

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25293426

研究課題名(和文) マルチオミクスによる口腔常在菌と歯周病細菌とのバイオフィーム形成機序の包括的解析

研究課題名(英文) Comprehensive multiomics analysis of mechanism of biofilm formation by oral normal bacterial flora and periodontopathic bacteria

研究代表者

永田 英樹 (Nagata, Hideki)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：50260641

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、有力な歯周病細菌である *Porphyromonas gingivalis* と代表的な口腔常在菌である *Streptococcus oralis* との相互作用により、両菌のバイオフィーム形成に関連するタンパク質の産生や遺伝子発現がどのように影響を受けるのかをマルチオミクスの手法を用いて解析した。その結果、両菌が相互作用することにより、産生が増加するタンパク質と減少するタンパク質を同定した。さらに、*P. gingivalis* リンゴ酸脱水素酵素欠損株は、親株と比較してバイオフィーム形成が抑制されたことから、同酵素が両菌のバイオフィーム形成に重要な役割を果たしていることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we used multiomics analysis-based approach to uncover the molecular basis of *Porphyromonas gingivalis*-*Streptococcus oralis* mixed-biofilm formation. Compared to the production profile in the *P. gingivalis* monobiofilm, production of several proteins was induced and that of some proteins was suppressed in the mixed biofilm. Similar results were obtained in mRNA level. Moreover, we constructed malate dehydrogenase-lacked *P. gingivalis*. The mutant showed less biofilm formation with *S. oralis* than the parent strain, indicating that malate dehydrogenase is important in the mixed-biofilm formation.

研究分野：予防歯科学

キーワード：バイオフィーム 歯周病細菌 口腔常在菌 マルチオミクス トランスクリプト プ

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病細菌が病原性を発揮するためには、デンタルバイオフィルムを形成し、歯周ポケット内に定着することが必要である。我々は、これまでに、*Porphyromonas gingivalis* 線毛と口腔レンサ球菌菌体表層の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) が特異的で高親和性の結合能を有することを報告した。また、この結合に参与する *Streptococcus oralis* GAPDH の活性領域はアミノ酸残基 166-183 の領域に存在し、これを基に作製したペプチドは *S. oralis* と *P. gingivalis* とのバイオフィルム形成を抑制することを示した。このペプチドは種々の口腔レンサ球菌と異なる線毛型を有する *P. gingivalis* とのバイオフィルム形成を抑制することや *Actinomyces naeslundii* などの口腔レンサ球菌以外の口腔常在菌と *P. gingivalis* とのバイオフィルム形成も阻害することも示した。さらに、*S. oralis* GAPDH は線毛以外にも *P. gingivalis* の tonB-dependent receptor protein、NAD-dependent glutamate dehydrogenase、リンゴ酸脱水素酵素 (malate dehydrogenase : MDH)、4-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase および GAPDH と特異的に結合し、それぞれをコードする遺伝子の発現は *S. oralis* GAPDH により影響を受けることを見出している。また、*P. gingivalis* の *ItpI* が情報伝達因子としてクオラムセンシングに参与し、口腔レンサ球菌とのバイオフィルム形成に参与していることも報告した。

一方、平成 23 年度～24 年度の挑戦的萌芽研究 (課題番号 23659984、研究代表者 永田英樹) において、*P. gingivalis* の増殖は口腔レンサ球菌の菌体や培養上清により抑制されることを報告した。口腔レンサ球菌が産生する酸により周囲の pH が一時的に低下し、*P. gingivalis* の生育が阻害されることが考えられるが、周囲の pH の低下が起こらない培養上清も *P. gingivalis* の増殖を抑制したことから、口腔常在菌の成分が *P. gingivalis* の生育に影響を与えていることが推測された。また、口腔レンサ球菌 GAPDH の存在下では、*P. gingivalis* の *luxS* mRNA の発現量が著しく増加することも見出している。*P. gingivalis luxS* は同菌のバイオフィルム形成に深く関ることが報告されており、口腔常在菌の菌体成分あるいは上清成分が *P. gingivalis* のバイオフィルム形成や病原因子の発現に強い影響を与えていることが推察される。このように、口腔常在菌と歯周病細菌の相互作用は、お互いに遺伝子の発現やタンパク質の産生に正負両方の影響を与え、フィードバック機構が働いてバイオフィルムや病原性の維持に参与していると推測されるが、そのメカニズムについては不明な点が多い。したがって、口腔常在菌と歯周病細菌との相互作用を調べ、それに関与する成分を同定し、その成分によるバイオフィルム形

