

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20623

研究課題名(和文) Porphyromonas gingivalis is involved in the detachment and aggregation of Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilm.

研究課題名(英文) Porphyromonas gingivalis is involved in the detachment and aggregation of Aggregatibacter actinomycetemcomitans biofilm.

研究代表者

原口 晃 (Haraguchi, Akira)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：00734998

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：PgとAaは歯周病において重要な歯周病原細菌である。本研究では、PgにおいてAaのバイオフィーム剥離を行うタンパクを同定し、Aaの被阻害因子について明らかにすることで、剥離のメカニズムを解明していくことを目的とする。Aaのバイオフィームに対してイオン交換クロマトグラフィーにて分画したフラクションごとのPg培養上清では剥離効果に有意差は認められなかった。また、Pgの培養上清で処理されたAa菌体の二次元電気泳動では菌体全体、膜画分抽出したものでも不特定多数の蛋白の分解が観察され、Aaの膜タンパクが非選択的に分解されていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：P. gingivalis and A. actinomycetemcomitans is one of the most etiologically important microorganisms in periodontal disease. The aim of this study was investigated the protein of P. gingivalis supernatant about biofilm detachment of A. actinomycetemcomitans, and inhibition of aggregation of A. actinomycetemcomitans and clarified the factor of mechanism of detachment. P. gingivalis culture supernatant which fractionated by ion exchange chromatography was not shown significant difference by a detachment of A. actinomycetemcomitans biofilm. In the two-dimensional electrophoresis of A. actinomycetemcomitans bacteria treated with the culture supernatant of P. gingivalis, decomposition of an unspecified number of proteins was observed even in the whole bacterial bodies and those extracted from membrane fractions. It was suggested that membrane protein of A. actinomycetemcomitans was dismantled nonselectively by proteases of P. gingivalis supernatant.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周病細菌 P. gingivalis A. actinomycetemcomitans

1. 研究開始当初の背景

歯周病は歯肉溝に棲息する細菌によって引き起こされる感染症で、歯周病原細菌が歯周組織局所に付着し、バイオフィルムを形成して成長することで、発症し重症化していく(Darveau et al., *Periodontology* 2000, 14(1):12-32, 1997)。菌体外多糖からなるグリコカリックスによって保護されたバイオフィルム中の細菌は、抗菌物質や貪食細胞、免疫グロブリンに対して抵抗性を示して局所に長期に留まり、感染の慢性化、難治化を招くと考えられている。特に *Porphyromonas gingivalis* (Pg)、

Aggregatibacter actinomycetemcomitans (Aa)は代表的な歯周病細菌であり、最近は冠性動脈心疾患や脳血管性疾患との関わりにおいて注目されている(Beck JD et al., *Ann Periodontol*, 3(1):127-141, 1998.

Spahr A et al., *Arch Intern Med*, 166(5):554-9, 2006.)。しかしながら、複雑なバイオフィルム構造のメカニズムの中で、歯周病細菌間の共生的な関係についての報告は多くあるが、歯周病細菌間でバイオフィルム中の競合的な報告は少ない。私たちはこれまでに、PgがAaに対してバイオフィルム形成に優位な関係をもっていることを示している(Takasaki et al., *J Periodontal Res*, 48:286-92, 2013.)。

先の研究にて私たちは、Pg ATCC33277株が培養上清中に分泌したKgpタンパクの分解活性がAa ATCC29523株のバイオフィルムの付着を阻害することを明らかにした。また一方で、Aaのバイオフィルムの凝集に対してはジンジパイン以外の酵素が阻害することを明らかにし、さらにその酵素はジンジパインによってプロセシングされることで活性化される酵素であることを見出した。(Haraguchi et al., *Mol Oral Microbiol*, 2014)。しかしながらAaの凝集阻害に関わるPg培養上清中の因子については、タンパクである可能性が高いものの、未だ決定的な分子としては特定できていない。さらに、Aaの被阻害因子についても使用したATCC29523株は線毛が著しく少ないため、線毛以外の因子が阻害され、付着、凝集阻害が惹起されていることは示唆されているものの、詳細な点までは明らかにできていない。そして、口腔外のバイオフィルム中の細菌間の競合的な関係については報告されているが、歯周病原細菌間での知見は少ない。さらに、Pgのジンジパインについての研究はこれまでに多くされているが、今回の研究はこれまでに報告の少ないジンジパイン以外の病原性を解明して行く。また、剥離される側にも注目し、剥離のメカニズムについて解明し、歯周病予防のメカニズムを確立すると考えている。

