

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K09608

研究課題名(和文) 口腔細菌カプノサイトファガをトリガー細菌とする歯周病発症機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the onset mechanism of periodontal disease triggered by oral bacterium Capnocytophaga

研究代表者

菊池 有一郎 (Kikuchi, Yuichiro)

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：30410418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病原細菌Capnocytophaga ochraceaの転写因子OxyRの機能解析を目的とし、遺伝子挿入変異株を作製した。歯面の初期定着群に属する口腔レンサ球菌Streptococcus gordoniiとC. ochracea野生株とOxyR遺伝子挿入変異株を用い共存培養におけるバイオフィーム形成量を測定した。その結果から、S. gordoniiが産生する過酸化水素の影響を回避するうえで、C. ochraceaのOxyRタンパク質が重要な役割を果たすことが判明した。また、その際にOxyRが、支配下にあるSod, AhpCタンパク質の転写を調節し酸化ストレスを消去していることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

C. ochracea は教科書においては歯周病原細菌とされている。しかし、その根拠は現状にて乏しいのが現実である。よって本研究は、C. ochracea は歯周病を誘発するトリガー細菌であるか否かについて、歯周病原細菌の生存に有利な環境構築解明という目的にて細菌学的アプローチを試みた。その結果から、C. ochracea が保有する「転写因子OxyR」がC. ochraceaが口腔内での歯面に形成するバイオフィーム形成の初期にて、重要な役割を果たすことを証明したので、学術的および社会的意義が深いと考える。

研究成果の概要(英文)：To analyze the function of the transcription factor OxyR protein of the periodontopathogenic bacterium Capnocytophaga ochracea, a gene insertion mutant strain was generated. Biofilm levels were measured in co-culture using Streptococcus gordonii, an oral Streptococcus belonging to the initial settlement group on the tooth surface, wild type of C. ochracea, and the mutant strain with the inserted OxyR protein gene. The results showed that the OxyR of C. ochracea played an important role in avoiding the effect of hydrogen peroxide produced by S. gordonii. We also confirmed that OxyR regulates the transcription of Sod and AhpC proteins, which are under the control of OxyR, to eliminate oxidative stress.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：歯周病原細菌 Capnocytophaga ochracea 転写因子 OxyR 酸化ストレス Streptococcus gordonii Sod AhpC

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

口腔は未同定の細菌も含め、約 700 種類の常在菌が生息する環境である¹⁾。その中で歯周病を引き起こす細菌は、主に歯面にバイオフィームである歯垢(デンタルプラーク)を形成し生存している。歯周病は慢性歯周炎と侵襲性歯周炎に大別される。2002 年、Socransky らは口腔細菌を歯周病原性への関連度により分類し、最も関連性が強いとされる *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* をレッドコンプレックス細菌とし、本実験の対象細菌であるカプノサイトファガ属は歯周病との関連性が低いグリーンコンプレックス細菌と分類した²⁾。

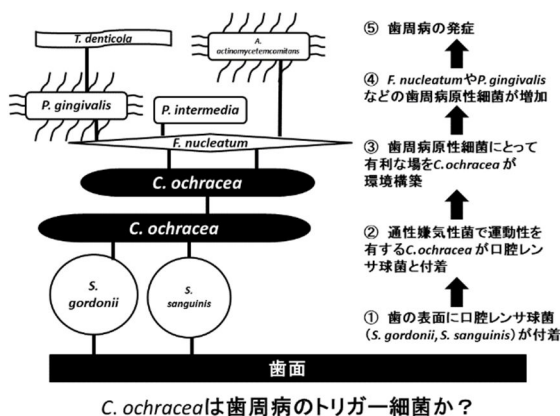
カプノサイトファガ属は通性嫌気性グラム陰性桿菌である。CO₂ 存在下で好氣的、嫌氣的にも発育が良好である。鞭毛や芽胞を持たないが、湿潤な培地上で滑走(gliding)することができる。口腔内に存在するカプノサイトファガ属は *C. ochracea*, *C. gingivalis*, *C. sputigena* の 3 種類が知られている。現在までの歯周病原性細菌に関する報告はレッドコンプレックス細菌が中心であり、カプノサイトファガ属に関する報告数は少ない。1979 年に最初の報告がなされ、その後、歯周病原部位からの検出³⁾、歯槽骨の骨吸収作用⁴⁾、脳膿瘍から薬剤耐性カプノサイトファガ属の分離⁵⁾など報告されているが、その反面歯周病変の特徴を有しない健全な歯肉溝からも分離されることも報告されている⁶⁾。また、*P. gingivalis* や *C. ochracea* の LPS にてヒト末梢血多形核白血球を刺激すると、IL-1, TNF-, IL-8 の産生は *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* より有意に低い⁷⁾ことや、*P. gingivalis* や *C. ochracea* の LPS は TLR4 のアンタゴニスト活性がある⁸⁾など、*C. ochracea* LPS の免疫抑制作用も報告されている。現在までにこのようなカプノサイトファガ属に関する報告があるが、歯周病発症機構におけるその役割は十分に明らかにされていない。

