

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17360

研究課題名（和文）歯周病原性バイオフィルムの制御におけるIX型分泌機構の役割の解明

研究課題名（英文）Role of the type IX secretion system in the regulation of biofilm formation of periodontal pathogens

研究代表者

喜田 大智 (Kita, Daichi)

東京歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：70755032

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）：口腔内細菌 *Capnocytophaga ochracea* はバイオフィルム形成能をもつ。これまでの研究からこの活性にはIX型分泌機構により分泌されるタンパク質（T9SS 積荷タンパク質）の一部がEPSとしてバイオフィルム形成に関与することが示唆された。本研究は *C. ochracea* EPS 構成タンパク質の同定、その中で、*C. ochracea* T9SS により分泌されていると予測されるものの抽出を行うことができた。また、*C. ochracea* T9SS が *C. ochracea* と *F. nucleatum* との混合バイオフィルム形成量に影響を与えることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究から、歯周病原性バイオフィルム形成の重要な因子のひとつに初期定着菌と歯周病原細菌との間のbridgeとして働く *Fusobacterium nucleatum* があげられる。また、*C. ochracea* の存在下で *F. nucleatum* のバイオフィルム形成促進が起こる。本研究の成果は、*C. ochracea* T9SS の働きが、*F. nucleatum* のバイオフィルム形成促進を妨げることにつながる可能性を示したことである。この成果は、歯周病原性バイオフィルム形成の阻止の可能性を探索し、歯周病の発症・進行の予防法開発へと研究を進展させるための一助となる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The oral bacterium *Capnocytophaga ochracea* has a biofilm-forming capacity. Our previous studies suggested that proteins secreted by the type IX secretion system (T9SS) are involved in biofilm formation as EPS. This study was able to identify *C. ochracea* EPS constituent proteins, among which those predicted to be secreted by *C. ochracea* T9SS were extracted. We found that *C. ochracea* T9SS affected the amount of mixed biofilm formation between *C. ochracea* and *F. nucleatum*.

研究分野：歯周治療系歯学

キーワード：バイオフィルム IX型分泌機構 *Capnocytophaga ochracea* 歯学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、*Porphyromonas gingivalis* 等の代表的な歯周病原細菌のみならず、その他多くの細菌と宿主との相互作用により誘発されるが、治療戦略において重要となるのが *P. gingivalis* を中心とする red complex が組み込まれた歯周病原性バイオフィルム形成の抑制である。このバイオフィルムを構成する細菌は、自らが分泌した接着性、粘着性に富む菌体外重合体物質 (extracellular polymeric substance: EPS) に包まれている。EPS は多糖、タンパク質、核酸、脂質などから構成され、バイオフィルムに物理的安定性、固相表面への強固な付着能などを付与する (Flemming HC et al. Nat. Rev. Microbiol. 2010)。したがって、この EPS が形成されるメカニズムを明らかにすることは、歯周病の発症機構解明・新たな治療戦略の開発につながる可能性が考えられるが、そのメカニズムはほとんど明らかにされていない。

多くの歯周病原細菌が属する Bacteroidetes 門では、タンパク質分泌機構である IX 型分泌機構 (T9SS) が存在する。T9SS は *P. gingivalis* などでプロテアーゼを含む多くの病原因子を菌体表面または菌体外へ分泌することが明らかとなっている (Sato K et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2010., McBride MJ, Zhu Y. J. Bacteriol. 2013)。グラム陰性菌のタンパク質分泌機構とバイオフィルム形成間には関係があることが報告されている (Chagnot C et al. Front. Microbiol. 2013)。我々は、デンタルバイオフィルム構成細菌 *Capnocytophaga ochracea* では、T9SS により分泌されるタンパク質 (T9SS 積荷タンパク質) の一部が EPS としてバイオフィルム形成に関与する可能性を報告した (Kita D et al. Appl. Environ. Microbiol. 2016)。しかしながら、分子レベルで T9SS がどのように *C. ochracea* EPS 形成へ関与するかは未解明である。

2. 研究の目的

P. gingivalis など多くの歯周病原細菌は IX 型分泌機構 (T9SS) をもつ。本機構はバイオフィルム形成に関与するが、詳細なメカニズムはほとんど明らかにされていない。これまで我々は、*C. ochracea* において本メカニズムの検討を行い、T9SS により分泌されるタンパク質 (T9SS 積荷タンパク質) の一部が EPS としてバイオフィルム形成に関与する可能性を示した。本研究は、*C. ochracea* の T9SS により分泌される EPS 構成タンパク質の同定、T9SS が *C. ochracea* と *F. nucleatum* の混合バイオフィルム形成に与える影響の解明を目的とした。

