

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592721

研究課題名(和文) 歯周病原細菌由来アミノ酸代謝物によるバイオフィルム形成能と病原性への影響の解明

研究課題名(英文) Elucidation of metabolites from periodontopathogenic bacteria on their biofilm formation and virulence.

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) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：インドールなどの代謝産物は、細菌のバイオフィルムの形成に影響を与える。本研究課題では、歯周病細菌のインドール産生酵素であるトリプトファン分解酵素についての研究を行った。まず、歯周病細菌の一種である *Prevotella intermedia* のトリプトファン分解酵素を精製して、その酵素学的な性質を明らかにした。また、22種の *Prevotella* 種のインドール産生能および関連遺伝子の有無について検討を行った。次年度以降は、環状ジヌクレオチドである、Cyclic-di-GMPの合成タンパク質と分解タンパク質に着眼して、それらの酵素を精製し、その機能について検討を行った。

研究成果の概要(英文)：Metabolites, including indole, have an effect on bacterial biofilm formation. In this study, study on tryptophanase producing indole was performed. Tryptophanase of *Prevotella intermedia*, which is one of periodontopathogenic bacteria, was purified and enzymatically characterized. In addition, capacity to produce indole and existence of the gene encoding tryptophanase were examined in 22 *Prevotella* species. Also, proteins to degrade and produce cyclic-di-nucleotides also investigated.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学

キーワード：代謝産物 歯周病 バイオフィルム

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は、口腔微生物が歯面および軟組織の表層に付着しバイオフィルムを形成することによって惹起される。それ故に、歯周病の制御には口腔内バイオフィルム形成メカニズムの解明は欠かすことができない。近年、浮遊性の細菌がバイオフィルムとして固相に定着する際、様々な低分子量のクォラムセンシング分子が重要な働きを持つことが明らかとなった。

申請者は代表的な口腔内の有臭物質として認識されてきたインドールに着眼し、*Porphyromonas gingivalis* や *Fusobacterium nucleatum* などの歯周病原細菌がトリプトファンを基質として非常に多量のインドールを産生することを明らかにし、さらにその産生機構を分子生物学的に解明した。さらに、インドールやその基質となるトリプトファンが、クォラムセンシング分子としての働き菌体のバイオフィルム形成能に大きく関与していることを示した。

一方、細菌は環状ヌクレオチドをその細胞質内に産生して、病原性やバイオフィルム形成能していることが近年明らかとなった。しかし、口腔内の環状ヌクレオチドの産生や合成に関与する酵素は報告されていない。また、それらの分子がどのように病原性やバイオフィルム形成能に影響を及ぼすかは不明であった。

## 2. 研究の目的

### i) インドールおよびトリプトファンによるバイオフィルム形成促進のメカニズムの解明

インドールおよびトリプトファンが *F. nucleatum* のどのタンパク質によって認識され、どのようにタンパク質の発現に変化があるかを検討する。また、インドールによって発現が誘導される分子と抑制される分子を同定するために、インドール産生酵素遺伝子を不活化した変異株と野生株で、発現されたタンパク質の違いを検討する。一方、宿主側の影響をみるために、歯肉繊維芽細胞に対するインドールの働きを検討する。

### ii) 環状ジヌクレオチドの産生機構とその影響の影響の検討

環状ジヌクレオチドである cyclic-di-GMP の存在下において口腔微生物を培養して、バイオフィルム形成能に与える影響を検討する。

## 3. 研究の方法

インドールおよびトリプトファンによるバイオフィルム形成促進のメカニズムの解明するために、それらの分子にて発現量が促進あるいは抑制されるタンパク質を 2 次元電気泳動法後、TOF-MS によるスポット解析にて同定する。この実験は、インドール産生酵素をコードする *tnaA* 遺伝子を不活化した株を作製したものを使用して、同様の実験を行った。

環状ジヌクレオチドを様々な濃度で培地に加えて、ポリスチレンプレート上にバイオフィルムを形成させ、クリスタルバイオレットを用いて比色法にてバイオフィルム量を定量した。

## 4. 研究成果

初年度では、*Prevotella* 種におけるトリプトファン分解酵素をコードする遺伝子(*tnaA*)と同酵素の機能について検討した。*P. intermedia* ATCC 25611 における *tnaA* 遺伝子は大腸菌を用いた組換えタンパク質として精製し、その酵素的性質を明らかにした。一方、*P. intermedia* において *tnaA* の転写単位を RT-PCR 法により検討した。また、22 種の *P. intermedia* において、そのインドール産生能を測定し、サザンハイブリダイゼーション法にて *tnaA* の有無について調べた。*P. intermedia* のトリプトファナーゼは、*F. nucleatum* や *P. gingivalis* のものと比較して、インドール産生能は低かったが、類似の性質を示した。同菌の *tnaA* は単独で転写されていた。22 種の *P. intermedia* のうち、6 種がインドール産生を示し、そのいずれもが *P. intermedia* 由来 *tnaA* とハイブリダイズする遺伝子を有した。残りの 16 種においては、インドール産生能も *tnaA* 遺伝子の

