

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25年 4月 23日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22580087

研究課題名（和文） ゲノム再編によるバクテリアの高病原化に関わる研究

研究課題名（英文） Study on bacterial hypervirulation by genomic rearrangement

研究代表者

阿座上 弘行 (AZAKAMI HIROYUKI)

山口大学・農学部・准教授

研究者番号：40263850

研究成果の概要（和文）：歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のゲノム再編がファージ感染を介して起こること、それによりレクチン活性、バイオフィーム形成能、溶血活性、増殖速度、炎症性サイトカイン誘導能などの本菌の病原性の各指標が上昇することも明らかにした。さらに、この高病原化が *E. corrodens* で普遍的に起こりうることも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We found that the genomic recombination occurs in periodontopathogenic bacterium, *Eikenella corrodens*, through phage infection. Moreover, we found that the genomic recombination leads to hypervirulation including the increase of lectin activity, biofilm formation, hemolytic activity, growth rate, and induction of inflammatory cytokine. We suggested that this hypervirulation might occur frequently in *E. corrodens*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、応用微生物学

キーワード：歯周病原性細菌、ゲノム再編、*Eikenella corrodens*

1. 研究開始当初の背景

我々は病原微生物の宿主への定着機構を研究する一環として、歯周病原性細菌の口腔内への定着について研究を行ってきた。35歳以上の80%以上が歯周組織に疾患があると言われており、いまや歯周病は国民病とまで言われてい

る。歯周病は虫歯と並ぶ二大口腔疾患の一つで、歯を失う原因の大部分を占め、深刻化する高齢化の中で健康で文化的な生活を維持する上でその対策が望まれている。歯周病の発症の第一段階は、デンタルプラーク(歯垢)を構成する細菌が歯面や歯周組織に付着することである。

歯周病原性細菌の多くは菌体表層に付着因子を有しており、付着した細菌はバイオフィームと呼ばれる複合細菌コミュニティを形成することで口腔内に定着する。

Eikenella corrodens は歯周病患者の病変部から頻繁に分離され、無菌動物への単一感染でも重度の歯周疾患を惹起することから歯周病原性細菌の一つと考えられている。恵比須らは、本菌が菌体表層に *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) に特異的なレクチン様の付着因子を有し、これを介して口腔内上皮細胞へ付着したり、プラーク構成異種細菌と共凝集することが報告してきた。さらに、このレクチン物質を介し、マウスB細胞の活性化、炎症性サイトカインの誘導などを行うことなども報告している。したがって、本菌による歯周病の発症と進行にこのレクチン様物質が大きく関わっていると考えられている。

近年、我々は *E. corrodens* の臨床分離株の一つ 1073 株にプラスミド DNA を発見した。これを導入した株では、本菌の病原性に大きく関与する GalNAc 依存レクチン活性が上昇した (Azakami et al, *Gene*, 2005)。さらに、このプラスミド上の ORF4 が、病原微生物のタイプ 4 線毛遺伝子特異的に組換えを起こすリコンビナーゼと高い相同性を示していた。この ORF4 を導入した株では、ゲノム上のタイプ 4 線毛遺伝子領域に組換えが起こり、本菌の病原性の指標であるレクチン活性が上昇した (Azakami et al, *Microbiology*, 2006)。また、我々は本菌がポリスチレン表面上でバイオフィームを形成し、このバイオフィーム形成には菌体表層レクチンが関与していることを示した。さらに、バイオフィーム形成能が低い株に pMU1 由来の ORF4 遺伝子を導入すると、バイオフィーム形成能が上昇することも明らかにした (Azakami et al, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2006)。これらのことから、プラスミド上にコードされ

たリコンビナーゼによって本菌のゲノム再編が起こり、その結果、高病原化することが示唆されている。

2. 研究の目的

本研究課題では、これまでの研究で示唆されたようなプラスミドによるゲノム再編が実際に口腔内で起こっているのか、またそれに伴って本菌が高病原化しているのかを明らかにすることを目的としている。歯周病患者の口腔内からゲノムの再編が起こった株や高病原化株を分離し、そのゲノム構造や病原性を調べ、その検出頻度が歯周病患者の病態と相関があるかどうかを明らかにする。また、ゲノム再編による高病原化が常在菌も含めた口腔細菌叢にどのような影響を与えるのかも調査する。

