

Role of ECF sigma factors in biofilm formation of
Porphyromonas gingivalis
 (歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の
 バイオフィーム形成における ECF シグマ因子の役割)

小野沢 諭

松本歯科大学 大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座
 (主指導教員：長谷川 博雅 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士(歯学)学位申請論文

Role of ECF sigma factors in biofilm formation of *Porphyromonas gingivalis*

SATOSU ONOZAWA

Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine,
 Matsumoto Dental University

(Chief Academic Advisor : Professor Hiromasa Hasegawa)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
 Matsumoto Dental University for the degree Ph.D. (in Dentistry)

【背景と目的】

歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (以下 *P. gingivalis* と略す) は、偏性嫌気性グラム陰性桿菌であり、血液寒天培地上での黒色集落形成、赤血球凝集性、ヘモグロビン吸着性、糖非発酵性、強力なプロテアーゼの産生など興味深い性状を示す細菌である。

P. gingivalis は、歯周ポケット底部の嫌気度の高い部位にバイオフィーム(デンタルプラーク)を形成し軽度 or 持続的に感染する結果、病原性を発現する。口腔内は、人体の中でも外界に開かれた環境下であり、温度、酸素、pH、栄養状態、他の細菌や宿主細胞など周囲環境からの影響を受

けやすい。よって、その環境下で軽度 or 持続的に感染することが可能な *P. gingivalis* は、周囲環境ストレスを回避する何らかの防御機構を備えていることが予測される。

原核生物において周囲環境ストレスを回避するうえで重要な役割を果たす ECF (extra cytoplasmic function) シグマ因子は大腸菌を代表とするあらゆる細菌において存在が確認され、性状が解析されているが、歯周病原細菌の ECF シグマ因子に関する報告は少数である。そこで本研究は、歯周病原細菌 *P. gingivalis* の ECF シグマ因子と、周囲環境ストレスを回避するうえで重要な役割を担っているバイオフィームの形成との関

連性について検討した。

【材料と方法】

用いた細菌株は *P. gingivalis* ATCC33277と、それを親株とした ECF シグマ因子変異株及び相補株である。最初に ECF シグマ因子遺伝子 (PGN_0274, PGN_0319, PGN_0450, PGN_0970, PGN_1740) のクローニングを行い、その後エリスロマイシンカセットをそれぞれの遺伝子の中間に挿入したターゲッティングベクターを構築した。そのベクターをエレクトロポレーターにて *P. gingivalis* ATCC33277に導入し、形質転換を起こさせることによって ECF シグマ因子変異株を得た。

また PGN_0274と PGN_1740については、両遺伝子とその周辺部を pT-COW ベクターに組み込み、エレクトロポレーション法にてこれらのプラスミドをそれぞれの変異株に導入して、プラスミド性の PGN_0274相補株と PGN_1740相補株を得た。

次に、野生株と ECF シグマ因子変異株を3日間嫌気培養し、デジタル比色計 miniphoto 518R (タイテック株式会社) を用いて増殖速度を測定した。

バイオフィルムの形成については、前培養した野生株と ECF シグマ因子変異株、および相補株の濁度を OD660nm = 0.1 に揃え、コラーゲン1コート12ウェルプレートに1.5ml ずつ植菌し、2日間嫌気培養を行った。その後浮遊細菌を除去し、クリスタルバイオレット染色を15分間行い、PBSにて洗浄した。乾燥後、1% SDS 0.5ml を用い

て溶出させ、その吸光度 (OD600nm) をマイクロプレートリーダー) にて測定した。

【結果】

- (1) 親株と比較し、増殖速度の遅滞と静止期における濁度の低下を示した ECF シグマ因子変異株が認められた。その程度は様々であるが、その中でも PGN_1740変異株が著明な値を示した。
- (2) 野生株と比較し、PGN_0274 変異株、PGN_0319変異株、PGN_1740変異株はバイオフィルム形成能の有意な増加を認めた。その中でも、PGN_0274変異株と PGN_1740変異株にて顕著な増加を認めた。
- (3) PGN_0274変異株と PGN_1740変異株におけるバイオフィルム形成量の増加は、それぞれの相補株にて野生株と同程度に回復した。

【考察と結論】

PGN_0274変異株と PGN_1740変異株に認められるバイオフィルム形成能の増加は、それぞれの相補株にて野生株と同程度にまで回復した。このことより、PGN_0274と PGN_1740は、*P. gingivalis* のバイオフィルム形成に関わるタンパク質の遺伝子発現を調節している可能性が示唆された。PGN_0274は *P. gingivalis* の病原因子ジンジパインの膜輸送に、PGN_1740は *P. gingivalis* の酸化ストレス回避機構に関わると過去に報告されているので、これらの ECF シグマ因子を標的とした抗菌薬を創薬することが実現すれば、選択毒性の高い優れた薬剤となることが示唆される。