

研究者：吉田 翔（所属：岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 小児歯科学分野）

## 研究題目：動物由来歯周病関連菌 *Porphyromonas gulae* 線毛の役割とその病原性の解析

### 目的：

動物由来歯周病関連菌 *Porphyromonas gulae* は犬の歯周病変部位から高頻度で検出されるだけでなく、伴侶動物を飼育する歯周病患者の病変部プラーク部位から検出され、*P. gulae* の感染がヒト歯周病の発症に関連している可能性が示唆されている。申請者が所属するグループでは *P. gulae* 菌体表層に線毛（FimA）が存在し、さらに線毛構成サブユニットをコードする遺伝子 *fimA* は、核酸配列構造の違いにより A/B/C の3つの異なる遺伝子型が存在することを明らかにした。また線毛遺伝子 Type C 保有 *P. gulae* 株は歯周病変部位から高頻度で検出されるだけでなく、細胞傷害性を有することを明らかにした。これらの結果を踏まえて、我々はカイコモデルを用いて線毛遺伝子型による *P. gulae* の病原性の違いを検討し、さらに *P. gulae fimA* 欠損株を用いて *P. gulae* 線毛の歯周病発症における意義を解明し、*P. gulae* 感染と歯周病発症の機序を明らかにする。

### 対象および方法：

#### 1. リコンビナント FimA タンパクの作製および精製

リコンビナント FimA (rFimA) の作製および精製の手順を図1に示す。線毛遺伝子 Type C 保有 *P. gulae* 株から抽出したゲノム DNA を鋳型として、Polymerase Chain Reaction (PCR) 法で *fimA* 遺伝子を増幅した。PCR 産物はクローニングベクター pGEMR<sup>®</sup>-T easy に挿入し、大腸菌 DH5a 株に形質転換してプラスミドを複製した。シーケンス解析によって、ベクターに *fimA* 遺伝子が正しく挿入されていることを確認した。GST 融合タンパク発現ベクター pET42a (+) にライゲーションさせ、大腸菌 BL21 株に形質転換した。イソプロピル β-D-1-チオガラクトピラノシド (IPTG) 誘導により目的タンパクを発現させ、GST 融合アフィニティーカラムクロマトグラフィーを用いて精製した。精製後の確認のため、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動上で rFimA を展開させた。一次抗体にヤギ抗 GST 抗体、二次抗体にアルカリフォスファターゼ標識ウサギ抗ヤギ IgG 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った結果、GST と目的タンパクが結合した約 75kDa のバンドを確認した。

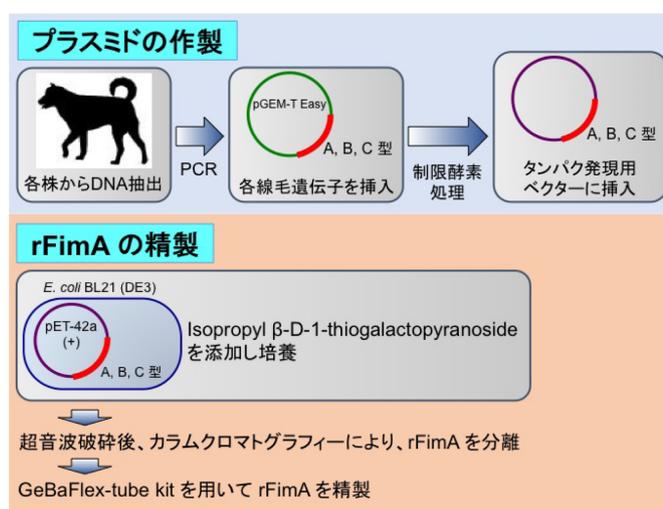


図1 リコンビナント FimA (rFimA) の作製

## 2. カイコモデルを用いた *P. gulyae* 病原性の解析

病原性の評価モデルとして、5令のカイコに各線毛タイプ別 *P. gulyae* ( $5 \times 10^7$  cfu) あるいは各タイプの rFimA 50 $\mu$ l (5  $\mu$ g) をカイコの腹腔内に投与し感染させた。37 $^{\circ}$ C のインキュベーター中で10日間飼育し、1群10匹として12時間毎にカイコの生存数を測定した(図2)。コントロール群には PBS あるいは GST タンパク 50 $\mu$ l (5 $\mu$ g) を腹腔内投与した。有意差検定について2群比較は Student's-t 検定を、多群比較は分散分析(カプラン-マイヤー法)を行った後に事後比較として log-rank 検定を用いて行い、有意水準を0.05% に設定し、p値が有意水準を下回る場合に有意差ありと判断した。