本研究の遂行により高リスクな高病原化株の検出が可能になれば、新たな歯周病の診断法や予防法の開発が期待される。また、現在よりもよりの確な治療方針の選択が可能となるかもしれない。また、このようなゲノム再編による高病原化機構は本菌のみならず、病原微生物が宿主の免疫防御機構などから逃れるために獲得したことが考えられる。したがって、本研究分野の成果が、動植物を宿主とする病原微生物一般の高病原化機構の解明へと応用されることも期待される。

3. 研究の方法

(1) 菌株および培養条件

E. corrodens 1073 株は S. S. Socransky (Forsyth Dental Center, Boston, USA) から分与された。 *E. corrodens* 1073 株より luxS 遺伝子をクローニングしカナマイシン耐性遺伝子を挿入後、相同的組換えにより luxS 欠損株 1073luxS を作成した。 1073 株および 1073luxS 株は 2mg/ml の硝酸カリウムおよび 5 μ g/ml のヘミンを含むトリプティックソイブ

ロスで、37°Cで培養した。欠損株の培養には、50 μ g/mlのカナマイシンを添加した。また、*Vibrio harveyi*はAB最少培地(10あたり3gのリン酸二カリウム、1gのリン酸一ナトリウム、1gの塩化アンモニウム、0.3gの硫酸マグネシウム、0.15gの塩化カリウム、0.01gの塩化カルシウム、2.5mgの硫酸鉄、および0.5%グルコースを含む)で、30°Cで培養した。クローニングおよびシークエンス解析の宿主として*E.coli* XL-1株をベクターとしてpHSG298およびpMW219を用いた。大腸菌はLB培地で培養した。上皮細胞への付着アッセイにはヒト咽頭ガン由来でのKB細胞を用い、10%ウシ血清アルブミンを加えたMEM培地で培養した。

(2) バイオフィームアッセイ(静置系)

*E. corrodens*を上述の培地を分注した96穴マイクロタイタープレートに接種し、37°Cで36時間静置培養した。培地および浮遊菌を除去し、精製水で洗浄乾燥したプレート底面の付着菌を1%クリスタルバイオレットで染色した。99%エタノールで抽出後、595nmの波長の吸光度を測定し、この値をバイオフィーム量とした。

(3) フローセルを用いたバイオフィーム観察

Modified Robins Deviceの各カセット内に唾液でコーティングしたハイドロアパタイトディスクを固定し、ここに*E. corrodens*の培養液を一定の流速で循環させた。37°Cで1週間還流させた後ディスクを取り出し、ディスク上に形成したバイオフィームを走査電子顕微鏡により観察した。

(4) AI-2アッセイ

センサー株*V. harveyi* BB170をAB培地で30°C一晩培養した。これをAB培地に5,000倍希釈したものを1.8mlずつ試験管に分注し、これに試料を添加し、30°Cで培養した。一定時間後の培養液の発光をMicroLumat LB96Pルミノメーター(Berthold, ドイツ)で測定した。*V. harveyi* BB170の培養上清およびAB培地を添加した場合をそれぞれ陽性対照、陰性対照とし、陰性対照に対

する相対値から試料中のAI-2量を求めた。

(5) オートインデューサー2の精製

*E. corrodens*を培養後、AI-2の生成量が最大となる培養15時間後に集菌した。培養上清をメンブランフィルター(孔径0.22 μ m)でろ過し、これを酢酸エチルで抽出した。ロータリーエバポレーターにて酢酸エチルを蒸発させ、得られた乾固物を少量の酢酸エチルに溶解させた。これをC18逆相カラムにかけ、60%メタノールにて溶出を行った。この画分をシリカゲルプレートにアプライし、60%メタノールを展開溶媒に薄層クロマトを行った。観察されたそれぞれのバンドをシリカゲルプレートごと削り取り、酢酸エチルによりそれぞれのバンド成分をシリカゲルより溶出した。各溶出液をろ過し酢酸エチルを蒸発させた後、少量のジメチルスルホキシドに溶解させた。各精製段階における画分を*V. harveyi*を用いたバイオアッセイを行い、AI-2を含む画分を得た。

