

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659812

研究課題名(和文) シクロデキストリン依存的な口腔細菌の全身伝播機構の解析

研究課題名(英文) Role of cyclodextrin in oral bacteria-associated systemic illness

研究代表者

川端 重忠 (KAWABATA, SHIGETADA)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50273694

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：シクロデキストリン(CD)は、上皮細胞膜上のコレステロールを包接し、メタロプロテアーゼ依存的な上皮バリア破壊シグナルを誘導する。本研究では、歯周病原性細菌が口腔内に豊富に存在するデンプンやグリコーゲン等の α -グルカンからCDを産生することを明らかにした。これらの結果から、口腔細菌によるCD産生は粘膜上皮透過性を亢進させ、口腔常在細菌の全身伝播に寄与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Alpha-glucans such as starch and glycogen are abundant in the human oral cavity. Degradation of alpha-glucans by alpha-glucanotransferase (CGTase) enzymes leads to the cyclodextrins (CDs) production. CDs induce a cholesterol-depleted membrane and a destabilization of the barrier function of tight junctions in host cells. We demonstrated that *Porphyromonas gingivalis*, a periodontal pathogen, utilize alpha-glucans to produce CDs. Our data suggest that *P. gingivalis*-produced CDs contribute to the pathogenesis of oral bacteria-associated systemic illness.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔細菌 シクロデキストリン 上皮バリア

1. 研究開始当初の背景

口腔レンサ球菌は、口腔内で豊富に存在するデンプンやグリコーゲン等の α -グルカン分解し、エネルギー産生に利用する。 α -グルカンからシクロデキストリン α -グルカノトランスフェラーゼ (CGTase) の作用により得られるシクロデキストリン (CD) は、外側が親水性、内部空洞が疎水性のドーナツ状構造を呈する。その空洞内にゲスト分子を取り込み、包接化合物を形成することによりゲスト分子の安定性および溶解性の改善に寄与する。CD は局所刺激性が低く、生体内では速やかにグルコースに代謝されることから、食品、医薬品、化粧品など多岐に渡り利用されている。しかしながら、近年の報告により、水溶性の高い天然型 CD のメチル化体は上皮細胞からコレステロールを包接除去し、メタロプロテアーゼ依存的なタイトジャンクションの可逆的分解と細胞間隙透過性の上昇を誘導することが明らかになってきている (Casas *et al.*, 2010. *Exp Cell Res*, 316: 353-365)。一部の病原性の高い *Streptococcus* 属では、細菌の組織侵入機構の一つとして上皮細胞間を介する経路が報告されている (Sumitomo *et al.*, 2011. *J Biol Chem*, 286: 2750-2761; Pezzicoli *et al.*, 2008. *J Infect Dis*, 198: 890-898)。興味深いことに、口腔フローラを形成する常在細菌である *Streptococcus sanguinis*, *S. mitis*, *S. oralis* のゲノム上には、推定 CGTase をコードする遺伝子が存在することを確認した。従って、口腔フローラによる CD 産生が粘膜上皮を介した口腔レンサ球菌の全身伝播に寄与する可能性が考えられた。

2. 研究の目的

高齢化社会を迎えた日本では、口腔内の常在細菌と全身疾患の関連性が注目され、口腔衛生管理の重要性が再認識されている。一般的に、基礎心疾患を持つ患者が抜歯やスケーリングなどの歯科処置を行う場合には、一過性の菌血症からの亜急性細菌性心内膜炎等の発症を防ぐ目的で抗菌薬が投与される。しかし、口腔フローラを形成する常在細菌の代謝産物が口腔粘膜細胞の透過性を高め、種々の口腔細菌の血流への侵入を促進させるのであれば、主に免疫能低下や基礎疾患が認められる患者や高齢者を対象とした新たな予防法を講ずる必要性が生じる。本研究では、口腔細菌由来 CGTase による CD の産生と口腔フローラによる全身疾患発症との関連性について解析し、CD を介した口腔細菌の全身への伝播、および簡易診断マーカーとしての CD の可能性を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 使用菌株

口腔細菌である *S. sanguinis* SK36, *S. oralis* SK23, *S. mitis* ATCC6249, *S. mutans* MT8148, *S. pyogenes* NIH35, *Porphyromonas gingivalis* W83, *P. gingivalis* ATCC33277, *P. gingivalis* 381, *P. gingivalis* HW24D1 を使用した。

