

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592463

研究課題名(和文) 歯周病細菌によって産生されるインドールと歯周疾患の関連の解明

研究課題名(英文) Elucidation of relationship between indole produced in periodontopathogenic bacteria and periodontal disease

研究代表者

吉田 康夫 (YOSHIDA YASUO)

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：10315096

研究成果の概要(和文)：

歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis*、*Fusobacterium nucleatum* および *Prevotella intermedia* のインドール産生機構を分子生物学的に明らかにする目的で、*tnaA* 遺伝子の転写単位、転写開始地点の決定、トリプトファナーゼ(インドール産生酵素)の精製を行った。また、インドールは *F. nucleatum* のバイオフィーム形成を促進することが明らかとなった。さらに、その基質であるトリプトファンはインドールの基質としてのみならず、分解されなくても同菌のバイオフィーム形成を促進することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：

To elucidate the molecular mechanism to produce indole in *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum*, and *Prevotella intermedia*, we carried out the transcriptional analyses of *tnaA* encoding tryptophanase associated with indole production and enzymatic characterization of the purified protein. We also clarified induction of *F. nucleatum* biofilm formation by indole. In addition, tryptophan that is a substrate for indole production was also suggested to promote biofilm formation of the microorganism.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20年度	2,400,000	720,000	3,120,000
21年度	700,000	210,000	910,000
22年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会系歯学

キーワード：インドール、歯周病細菌、バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

口腔内には数十種類の有臭成分の存在が知られており、代表的なものとして、硫化水素やメチルメルカプタンなどの揮発性硫化物とトリプトファンの分解産物と予測されるインドールやスカトールが挙げられる。これらの口臭原因物質の産生機序と歯周病の関連は示唆されてきたが、その詳細は長らく不明であった。

多くの口腔常在細菌はインドール産生能を有しないが、代表的な歯周病関連細菌である *Porphyromonas gingivalis* や *Fusobacterium nucleatum* はインドール産生能を有することが知られている。しかし、どのような反応経路で口腔内のインドールを合成するかについてはいまだ報告がないのが現状であった。

また、インドールは細菌間のシグナル分子（生育環境に応答して、細菌の病原性やバイオフィーム形成能を制御する自己誘導物質）である可能性も指摘されており、歯周病細菌が産するインドールと歯周病の発症や進行との関連は大変興味深いと思われた。これらのことを踏まえ、申請者らは歯周病原細菌のインドール産生メカニズムと、歯周病の発症や進行にインドールがどのように関与しているのかを明らかにする目的で本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

そこで、インドールは細菌間のシグナル分子（生育環境に応答して、細菌の病原性やバイオフィーム形成能を制御する自己誘導物質）である可能性も指摘されており、歯周病細菌が産するインドールと歯周病の発症や進行との関連は大変興味深いと思われた。これらのことを踏まえ、申請者らは歯周病原細菌のインドール産生メカニズムと、歯周病の発症や進行にインドールがどのように関与しているのかを明らかにする目的で本研究計画を立案した。

3. 研究の方法

研究に用いた歯周病細菌は、*Porphyromonas gingivalis* や *Fusobacterium nucleatum* および *Prevotella intermedia* であり、インドール産生酵素であるトリプトファナーゼをコードする遺伝子の同定、周辺遺伝子との転写単位の決定には、Reversed-transcriptase mediated PCR 法を用いた。また、RLM-RACE 法にて転写開始点の決定を行った。それぞれのトリプトファナーゼは、大腸菌の組換えタンパク質として精製され、酵素学的パラメーターの決定、基質特異性の決定等の酵素学的解析を行った。また、酵素安定性に関する実験等も行った。*F.*

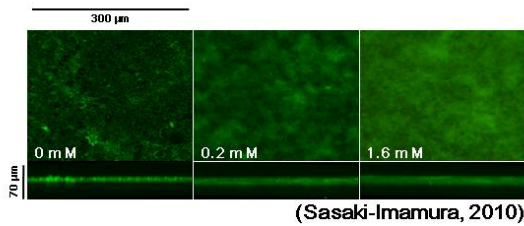
nucleatum に関しては、インドールおよびその基質であるトリプトファン存在下でのバイオフィーム形成能をクリスタルバイオレット法および共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

まず、代表的な歯周病細菌である *Porphyromonas gingivalis* W83 株の全塩基配列から、大腸菌のトリプトファナーゼをコードする遺伝子 *tnaA* のホモログを検索したところ、*pg1401* 遺伝子が高い相同性を示した。同遺伝子をクロラムフェニコール耐性遺伝子と置き換えた変異株の粗酵素抽出物を得て、基質であるトリプトファンを加えてインドール産生能を高速液体クロマトグラフィーで分析したところ、変異株のインドール産生能が失なわれていたことが確認され、*pg1401* 遺伝子は *Porphyromonas gingivalis* W83 株のトリプトファナーゼをコードすることが明らかとなった。またその変異株に同遺伝子の導入したところインドール産生能は補完された。さらに、大腸菌の組み換えタンパク質として *TnaA* を精製して、反応条件や基質特異性などの酵素学的性質を決定した。これらの実験結果を通して、歯周病細菌のインドール産生能に関する生化学的メカニズムの一端が明らかとなった。