成や病原因子の発現に及ぼす影響を包括的に解析することは、バイオフィルム形成メカニズムや歯周病病態の理解に寄与し、歯周病予防につながるものと考えられる。以上のことより、本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

歯周病細菌が病原性を発揮するためには、デンタルバイオフィルムを形成し、歯周ポケット内に定着することが必要である。我々は、これまでに、*P. gingivalis* の線毛をはじめとするいくつかの菌体表層タンパク質が口腔レンサ球菌菌体表層に存在する GAPDH と結合することや *S. oralis* GAPDH との相互作用により *P. gingivalis* の *luxS* mRNA 量が著しく増加することを明らかにした。本研究では、口腔常在菌との相互作用が、歯周病細菌のバイオフィルム形成や病原性に関連する遺伝子やタンパク質の発現に与える影響についてマルチオミクス解析により検討し、口腔常在菌と歯周病細菌のバイオフィルム形成機序を包括的に解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) バイオフィルム形成モデルのプロテオミクス

*S. oralis* ( $1.5 \times 10^9$  CFU/mL) 懸濁液に *P. gingivalis* ( $1.5 \times 10^9$  CFU/mL) を加え、嫌氣的に 37 °C で 12 時間インキュベートした。集菌後、菌体を超音波破碎し、上清を回収した。トリクロロ酢酸で沈殿させたサンプルを還元、アルカリ化し、トリプシンで消化して得られたサンプルをショットガンプロテオミクスにより解析した。バイオフィルムは蛍光顕微鏡を用いて観察した。コントロールとして単体の菌を用いた。

(2) タンパク質の同定

得られたペプチドを *S. oralis* および *P. gingivalis* のデータベースを用いて同定した。

(3) タンパク質量

タンパク質量の統計法は Vera らの方法に準じて行った。

(4) quantitative real-time PCR (qRT-PCR) による転写活性の解析

*P. gingivalis* と *S. oralis* を 6 時間共培養した後、両菌の転写活性を qRT-PCR により解析した。

(5) *P. gingivalis* のバイオフィルム形成に参与するタンパク質の欠損株の作製

*P. gingivalis* ATCC 33277 株の *mdh* 遺伝子を欠損させ、エリスロマイシン耐性遺伝子カセットを挿入した変異株と *mdh* 遺伝子相補株を作製した。野生株、変異株、相補株の増殖能を、経時的に光学濃度を測定することにより比較した。また、HI 染色した口腔レンサ球

菌に FITC 染色した *P. gingivalis* を加えてバイオフィルムを形成させ、蛍光顕微鏡にて観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 混合バイオフィルムにおけるプロテオーム解析

*P. gingivalis* からは 343 のタンパク質が同定された。そのうち、単独で培養した場合のみに認められたタンパク質が 193、単独培養と *S. oralis* との共培養の両方で認められたタンパク質が 135、共培養のみで認められたタンパク質が 15 であった。一方、*S. oralis* からは 250 のタンパク質が同定された。そのうち、単独で培養した場合のみに認められたタンパク質が 115、単独培養と *P. gingivalis* との共培養の両方で認められたタンパク質が 106、共培養のみで認められたタンパク質が 29 であった。

*S. oralis* と共培養することにより、*P. gingivalis* では 3 つのタンパク質の産生が増加し、31 のタンパク質の産生が減少した。一方、*S. oralis* では、*P. gingivalis* と共培養することにより、2 つのタンパク質の産生が誘導され、2 つのタンパク質の産生が減少した。

