグマ因子の関連性について解析を試みた。野生株(ATCC 33277 株)と ECF シグマ因子変異株 5 種類を用い静止期における Rgp, Kgp 活性を測定した。その結果 PGN_0274 変異株にて Rgp, Kgp 活性の顕著な低下を認めた。この結果は、PGN_0274 変異株が血液寒天培地上にて黒色集落を形成せず透明な集落を形成するという事実と矛盾しない結果となった。

(5) 薬剤感受性試験

P. gingivalis の薬剤感受性と ECF シグマ因子との間の関連性の有無について解析を試みた。その結果、テトラサイクリン、オフロキサシンに対する感受性に顕著な変化は認められなかったものの、アンピシリンに対する感受性は PGN_0274 変異株で増加、PGN_0450, PGN_1740 変異株で低下した。

(6) 透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察

透過型電子顕微鏡 (TEM) による菌体表層構造の観察では、PGN_0274 変異株において vesicle 形成の増加と細胞壁部分の厚みの低下が認められた。

以上より、*P. gingivalis* ATCC 33277 株における ECF シグマ因子 PGN_0274 の働きを阻害することで、*P. gingivalis* の歯周病原性を弱め、歯周病の予防へとつながることが期待できる実験結果を得ることができた。

< 引用文献 >

- Lonetto, M.A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 91 : 7573, 1994
- Kikuchi Y. et al., Oral Microbiol Immunol. 24 : 377-383, 2009
- Dou Y. et al., FEMS Microbiol Lett. 312 : 24, 2010

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計6件)

菊池有一郎, 国分栄仁, 柴山和子, 大原直也, 中山浩次, 石原和幸

Porphyromonas gingivalis ECF シグマ因子変異株における菌体表層性状の解析
第58回歯科基礎医学会学会大会・総会, 平成28年8月24-26日, 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌市)

菊池有一郎, 藤瀬和隆, 柴山和子, 国分栄仁, 大原直也, 中山浩次, 石原和幸

Porphyromonas gingivalis ECF シグマ因子変異株の性状解析
第89回日本細菌学会大会・総会, 平成28年3月22-25日, 大阪国際交流センター (大阪府・大阪市)

菊池有一郎, 柴山和子, 国分栄仁, 大原直也, 中山浩次, 石原和幸

Porphyromonas gingivalis ECF シグマ因子変異株の性状解析
第57回歯科基礎医学会学会大会・総会, 平成27年9月11-13日, 朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター (新潟県・新潟市)

Y. Kikuchi, K. Shibayama, E. Kokubu, N. Ohara, K. Nakayama, K. Ishihara
Role of Putative ECF Sigma Factors in *Porphyromonas gingivalis*
93rd General Session & Exhibition of the IADR MARCH 11-14 2015 (Boston USA)

Kikuchi Y, Shibayama K, Kokubu E, Ohara N, Nakayama K, Ishihara K.
Role of extracytoplasmic function sigma factors in biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis*
The 62nd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research. December 4-5, Osaka, Japan KKRホテル大阪 (大阪府・大阪市)

菊池有一郎, 柴山和子, 国分栄仁, 大原直也, 中山浩次, 石原和幸

バイオフィーム形成における *Porphyromonas gingivalis* ECF シグマ因子の役割
第56回歯科基礎医学会学会大会・総会, 平成26年9月25-27日, 福岡国際会議場 (福岡県・福岡市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

菊池 有一郎 (KIKUCHI, Yuichiro)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号: 30410418

(2)研究分担者

石原 和幸 (ISHIHARA, Kazuyuki)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号: 00212910

国分 栄仁 (KOKUBU, Eitoyo)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号: 70453785

柴山 和子 (SHIBAYAMA, Kazuko)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号: 60408317

(3)連携研究者

中山 浩次 (NAKAYAMA, Koji)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 80150473

大原 直也 (OHARA, Naoya)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 70223930