4. 研究成果

ピロガロール型Bリングやガロイル基を持つカテキン類の添加により*E. corrodens*のバイオフィーム形成が抑制された。このうち、ピロガロール型Bリングを持つカテキン類には増殖抑制効果は見られなかった。さらに、ガロイル基を構成する没食子酸の添加により増殖阻害なしにバイオフィーム形成を抑制した。これらの結果より、ある種のカテキン類は最小生育阻害濃度以下でバイオフィーム形成を抑制することが示唆された。近年、クオラムセンシングがバイオフィーム形成を調節することが明らかとなり、数多くの研究が進められている。そこでAI-2合成に関与するluxS遺伝子を欠損させた変異株を用いて、カテキン類のバイオフィーム抑制効果におけるクオラムセンシングの関与を調べたところ、最小生育阻害濃度以下のエピガロカテキンガレート(EGCg)に見られたバイオ

フィルム抑制は luxS 欠損株では見られなかった。これらの結果から、ガロイル基をもつカテキン類は AI-2 を介した QS を阻害し、これによってバイオフィーム形成を抑制する可能性が示唆された(学術雑誌 Biosci. Biotechnol. Biochem, 2010 に論文発表)。

また、本菌がプラスミド DNA を介したゲノム再編により、溶血活性が発現することを示した。さらに、このゲノム再編により口腔上皮細胞への付着が上昇すること、この付着の上昇はゲノム再編によるレクチン活性の増加に伴うものであることを明らかにした。一方、ゲノム再編により口腔上皮細胞への侵入能力は低下した(Pacificchem 2010 などの国内外の学会で発表、学術雑誌 Biosci. Biotechnol. Biochem, 2011 に論文発表)。

Eikenella corrodens は歯周病関連細菌の一つで、その菌体表層のレクチンが本菌の病原性に大きく関与する。我々は臨床分離株の一つ(1073 株)から線状ファージに由来するプラスミド pMU1 を発見し、それにコードされたリコンビナーゼ遺伝子を標準株(23834 株)に導入することにより、線毛遺伝子領域を含むゲノムが大きく再編されることを報告した。さらに、このゲノム再編により、線毛の消失に伴うコロニー形状の変化が見られ、またレクチン活性、バイオフィーム形成能、溶血活性、増殖速度、炎症性サイトカイン誘導能などの本菌の病原性の各指標が上昇することも明らかにした。ゲノム再編が起こった株の線毛遺伝子領域の塩基配列を解析したところ、ある臨床分離株(VA1 株)とほぼ同じであったことから、このようなゲノム再編による高病原化が口腔内で頻繁に起こっている可能性が示唆された。国内外から分離された臨床分離株 7 株に pMU1 由来のリコンビナーゼ遺伝子を導入した。その結果、4 株にゲノム再編が見られたが、残

りの 3 株では変化は認められなかった。また、ゲノム再編の見られた 4 株全てにおいて、線毛の消失に伴うコロニー形状の変化が見られ、レクチン活性、バイオフィーム形成能、溶血活性、増殖速度、サイトカイン誘導能が上昇していた。しかし、ゲノム再編が見られなかった 3 株では、これらの変化は見られなかった。したがって、ゲノム再編による高病原化がファージ感染などによって口腔内で頻繁に起こっている可能性が示唆された。また、ゲノム再編が見られた株は全てゲノム中に線状ファージ(pMU1)の配列を含んでいたことから、かつてファージ感染を受けた株が再度感染を受けることによって高病原化する可能性が示唆された。さらに、株が分離された地域性によって組換え株の検出頻度が異なっていたことから、ファージの感染が水平伝播により広がったことも示唆された(IUMS2011 など国内外の学会で発表)。

E. corrodens の定常期における AI-2 活性の減少のメカニズムについて研究を行った。このメカニズムを調べるために、対数増殖期中期の培養性から AI-2 を抽出、精製した。また同時に、定常期の培養上清を硫酸沈殿により分画した。それぞれの画分を精製した AI-2 または MHF とインキュベーションしたところ、30%硫酸画分により AI-2 活性、MHF 活性ともに減少した。このことは、AI-2 と MHF が同じ機構で不活性化されたことを示唆している。30%画分の熱処理およびトリプシン処理を行ったところ、この画分による AI-2 の不活化を完全に停止させることはできなかった。したがって、部分的に熱安定なタンパク質が AI-2 の不活化に関与することが示唆された。さらに、この酵素が MHF を別の形に変換することを観察した。これらの結果から、*E. corrodens* は AI-2 の不活化酵素を生産し、AI-2 はこれによって分解または修飾さ