3. 研究の方法

(1) *C. ochracea* T9SS により分泌される EPS 構成タンパク質の同定

C. ochracea T9SS により分泌される EPS 構成タンパク質の同定を、*C. ochracea* 野生株と T9SS 構成タンパク質をコードする遺伝子 *gldK* の欠失株 (*gldK*) の EPS 中のタンパク質の発現を比較することで行うこととした。まず、各株を 37℃、嫌気下で 48 時間培養し、バイオフィルムを形成させた。その後、培養上清を除去し、PBS で洗浄を行った。その後、各文献 (Mohammed MMA et al. Anaerobe. 2017、Chiba A et al. Microb Biotechnol. 2015) を参考に、1.5 M NaCl の処理を行った後、5,000 g、10 分間の遠心を行い、上清を得た。これを 0.22 μm フィルターに通し、*C. ochracea* 野生株と *gldK* の EPS を得た。また、それぞれのバイオフィルム中のタンパク質の抽出も行った。それらを SDS-PAGE により分離し、各株間で発現量に差を認めるバンドの存在を確認した。その後、ラベルフリー法 (Creative Proteomics 社に委託) により各サンプル中のタンパク

質の同定、野生株と *gldK* 間のタンパク質の比較定量を行った。

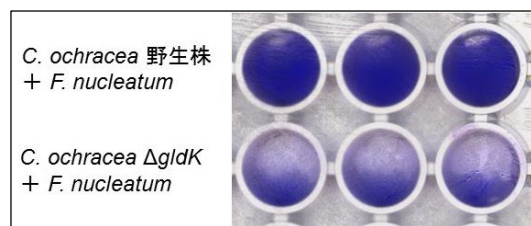
(2) *C. ochracea* T9SS の *C. ochracea* と *F. nucleatum* との混合バイオフィーム形成への影響の確認

C. ochracea T9SS の *C. ochracea* と *F. nucleatum* との混合バイオフィーム形成への影響を確認するために、まず野生株、*gldK* それぞれと *F. nucleatum* の共凝集反応を奥田らの論文 (Okuda T et al. Anaerobe. 2012) を参考に観察した。*C. ochracea* 野生株と *gldK* それぞれと *F. nucleatum* の混合バイオフィーム形成は、以下のように行った。まず、各株を 37℃、嫌気下で前培養した後、96-well Plate の各ウェルに *C. ochracea* と *F. nucleatum* をそれぞれ 100 μl ずつ加えた。37℃、嫌気下で 48 時間培養し、バイオフィームを形成させた。混合バイオフィームの形成はクリスタルバイオレット染色法、走査型電子顕微鏡および共焦点レーザー顕微鏡を用いて比較した。

4. 研究成果

(1) T9SS 積荷タンパク質は *C. ochracea* バイオフィーム中の EPS の一部として本菌のバイオフィーム成熟に関与するとの考えのもとで研究を進めた。まず、1.5 M NaCl の処理により *C. ochracea* 野生株と $\Delta gldK$ の EPS を抽出した。また、それぞれのバイオフィーム中のタンパク質の抽出も行った。その後、ラベルフリー法により各サンプル中のタンパク質の同定、野生株と $\Delta gldK$ 間のタンパク質の比較定量を行った。その結果、EPS には約 874 種類、バイオフィーム中には約 1357 種類のタンパク質が認められた。その中には、バイオインフォマティクス解析の結果から *C. ochracea* の T9SS 構成タンパク質と推測される GldK、GldL、GldM、GldN、OmpA が含まれていた。T9SS 積荷タンパク質の特徴として C 末端に共通モチーフ (Por_secret_tail、T9SS CTD signal) が存在していることが明らかになっている。*C. ochracea* の T9SS 積荷タンパク質と推測される SprB、Hyalin も認められた。今回は 1 回分の測定であるため、検出強度差について統計的有意性の評価はできていない。ただ、野生株と比較し、 $\Delta gldK$ において EPS、バイオフィーム中の T9SS 構成タンパク質の発現量は大幅に低下していた。また、T9SS 積荷タンパク質の発現量は、 $\Delta gldK$ において、EPS 中では低下、バイオフィーム中では上昇していた。

(2) 野生株と *F. nucleatum* の反応と比較し、*gldK* と *F. nucleatum* の共凝集反応に有意差は認められなかったが、右図に示すように混合バイオフィーム形成量には有意な減少を認めた。



以上の結果に基づき、今後、*gldK* 以外の T9SS 構成タンパク質や Hyalin をコードする遺伝子の欠失株を作製し、*C. ochracea* T9SS により分泌される *C. ochracea* EPS 構成タンパク質のバイオフィーム形成への影響をさらに検討していく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Saito Atsushi, Bizenjima Takahiro, Takeuchi Takahiro, Suzuki Eiichi, Sato Masahiro, Yoshikawa Kouki, Kitamura Yurie, Matsugami Daisuke, Aoki Hideto, Kita Daichi, Imamura Kentaro, Irokawa Daisuke, Seshima Fumi, Tomita Sachiyo	4. 巻 46
2. 論文標題 Treatment of intrabony periodontal defects using rhFGF 2 in combination with deproteinized bovine bone mineral or rhFGF 2 alone: A 6 month randomized controlled trial	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Periodontology	6. 最初と最後の頁 332 ~ 341
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1111/jcpe.13086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kita Daichi, Kinumatsu Takashi, Yokomizo Atsushi, Tanaka Miki, Egawa Masahiro, Makino-Oi Asako, Tomita Sachiyo, Saito Atsushi	4. 巻 11
2. 論文標題 Clinical effect of a dentifrice containing three kinds of bactericidal ingredients on periodontal disease: a pilot study in patients undergoing supportive periodontal therapy	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BMC Research Notes	6. 最初と最後の頁 116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13104-018-3216-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----