

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861798

研究課題名(和文)ポルフィロモナスジンジバリスバイオフィルムにおける薬剤排出ポンプの役割解析

研究課題名(英文)Role of multidrug efflux pumps on Porphyromonas gingivalis biofilm

研究代表者

山口 幹代(Yamaguchi, Mikiyo)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30523089

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)：本研究より、辺縁性歯周炎や根尖性歯周炎の病原性細菌の一種である *Porphyromonas gingivalis* は、バイオフィルム形成および抗菌薬抵抗性に関与する可能性がある薬剤排出ポンプをコードする遺伝子に相同性を持つ遺伝子を有するものの、数種の細菌種において薬剤排出ポンプを阻害することが報告されている薬剤排出ポンプ阻害剤によって、*P. gingivalis*のバイオフィルム形成およびエリスロマイシン感受性は影響を受けないことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：This study showed that *Porphyromonas gingivalis*, which is a major pathogen in marginal periodontitis and refractory periapical periodontitis, has several genes encoded a putative multidrug efflux pumps. However, two inhibitors of multidrug efflux pump, which were reported to inhibit multidrug efflux pumps in several bacterial species, didn't affect biofilm formation and sensitivity to erythromycin in *P. gingivalis*.

研究分野：歯科保存学

キーワード：バイオフィルム 抗菌薬抵抗性 薬剤排出ポンプ

1. 研究開始当初の背景

バイオフィーム形成細菌は抗菌薬に対する抵抗性を持つ。そのため、バイオフィーム感染症である辺縁性および根尖性歯周炎はしばしば難治化・慢性化の経過をたどる。バイオフィーム形成細菌の抗菌薬抵抗性メカニズムは 1) 菌体外マトリックスによる浸透阻害、2) 増殖速度の低下による感受性の減弱、3) 遺伝子発現の変化による抵抗性の獲得、が考えられているものの、その詳細は明らかにはなっていない。そのため、バイオフィーム感染症の治療法の第一選択はバイオフィームの機械的除去である。しかしながら、機械的除去が困難な部位に形成されたバイオフィームに対しては、機械的除去に頼らない新たな治療法・抑制法の開発が必須であり、病原性細菌であると考えられる細菌種のバイオフィームにおける抗菌薬抵抗性メカニズムの解明は急務である。

一方、浮遊細菌では複数種の抗菌薬に対して抵抗性を示すようになる多剤耐性化に薬剤排出ポンプの過剰発現が寄与していると考えられている。

近年、サルモネラ菌ではバイオフィーム形成に関与する薬剤排出ポンプが同定され、緑膿菌においては、バイオフィームの抗菌薬抵抗性に関与する薬剤排出ポンプが同定された。

2. 研究の目的

本研究では、辺縁性および根尖性歯周炎の病原性細菌の一種である *Porphyromonas gingivalis* において、バイオフィーム形成および抗菌薬抵抗性に関与する薬剤排出ポンプを明らかにするとともに、阻害方法について検索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) バイオフィーム形成および抗菌薬抵抗性に関与する薬剤排出ポンプをコードする遺伝子に相同性をもつ遺伝子の選定

P. gingivalis ATCC 33277 株の浮遊細菌およびバイオフィーム形成細菌のマイクロアレイの結果より (Yamamoto R et al, *Appl Environ Microbiol* 77, 2011, *Biology Gene Expression Database*, accession number CBX149)、浮遊細菌と比較してバイオフィーム形成細菌で発現が有意に上昇している遺伝子を抽出し、ゲノム配列から薬剤排出ポンプをコードする遺伝子に相同性を持つ遺伝子を選定した。

(2) 薬剤排出ポンプ阻害剤が *P. gingivalis* の増殖に与える影響の検索

薬剤排出ポンプ阻害剤として、種々の細菌で薬剤排出ポンプを阻害することが報告されている phenyl-arginine-naphthylamide (PA N) および carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazone (CCCP) を用いた。*P. gingivalis* ATCC 33277 株を 2×10^8

cells/ml に調整し、96 穴プレートに 100 μ l 播種した。連続希釈して PA N、CCCP のいずれかを 100 μ l 添加し、嫌気的条件下で 3 日間培養後、550 nm (OD_{550}) で上清の吸光度を測定した。