(2) 組換えタンパクの作製

S. pyogenes NIH35 株および *P. gingivalis* ATCC33277 株の染色体 DNA を鋳型として、*amyA* と *cbm20* 遺伝子に特異的なプライマーを用いて、各遺伝子を PCR 法により増幅した。得られた PCR 産物は pET-32a vector (Novagen) に組み込み、*E. coli* BL21-CodonPlus (DE3)-RIPL 株 (Agilent Technologies) に形質転換した。形質転換体を 100 μ g/ml アンピシリンと 34 μ g/ml クロラムフェニコールを含む LB 培地で 37 において振盪培養した。波長 600 nm における吸光度が 0.4 に達した時点で終濃度 3 mM のイソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシドを添加し、さらに 4 時間培養した。菌体は PBS で洗浄した後、超音波で破碎した。沈殿画分は封入体洗浄液 (0.5% Triton X-100, 1 mM EDTA (pH 8.0)) で洗浄した後、8 M 尿素水溶液を加え、室温で 1 時間静置した。サンプルは溶解バッファー (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM imidazole) で透析した後、Ni-NTA 精製システム (Qiagen) により精製した。

(3) α -グルカン分解能の測定

口腔細菌は 1% デンプンを含む BHI 寒天培地に播種し、24 時間培養した。菌が生育した寒天培地にルゴール液を加え、口腔細菌によるデンプンの分解をヨウ素デンプン反応で検出した。

(4) シクロデキストリン産生量の測定

口腔細菌を 1% デンプンを含む BHI 液体培地もしくは GAM 培地に接種し、37 で一晚培養した。各菌体の培養上清と 100 μ M フェノールフタレイン水溶液を等容量混合し、25 で 15 分間反応させた後、550 nm における吸光度を測定した。なお、 β -cyclodextrin (Wako) を標準として検量線を作成し、各株から産生する CD 量を算出した。

4. 研究成果

(1) 口腔細菌は α -グルカン分解能を有する

推定シクロデキストリン α -グルカノトランスフェラーゼ (CGTase) を有することをデータベース上で確認した口腔細菌である *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. pyogenes* の 4 種と細菌性心内膜炎の主な起因菌の一つで

ある *S. mutans* について、ヨウ素デンプン反応により α -グルカン分解能を検討した(図1)。試験した全ての菌種において、デンプンの分解によるクリアゾーンが検出されたことから、 α -グルカン分解能を有することが示された。

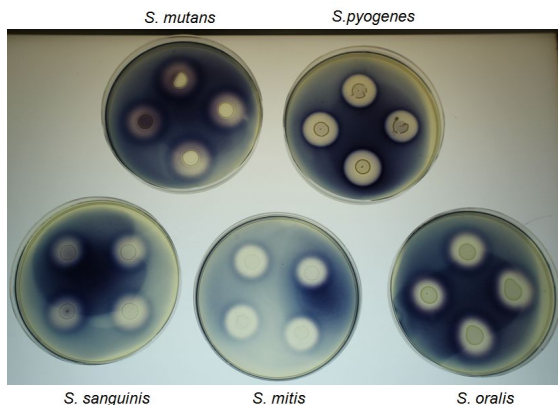


図1. 口腔細菌の α -グルカン分解能

1% 水溶性デンプン含有 BHI 寒天培地に口腔細菌の培養液を塗布した。寒天培地にヨウ素を添加し、デンプンの分解によるクリアゾーンを検出した。

(2) 一部の口腔細菌は α -グルカンから CD を産生する

α -グルカン分解能が認められた *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. pyogenes* および *S. mutans* について、 α -グルカンから CD を産生するかどうかを検討した(図2A)。*S. pyogenes* は、1% デンプンから約 250 μ M の CD を産生することが確認されたが、*S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. mitis*, および *S. mutans* からの CD 産生は認められなかった。そこで、各菌種の推定 CGTase のアライメント解析を行った結果、CD 産生が認められた *S. pyogenes* は、推定 CGTase の N 末に α -アミラーゼドメイン、C 末に starch-binding site を含む CBM20 ドメインを有することが明らかになった。一方、CD 産生が認められなかった *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. mitis*, および *S. mutans* の推定 CGTase は、N 末に α -アミラーゼドメインを有するが、C 末に CBM20 ドメインを持たないことを確認した。これらの結果から、CD 産生には CBM20 ドメインが重要であることが示唆された。また、心臓血管系疾患や誤嚥性肺炎などの全身性疾患との関連性が指摘されている *P. gingivalis* の 4-alpha-glucanotransferase は N 末に CBM20 ドメインを有することを確認した。そこで、*P. gingivalis* W83 株、ATCC33277 株、381 株、HW24D1 株の CD 産生量を測定した結果、全ての *P. gingivalis* 株は 1% デンプンから約 150 μ M の CD を産生することが明らかになった(図2B)。

