

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 15 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592343

研究課題名（和文）歯周病原性菌繊毛のアミロイド線維形成とバイオフィルム形成との関連性

研究課題名（英文）Association between biofilm formation and amyloid-like fiber in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

## 研究代表者

君塚 隆太（KIMIZUKA RYUTA）

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：90287178

研究成果の概要（和文）：*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* は侵襲性歯周炎の病原体である。本菌は高い付着性を有し、それが病原性において重要な役割を果たしている。本研究では、*A. actinomycetemcomitans* の表層タンパクからアミロイド様成分を含む線毛以外の付着因子を解明することを目的とした。

アミロイド様成分は thioflavin T 蛍光測定により検出でき、イオン交換およびゲル濾過によって分画できた。得られた画分の加熱およびプロテアーゼ処理、酸性の buffer に溶解によっても安定しており大腸菌などのアミロイド線維と類似していた。

研究成果の概要（英文）：*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is a pathogen of aggressive periodontitis. This microorganism has strong adherence activity and the ability plays an important role in its virulence. In this project, we intended to identify adherence factor including amyloid-like fiber other than fimbriae.

Amyloid-like fiber was detected by the thioflavin T fluorescence assay. The amyloid-like fiber was fractionated with ion-exchange chromatography and gel chromatography. The fiber was stable after heat treatment and solubilization with the acidic buffer. The profile is resembled with the amyloid fiber of *Escherichia coli*.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
21 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
22 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
23 年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯学

キーワード：口腔細菌学、付着、バイオフィルム、線毛、アミロイド、歯周病、歯周病原性菌、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病原性 *Aggregatibacter*

*actinomycetemcomitans* は侵襲性歯周炎の発症に関わるとともに、心内膜炎や髄膜炎に

も関わることが知られている。本菌は、ロイコトキシン、細胞膨化壊死毒素等の外毒素に加え、内毒素、線毛、Fc-binding protein等の病原性因子を持つ。本菌の新鮮分離株は長い線毛を有し、血液平板培地上で rough 型の強固な付着性のコロニーを形成し、液体培地中ではガラス壁に付着して発育する。細菌産生アミロイド線維は、大腸菌やサルモネラ菌で報告されており、共凝集、バイオフィーム形成などに深く関与している。*A. actinomycetemcomitans* は、継代によって線毛を失うが、線毛欠損株においても付着性を有することが認められている。歯周病原性細菌がアミロイド様物質を産生するか否かについては不明である。本菌は、歯周病原性菌の中においては、細胞膨化壊死毒素等の腸内細菌に認められる毒素を持つと共に、内毒素も腸内細菌と類似した活性を示す。そのため、付着機構としてアミロイド様成分を有する可能性があり、その存在の解析が必要とされている。

## 2. 研究の目的

本研究では、既にその存在及び機能が明らかにされている線毛以外の付着因子を明らかにする目的で *A. actinomycetemcomitans* の表層タンパクを分離し、その画分からアミロイド様成分中心として付着因子を同定し、本菌の今まで明らかにされていない付着およびバイオフィーム形成機構についての解析を行った。

## 3. 研究の方法

*A. actinomycetemcomitans* Rough 型コロニー形成株 AKR を供試した。Yeast extract 添加 Trypticase soy broth で 2 日間、5%CO<sub>2</sub> 下で菌を培養した。培養後、管壁に付着した菌体を 2-aminomethanol buffer で剥離し、集菌、洗浄した。付着成分の精製を行うため菌体を超音波破碎後、各種酵素処理を行い、可溶させた画分をイオン交換およびゲルろ過クロマトグラフィーで分画した。分画したサンプル中のアミロイド様成分の存在および含有量は、thioflavin T 蛍光測定を用いて蛍光強度を分光蛍光光度計より測定することで判定した（励起波長:450 nm、蛍光波長:486 nm）。菌体表層の線異様構造の有無については、透過型電子顕微鏡によって解析を行った。

## 4. 研究成果

部分精製したアミロイド様成分は thioflavin T 蛍光測定により、486 nm をピークとする蛍光として検出できた。アミロイド様成分は、加熱およびプロテアーゼ処理後も、その ThT の蛍光強度に影響は認められなかった。また蛍光強度は、pH3-4 の酸性の

buffer 中で安定していたが、アルカリの buffer 中では消失した。さらに 37°C に 100 日保存し、乾燥状態になった成分を酸性の buffer に溶解した後においても蛍光が検出できた。これらのことは、本菌のアミロイド様物質が、加熱やプロテアーゼ処理さらには酸性 buffer 溶液中での安定性などの点で大腸菌などのアミロイド線維と類似していることを示している。しかしながら透過型電子顕微鏡による観察ではアミロイド状線維の典型的な構造は観察できなかった。以上のことから *A. actinomycetemcomitans* rough 型集落形成株菌体表層には、アミロイド様物質が存在し、本菌の付着やバイオフィーム形成などの歯周病原性に関与していると考えられた。