れることが示唆された (学術雑誌 Biosci. Biotechnol. Biochem, 2013 に論文発表)。

E. corrodens のバイオフィーム形成における AI-2 の役割を調べた。AI-2 分子がバイオフィーム形成に直接影響を与えるかどうかを調べるために、精製した AI-2 を *E. corrodens* の *luxS* 変異株と野生株に添加し、静置系のバイオフィームアッセイによりバイオフィーム形成を比較した。その結果、AI-2 の添加により、*E. corrodens* のバイオフィーム形成が増加した。さらに、走査型電子顕微鏡や共焦点レーザー顕微鏡を用いて、*luxS* 変異株と野生株がフローセルシステムで形成したバイオフィームを比較した。*luxS* 変異株のバイオフィームでは野生株のものと比較して、生菌数が著しく減少し、疎らな構造が見られた。このことから、AI-2 がバイオフィームの成熟に関与することが示唆された。一方、共焦点反射顕微鏡を用いた解析では、野生株のバイオフィームは *luxS* 変異株のものよりも早く成熟し、時間とともに薄く疎らになっていくことが示された。これらの結果から、LuxS 酵素は *E. corrodens* においてバイオフィームの成熟と剥離を促進することが示唆された (学術雑誌 J. Biosci. Bioeng., 2013 に論文発表)。

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 6 件)

- ① MM. Karim, T. Hisamoto, T. Matsunaga, Y. Asahi, Y. Noiri, S. Ebisu, A. Kato, H. Azakami: LuxS Affects Biofilm Maturation and Detachment of the Periodontopathogenic Bacterium *Eikenella corrodens*, Journal of Bioscience and Bioengineering, in press (2013) 査読有 (doi:10.1016/j.jbiosc.2013.03.013)
- ② MM. Karim, A. Nagao, F.J. Mansur, T. Matsunaga, Y. Akakabe, Y. Noiri, S. Ebisu, A. Kato, H. Azakami: The periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens* produces an

autoinducer-2-inactivating enzyme, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, in press (2013) 査読有 (doi:10.1271/bbb.130047)

- ③ Y. Asahi, Y. Noiri, J. Igarashi, H. Suga, Azakami H, S. Ebisu: Synergistic effects of antibiotics and an N-acyl homoserine lactone analog on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. Journal of Applied Microbiology, 112:404-411 (2012) 査読有
- ④ H. Maezono, Y. Noiri, Y. Asahi, M. Yamaguchi, R. Yamamoto, N. Izutani, Azakami H, S. Ebisu: Antibiofilm Effects of Azithromycin and Erythromycin on *Porphyromonas gingivalis*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 55, 5887-5892 (2011) 査読有
- ⑤ T. Matsunaga, A. Nakayuki, Y. Saito, A. Kato, Y. Noiri, S. Ebisu, H. Azakami: Genomic Recombination through Plasmid-encoded Recombinase enhances Hemolytic Activity and Adherence to Epithelial Cells in the Periodontopathogenic Bacterium *Eikenella corrodens*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 75, 748-751 (2011) 査読有
- ⑥ T. Matsunaga, A. Nakahara, KM. Minnatul, Y. Noiri, S. Ebisu, A. Kato, H. Azakami: The Inhibitory Effects of Catechins on Biofilm Formation by the Periodontopathogenic Bacterium, *Eikenella corrodens*. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 74:2445- 2450 (2010) 査読有

[学会発表] (計 21 件)

- ① Karim Minnatul : Purification and characterization of autoinducer-2 inactivating enzyme in periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens*, 日本農芸化学会 (東北大学、仙台市、2013 年 3 月 26 日)
- ② 阿座上弘行 : オートインデューサーの不活性化による歯周病関連細菌 *Eikenella corrodens* の口腔内コミュニケーション戦略、日本細菌学会 ワークショップ「細菌間および細菌宿主間の相互作用」、日本細菌学会 (幕張メッセ、千葉市、2013 年 3 月 18 日)
- ③ Mansur Jasin : Purification and characterization of autoinducer-2 inactivating enzyme in periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens*, 日本分子生物学会 (マリンメッセ福岡、福岡市、2012 年 12 月 12 日)
- ④ Mansur Jasin : Purification and