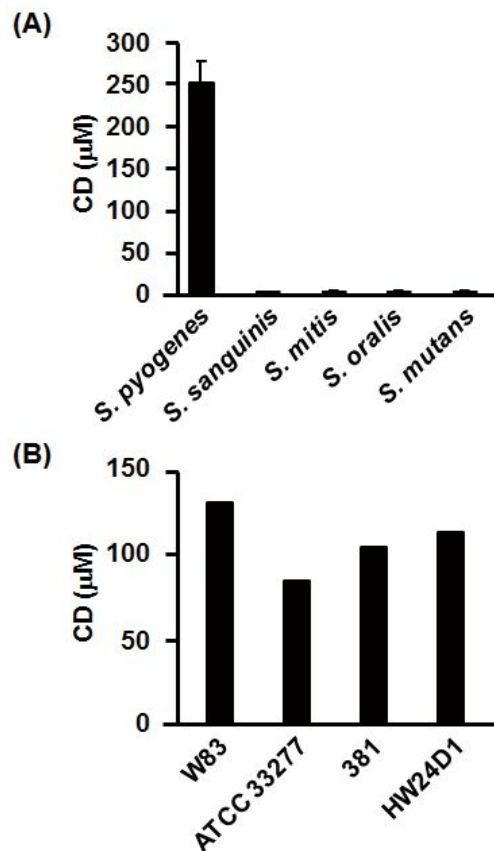


図2. 口腔細菌が産生する CD 量の測定

(A) 各種口腔レンサ球菌は 1% デンプンを含む BHI 液体培地で 37℃, 一晩培養した。培養液中に含まれる CD 量はフェノールフタレイン溶液を用いて定量した。

(B) 1% デンプンを含む GAM 培地で *P. gingivalis* を培養し、培養液中に含まれる CD 量を測定した。

(3) CGTase 活性には α -アミラーゼドメインと CBM20 ドメインが必要である

α -グルカンからの CD 産生が認められた *P. gingivalis* の推定 CGTase である 4-alpha-glucanotransferase の組換えタンパクを作製し、4-alpha-glucanotransferase と CD 産生の関連性を検討した。なお、*S. pyogenes* の推定 GTase である AmyA の組換えタンパクを作製し、陽性コントロールとして使用した。陽性コントロールである AmyA は 1% デンプンから約 210 μ M の CD を産生したが、組換え 4-alpha-glucanotransferase の CD 産生量は約 30 μ M であった(図3)。これらの結果から、 α -グルカンから CD を産生する CGTase 活性には、CBM20 ドメインだけでなく、 α -アミラーゼドメインも重要であることが明らかになった。*P. gingivalis* の 4-alpha-glucanotransferase は α -アミラーゼドメインを含まないが、唾液中の α -アミラーゼもしくは他の口腔細菌が産生する α -アミラーゼの作用により産生した直鎖状マルトデキ

ストリンを環状デキストリン (CD) に変換し、口腔粘膜バリアを傷害する可能性が示唆された。

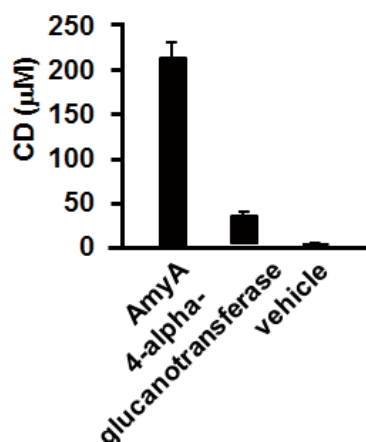


図3. 組換え CGTase による CD の産生

1% デンプン溶液と各組換えタンパク (1 µM) を等容量混合し、37 °C で 72 時間反応させた。組換えタンパクによる CD の産生量はフェノールフタレイン溶液を用いて定量した。