## 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 2 件)

- ① Kimizuka, R., Kato, T., Hashimoto, S., Yamanaka-Okada, A., Okuda, K., Ishihara, K., Congo red-binding protein in rough-phenotype aggregatibacter *actinomycetemcomitans* is amyloid-like fiber, Bull Tokyo Dent Coll, 査読有 50, 2009, 23-29, [https://www.jstage.jst.go.jp/article/tdcpublish/50/1/50\\_1\\_23/\\_article2](https://www.jstage.jst.go.jp/article/tdcpublish/50/1/50_1_23/_article2)
- ② Yamada, K., Yama, M., Takaku, Y., Kakizawa, T., Kimizuka, R., Okuda, K., Kato, T., Antimicrobial activity of super-oxidised water against oral microorganisms, Arch Oral Biol, 査読有 55, 2010, 397-400, DOI: 10.1016/j.archoralbio.2010.03.002

[学会発表] (計 12 件)

- ① Saito A, Inagaki S, Kimizuka R, Ishihara K: Invasin of host cells by periodontopathic bacteria in polymicrobial infection, 87 th General session & exhibition of the International Association for Dental Research, Apr. 1-4, Miami, USA 2009.
- ② Inagaki S, Saito A, Kimizuka R, Ishihara K: *Treponema denticola* invasion of human gingival epithelial cells, 88 th General session & exhibition of the International Association for Dental

- Research, July. 12-17, Barcelona, Spain 2010.4830.
- ③ Ishihara K, Inagaki S, Kimizuka R: *Treponema denticola* invasion of human gingival epithelial cells, Godon Conference, Spirochetes, Biology of, Jan. 31-Feb. 6 2010.
- ④ Kato T, Kimizuka R, Ishihara K: Effect of ethanol on galectin-3 production by human endothelial cells, 88 th General session & exhibition of the International Association for Dental Research, July. 12-17, Barcelona, Spain.
- ⑤ Kimizuka R, Kato T, Ishihara K: Identification of amyloid-like fiber in rough-phenotype *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, 88 th General session & exhibition of the International Association for Dental Research, July. 12-17, Barcelona, Spain 2010.
- ⑥ Kokubu E, Inagaki S, Kimizuka R, Ishihara K: Behavior of epithelial rests of Malassez cells infected by *Treponema denticola*, XIII International Congress for Bacteriology and Applied Microbiology, 6-10 September 2011, Sapporo 2011. .
- ⑦ Kimizuka R, Kato T, Kokubu E, Ishihara K: Effects of *Treponema denticola* infection on polarized epithelial cells, 第 85 回日本細菌学会総会、長崎、平成 24 年 3 月 27-29 日、長崎 2012.
- ⑧ Kokubu E, Inagaki S, Kimizuka R, Ishihara K: Behavior of epithelial rests of Malassez cell infected by *Treponema denticola*, 第 85 回日本細菌学会総会、長崎、平成 24 年 3 月 27-29 日、長崎 2012.
- ⑨ 齋藤淳, 稲垣覚, 国分栄仁, 君塚隆太, 石原和幸: Polymicrobial 感染における歯周病

原性菌 *Porphyromonas gingivalis* の宿主細胞への侵入について, 第 93 回日本細菌学会関東支部総会, 10 月 21-22 日, 東京 2010.

- ⑩ 加藤哲男, 橋本健司, 君塚隆太, 齋藤英一, 谷口正之, 伊勢村知子, 石原和幸: 唾液抗プロリントタンパク質由来ペプチドの内毒素に対する影響, 第 53 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 9 月 30 日—10 月 2 日, 岐阜 2011..
- ⑪ 国分栄仁, 稲垣覚, 君塚隆太, 石原和幸: *Treponema denticola* の細胞侵入に対する Malassez 上皮遺残細胞の細胞動態, 第 53 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 9 月 30 日—10 月 2 日, 岐阜 2011..
- ⑫ 国分栄仁, 稲垣覚, 君塚隆太, 石原和幸: *Treponema denticola* の細胞侵入に対する Malassez 上皮遺残細胞の細胞動態, 第 94 回日本細菌学会関東支部総会, 10 月 6 日-7 日, 東京 2011.

[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

君塚 隆太 (KIMIZUKA RYUTA)

研究者番号 : 90287178

(2) 研究分担者

石原 和幸 (ISHIHARA KAZUYUKI)

研究者番号 : 00212910

(3) 研究分担者

加藤 哲男 (KATO TETSUO)

研究者番号 : 00159253