文 献

- 1) Aas JA, *et al.*, J Clin Microbiol. 43:5721-5732, 2005.
- 2) Socransky SS, *et al.*, Periodontology 2000. 28:12-55, 2002.
- 3) Newman MG, *et al.*, J Periodont. 47:373-376, 1976.
- 4) Iino Y, *et al.*, Archs Oral Biol. 29:59-63, 1984.
- 5) Wang HK, *et al.*, J Clin Microbiol. 45:645-647, 2007.
- 6) Hayashi F, *et al.*, Microbiol Immunol. 45:17-22, 2001.
- 7) Yoshimura A, *et al.*, J Periodont Res. 32:279-286, 1997.
- 8) Yoshimura A, *et al.*, Infect Immun. 70:218-225, 2002.

2. 研究の目的

本研究は、*C. ochracea* は歯周病を誘発するトリガー細菌であるか否かについて、「*C. ochracea* は自身の生存に有利な環境を構築できるか」ということに注目し、口腔レンサ球菌との共存戦略について解明することを目的とした。また、*C. ochracea* がトリガー細菌であるなら、*C. ochracea* が保有する「転写因子」が重要な役割を果たすことが予想されるので、その機構について明らかにする。



3. 研究の方法

(1) *C. ochracea* の転写因子 OxyR の変異株の作製

最初に、*C. ochracea* の病原性発現に重要な役割を果たすと予想される転写因子 OxyR の変異株の作製を試みた。*C. ochracea* がトリガー細菌であるには、デンタプラーク中の初期定着菌群の中で過酸化水素を産生する口腔レンサ球菌 *Streptococcus gordonii* や *Streptococcus sanguinis* からの酸素によるストレスを消去しつつ共存できることが不可欠である。その時重要な役割を果たすと考えられる転写因子について OxyR を予想し、その変異株を作製した。

方法は、*C. ochracea* ATCC 27872 のゲノムから OxyR 遺伝子 (Coch_0002) をクローニングし、その遺伝子の途中にエリスロマイシンカセット耐性遺伝子を挿入し、ターゲティングベクターを構築した。そのベクターをエレクトロポレーション法にて、*C. ochracea* 内に組み込み、遺伝子の相同組換えを起こさせた。その培養液をエリスロマイシン含有血液寒天培地表面に塗抹し、一週間後増殖した集落を変異株の候補として保存した。目的の OxyR 遺伝子の途中にエリスロマイシンカセット耐性遺伝子が挿入されていることを PCR 法にて確認したクローンを、その後の実験に使用した。

(2) *C. ochracea* OxyR 変異株の酸化ストレスに対する感受性の検討

次に、野生株と OxyR 変異株を用い阻止円形成法にて酸化ストレス感受性試験を行った。また、酸化ストレス除去に関わるタンパク質として Sod と AhpC に注目し、その転写量についてリアルタイム PCR 法 (qRT-PCR) にて解析した。

(3) *C. ochracea* と早期定着細菌である口腔レンサ球菌 *Streptococcus gordonii* との共生における OxyR の役割について検討

C. ochracea 野生株と OxyR 変異株と *S. gordonii* とを共培養しバイオフィーム形成量をクリスタルバイオレット染色法にて測定する。その結果、野生株と比較し OxyR 変異株にてバイオフィーム形成量の低下が認められれば、*C. ochracea* の転写因子 OxyR が過酸化水素を産生する口腔レンサ球菌との共生に重要な役割を果たすことが判明する。

4. 研究成果

本研究は、口腔細菌 *C. ochracea* と歯周病発症との関連性について検討することが目的である。環境変化に富む歯肉溝に *C. ochracea* が慢性感染することが歯周病発症に必須と考え、その慢性感染に重要な役割を果たすと予想される転写因子 OxyR に注目した。理由は、OxyR は他の細菌において酸化ストレス除去に関係すると数多く報告されているからである。我々は最初に OxyR タンパク質の変異株作製を試み、成功した。

次に野生株と OxyR 変異株を用い阻止円形成法にて酸化ストレス感受性試験を行った。その結果、野生株に比べ変異株にて有意に酸化ストレスに対する感受性が増加した。(図 1)