- characterization of autoinducer-2 inactivating enzyme in periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens*, Brawijaya International Agriculture 2012 (Brawijaya Univeristy, Malang, Indonesia, 2012年12月4日)
- ⑤ Karim Minnatul : Effect of Autoinducer-2 on biofilm formation of periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens*, Brawijaya International Agriculture 2012 (Brawijaya Univeristy, Malang, Indonesia, 2012年12月4日)
- ⑥ 倉重吉宏 : 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* はフェージ感染により口腔内で高病原化する、日本生物工学会 (神戸国際会議場、神戸市、2012年10月24日)
- ⑦ 山本美保子 : 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* の溶血因子の精製と解析、日本生物工学会 (神戸国際会議場、神戸市、2012年10月24日)
- ⑧ 阿座上弘行 : 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* はゲノム再編により高病原化する、日本農芸化学会中四国支部例会 BBB 論文賞受賞講演 (愛媛大学、松山市、2012年6月2日)
- ⑨ 阿座上弘行 : 歯周病関連細菌 *Eikenella corrodens* はゲノム再編により高病原化する、日本細菌学会 (長崎ブリックホール、長崎市、2012年3月27日)
- ⑩ Karim Minnatul : 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のオートインデューサー 2 分解酵素の解析、日本農芸化学会 (京都女子大学、京都市、2012年3月25日)
- ⑪ 山本美保子 : 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* の溶血因子の精製と解析、日本農芸化学会 (京都女子大学、京都市、2012年3月25日)
- ⑫ 倉重吉宏 : 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* はフェージ感染により口腔内で高病原化する、日本農芸化学会 (京都女子大学、京都市、2012年3月25日)
- ⑬ 山田和範 : 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のゲノム再編機構の解析日本生物工学会 (東京農工大学、小金井市、2011年9月27日)
- ⑭ 長尾章子 : 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のオートインデューサー 2 の分解に関する研究、日本生物工学会 (東京農工大学、小金井市、2011年9月26日)
- ⑮ 阿座上弘行 : Genomic Recombination through Plasmid-Encoded Recombinase Enhances Hemolytic Activity and Adherence to Epithelial Cells in the Periodontopathogenic Bacterium *Eikenella corrodens*, IUMS2011 (札幌コンベンションセンター、札幌市、2011年9月10日)
- ⑯ 松永哲郎 : 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* の菌体表層レクチンはポーリン様のタンパク質である、日本農芸化学会 (震災のため大会は中止、2011年3月27日)
- ⑰ Karim Minnatul : Autoinducer 2 from periodontopathogenic bacterium, *Eikenella corrodens*, interconvert between several functional forms、日本農芸化学会 (震災のため大会は中止、2011年3月26日)
- ⑱ 松永哲郎 : Effect of genomic recombination in periodontopathogenic bacterium on its lectin-dependent adhesion to epithelial cells, Pachichem 2010 Conference (Hawaii Convension Center, Honolulu, USA, 2010年12月16日)
- ⑲ 松永哲郎 : Purification of cell-surface lectin and its role in pathogenicity of periodontopathogenic bacterium, *Eikenella corrodens*, 日本分子生物学会 (神戸国際会議場、神戸市、2010年12月10日)
- ⑳ 松永哲郎 : 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* の菌体表層レクチンの精製と解析日本生物工学会 (フェニックス・シーガイア・リゾート、宮崎市、2010年10月28日)
- ㉑ 長尾章子 : 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のオートインデューサー分解酵素の精製と解析、日本生物工学会 (フェニックス・シーガイア・リゾート、宮崎市、2010年10月28日)
- [その他]
ホームページ等
<http://web.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~azakami/>
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
阿座上 弘行 (AZAKAMI HIROYUKI)
山口大学・農学部・准教授
研究者番号 : 40263850
- (2) 研究分担者
野村 由一郎 (NOIRI YUICHIRO)
大阪大学・歯学研究科・准教授
研究者番号 : 50218286
- (3) 連携研究者
恵比須 繁之 (EBISU SHIGEYUKI)
大阪大学・歯学研究科
研究者番号 : 50116000