存在も認められなかった。*Prevotella micans* はインドール産生能を有するにも拘わらず、16S rRNA 遺伝子を利用した系統樹解析において、インドール非産生グループに属した。このことは、同菌の *tnaA* 遺伝子は比較的近年に他の *P. intermedia* 種から移動したことが示唆された。

次に、細菌が産生する環状ヌクレオチドである cyclic-di-GMP が、口腔内細菌のバイオフィルム形成能や病原性の発現にどのような影響を与えるかを検討した。cyclic-di-GMP はう蝕原因細菌である *Streptococcus mutans* の野生株が形成するバイオフィルムを減少させた。Real-time 定量 PCR の結果、同菌の付着能と深く関わりのある不溶性グルカンの発現に関与する遺伝子である、*gtfB* および *gtfC* の発現量が有意に減少していることが明らかとなった。一方、水溶性グルカンの合成酵素である GtfD をコードする遺伝子の発現量には変化を与えなかった。また、そらのグルカン合成遺伝子 *gtfB*、*gtfC* および *gtfD* のすべてを不活化した変異株においても、バイオフィルムの形成が抑制されたことから、グルカン合成以外の付着に関与する分子にも影響を与えることが示唆された。

さらに、*T. denticola* の TDE2725 の一次構造が c-di-GMP の合成に関与する GGDEF motif を含むことに注目し、この組換えタンパク質を精製し、その酵素学的活性の検討を行った。その後、TDE2725 遺伝子の不活化を試み、その形態や性状の解析を行った。方法として、TDE2725 の組換えタンパク質 pGEX6p-1 ベクターを用いて精製し、GTP を基質として酵素反応を行い、産生される c-di-GMP HPLC にて分離し、解析した。また、TDE2725 遺伝子の欠失変異株は、同遺伝子をエリスロマイシン耐性遺伝子に置換して作製した。その変異株においてポリエチレンプレートを用いた付着能試験および軟寒天培地を用いた運動能試験を行い、野生株との比較検討を行った。また、走査型電子顕微鏡および透過型電子顕微鏡により形態

の観察を行った。本研究における TDE2725 タンパク質の反応条件においては、GTP を基質として c-di-GMP は検出されず、TDE2725 は c-di-GMP の合成に関与していない可能性が示唆された。変異株と野生株と比較して、発育曲線、運動能、性状、形態には顕著な違いは認められなかったが、付着能が減少する傾向が認められた。この所見から、TDE2725 遺伝子は *T. denticola* の付着関連機能を持つ可能性が示唆された。

## 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 12 件 )

1. K. Nagano, Y. Abiko, Y. Yoshida, and F. Yoshimura. Comparative analyses for DNA sequence of *fimA* and antigenicity of FimA fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* strains. *Mol. Oral Microbiol.*, 28: 392-403, 2013.
2. Y. Kezuka, Y. Yoshida, and T. Nonaka. Crystal structures of  $\beta$ C-S lyase from *Streptococcus anginosus* in complex with its reaction intermediates. *Photon Factory Activity Rep. Part B* 30, 275, 2013.
3. Y. Hasegawa, K. Nagano, R. Ikai, M. Izumigawa, Y. Yoshida, N. Kitai, R. J. Lamont, Y. Murakami, and F. Yoshimura. Localization and function of the accessory protein Mfa3 in *Porphyromonas gingivalis* Mfa1 fimbriae. *Mol. Oral Microbiol.*, 28: 467-480, 2013.
4. A. Yano, S. Kikuchi, T. Takahashi, K. Kohama, and Y. Yoshida. Inhibitory effects of the phenolic fraction from the pomace of *Vitis coignetiae* on biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Arch. Oral Biol.*, 57: 711-719, 2012.
5. A. de Toledo, E. Nagata, Y. Yoshida, and T. Oho. *Streptococcus oralis* coaggregation