##### (2) qRT-PCR により同定したタンパク質をコードする遺伝子発現量の解析

*P. gingivalis* で同定したタンパク質からバイオフィルム形成に関連する 17 のタンパク質を選択し、qRT-PCR によりその遺伝子発現量を調べた。その結果、16 の遺伝子でタンパク質産生の増減と一致する結果が得られた。GyrB、RpoD および FimA の産生量の増加は、mRNA レベルでもタンパク質レベルでも確認された。さらに、混合バイオフィルム形成において重要な役割を果たしていると考えられている *P. gingivalis* の LuxS の発現量についても検討した。*S. oralis* と共培養することにより、*P. gingivalis luxS* 発現量は、約 4.5 倍増加した。一方、*S. oralis* においては、*P. gingivalis* との共培養により、GapC の発現量が有意に増加することがタンパク質レベルでも遺伝子レベルでも確認された。

共凝集により発現量が減少したタンパク質は、*P. gingivalis* では、*eno*、*fabD*、*fetB*、*oafO-sf*、*ompA*、*prc*、*recQ*、*rnfG*、*sod*、*sufC*、*uspA*、*gapA*、*rgpB* などであった。一方、*S. oralis* においては、*GatC*、*RpmD*、*Fabf2* などのタンパク質の産生が、*P. gingivalis* との共培養により減少することが示された。

##### (3) *P. gingivalis* MDH 欠損株によるバイオフィルム形成

*mdh* 遺伝子を欠損させた *P. gingivalis* 変異株は、野生株や相補株と比較し、培養後 6 時間までは増殖の抑制がみられたが、その後はほぼ同程度に増殖した。

口腔レンサ球菌とのバイオフィルム形成

能は、野生株や相補株と比較して、変異株では抑制された。この結果は、MDH が口腔レンサ球菌とのバイオフィルム形成に重要な役割を果たしていることを示唆している。

以上の結果は、*P. gingivalis* と口腔レンサ球菌との共培養により、両菌の複数のタンパク質が正負の影響を受けており、これらのタンパク質が混合バイオフィルム形成に関与していることが示唆された。本研究は、*P. gingivalis* のバイオフィルム形成に及ぼす口腔常在菌の影響について新たな知見を与えるものであり、今後、バイオフィルム形成抑制法による歯周病予防につながるものであると考えられる。

#### < 引用文献 >

Maeda K, Nagata H, Yamamoto Y et al, Glyceralddehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus oralis* functions as a coadhesin for *Porphyromonas gingivalis* major fimbriae, *Infect Immun*, 2004, 72, 1341-1348

Maeda K, Nagata H, Kuboniwa M et al, Characterization of binding of *Streptococcus oralis* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to *Porphyromonas gingivalis* major fimbriae, *Infect Immun*, 2004, 72, 5475-5477

Maeda K, Nagata H, Nonaka A et al, Oral streptococcal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase mediates interaction with *Porphyromonas gingivalis* fimbriae, *Microbes Infect*, 2004, 6, 1163-1170

Nagata H, Iwasaki M, Maeda K et al, Identification of the binding domain of *Streptococcus oralis* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for *Porphyromonas gingivalis* major fimbriae, *Infect Immun*, 2009, 77, 5130-5138

Maeda K, Nagata H, Kuboniwa M et al, Identification and characterization of *Porphyromonas gingivalis* client proteins that bind to *Streptococcus oralis* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *Infect Immun*, 2013, 81, 753-763

Maeda K, Tribble GD, Lamont RJ et al, A *Porphyromonas gingivalis* tyrosine phosphate is a multifunctional regulator of virulence attributes, *Mol Microbiol*, 2008, 69, 1153-1164

McNab R, Ford SK, El-Sabaeny A et al, LuxS-based signaling in *Streptococcus*

*gordonii*: antiinducer 2 controls carbohydrate metabolism and biofilm formation with *Porphyromonas gingivalis*, J Bacteriol, 2003, 185, 274-284

Vera M, Krok B, Bellenberg S et al, Shotgun proteomics study of early biofilm formation of *Acidithiobacillus ferrooxidans*, Proteomics, 2013, 13, 1133-1144

#### 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8件)

Kuboniwa M, Sakanaka A, Hashino E et al (6名), Prediction of periodontal inflammation via metabolic profiling of saliva, J Dent Res, 2016, 95, 1381-1386, 10.1177//002034516661142, 査読有