本研究において、歯周病原性細菌である *P. gingivalis* が α-グルカンから CD を産生することを明らかにした。歯周炎患者の歯肉組織で産生するサイトカインもまた口腔粘膜上皮の透過性を変化させ、CD との協調作用によりバリア機能を傷害すると推察される。これらの知見を基に、*P. gingivalis* による α-グルカンからの CD の産生と口腔細菌による心臓血管系疾患や誤嚥性肺炎などの全身性疾患との関連性が証明されれば、口腔内の CD をリスクファクターとして、予防医学に基づいた新たな診断法および創薬戦略を提案できると考える。

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 9 件)

1. Okahashi N, Sumitomo T, Nakata M, Sakurai A, Kuwata H, and Kawabata S. 2014. Hydrogen peroxide contributes to the epithelial cell death induced by the oral mitis group of streptococci. *PLoS One* 9(1): e88136. doi:10.1371/journal.pone.0088136.
2. Beulin DS, Yamaguchi M, Kawabata S, and Ponnuraj K. 2014. Crystal structure of PfbA, a surface adhesion of *Streptococcus pneumoniae*, provides hints into its interaction with fibronectin. *Int J Biol Macromol* 64: 168-173. doi:

10.1016/j.ijbiomac.2013.11.035.

3. Yamaguchi M, Terao Y, Mori-Yamaguchi Y, Domon H, Sakae Y, Yagi T, Nishino K, Yamaguchi A, Nizet V, and Kawabata S. 2013. *Streptococcus pneumoniae* invades erythrocytes and utilizes them to evade human innate immunity. *PLoS One* 8(10): e77282. doi: 10.1371/journal.pone.0077282.
4. Honda-Ogawa M, Ogawa T, Terao Y, Sumitomo T, Nakata M, Ikebe K, Maeda Y, and Kawabata S. 2013. Cysteine proteinase from *Streptococcus pyogenes* enables evasion of innate immunity via degradation of complement factors. *J Biol Chem* 288(22): 15854-15864. doi: 10.1074/jbc.M113.469106.
5. Sumitomo T, Nakata M, Higashino M, Terao Y, and Kawabata S. 2013. Group A streptococcal cysteine protease cleaves epithelial junctions and contributes to bacterial translocation. *J Biol Chem* 288(19): 13317-13324. doi: 10.1074/jbc.M113.459875.
6. Okahashi N, Nakata M, Sumitomo T, Terao Y, and Kawabata S. 2013. Hydrogen peroxide produced by oral streptococci induces macrophage cell death. *PLoS One* 8(5): e62563. doi: 10.1371/journal.pone.0062563.
7. Yamaguchi M, Terao Y, and Kawabata S. 2013. Pleiotropic virulence factor - *Streptococcus pyogenes* fibronectin-binding proteins. *Cell Microbiol.* 15(4): 503-511. doi: 10.1111/cmi.12083.
8. 川端重忠. 2013. 序 - 注目される劇症型細菌感染症の現状と理解 -. 特集 1 「いわゆるヒト喰いバクテリアと劇症型感染症」. 化学療法の領域 29(7):26-27 (1408-1409).
9. 住友倫子, 川端重忠. 2013. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症の発症に寄与する細菌因子. 特集 1 「いわゆるヒト喰いバクテリアと劇症型感染症」. 化学療法の領域 29(7): 1430-1437 (48-55).

[学会発表](計 15 件)

1. 中田匡宣, 住友倫子, 浜田茂幸, 川端重忠. *Streptococcus pyogenes* が産生する FCT3 型線毛の発現調節機構の解析. ワークショップ「細菌の環境シグナル受容体と遺伝子調節ネットワーク」第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 27~28 日, 東京都江戸川区・タワーホール船堀.
2. 山口雅也, 山口有可, 川端重忠, Victor Nizet. キャリアパスにおける海外留学の重要性. ワークショップ「後輩研究者諸君へ! 先輩研究者がアドバイスする研究のいろは」第 87 回日本細菌学会総会, 2014 年 3 月 27 日, 東京都江戸川区・タワーホール船堀.
3. 中田匡宣, 住友倫子, 浜田茂幸, 川端重忠. Regulation of pilous gene expression in FCT type 3 strain of *Streptococcus pyogenes* (*Streptococcus pyogenes* が産生する FCT3 型線毛の発現調節機構の解析). 第 87 回日