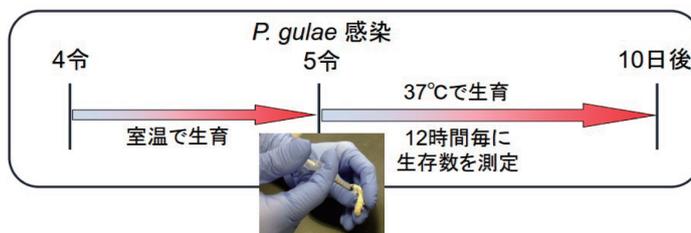


図2 カイコ飼育の手順

### 結果および考察：

#### 結果

10日間のカイコ飼育の結果、各線毛を有する *P. gulyae* 感染によるカイコの生存率は、いずれの感染群も対照群と比較して有意に生存率が低下した。感染144時間後には、C型線毛保有株 D049 株の感染群は全て死亡したが、A型線毛保有株 ATCC51700 株とB型線毛保有株 D040 株感染群は50%以上の生存が認められた。感染228時間後にはB型線毛保有株感染群全てが死亡したが、A型線毛保有株感染群は約10%の生存が確認された。分散分析の結果、C型保有株感染群とA型保有株感染群 ( $P=0.001$ ) もしくはB型保有株感染群との間には有意差が認められた ( $P=0.006$ )。

線毛タンパク投与群は、GST タンパクのみを投与した対照群と比較して生存率が低下したものの、感染240時間後、組換えC型線毛投与群は90%が死亡した。これに対し、*P. gulyae* 感染同様にA型 rFimA 投与群とB型 rFimA 投与群は50%以上の生存が認められ、A型 rFimA とB型 rFimA 投与群と GST 投与群に有意差は認めなかった。

#### 考察

C型線毛保有株の感染後、A型ならびにB型線毛保有株と比較して、早期にカイコの死亡をもたらすことから、高い病原性を保有することが示唆された。また *P. gulyae* の病原性は線毛遺伝子別に依存しており、C型が最も高いと考えられる。そのため本研究ではさらにC型に焦点を当て、*P. gulyae* の歯周病発症の機序を明らかにしたいと考えている。そのために現在、図3に示す方法により、ノックアウト株の作製を進めている。線毛遺伝子 Type C 保有 *P. gulyae* 株から抽出したゲノム DNA を鋳型として、PCR 法で *fimA* 遺伝子を増幅した。PCR 産物を pANT-Vector にライゲーションさせ、*E. coli* DH5a 株に形質転換した。*fimA* 遺伝子領域を pANT-Vector に挿入し、また Em<sup>r</sup> 領域を pGEM<sup>®</sup>-T easy vector に挿入したプラスミドを作製した。今後は、電気穿孔法によって *P. gulyae fimA* 欠損株を作製した後、ヒト歯肉上皮細胞を利用した付着侵入能の評価や、カイコモデルへの腹腔内感染による病原性の評価を予定している。

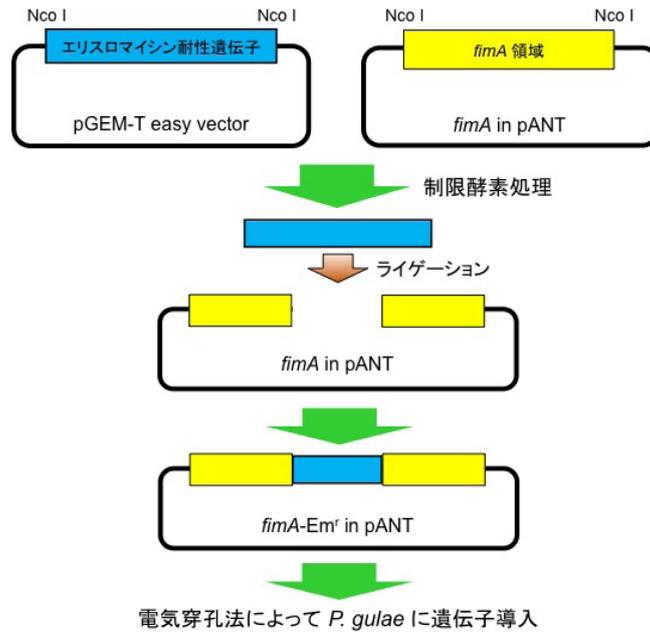


図3 *P. gulae* 線毛欠損株の作製手順

#### 成果発表：

1. 「犬とその飼い主における歯周病原細菌の伝播と接触度に関する検討」第52回日本小児歯科学会、東京都品川区、2014年5月16日-17日
2. 「*Porphyromonas gulae* FimA タンパクのカイコを用いた病原性の解析」第53回日本小児歯科学会、広島県広島市、2015年5月21日-22日
3. 「Protective effects of clindamycin against *Porphyromonas gulae* toxicity in silkworm larvae」第10回アジア小児歯科学会および第54回日本小児歯科学会、東京都文京区、2016年5月26日-28日
4. 「カイコ感染モデルを用いた *Porphyromonas gulae* FimA の病原性解析」第59回歯科基礎医学会学術大会、長野県塩尻市、2017年9月16日-18日