Sakanaka A, Kuboniwa M, Hashino E et al (6名), Distinct signatures of dental plaque metabolic byproducts dictated by periodontal inflammatory status, Sci Reports, 2016, 7, 10.1038/strep42818, 査読有

Sakanaka A, Takeuchi H, Kuboniwa M et al (4名), Dual lifestyle of *Porphyromonas gingivalis* in biofilm and gingival cells, Microb Pathog, 2016, 94, 42-47, 10.1016/j.micpath.2015.10.003, 査読有

Chen J, Ni Y, Liu C, Yamaguchi Y, Chen Q, Sekine S et al (8名), Rapid identification and quantitation for oral bacteria based on short-end capillary electrophoresis, Talanta, 2016, 160, 425-430, 10.1016/j.talanta.2016.07.049, 査読有

Liu C, Yamaguchi Y, Sekine S et al (7名), Gene analysis of multiple oral bacteria by the polymerase chain reaction coupled with capillary electrophoresis, J Sep Sci, 2016, 39, 986-992, 10.1002/jssc.201501087, 査読有

Izui S, Sekine S, Maeda K, Kuboniwa M, Takada A, Amano A, Nagata H, Antibacterial activity of curcumin against periodontopathic bacteria, J Periodontol, 2016, 87, 83-90, 10.1902/jop2015.150260, 査読有

Maeda K, Nagata H, Ojima M et al (4名), Proteomic and transcriptional analysis of

interaction between *Porphyromonas gingivalis* and *Streptococcus oralis*, J Proteome Res, 2015, 14, 82-94, 10.1021/pr.500848e, 査読有

永田英樹、ユーカリ抽出物配合チューインガムの口臭抑制効果、J Japan Ass Oral Environ, 2013, 44, 253-260, <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jao/-char/ja/>, 査読無

[学会発表](計22件)

Kuboniwa M, Insight into the oral microbiome study, 2<sup>nd</sup> Symposium 2016 of Yeongnam Branch of Korean Academy of Preventive Dentistry and Oral Health, 2016年11月25日, Daegu, Korea

泉井秀介、関根伸一、天野敦雄、歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* による細胞傷害に対するクルクミンの阻害効果、第31回日本香辛料研究会・学術講演会、2016年10月8日、長浜勤労者福祉会館(滋賀県長浜市)

坂中哲人、久保庭雅恵、*Fusobacterium nucleatum* との栄養共生における *Streptococcus gordonii* アルギニン・オルニチンアンチポーター-ArcD の機能解析、大阪大学歯学会第122回例会、2016年7月14日、大阪大学(大阪府吹田市)

Sakanaka A, Kuboniwa M, Hashino E et al (5名), Salivary microbially-derived metabolic signatures are linked to periodontal inflammatory status, 94<sup>th</sup> IADR General Meeting, 2016年6月24日, Seoul, Korea

Sakanaka A, Kuboniwa M, Hashino E et al (4名), Relationship between tongue coating and salivary metabolome. 12<sup>th</sup> International Conference of Asian Academy of Preventive Dentistry, 2016年5月28日, 東京医科歯科大学(東京都文京区)

泉井秀介、関根伸一、永田英樹ら(4名)、*Porphyromonas gingivalis* ベンクルによる細胞傷害に対するウコン・クルクミンの阻害効果、第65回日本口腔衛生学会・総会、2016年5月28日、東京医科歯科大学(東京都文京区)

関根伸一、泉井秀介、永田英樹ら(4名)、ラマン分光散乱を用いた新規口臭測定装置の開発、第65回日本口腔衛生学会。総会、2016年5月28日、東京医科歯科大学(東京都文京区)

泉井秀介、関根伸一、永田英樹、クルクミンの歯周病予防素材としての可能性につい

て、第5回口腔保健用機能性食品研究会・総会、2016年1月24日、東北大学（宮城県仙台市）

泉井秀介、永田英樹、天野敦雄、クルクミンが *Porphyromonas gingivalis* ベシクルのヒト歯肉上皮細胞への侵入に及ぼす影響、第57回歯科基礎医学会学術大会、2015年9月13日、朱鷺メッセ（新潟県新潟市）