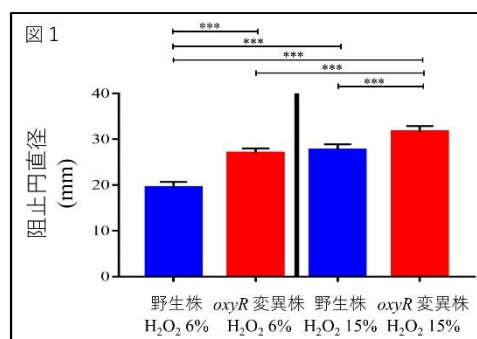
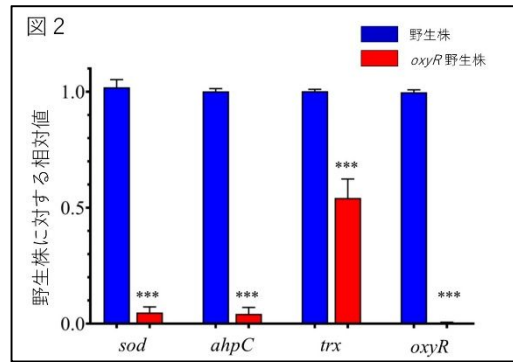
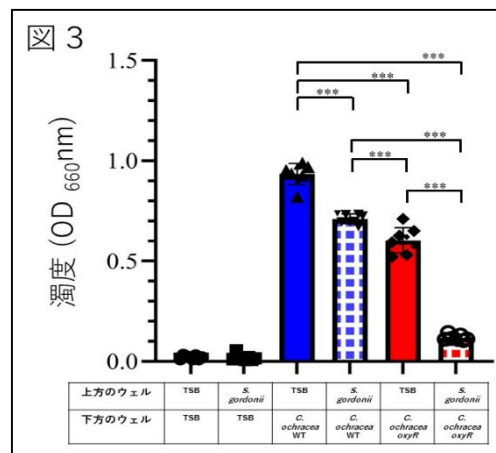


図1の結果より、*C. ochracea* 野生株と OxyR 変異株の嫌気培養下における、酸化ストレスに関与する遺伝子 (*sod*, *ahpC*, *trx*) の転写量を qRT-PCR 法にて解析した。その結果、野生株と比較し OxyR 変異株において *sod*, *ahpC* の転写はほぼ認められなかった。このことより、転写因子 OxyR は *sod*, *ahpC* の転写調節に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。またこの結果は、図1に示した野生株と比較し OxyR 変異株は酸化ストレスに対する感受性が高いことの大きな理由であると考えられる。



口腔バイオフィームを形成する際、歯面に最初に付着する細菌は口腔レンサ球菌の一種である Mitis グループ (*S. gordonii*, *Streptococcus oralis* など) ということが知られている。Mitis グループのレンサ球菌は過酸化水素を産生することも知られている。その環境にて *C. ochracea* は Mitis グループのレンサ球菌と付着することができ、慢性感染することが可能である。つまり *C. ochracea* は Mitis グループのレンサ球菌が産生する過酸化水素の影響を回避していることが考えられる。この仮説を確認するために、*S. gordonii* と *C. ochracea* をマルチウェルプレートの一つのウェルにカルチャーインサート(細菌が通過できないほどの小さな孔が存在するフィルターが底面になっているカップ)を挿入し、上下のウェルにて共培養させる実験系を用いた。その結果、*S. gordonii* と共存する時の *C. ochracea* 野生株のバイオフィーム形成量と比較し、*C. ochracea* OxyR 変異株のバイオフィーム形成量は顕著に低下することが判明した。(図3)



以上の結果から、過酸化水素を産生する早期定着細菌 *S. gordonii* 存在下で *C. ochracea* が増殖するためには転写因子 OxyR が重要な役割を果たし、その OxyR が酸化ストレスに関与する遺伝子 (*sod*, *ahpC*) の転写を調節し、過酸化水素などによる酸化ストレスを消去していることを明らかにした。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yuichiro Kikuchi, Kazuko Okamoto-Shibayama, Eitoyo Kokubu, Kazuyuki Ishihara	4. 巻 72
2. 論文標題 OxyR inactivation reduces the growth rate and oxidative stress defense in Capnocytophaga ochracea	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Anaerobe	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.anaerobe.2021.102466.	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菊池有一郎、柴山和子、国分栄仁、石原和幸
2. 発表標題 口腔細菌カプノサイトファガの OxyR 変異株作製
3. 学会等名 歯科基礎医学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊池有一郎、柴山和子、国分栄仁、石原和幸
2. 発表標題 口腔細菌 Capnocytophaga ochracea OxyR変異株の性状解析
3. 学会等名 日本細菌学会
4. 発表年 2020年

〔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
研究分担者	石原 和幸 (Ishihara Kazuyuki) (00212910)	東京歯科大学・歯学部・教授 (32650)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	柴山 和子 (Shibayama Kazuko) (60408317)	東京歯科大学・歯学部・講師 (32650)	
研究分担者	国分 栄仁 (Kokubu Eitoyo) (70453785)	東京歯科大学・歯学部・講師 (32650)	

	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
連携研究者	大原 直也 (Ohara Naoya) (70223930)	岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授 (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関