

Title	1 : Capnocytophaga ochracea のIX 型分泌機構のバイオフィルム形成への関与
Author(s)	喜田, 大智; 菊池, 有一郎; 今村, 健太郎; 国分, 栄仁; 柴山, 和子; 黒田, 美智代; 山之内, 一也; 齋藤, 淳; 石原, 和幸
Journal	歯科学報, 114(5): 502-502
URL	http://hdl.handle.net/10130/3477
Right	

口 演

No.1 : *Capnocytophaga ochracea* の IX 型分泌機構のバイオフィーム形成への関与

喜田大智¹⁾, 菊池有一郎²⁾³⁾, 今村健太郎¹⁾, 国分栄仁²⁾³⁾, 柴山和子²⁾, 黒田美智代⁴⁾,
山之内一也⁵⁾, 齋藤 淳¹⁾³⁾, 石原和幸²⁾³⁾ (東歯大・歯周)¹⁾ (東歯大・微生物)²⁾ (東歯大・口科研)³⁾
(栃木県)⁴⁾ (千葉県)⁵⁾

目的: *Capnocytophaga ochracea* はデンタルプラーク中に認められるグラム陰性桿菌で、滑走能を有する。本菌は口腔以外に、易感染性患者の敗血症等の病巣からの検出も報告されている。*C. ochracea* が含まれる phylum に属する菌には、滑走運動関連タンパク質分泌に関わる IX 型分泌機構をもつものがあり、その一つである *Tannerella forsythia* においてはバイオフィーム形成への関与も報告されている。本菌にもそれを司る遺伝子群のオルソログが存在するが、詳細は不明である。本研究では、その一つである Coch_1748 (*porT*) と、それにより分泌される滑走運動関連タンパク質をコードする遺伝子のオルソログ Coch_0203 の変異株を作製し、IX 型分泌機構が *C. ochracea* の滑走運動とバイオフィーム形成に与える影響を検討した。

方法: *C. ochracea* ATCC 27872 株に対し、*ermF-ermAM* cassette を用い、変異株を作製した。滑走運動は 0.1% Yeast extract 含有 Tryptic soy agar

上とガラス平面上で、位相差顕微鏡を用い観察した。バイオフィーム形成量は、*C. ochracea* を TS broth での前培養後、96 well プレートに播種し、37°C、嫌気培養下で 6~48 時間培養し、クリスタルバイオレット染色により定量した。バイオフィームの形態観察およびバイオマスの定量は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

結果および考察: Coch_1748 (*porT*) および Coch_0203 変異株は滑走能を失っていた。バイオフィーム形成量は野生株と比較して、Coch_1748 (*porT*) 変異株では培養後 6 時間で約 45%、8 時間で 57%、24 時間で 53%、48 時間で 81% の減少を認めた ($P < 0.05$)。Coch_0203 変異株では、48 時間において有意に減少し、約 32% 程度の減少を認めた。この形成量の違いはバイオマスの違いと関連していた。以上の結果より、*C. ochracea* の滑走運動とバイオフィーム形成に IX 型分泌機構により輸送されるタンパク質が関与する事が示唆された。

No.2 : *Treponema denticola* ECF シグマの機能解析

藤瀬和隆¹⁾, 菊池有一郎¹⁾, 国分栄仁¹⁾, 柴山和子¹⁾, 石原和幸¹⁾²⁾ (東歯大・微生物)¹⁾
(東歯大・口科研)²⁾

目的: *Treponema denticola* は慢性歯周病炎症病巣から高頻度で分離され、その発症と進行に関与している。本菌の歯肉溝等への定着には環境ストレスへの応答が重要となる。細菌の環境応答は遺伝子発現の変化により支えられており、多くは二成分制御系を始めとする転写因子群、およびシグマ因子により調節されている。ECF シグマ因子は、外界からのシグナルを感知して、特定の遺伝子の転写を引き起こすことが知られている。*T. denticola* のシグマ因子に関する報告はまだ少なく、その解析は本菌の環境ストレス応答と病原性変化の解明に重要な役割を果たすと考えられる。本研究では TDE2320 により code される *T. denticola* ECF シグマ因子の機能解析を目的とした。

方法: TDE2320 の open reading frame にエリスロマイシン (EM) 耐性遺伝子を挿入したフラグメントを作製しこれを *T. denticola* ATCC 35405 株にエレクトロポレーションにより形質転換を行った。形質転換体を 40 μ g/ml EM を含む TYGVS 培地にて選

択し欠損株をスクリーニングした。組換えの確認は PCR により行った。またリアルタイム PCR による TDE2320 の発現も確認した。得られたクローンを嫌気下条件で培養し OD660 での吸光度による増殖を測定し、野生株との比較を行った。また大気中で培養することにより酸化ストレス下での菌の生存率についても解析した。

結果および考察: EM 添加 TYGVS プレートによる選択で 3 クローンを得た。PCR による増幅では 3 クローン共に TDE2320 中への EM カセットの挿入が確認された。リアルタイム PCR では欠損株での発現量は TDE2320 の野生株に比べ著明に減少していた。欠損株では野生株に比べ増殖速度の上昇が認められ、シグマ因子欠損が発育に影響を与えているのが明らかになった。酸化ストレス下での培養における菌の生存率については野生株とほぼ同様であった。これらより *T. denticola* にとってシグマ因子は発育には影響を与えるが、酸化ストレスに対しての応答には必須なものでは無いことが示唆された。