研究者：山﨑　由衛（所属：岡山大学病院小児歯科）

研究題目：犬歯周病原細菌 *Porphyromonas gulae* FimA タンパクの歯周病予防ワクチンへの応用

目　的：

Porphyromonas gulae はグラム陰性偏性嫌気性菌であり，犬における歯周病原細菌の１つとして知られている。これまでに，ヒトにおける 10 種の主要な歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis*（Pgi），*Treponema denticola*（Td），*Tannerella forsythia*（Tf），*Capnocytophaga ochracea*（Co），*Capnocytophaga sputigena*（Cs），*Prevotella intermedia*（Pi），*Prevotella nigrescence*（Pn），*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*（Aa），*Campylobacter rectus*（Cr），*Eikenella corrodens*（Ec）および *P. gulae*（Pgu）の分布に関して，犬の口腔サンプルを用いて検討を行った。その結果，*P. gulae* および *C. rectus* は 90％以上の高い検出率を示し，ほぼ全ての犬が保有している菌種である可能性が考えられた（図 1）。さらに，多数の *P. gulae* 分離株を用いた分析から，*P. gulae* には *P. gingivalis* の菌体表層に存在する線毛タンパク FimA と同様のタンパクが存在することが分かった。また，FimA をコードする *fimA* 遺伝子の配列を特定すると，大きく 3 つのタイプ（A/B/C 型）に分類されることも明らかにした。その後，培養細胞やマウス膿瘍形成モデルによって検討した結果，C 型株が最も高い病原性を示すことが示された。本研究の目的は，各タイプの *fimA* 遺伝子の配列からリコンビナント FimA の作製を行い，歯周病予防ワクチンの開発を目指した研究につなげていくことである。

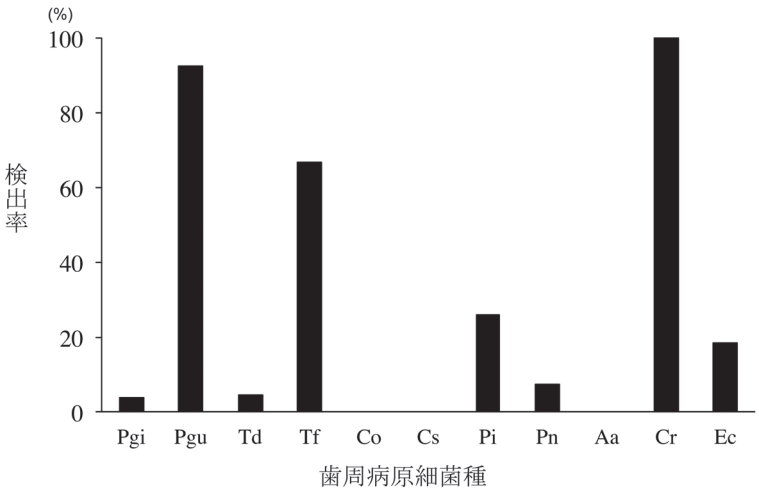

図 1　犬から検出される歯周病原細菌種

材料および方法：

これまでに特定した各タイプの *fimA* 遺伝子全配列データを基にして，開始コドンから終止コドンまでを制限酵素の認識配列を付加したプライマーを構築し，各タイプの株から抽出したゲノム DNA を用いて PCR 法にて増幅させた。そして，図 2 に示すように，各型の PCR 産物を付加した制限酵素によって切断して *fimA* 遺伝子断片を切り出し，同様の制限酵素で処理した GST 融合タンパク発現用ベクター pET42a（+）とライゲーションすることにより，目的タンパク発現用プラスミドを作製した。得られた各タンパク発現用プラスミドをタンパク発現用大腸菌 *Escherichia coli* BL21（DE3）株に形質転換し，Luria-Bertani 液体培地で振とう培養した。そ

の後，遠心分離により菌体を取り出し，リン酸緩衝生理食塩水に懸濁し得られた菌液を超音波で破砕し，遠心分離した後に菌体を取り除いて上清を分離した。上清中に溶出した目的タンパクの発現は，抗 GST 抗体を用いて Western-blot 分析を行うことにより確認した。