2. 研究の目的

Pgはジンジパイン以外にも様々なタイプのプロテアーゼを有していることが報告されている。その中でもペリオドンティンや prolyl tripeptidyl peptidaseはPgのプロテアーゼであり、ジンジパインによるプロセシングを受けて成熟することが示唆されている。これらの研究結果を踏まえ、RgpとKgpは本菌の様々なタンパク(線毛や、ペリオドンティンなどのプロテアーゼ)をプロセシングする酵素として重要な機能を持っていることが強く示唆される。このことから、Kgpの酵素活性が、Aaの付着因子を破壊する効果を有している可能性が示されるとともに、ジンジパインによりプロセシングされた酵素などが、Aa菌体表層の菌体外膜タンパク質中のFlp1のような凝集に關与する付着因子を阻害する効果を有していることが考えられるため、これらのどの酵素が凝集阻害に關与しているのか解明していく。

PgのKgpやジンジパイン以外の酵素によって阻害されるAaの付着・凝集因子について、付着凝集因子としては線毛等が考えられる。しかし、Aa ATCC29523株では、臨床分離株に比べ線毛が著しく少ない株なので、付着、凝集が線毛以外の因子によることが強く示唆されることから、線毛以外の因子について同定していく。

3. 研究の方法

Pg ATCC33277株は羊血液寒天培地(5% defibrinated laked sheep blood, 4% tryptic soy agar, 0.5% brain heart infusion, 0.1% cysteine, hemin 5 µg/ml, menadione 1 µg/ml)あるいは、enriched BHI broth(3.7% brain heart infusion, 0.5% yeast extract, 0.05% cysteine)にhemin 5 µg/ml, menadione 1 g/mlを含むenriched BHI brothを用いて酸素吸収剤であるアネロパック・ケンキ(三菱ガス化学株式会社)を使用し、嫌気的条件下にて37℃で培養した。株は寒天培地にて培養した菌体を、enriched BHI brothを用いて、嫌気下、37℃、24時間培養した後、対数増殖後期まで達した培養液を新鮮な培地に10倍希釈して二次培養(嫌気下、37℃、24時間)した。更に、二次培養液を新鮮な培地に20倍希釈をし、細菌数を $3\sim 5 \times 10^7$ 個/mlになるように三次培養(嫌気下、37℃、24時間)を行った。培養後、三次培養液を遠心分離(6,000×g、4分、15分)、超遠心分離(100,000×g、4分、60分)することによってベジクルを除去し、各Pg株の培養上清を回収した。

Aa ATCC29523株のバイオフィルムは寒天培地にて培養した菌体を、enriched BHI brothを用いて、5% CO₂下、37℃、24時間培養した後、対数増殖後期まで達した培養液を新鮮な培地に10倍希釈して二次培養(5% CO₂下、37℃、24時間)した。更に、二次培養液

を新鮮な培地に 20倍希釈をし、細菌数を $3 \sim 5 \times 10^7$ 個/ml になるように三次培養(5% CO₂下、37℃、24時間)を行った。

回収したPg培養上清を、イオン交換クロマトグラフィーにかけ、フラクション毎にAa バイオフィルム剥離試験を行った。

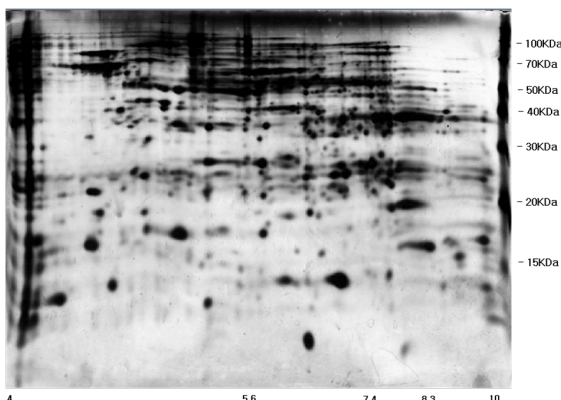
Aa三次培養液を 6,000 × gで4℃、15分間遠心分離することで菌体を回収し、得られた菌体を PBSにて 2回 洗浄後、再度菌体を 6,000 × gで4℃、15分間、遠心分離して回収した。

