2025 年度 若手・女性研究者奨励金 レポート

研究課題	**歯肉縁下細菌バイオフィルムの病原性に鉄制限が及ぼす影響の解析**
キーワード	①歯周病原細菌、②環境ストレス、③ディスバイオーシス

研究者の所属・氏名等

フリガナ 氏　名	ヒサナガ　リオ 久永　理央
配付時の所属先・職位等 （令和 7 年 4 月 1 日現在）	東京歯科大学歯周病学講座　助教
現在の所属先・職位等	同上
プロフィール	2019 年 3 月　東京歯科大学卒業 2019 年 4 月　東京歯科大学水道橋病院　臨床研修歯科医 2020 年 4 月　東京歯科大学大学院歯学研究科（歯周病学専攻）入学 2024 年 3 月　東京歯科大学大学院歯学研究科（歯周病学専攻）卒業 〔受賞〕 2023 年度「大学院第一種奨学金における特に優れた業績による返還免除」（独立行政法人日本学生支援機構）

1. 研究の概要

歯周炎は、歯肉縁下細菌叢のバランスの乱れ（ディスバイオーシス）により引き起こされる。細菌叢の組成が病原性へとシフトしていくプロセスにおいては、個々の細菌間相互作用が重要な役割を果たしているが、その具体的なメカニズムは未だ不明な点が多い。そこで本研究では、歯周病原細菌の鉄を介した細菌間相互作用がディスバイオーシスにおいて果たす役割を解析するため、主要な歯周病原性菌である *Treponema denticola* と *Porphyromonas gingivalis* を用いて解析を行った。

これまでに、*T. denticola* は鉄の取り込みタンパク質として TroA を保有することが報告されていたが、本研究により同菌の遺伝子 *iexT1-3* にコードされるタンパク質も鉄取り込みに関与していることが示唆された。さらに解析を進めた結果、同タンパク質が酸素ストレス応答に関与している可能性も見出した。

現在は、この *iexT1-3* 由来タンパク質に焦点を当て、*P. gingivalis* との混合バイオフィルム形成プロセスに与える影響について解析を進めている。

2. 研究の動機、目的

歯周病の発症や進行には、ディスバイオーシスが関与しているが（Hajishengallis et al., 2012）、その詳細なメカニズムについては未だ不明な点が多い。

これまでの研究から、歯周炎部位に認められる *Porphyromonas gingivalis* と *Treponema denticola* は混合感染により病原性が高まり（Holt et al., 1999）、歯槽骨吸収が促進されること（Kesavalu et al., 2007; Orth et al., 2011）が報告されている。しかしながら、これら主要な菌種がディスバイオーシスの過程でどのように相互作用しているかについては、ほとんど解析がなされていない。

そこで我々は、この細菌間の相互作用や病原性を紐解く鍵として「鉄」に着目した。 鉄は口腔内細菌の生存・増殖、病原性の発現に重要な栄養素である（Andrews et al., 2003）。例

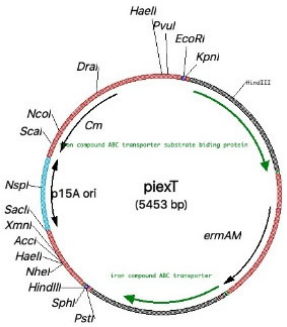
えば、鉄取り込み調節タンパク質 Fur は *Staphylococcus aureus* をはじめとする様々な細菌の病原性に関与しており（Horsburgh et al., 2001）、*P. gingivalis* の主要なヘミン（鉄）取り込みタンパク質である hmuR を欠損させると、複数菌種によるバイオフィルム形成能が低下することも報告されている（Kuboniwa et al., 2009）。

このように、鉄が細菌の生存や定着に重要であることは示唆されているものの、環境中の鉄制限（ストレス）に直面した際の各細菌の応答や、バイオフィルムの構造・病原性への影響を明らかにした研究は少ない。

そこで本研究は、環境における鉄制限ストレスが、*P. gingivalis* と *T. denticola* の相互作用、およびそれらにより形成されるバイオフィルムの代謝や病原性に及ぼす影響を解明することを目的とした。

3. 研究の結果

T. denticola の鉄代謝機構を解明するため、KEGG データベースを用いてゲノム上の鉄代謝関連遺伝子の抽出を行った。その結果、*Tro* 遺伝子群を含む鉄輸送に関わるトランスポーター遺伝子 12 種、鉄依存性転写調節因子の遺伝子 2 種、鉄クラスタータンパク質の遺伝子 4 種、鉄結合性酵素の遺伝子 4 種を見出した。このうち、ゲノム上で隣接する *iexT1*、*iexT2*、*iexT3* の 3 遺伝子は、それぞれトランスポーターの ATP 結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および鉄結合タンパク質としてアノテーションされており、Blast 解析の結果、*iexT2* は ABC-type Fe^{3+}-siderophore transport system の permease component（FepD）と類似性を示したことから鉄の取り込みへの関与が示唆され、また *iexT3* が鉄結合タンパク質であることからも、*iexT1-3* は iron importer をコードしていると考えられた。