- 本細菌学会総会，2014年3月26～28日，東京都江戸川区・タワーホール船堀。
4. 住友倫子, 東野美晴, 中田匡宣, 川端重忠. Group A *Streptococcus* translocates across epithelial barrier via tricellular tight junctions. 第 87 回日本細菌学会総会, 2014年3月26～28日, 東京都江戸川区・タワーホール船堀.
 5. 森田知里, 住岡龍一, 中田匡宣, 住友倫子, 岡橋暢夫, 浜田茂幸, 川端重忠. Wall-anchored nuclease of *Streptococcus sanguinis* contributes to evasion of innate immunity. 第 87 回日本細菌学会総会, 2014年3月26～28日, 東京都江戸川区・タワーホール船堀.
 6. 毛利泰士, 住友倫子, 中田匡宣, 川端重忠. *Streptococcus pyogenes* の C3 様 ADP リボシルトランスフェラーゼ SpyA の機能解析 (Functional characterization of SpyA from *Streptococcus pyogenes*). 第 87 回日本細菌学会総会, 2014年3月26～28日, 東京都江戸川区・タワーホール船堀.
 7. 岡橋暢夫, 中田匡宣, 住友倫子, 寺尾豊, 川端重忠. 口腔レンサ球菌が産生する過酸化水素がマクロファージの細胞死を誘導する. 第 87 回日本細菌学会総会, 2014年3月26～28日, 東京都江戸川区・タワーホール船堀.
 8. 赤司壮一郎, Minkyung Jung, 松永哲郎, 井田智章, 藤井重元, 澤智裕, 居原秀, 川端重忠, 熊谷嘉人, 赤池孝章. 8-ニトロ-cGMPによる宿主と細菌のGAPDH制御を介する解糖系リプログラミング. 第 87 回日本細菌学会総会, 2014年3月26～28日, 東京都江戸川区・タワーホール船堀.
 9. 森田知里, 住岡龍一, 中田匡宣, 岡橋暢夫, 住友倫子, 川端重忠. *Streptococcus sanguinis* が産生するヌクレアーゼの機能解析. 第 66 回日本細菌学会関西支部総会, 2013年11月16日, 吹田市・大阪大学微生物病研究所 谷口記念講堂.
 10. 住友倫子, 中田匡宣, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌は宿主カルパインの活性化を介して上皮バリアを突破する (Group A *Streptococcus* translocates across an epithelial barrier via calpain activation). 第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 2013年9月20～22日, 岡山市・岡山コンベンションセンター.
 11. 森田知里, 住岡龍一, 中田匡宣, 岡橋暢夫, 住友倫子, 川端重忠. *Streptococcus sanguinis* の菌体表層ヌクレアーゼは自然免疫からの回避に寄与する (Extracellular nuclease form *Streptococcus sanguinis* contributes to evasion of innate immunity). 第 55 回歯科基礎医学会学術大会, 2013年9月20～22日, 岡山市・岡山コンベンションセンター.
 12. Nakata M, Kawabata S. Mode of expression and assembly mechanism of Group A Streptococcal pili. The 12th Awaji International Forum on Infection and Immunity. September 10-13, 2013. Awaji Yumebutai International Conference Center, Awaji, Hyogo, Japan.
 13. 住友倫子, 中田匡宣, 寺尾豊, 川端重忠. A 群レンサ球菌の上皮バリア突破機構に關与する宿主プロテアーゼの解析. 第 22 回 Lancefield レンサ球菌研究会, 2013年6月28～29日, 東京都港区・ホテル島根イン青山.
 14. 住岡龍一, 中田匡宣, 森田知里, 野杵由一郎, 林美加子, 川端重忠. 口腔常在レンサ球菌が産生する細胞外ヌクレアーゼの機能解析 (Functional analysis of extracellular nuclease from oral commensal *Streptococcus*). 第 138 回日本歯科保存学会 2013 年度春期学術大会, 2013年6月27～28日, 福岡市・福岡国際会議場.
 15. Sumitomo T, Nakata M, Higashino M, Terao Y, and Kawabata S. Group A streptococcal pyrogenic exotoxin B cleaves epithelial junctions and contributes to bacterial translocation. 113th General Meeting of American Society for Microbiology. May 18-21, 2013. Colorado Convention Center, Denver, CO, USA.
- 〔その他〕
ホームページ等
<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~mcrbio/>
6. 研究組織
- (1)研究代表者
川端 重忠 (KAWABATA, Shigetada)
大阪大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号：50273694
 - (2)研究分担者
寺尾 豊 (TERAO, Yutaka)
新潟大学・大学院医歯学総合研究科・教授
研究者番号：50397717
- 中田 匡宣 (NAKATA, Masanobu)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：90444497
- 住友 倫子 (SUMITOMO, Tomoko)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：50423421