前田和彦、永田英樹、小島美樹ら（4名）、*Porphyromonas gingivalis* のリンゴ酸脱水素酵素がバイオフィーム形成に及ぼす影響、第64回日本口腔衛生学会・総会、2015年5月29日、つくば国際会議場（茨城県つくば市）

関根伸一、泉井秀介、橋野恵衣、永田英樹ら（5名）、マイクロチップPCRとキャピラリー電気泳動システムを用いた即時細菌検査システムの開発、第64回日本口腔衛生学会・総会、2015年5月29日、つくば国際会議場（茨城県つくば市）

Izui S, Sekine S, Nagata H et al (4名), Inhibitory effect of curcumin on inflammatory responses of gingival epithelial cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* vesicles, 62<sup>nd</sup> Annual Meeting of JADR, 2014年12月5日, KKR Hotel (大阪府大阪市)

Izui S, Sekine S, Nagata H et al (4名), Inhibitory effect of curcumin on *Porphyromonas gingivalis* infection, 11<sup>th</sup> International Conference of Asian Academy of Preventive Dentistry, 2014年9月18日, Beijing, China

清原宏之、小島美樹、小野高裕、泉井秀介、関根伸一、永田英樹ら（7名）、歯周ポケット内細菌叢の複雑化が脂質プロファイルに与える影響・吹田研究、第63回日本口腔衛生学会・総会、2014年5月31日、熊本市民会館（熊本県熊本市）

泉井秀介、関根伸一、高田明比古、前田和彦、久保庭雅恵、永田英樹ら（7名）、クルクミンが歯周病菌の生育およびバイオフィーム形成に及ぼす影響、第63回日本口腔衛生学会・総会、2014年5月31日、熊本市民会館（熊本県熊本市）

前田和彦、永田英樹、小島美樹、関根伸一ら（6名）、*Porphyromonas gingivalis* が *Streptococcus oralis* のタンパク質発現に及ぼす影響、第63回日本口腔衛生学会・総会、2014年5月30日、熊本市民会館（熊本県熊本市）

Nagata H, Potential candidates for

preventing *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation, 2<sup>nd</sup> Japan-Thailand-Korea Joint Symposium, 2013年12月6日, Seoul, Korea

前田和彦、永田英樹、小島美樹ら（4名）、口腔レンサ球菌との混合培養における *Porphyromonas gingivalis* タンパク質発現のショットガンプロテオミクス、第24回近畿・中国・四国口腔衛生学会総会、2013年10月6日、岡山大学（岡山県岡山市）

泉井秀介、関根伸一、前田和彦、永田英樹ら（5名）、クルクミンが歯周病菌の増殖とプロテアーゼ活性に及ぼす影響、第24回近畿・中国・四国口腔衛生学会総会、2013年10月6日、岡山大学（岡山県岡山市）

永田英樹、機能性食品の機能評価方法：歯周組織維持機能評価、第62回日本口腔衛生学会・総会、2013年5月17日、キッセイ文化ホール（長野県松本市）

②前田和彦、永田英樹、小島美樹ら（4名）、*Porphyromonas gingivalis* MDHの混合バイオフィーム形成に及ぼす阻害効果、第62回日本口腔衛生学会・総会、2013年5月17日、キッセイ文化ホール（長野県松本市）

②関根伸一、橋野恵衣、久保庭雅恵、永田英樹ら（5名）、小型印刷電極を用いた *P. gingivalis* 線毛型株検出システムの臨床応用、第62回日本口腔衛生学会・総会、2013年5月17日、キッセイ文化ホール（長野県松本市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

永田英樹 (NAGATA, Hideki)  
大阪大学・歯学研究科(研究院)・招へい  
教員  
研究者番号：50260641

### (2) 研究分担者

久保庭雅恵 (KUBONIWA, Masae)  
大阪大学・歯学研究科(研究院)・准教授  
研究者番号：00303983

関根伸一 (SEKINE, Shinichi)  
大阪大学・歯学部附属病院・講師  
研究者番号：70506344

前田和彦 (MAEDA, Kazuhiko)  
大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教  
研究者番号：00346165