(3) 薬剤排出ポンプ阻害剤が *P. gingivalis* のバイオフィーム形成に及ぼす影響の検索

P. gingivalis ATCC 33277 株を 2×10^8 cells/ml に調整し、96 穴プレートに 100 μ l 播種した。連続希釈した PA N、CCCP のいずれかを 100 μ l 添加し、嫌気的条件下で 3 日間培養し、バイオフィームを形成した。バイオフィームを形成した各ウェルを PBS にて洗浄後、200 μ l の PBS にて懸濁し、550 nm (OD_{550}) で吸光度を測定した。

(4) 薬剤排出ポンプ阻害剤が *P. gingivalis* のエリスロマイシン感受性に及ぼす影響の検索

U 字の 96 穴プレートに連続希釈したエリスロマイシンと増殖を抑制しない濃度の PA N、CCCP のいずれかを添加し、*P. gingivalis* ATCC33277 株を最終摂取濃度が 10^5 CFU/ウェルとなるように播種し、嫌気的条件下で 2 日間培養し、増殖が認められないウェルのうち最小の薬剤濃度を最小発育阻止濃度 (MIC) とした。

(5) 統計学的有意差の検定

3. (1) 項では Student's t-test、それ以外の定量的解析においては、Tukey-Kramer test を用いた。

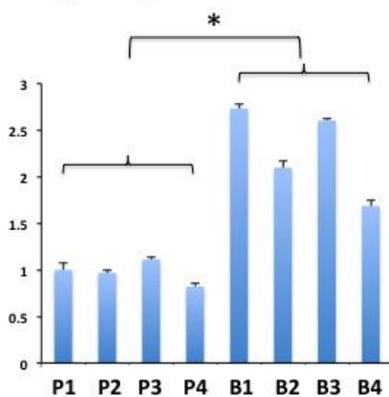
4. 研究成果

(1) 薬剤排出ポンプをコードする遺伝子に相同性をもつ遺伝子

P. gingivalis ATCC 33277 株の遺伝子配列より、薬剤排出ポンプをコードする遺伝子に相同性を持つ遺伝子は 20 種存在した。それらの遺伝子のうち、浮遊細菌とバイオフィーム形成細菌の継時的な遺伝子発現の変化を検索したマイクロアレイの結果より、恒常的に発現している遺伝子として、PGN_0006、PGN_0886、PGN_1207、PGN_1431、PGN_1432、PGN_1537、PGN_1538、PGN_1680、PGN_1681、PGN_1682、PGN_1683、PGN_2012、PGN_2013、PGN_2014 が同定された。また、バイオフィーム形成細菌で発現が上昇する遺伝子として、PGN_0081、PGN_0142、PGN_0444、PGN_0445、PGN_0715 が、さらに浮遊細菌で発現が上昇する遺伝子として、PGN_1749 が同定された (図 1)。これらの結果より、バイオフィーム形成細菌で発現が上昇する 5 種の薬剤排出ポンプをコードする遺伝子に相同性を持つ遺伝子 (PGN_0081、PGN_0142、PGN_0444、PGN_0445、PGN_0715) がバイオフィーム形成およびバイオフィームにおける抗菌薬抵抗性に関与している可能性が示唆された。

恒常的に発現している遺伝子	PGN_0006、PGN_0886、 PGN_1207、PGN_1431、 PGN_1432、PGN_1537、 PGN_1538、PGN_1680、 PGN_1681、PGN_1682、 PGN_1683、PGN_2012、 PGN_2013、PGN_2014
バイオフィーム形成細菌で発現が上昇する遺伝子	PGN_0081、PGN_0142、 PGN_0444、PGN_0445、 PGN_0715
浮遊細菌で発現が上昇する遺伝子	PGN_1749

PGN_0081 (MATE型)



<浮遊細菌>

- P1: 培養 2.5時間後
- P2: 培養 6時間後
- P3: 培養 9時間後
- P4: 培養 12時間後

<バイオフィーム形成細菌>

- B1: 形成 3日後
- B2: 形成 6日後
- B3: 形成 9日後
- B4: 形成 14日後
- P1の発現量を1とする

Student's t-test * $P < 0.001$

図 1 浮遊細菌とバイオフィーム形成細菌で発現に変化がある遺伝子とバイオフィーム形成細菌において発現が上昇する薬剤排出ポンプの一例

(2) 薬剤排出ポンプ阻害剤が *P. gingivalis* の増殖に与える影響

PA N は 32 $\mu\text{g/ml}$ 以上で *P. gingivalis* の増殖を抑制した(図 2)。また、CCCP は 0.001953 $\mu\text{g/ml}$ 以上で *P. gingivalis* の増殖を抑制した(図 3)。

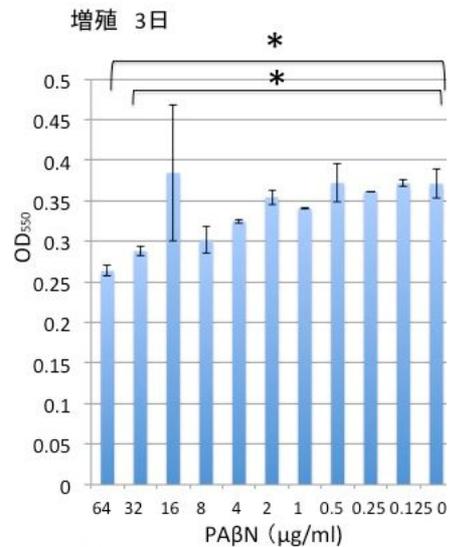


図 2 PA N が *P. gingivalis* の増殖に与える影響

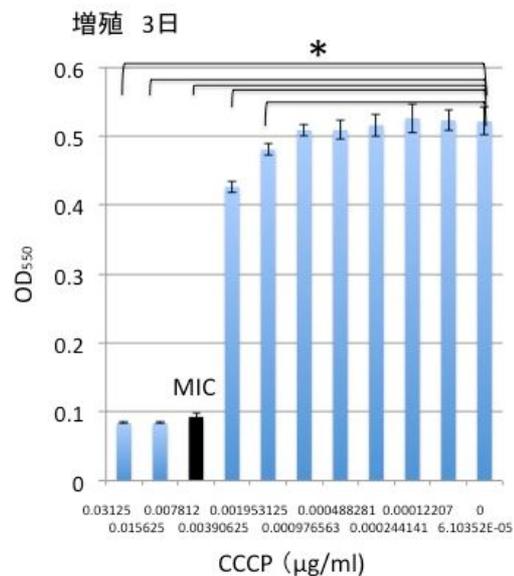


図 3 CCCP が *P. gingivalis* の増殖に与える影響

(3) 薬剤排出ポンプ阻害剤が *P. gingivalis* のバイオフィーム形成に及ぼす影響

PA N は *P. gingivalis* のバイオフィーム形成を抑制しなかった(図 4)。また、CCCP は 0.001953 $\mu\text{g/ml}$ 以上で *P. gingivalis* のバイオフィーム形成を抑制した(図 5)。

バイオフィーム 3日

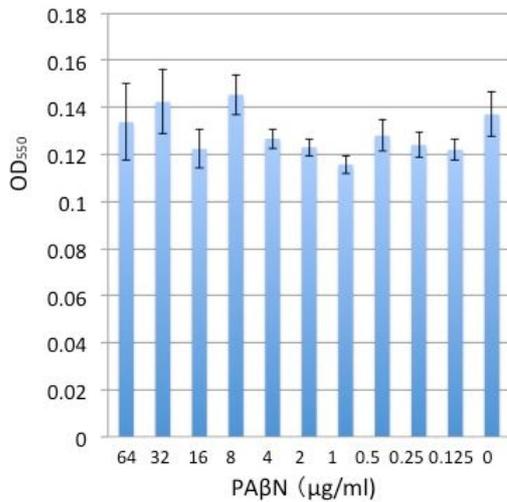


図4 PABNが *P. gingivalis* のバイオフィーム形成に与える影響

バイオフィーム 3日

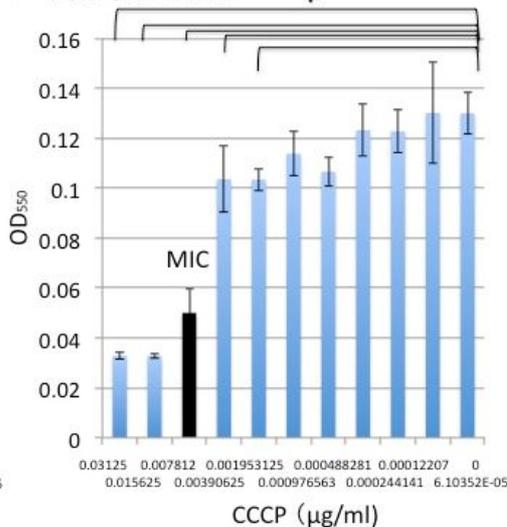


図5 CCCPが *P. gingivalis* のバイオフィーム形成に与える影響

(4) 薬剤排出ポンプ阻害剤が *P. gingivalis* のエリスロマイシン感受性に及ぼす影響

エリスロマイシンのMICは4 μg/mlのPABN, 0.000976563 μg/mlのCCCP添加時とも、0.0125 μg/mlであった。

これらの結果より、*P. gingivalis* ATCC 33277株には、バイオフィーム形成および抗菌薬抵抗性に関与する可能性がある薬剤排出ポンプをコードする遺伝子に相同性を持つ遺伝子が存在するものの、増殖を抑制しない濃度の薬剤排出ポンプ阻害剤は、バイオフィーム形成およびエリスロマイシン感受性に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

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3件)

1. Yamamoto R, Noiri Y, Yamaguchi M, Asahi Y, Maezono H, Ebisu S, Hayashi M. Inhibition of polysaccharide synthesis by the *sinR* orthologue PGN_0088 is indirectly associated with the penetration of *Porphyromonas gingivalis* biofilms by macrolide antibiotics. *Microbiology*. 161:422-429, 2015. 査読有
2. Asahi Y, Noiri Y, Miura J, Maezono H, Yamaguchi M, Yamamoto R, Azakami H, Hayashi M, Ebisu S. Effects of the tea catechin epigallocatechin gallate on *Porphyromonas gingivalis* biofilms. *Journal of Applied Microbiology*. 116:1164-1171, 2014. 査読有
3. 山口幹代, 野村由一郎. 根尖性歯周炎と細菌-バイオフィーム形成を中心に-. *歯科医療*, 27: 27-34, 2013. 査読無

〔学会発表〕(計2件)

1. Yamamoto R, Noiri Y, Yamaguchi M, Asahi Y, Maezono H, Kuboniwa M, Hayashi M, Ebisu S. Role of PGN_0088 of *Porphyromonas gingivalis* Biofilm Formation. 2nd Meeting of the Association for Dental Research - Asia Pacific Region, August 22, 2013, Plaza Athenee, Bangkok, Thailand.
2. Yamaguchi M, Noiri Y, Ito Y, Komichi S, Hayashi M. Investigation on factors causing refractory periapical periodontitis in general practices. The 9th World Endodontic Congress, May 26, 2013, Tokyo International Forum, Chiyodaku, Tokyo.

6. 研究組織

(1)研究代表者

山口 幹代 (YAMAGUCHI MIKIYO)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号: 30523089