- receptor polysaccharides induce inflammatory responses in human aortic endothelial cells. *Mol. Oral Microbiol.*, 27: 295-307, 2012.
6. Y. Kezuka, Y. Yoshida, and T. Nonaka. Structural insights into catalysis of by  $\beta$ C-S lyase from *Streptococcus anginosus*. *Proteins*, 80: 2447-2458, 2012.
  7. K. Nagano, Y. Abiko, Y. Yoshida, and F. Yoshimura. *Porphyromonas gingivalis* FimA fimbriae: Roles of *fim* gene cluster in the fimbrial assembly and antigenic heterogeneity among *fimA* genotypes. *J. Oral Biol*, 54: 160-163, 2012.
  8. K. Nagano, H. Hasegawa, Y. Abiko, Y. Yoshida, Y. Murakami, and F. Yoshimura. Differential antigenicity of FimA fimbriae among the genotypes in *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS ONE*. e43722, 2012.
  9. Y. Kezuka, N. Abe, Y. Yoshida, and T. Nonaka. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of two hydrogen sulfide-producing enzymes from *Fusobacterium nucleatum*. *Acta. Cryst. F68*: 1504-1510, 2012.
  10. Y. Yoshida, K. Suwabe, K. Nagano, Y. Kezuka, H. Kato, and F. Yoshimura. Identification and enzymic analysis of a novel protein associated with production of hydrogen sulfide and L-serine from L-cysteine in *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586. *Microbiology-SGM*, 157: 2164-2171, 2011.
  11. T. Sasaki-Imamura, Y. Yoshida, K. Suwabe, F. Yoshimura, and H. Kato. Molecular basis of indole production catalyzed by tryptophanase in the genus *Prevotella*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 322: 51-59, 2011.
  12. K. Suwabe, Y. Yoshida, K. Nagano, and F. Yoshimura. Identification of an L-methionine  $\gamma$ -lyase involved in the production of hydrogen sulfide from L-cysteine in *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* ATCC 25586. *Microbiology-SGM*, 157: 2992-3000, 2011.
- [学会発表](計10件)
1. Yoshida Y, Yang J, Nagano K, Abiko Y, Yoshimura F, Cisar JO: Cell surface coaggregation receptor polysaccharide in *Streptococcus sanguinis*. 第55回歯科基礎医学学会学術大会・総会(岡山), 2013.9.20.
  2. 吉田康夫: 口腔微生物のバイオフィルム形成および病原性の発現における環状ヌクレオチドの効果. 日本細菌学会 第7回若手研究者育成のためのワークショップ「若手研究者によるバイオフィルム研究ワークショップ」(東京), 2013.6.2.
  3. 金野弘靖, 吉田康夫, 中村好徳, 田中貴信, 吉村文信: 口腔内レンサ球菌が形成するバイオフィルムにおける cyclic di GMP の影響. 第86回日本細菌学会総会(千葉), 2013.3.18.
  4. Kezuka Y, Yoshida Y, Nonaka T: Structure analysis of hydrogen sulfide-producing enzyme complexed with its reaction intermediates from a periodontal pathogen. A Joint Meeting of the Asian Crystallographic Association and Society of Crystallographers in Australia and New Zealand (Adelaide, Australia), 2012.12.3.
  5. 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: *Streptococcus sanguinis* 由来グルカン合成タンパク質のバイオフィルム形成に与える影響. 第49回中部支部総会(金沢), 2012.11.10.
  6. 金野弘靖, 吉田康夫, 中村好徳, 田中貴信, 吉村文信: 口腔細菌が形成するバイオフィルムにおける cyclic-di-GMP の影響. 第54回歯科基礎医学学会学術大会・総会(福島), 2012.9.15.

7. Suwabe K, Yoshida Y, Ito S, Nagano K, Yaegashi T, Yoshimura F: Identification and characterization of different 4 enzymes to produce H<sub>2</sub>S in *Fusobacterium nucleatum*. 第 85 回日本細菌学会総会 (長崎), 2012.3.29.
8. Yoshida Y, Suwabe K, Nagano K, Abiko Y, Kikuchi K, Yoshimura F: Identification of oral streptococcal adhesin related to coaggregation with other oral streptococci. 第 85 回日本細菌学会総会 (長崎), 2012.3.27.
9. 金野弘靖, 岩井孝充, 中村好徳, 津田賢治, 吉田康夫, 吉村文信, 河合達志, 田中貴信: ノンクラスプデンチャー床用材料に対する *Streptococcus gordonii* の付着に関する検討. 平成 23 年度日本補綴歯科学会東海支部学術大会. 2011.10.2.
10. 吉田康夫, 今村隆子, 須和部京介, 加藤裕久, 吉村文信: *Prevotella* 種によるのインドル産生能の分子生物学的解明. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会 (岐阜), 2011.10.1.

〔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

永野恵司 (Nagano, Keiji)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号 : 60367620

長谷川義明 (Hasegawa, Yoshiaki)

朝日大学・歯学部・講師

研究者番号 : 70460524