次に、歯周病細菌のインドール産生メカニズムとインドールがバイオフィーム形成に与える影響について研究をおこなった。代表的な歯周病細菌である *F. cleatum* ATCC 25586 株の全塩基配列から、大腸菌のトリプトファナーゼをコードする遺伝子 *tnaA* のホモログを検索したところ、*fn1943* 遺伝子が高い相同性を示した。大腸菌の組み換えタンパク質として *Fn1943* を精製して、トリプトファンと反応させその産生物はインドールであったことを HPLC で確認した。この所見から *fn1943* 遺伝子はトリプトファナーゼをコードすることが明らかとなった。さらに、反応条件や基質特異性などの酵素学的性質を決定した。さらに、*F. nucleatum* のインドール産生量に比例してバイオフィーム形成が多くなることを共焦点レーザー顕微鏡で確認した（図1）。バイオフィーム形成は、外部から加えたインドールによっても増加した。これらの実験結果を通して、歯周病細菌のインドール産生能に関する生化学的メカニズムの一端が明らかとなった。

図1. インドール存在下における *F. nucleatum* のバイオフィルム



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

1. A. Yano, S. Kikuchi, Y. Yamashita, Y. Sakamoto, Y. Nakagawa, and Y. Yoshida. The inhibitory effects of mushroom extracts on sucrose-dependent oral biofilm formation. *Appl. Microbiol. Biot.*, 86: 615-623, 2010. 査読有り
 2. Y. Yoshida, S. Ito, H. Tamura and K. Kunimatsu. Use of a novel assay to evaluate enzymes that produce hydrogen sulfide in *Fusobacterium nucleatum*. *J. Microbiol. Meth.*, 80: 313-315, 2010. 査読有り
 3. T. Sasaki-Imamura, A. Yano, and Y. Yoshida. Production of indole from L-tryptophan and their effects on biofilm formation by *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586. *Appl. Environ. Microbiol.*, 76: 4260-4268, 2010. 査読有り
 4. Y. Yoshida, S. Ito, M. Kamo, Y. Kezuka, H. Tamura, K. Kunimatsu, and H. Kato. Production of hydrogen sulfide by two enzymes associated with biosynthesis of homocysteine and lanthionine in *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586. *Microbiology-SGM*, 156: 2260-2269, 2010. 査読有り
 5. H. Tamura, A. Yamada, Y. Yoshida and H. Kato. Identification and characterization of an autolysin gene, *atlh*, from *Streptococcus downei*. *Curr. Microbiol.*, 58: 432-437, 2009. 査読有り
 6. Y. Yoshida, T. Sasaki, S. Ito, H. Tamura, K. Kunimatsu and H. Kato. Identification and molecular characterization of tryptophanase encoded by *tnaA* in *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology-SGM*, 155: 968-978, 2009. 査読有り
 7. J. Yang, M. Ritchey, Y. Yoshida, C. A. Bush and J. O. Cisar. Comparative structural and molecular characterization of ribitol-5-phosphate-containing *Streptococcus oralis* coaggregation receptor polysaccharides. *J. Bacteriol.*, 191: 1891-1900, 2009. 査読有り
 8. Y. Kezuka, Y. Yoshida and T. Nonaka. Crystallization and preliminary X-ray analysis of C-S lyases from two oral streptococci. *Acta. Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.* F65: 874-877, 2009. 査読有り
- [学会発表] (計 8 件)
1. K. Suwabe, Y. Yoshida, D. Sasaki, F. Yoshimura, K. Kunimatsu : Identification and characterization of novel enzymes associated with hydrogen sulfide production in *Fusobacterium nucleatum*. 50th General Session and 1st International Congress of the KAP, Nov. Seoul(2010)
 2. 今村隆子、吉田康夫、加藤裕久 : *Prevotella intermedia* ATCC 25611 におけるインドール産生能の解明. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会、2010 年 9 月 (東京)
 3. T. Sasaki-Imamura, Y. Yoshida, A. Yano, and H. Kato : Production of indole that increases biofilm formation of *Fusobacterium nucleatum*. 88th General Session & Exhibition of the IADR, June. Barcelona(2010)
 4. 伊東俊太郎、吉田康夫、須和部京介、國松和司 : カテキンによる揮発性硫化物の抑制効果. 第 53 回春季日本歯周病学会学術大会、2010 年 5 月 (盛岡)
 5. 須和部京介、吉田康夫、伊東俊太郎、田村晴希、國松和司、加藤裕久 : *Fusobacterium nucleatum* においてシステイン合成酵素は硫化水素産生に関与する. 第 83 回日本細菌学会総会、2010 年 3 月 (横浜)
 6. 佐々木隆子、吉田康夫、田村晴希、加藤裕久 : *Fusobacterium nucleatum* のインドール産生能の解明. 第 51 回歯科基礎医

学会学術大会、2009年9月（新潟）

7. 伊東俊太郎、吉田康夫、田村晴希、須和部京介、國松和司、加藤裕久：
Fusobacterium nucleatum における2つの硫化水素産生酵素. 第51回歯科基礎医学学会学術大会、2009年9月（新潟）
8. S. Ito, Y. Yoshida, T. Sasaki, K. Kunimatu, H. Kato : Molybdenum ion inhibits the production of volatile sulfur compounds. 87th General Session & Exhibition of the IADR, Apr. Miami, USA.(2009)

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 康夫（愛知学院大学・歯学部・准教授）
研究者番号：10315096

(2) 研究分担者

岸 光男（岩手医科大学・歯学部・准教授）
研究者番号：60295988

帖佐 直幸（岩手医科大学・歯学部・助教）
研究者番号：80326694

中野 善夫（日本大学・歯学部・准教授）
研究者番号：80326694

(3) 連携研究者