Aa菌体に対し、Pg培養上清を加えて前処理したPg培養上清、およびコントロールとしてBHIを各々5mlずつ加え、37℃にて1時間静置処理し再びPBSで2度洗浄した。洗浄後、ホモジナイズ後、Cell extractを抽出した。膜画分はReadyPrep™ Protein Extraction Kitを用いて回収し、Genomine社に2次元電気泳動を依頼し解析した。

4. 研究成果

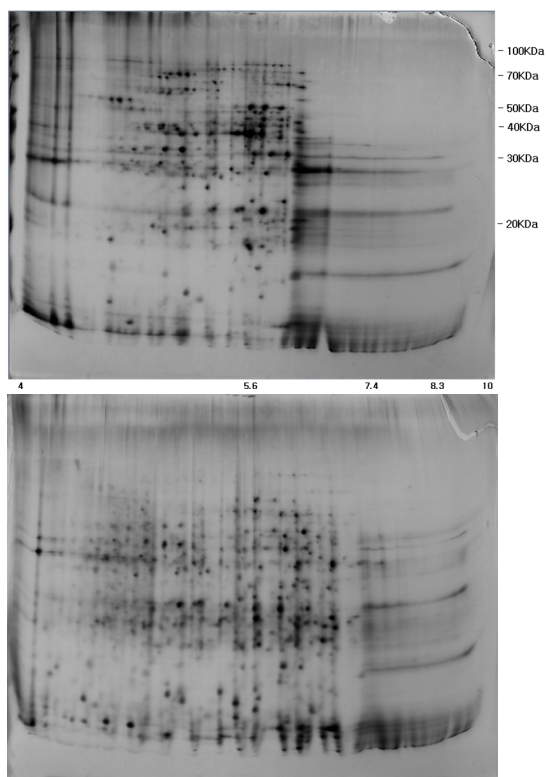
Pg 培養上清の各フラクションに Aa の剥離能試験を行った結果、それぞれのフラクションに有意な剥離効果は認められなかった。

Aa 菌体を Pg 培養上清で処理し、2次元電気泳動を行ったところ、処理前(コントロール)(上図)と処理後(下図)では多くのフラグメントの消失を認められた。



そこで Aa 菌体の膜画分を抽出し、2次元電気泳動を行ったところ、処理前(コントロール)(上図)と比較して処理後の Aa 菌体

の膜画分(下図)は分子量の低いところで多くのフラグメントが出現した。



以上より Pg 培養上清中の Aa バイオフィルム剥離因子、凝集阻害因子については別方向の視点からさらなる研究が必要であり、凝集阻害、剥離される Aa の因子としては、Pg のプロテアーゼによって Aa の膜タンパクが非選択的に分解されているため、Pg の剥離凝集阻害因子と Aa の被阻害因子を同時に解明していく必要がある。今後、Pg と Aa に限らず、多くの菌体間インタラクションについて解明していく予定である。

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)

1: M. Takeshita, A. Haraguchi, M. Miura, T. Hamachi, T. Fukuda, T. Sanui, A. Takano, F. Nishimura.

Antibiotic Effects against Periodontal Bacteria in Organ Cultured Tissue.

Clinical and Experimental Dental Research. 3(1), 5-12, 2017

DOI: 10.1002/cre2.48 (査読あり)

2: T. Sanui, M. Takeshita, T. Fukuda, A. Haraguchi, Y. Aida, F. Nishimura.

Anti-CD14 antibody-treated neutrophils respond to LPS: Possible involvement of CD14 upregulated by anti-CD14 antibody binding.

Immunological Investigations.46(2),
190-200, 2017
DOI:10.1080/08820139.2016.1238925(査読
有り)

3 : K. Nozoe, T. Sanui, M. Takeshita, T.
Fukuda, A. Haraguchi, Y. Aida, F.
Nishimura.

Innate immune-stimulatory activity of
Porphyromonas gingivalis fimbriae is
eliminated by phase separation using
Triton X-114.

Journal of immunological methods 441,
31-38, 2017

DOI:10.1016/j.jim.2016.11.012 (査読有
り)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

原口 晃 (HARAGUCHI AKIRA)

九州大学病院 口腔総合診療科 助教

研究者番号 : 00734998

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし