

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 8 月 31 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462804

研究課題名(和文) 歯周病原細菌の産生する短鎖脂肪酸が病原性に与える影響の解明と制御

研究課題名(英文) Elucidation and control of effect of short chain fatty acids on periodontopathogens

研究代表者

吉田 康夫 (Yoshida, Yasuo)

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：10315096

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病原細菌が産生する酪酸等の短鎖脂肪酸は、重度の歯周病患者の歯周ポケット内においては、健康人の10倍程度の高濃度で検出される。また、ヒト培養細胞にアポトーシスを起こす、バイオフィルム形成を促進する、感染ウイルスを活性化する等の作用が示唆されている。本研究課題では、酪酸産生酵素のリード化合物を利用した短鎖脂肪酸産生の抑制薬物の開発を目指すために、主に歯周病原細菌における短鎖脂肪酸の産生酵素を単離精製し、その酵素学的な特徴を明らかにすることによって、酪酸およびプロピオン酸合成機構を分子レベルで明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The concentration of short chain fatty acids (butyrate et al.), which is produced in the periodontal pockets, are approximately ten times more than that in the healthy pockets. In addition, butyrate induces apoptosis in human cells, including gingival fibroblasts and in T and B cells, and the molecule activates virus infected in human. In this study, to develop the medications that are inhibitors for enzymes associated with butyrate production, molecular basis on production of butyrate and propionate were elucidated by clarifying the properties of the purified enzymes.

研究分野：歯学

キーワード：短鎖脂肪酸 歯周病 Porphyromonas gingivalis 酪酸

## 1. 研究開始当初の背景

細菌は様々な代謝産物を産生して、菌体外に放出することが知られている。代表的な歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* の培養上清中に含まれる酪酸等の短鎖脂肪酸は、上皮細胞や免疫細胞にアポトーシスを起こして、歯周病の発症や進行に悪影響を与え、エイズウイルスや EB ウイルスの活性化に関与している。プロピオン酸や酪酸の歯肉溝内の濃度は、重度の歯周病患者の歯周ポケットでは健常人の 10 倍程度増加しており、歯周病のマーカーとしても臨床的に有用であることが示唆されている。しかし、歯肉溝滲出液の採取量はわずかなので、従来使用されてきたガスクロマトグラフィーとその検出器の検出感度では、臨床検体を解析することは困難であった。また、上記のように、酪酸等の短鎖脂肪酸の病原性についての *in vitro* な研究や臨床的な研究は行われてきたが、現在のところ、その産生に関与する酵素の同定はされておらず、また、それらの先行研究も純品である酪酸または培養上清を培養細胞等に *exogenous* に添加することによって得られたデータであり、歯周病原細菌における酪酸の働きを正確に理解するのは困難であった。

## 2. 研究の目的

### i) 歯周病原細菌による酪酸合成のメカニズムの解明

現在のところ、酪酸合成メカニズムの詳細は不明のままである。そこで、本研究課題で、その合成タンパク質の同定を行い、同タンパク質の組換えタンパク質を精製し、酵素学的性質を GC/MS および LC/MS 比色法を用いて明らかにする。現時点で、2 種類の候補タンパク質を GST-融合タンパク質として精製済みであ

る。

### ii) 歯周病原細菌による酪酸がバイオフィーム形成および与える影響と歯周組織への為害性への検討

酪酸が放線菌等の口腔微生物のバイオフィーム形成を促進するというデータが示唆されているが、そのメカニズム等については不明なままである。酪酸非産生株を用いて、口腔細菌のバイオフィーム量の変化を詳細に検討し、その関連タンパク質の同定を 2 次元電気泳動と TOF/MS 解析にて行う。

従来行われてきた免疫細胞や上皮細胞への為害性の研究は、*exogenous* に酪酸を添加する方法で行われており、そのような為害性が酪酸以外の要因に因るかどうかは不明なままである。上記の *P. gingivalis* の酪酸非産生株は、そのような生体細胞に対する酪酸の再検証するために有用である。

## 3. 研究の方法

本計画は、A. 酪酸産生酵素の産生メカニズムの解明、B. 歯周病細菌由来の酪酸のバイオフィーム形成や病原性に対する影響の 2 つのサブプロジェクトから構成された。3 年間の研究期間において、歯周病細菌の酪酸産生機構に関する遺伝子発現や酵素学的性質の決定等の基礎科学的な知見を得ながら、歯周病の発症や進行に与える影響を検討し、最終的に診断ツールや制御薬の開発を目指すものである。

## 4. 研究成果

*pgn0724* 遺伝子不活化株の培養上清において、野生株と比較して酪酸濃度は約 6 割に減少した。一方で、プロピオン酸濃度は約 6 倍に増加した。また *Pgn0724* 組換えタンパク質を用い、*succinyl-semialdehyde* と NADH を基質に酵素反応を行うと、NADH の消費が確認された。以

上の結果から、*P. gingivalis* において、succinyl-semialdehyde から 4-hydroxybutyrate を産生する反応には *pgn0724* 遺伝子が関与しており、また NADH 濃度依存的なものであると示唆された。同様の手法で *pgn0723* 遺伝子の生物学的役割と酵素学的な特徴について、詳細な結果を得た。

さらに、組換え PGN\_0725、PGN\_1341 および PGN\_1888 の機能解析

酪酸を産生する腸内細菌である *Roseburia hominis* の酪酸産生に関与する CoA 転移酵素と相同性を示す PGN\_0725 (39%)、PGN\_1341 (24%) および PGN\_1888 (42%) の組換えタンパク質を、それぞれ、大腸菌を用いて精製した。butyryl-CoA と酢酸ナトリウムを基質にしてそれぞれの酵素を反応させ、産生された短鎖脂肪酸を GC-MS にて、acetyl-CoA を比色法にて評価したところ、いずれの組換えタンパク質も酵素活性を有し、酪酸と acetyl-CoA を産生した。一方、propionyl-CoA と酢酸ナトリウムを基質にしたところ、PGN\_0725 および PGN\_1888 はプロピオン酸産生活性を有したが、PGN\_1341 は有しなかった。

PGN\_0725、PGN\_1341 および PGN\_1888 遺伝子不活化株の作製と機能解析

PGN\_0725、PGN\_1341 および PGN\_1888 遺伝子をエリスロマイシン、テトラサイクリン、アンピシリン耐性遺伝子を用いて不活化し、二重変異株や三重変異株を含め、7株の変異株を作製した。それらの変異株から得た粗酵素抽出液を得て、butyryl-CoA または propionyl-CoA と反応させたところ、PGN\_0725、PGN\_1341 および PGN\_1888 遺伝子のいずれかを不活化すると、野生株と比較し、酪酸およびプロピオン酸の産生能が有意に低下した。酪酸の産生に関しては PGN\_0725 を欠損させた変異株が、プロピオン酸に関しては PGN\_1888 を欠損させた変異株が、他の遺伝子の欠損株より有意に短鎖脂肪酸の産生能が低下した<sup>3)</sup>。

*P. gingivalis* は糖非発酵性でタンパク質を分解してエネルギー源にする。そこで、作製した短鎖脂肪酸の代謝酵素に関与する遺伝子欠損株と、同菌のプロテアーゼであるジンジパイン活性の関連を検討したところ、菌体表層のアルギニンジンジパインとリシンジンジパインの活性は、上清中に放出される酪酸の濃度と強い正の相関がみられた。

## 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 17 件)

K. Nagano, Y. Hasegawa, Y. Yoshida, and F. Yoshimura. Comparative analysis of motility and other properties of *Treponema denticola* strains. *Microb Pathog*, 102: 82-88, 2017. 査読あり

K. Nagano, Y. Hasegawa, Y. Yoshida, and F. Yoshimura A novel fimbrilin of PGN\_1808 in *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS ONE*, 12(3):e0173541, 2017. 査読あり

Y. Yoshida, M. Sato, Y. Kezuka, Y. Hasegawa, K. Nagano, J. Takebe and F. Yoshimura. Acyl-CoA reductase producing succinate semialdehyde from succinyl-CoA in the butyrate production of *Porphyromonas gingivalis*. *Arch. Biochim. Biophys.*, 596:138-148, 2016. 査読あり

Y. Hasegawa, K. Nagano, Y. Yoshida, N. Kikuchi, K. Persson, R. J. Lamont, A. Mitani, and F. Yoshimura. A role of Mfa5 for expression of Mfa1 fimbriae in *Porphyromonas gingivalis*. *J. Dent. Res.*, 95: 1291-1297, 2016. 査読あり

M. Sato, Y. Yoshida, Y. Hasegawa, K. Nagano, J. Takebe and F. Yoshimura. Three CoA transferases involved in the production of short chain fatty acids in *Porphyromonas gingivalis*. *Front Microbiol*, 7:1146, 2016.

査読あり

H. Konno, Y. Yoshida, K. Nagano, Y. Hasegawa, Y. Nakamura, Y. Tanaka and F. Yoshimura. Quantification of bacterial biofilms on different thermoplastic denture base resins using immunoblotting with enhanced chemiluminescence. *Aichi Gakuin Dent. Sci.*, 28:11-18, 2015. 査読あり

K. Nagano, Y. Hasegawa, Y. Yoshida, and F. Yoshimura. A major fimbriin variant of Mfa1 fimbriae in *Porphyromonas gingivalis*. *J. Dent. Res.*, 94: 1143-1148, 2015. 査読あり

Y. Yoshida, M. Sato, K. Nagano, Y. Hasegawa, T. Okamoto and F. Yoshimura. Production of 4-hydroxybutyrate from succinate semialdehyde in the butyrate biosynthesis of *Porphyromonas gingivalis*. *Biochim. Biophys. Acta (General subjects)*, 1850:2582-2591, 2015. 査読あり

H. Konno, Y. Yoshida, K. Nagano, Y. Hasegawa, Y. Nakamura, J. Takebe and F. Yoshimura. (in Japanese). The function of the cyclic nucleotides in oral bacteria. *Bacterial Adherence & Biofilms (in Japanese)*, 29: 65-69, 2015. 査読なし

R. Ikai, Y. Hasegawa, M. Izumigawa, K. Nagano, Y. Yoshida, N. Kitai, R. J. Lamont, F. Yoshimura and Y. Murakami. Mfa4, an accessory protein of Mfa1 fimbriae, modulates fimbrial biogenesis, cell auto-aggregation, and biofilm formation in *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS ONE* 10: e0139454, 2015. 査読あり

Y. Yoshida, H. Konno, K. Nagano, Y. Abiko, Y. Nakamura, Y. Tanaka, and F. Yoshimura. The influence of a

glucosyltransferase, encoded by *gtfP*, on biofilm formation by *Streptococcus sanguinis* in a dual-species model. *APMIS*. 122: 951-960, 2014. 査読あり

J. Yang, Y. Yoshida, and J. O. Cisar. Genetic basis of coaggregation receptor polysaccharide biosynthesis in *Streptococcus sanguinis* and related species. *Mol. Oral Microbiol.* 29: 24-31, 2014. 査読あり

Y. Abiko, K. Nagano, Y. Yoshida, and F. Yoshimura. Major membrane TDE2508 regulates adhesive potency in *Treponema denticola*. *PLoS ONE*. 9(2):e89051, 2014. 査読あり

Y. Yoshida, J. Yang, K. Nagano, F. Yoshimura, and J. O. Cisar. Cell surface coaggregation receptor polysaccharide of oral streptococci. *J. Oral Biosci.* 56: 125-130, 2014. 査読あり

Y. Kezuka, Y. Yoshida, and T. Nonaka. Crystal structure of hydrogen sulfide-producing enzyme from a periodontal pathogen. *Photon Factory Activity Rep. Part B* 31, 4341 (2014). 査読なし

Y. Abiko, K. Nagano, Y. Yoshida, and F. Yoshimura. Characterization of *Treponema denticola* mutants defective in major antigenic proteins of Msp and TmpC. *PLoS ONE* 9(11): e113565, 2014. 査読あり

K. Nagano, Y. Yoshida, Y. Hasegawa, and F. Yoshimura. Characterization of the third fimbriae (53K fimbriae) in the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* (in Japanese). *Bacterial Adherence & Biofilms*. 28: 71-78, 2014. 査読なし

[学会発表](計12件)

Yoshida Y, Sato M, Kezuka Y, Hasegawa Y, Nagano K, Takebe J, Yoshimura F.