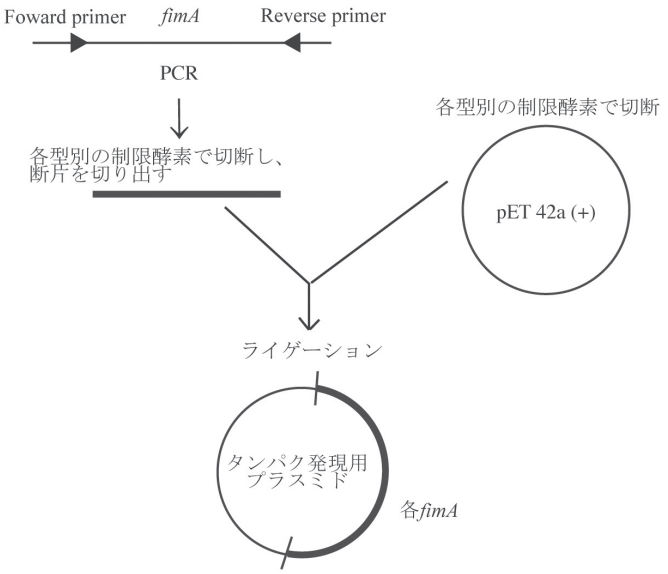

図 2　リコンビナント FimA タンパク発現用プラスミドの作成
fimA 遺伝子を PCR にて増幅させたものを，それぞれ配列を付加した制限酵素で消化しタンパク発現用ベクター pET42a（＋）に挿入させ，FimA タンパク発現用プラスミドを得た。

結果および考察：

まず，抽出した溶液中に，リコンビナント FimA タンパクが含有されているかの確認を行った。図 3 に示す Western-blot 像では，A 型および B 型のサンプルにおいて，分子量が約 70 kDa の位置に太いバンドを認めた。一方で，C 型に関しては作製が難航しており，様々なアプローチを用いて作製するための条件を検討している。C 型のリコンビナントタンパクの発現に成功した際には，全ての型のリコンビナントタンパクを GST 融合タンパク質精製用アフィニティーゲルを用いたクロマトグラフィーにより精製する予定である。そして，歯周病予防ワクチンの開発を目指した研究につなげていきたいと考えている。具体的には，まず FimA の細胞外マトリックスのレセプターであるインテグリンへの結合能の検討を予定している。さらに，各タイプのリコンビナント FimA タンパクをウサギに免疫することにより抗リコンビナント FimA 抗体を作製し，*P. gulae* の上皮細胞への付着および侵入に対する阻害効果を検討する予定である。

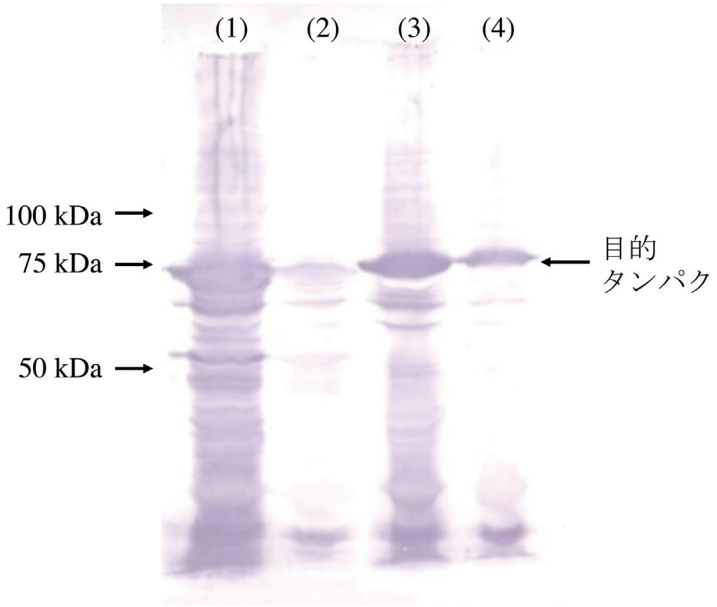

図 3　FimA タンパク A 型および B 型のタンパク発現の確認
(1) A 型 -IPTG（＋），(2) A 型 -IPTG（－），(3) B 型 -IPTG（＋），(4) B 型 -IPTG（－）

成果発表：

今後，上記内容を含めて国際ジャーナルに投稿予定である。