そこで、この iron importer の鉄制限環境における機能や役割を評価するため、*iexT2* 欠損株の作出を試みた。右図に示すように *iexT2* を *ermAM* に置換するためのプラスミドを作製して線状化した後に、エレクトロポレーション法により *T. denticola* ATCC 35405（標準株）へ形質転換を行った。しかし、複数回の試行においても *iexT2* 欠損株を得ることはできなかった。欠損株が作出できなかった原因としては、*iexT1-3* がコードする iron importer が *T. denticola* の生存・増殖に必須である可能性が考えられた。

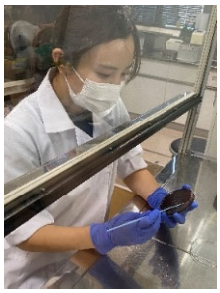
細菌の細胞内に取り込まれた鉄の多くはタンパク質等の分子に結合して存在するが、その一部は遊離の鉄イオンとして存在する。細胞内の二価鉄（Fe^{2+}）は、酸素ストレス下において有害なヒドロキシラジカル等を生成する Fenton 反応（右図）を引き起こし、DNA やタンパク質に深刻な傷害をもたらす。したがって、細胞内における鉄の量的制御は、酸素ストレス応答において極めて重要である。

$$Fe^{3+} + O_2^{\bullet} \leftrightarrow Fe^{2+} + O_2$$
$$Fe^{2+} + H_2O_2 \leftrightarrow Fe^{3+} + {}^{-}OH + {}^{\bullet}OH$$
$$O_2^{\bullet} + H_2O_2 \leftrightarrow {}^{-}OH + {}^{\bullet}OH + O_2$$

そこで、酸素ストレス下における遺伝子発現について DNA マイクロアレイを用いて解析した。その結果、嫌気条件下と比較して、酸素ストレス下では *iexT1* が 21.9 倍、*iexT2* が 32.1 倍、*iexT3* が 34.9 倍と、これら 3 遺伝子の発現が著しく上昇した。また、*iexT1-3* はオペロンを構成しており、これら 3 遺伝子によって一つのトランスポーター（鉄取り込み複合体）が形成されることが示唆された。以上より、*iexT1-3* は酸素ストレス応答に深く関与する新規の iron importer を構成する遺伝子群である可能性が考えられた。

現在は、Yoshikawa らのバイオフィルムモデル（Pathog Dis, 2018）を改変し、鉄制限ストレスを加える実験系を構築している。今後は本実験系を用いて、鉄制限環境が *iexT1-3* や *troA* を中心とした鉄獲得遺伝子群の発現に与える影響や、*P. gingivalis* と *T. denticola* のバイオフィルム形成能、およびその病原性の変化について、詳細に解析を進める予定である。

4. 研究者としてのこれからの展望



歯周病の病因としてディスバイオーシスの概念が提唱されて以降、エコロジカルな視点からの解析が進展している。従来、多種の細菌からなる口腔細菌叢のような複雑な集合体を高解像度で解析することは困難であったが、近年では single-cell 解析や空間オミックス解析などの手法が発展し、口腔細菌叢の構造や機能の全容をより緻密に把握することが可能となりつつある。しかし、複雑な細菌間相互作用やデンタルプラーク全体の病原性を解明するためには、各細菌種が担う代謝機構や病原因子の発現調節機構を分子レベルで解明することが不可欠である。

今後、個々の細菌の代謝プロセスについての研究を基盤として、細菌間相互作用の理解へと発展させ、将来的にはこれらの知見を統合することで、デンタルプラーク全体としての代謝動態や病原性の解明を目指している。

5. 支援者（寄付企業等や社会一般）等へのメッセージ

歯周病は、直接命に関わる場面は少ないものの、全身の健康や QOL の維持に深く関わる罹患率の高い疾患です。しかしながら、歯周病の基礎研究の分野においては競争的資金の獲得が容易ではない現状があります。そのような中で、本研究費は基礎研究を進め、今後さらに研究を発展させていく上で、大変有意義で心強い後押しであると感じております。

口腔健康の増進を通じて社会に貢献できるよう、今後とも研究に邁進してまいります。このたびのご支援に、心より感謝申し上げます。