*Porphyromonas gingivalis* における ATP 産生に関する phosphotransacetylase および acetate kinase の酵素学的解析. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌). 2016. 8. 24.

佐藤満成, 吉田康夫, 永野恵司, 長谷川義明, 武部純, 吉村文信. 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* における短鎖脂肪酸分泌とジンジパイン産生機構の関連. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌). 2016. 8. 24.

毛塚雄一郎, 吉田康夫. *Porphyromonas gingivalis* の酪酸産生に関する Succinyl-CoA 還元酵素の構造機能解析. 第 58 回歯科基礎医学会学術大会・総会 札幌コンベンションセンター (北海道・札幌). 2016. 8. 24.

Sato M, Yoshida Y, Nagano K, Hasegawa Y, Takebe J, Yoshimura F.

Characterization of CoA-transferases for propionic acid production in *Porphyromonas gingivalis*. 第 89 回日本細菌学会総会 大阪国際交流センター (大阪府・大阪市). 2016. 3. 23.

Yoshida Y, Sato M, Hasegawa Y, Nagano K, Takebe J, Yoshimura F PGN\_0723 producing succinate semialdehyde in the butyrate production in *Porphyromonas gingivalis*. 第 89 回日本細菌学会総会 大阪国際交流センター (大阪府・大阪市). 2016. 3. 23.

佐藤満成, 吉田康夫, 永野恵司, 長谷川義明, 武部純, 吉村文信. 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の短鎖脂肪酸産生機構に関する 3 種の CoA-transferase に関する分子生物学的研究. 2015. 12. 6. 第 87 回学術大会愛知学院大学歯学会 愛知学院大学 (愛

知県・名古屋)

吉田康夫, 佐藤満成, 永野恵司, 長谷川義明, 吉村文信 *Porphyromonas gingivalis* の酪酸産生機構に関する Succinyl-CoA 還元酵素の酵素学的解析. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市). 2015. 9. 12.

佐藤満成, 吉田康夫, 永野恵司, 長谷川義明, 武部純, 吉村文信. 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の酪酸産生機構に関する CoA-transferase に関する研究. 第 57 回歯科基礎医学会学術大会・総会 朱鷺メッセ (新潟県・新潟市). 2015. 9. 12.

佐藤満成, 吉田康夫, 永野恵司, 長谷川義明, 金野弘靖, 中村好徳, 田中貴信, 吉村文信. 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の短鎖脂肪酸産生機構の研究. 第 88 回日本細菌学会総会 長良川国際会議場 (岐阜県・岐阜市). 2015. 3. 26.

吉田康夫, 永野恵司, 長谷川義明, 中村好徳, 田中貴信, 吉村文信.

*Porphyromonas gingivalis* の酪酸産生機構に関する新規 CoA 転移酵素の同定とその酵素学的解析. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会 福岡国際センター (福岡県・福岡市). 2014. 9. 27.

佐藤満成, 吉田康夫, 金野弘靖, 永野恵司, 安彦友希, 中村好徳, 田中貴信, 吉村文信. 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の酪酸産生機構の解明. 第 44 回日本嫌気性菌感染症学会学術集会 沖縄県医師会館 (沖縄県・南風原町). 2014. 2. 22.

吉村文信, 吉田康夫, 佐藤満成, 安彦友希, 永野恵司. 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の酪酸産生機構. 第 43 回東海乳酸菌研究会 中日ビル (愛知県・名古屋). 2014. 2. 8.

{ 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

吉田康夫 (YOSHIDA Yasuo)

愛知学院大学・歯学部・准教授

研究者番号：10315096

(2)研究分担者

吉村文信 (YOSHIMURA Fuminobu)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：50001962

石原裕一 (ISHIHARA Yuichi)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：50261011

毛塚雄一郎 (KEZUKA Yuichiro)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：50397163