

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25450103

研究課題名(和文) オートインデューサーの変換による新たな口腔細菌間コミュニケーションの解明と応用

研究課題名(英文) Analysis and application of a new communication among oral bacteria using the conversion of autoinducer.

研究代表者

阿座上 弘行 (Azakami, Hiroyuki)

山口大学・農学部・教授

研究者番号：40263850

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：微生物は会話物質を使ってコミュニケーションしている。多くの病原微生物はこの会話によって病原性をコントロールしている。したがって、この会話をブロックしてやれば、病気の治療や予防に応用できる。本研究では、歯周病菌から会話物質をブロックする新しい因子を見つけて、その正体を明らかにした。今回見つけた因子は、幅広い微生物間のコミュニケーションに利用される会話物質に作用できる点が興味深い。

研究成果の概要(英文)：Microorganisms communicate each other using various chemical compounds as language. Most pathogenic bacteria control their pathogenesis by these communication. Thus, if we can block their communication, we may apply it to treatment or prevention to many diseases. In this study, we found and characterized a new factor to block the bacterial communication. It is very interesting that this factor can block the wide range of communication among bacteria.

研究分野：応用微生物学

キーワード：歯周病原性細菌 Eikenella corrodens オートインデューサー ポーリン クオラムセンシング

1. 研究開始当初の背景

我々は歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* が会話物質 AI-2 を分解または変換する酵素を見つけ、その解析を行ってきた。その結果、本菌が口腔内で AI-2 の翻訳を行っている。本菌が会話物質を変換することで多段階の制御を行っている、という2つの仮説を考えた。

2. 研究の目的

本研究では、これらの仮説を確かめるために、*E. corrodens* の培養上清から AI-2 不活化酵素 (AI-2 変換酵素) を精製し、その同定を行う。また、AI-2 の不活化 (変換) 機構を明らかにする。さらに、他の口腔細菌のコミュニケーションにこの酵素がどのように作用するか調べる。また、この酵素のバイオフィーム抑制剤、歯周病治療薬としての可能性を調べる。

3. 研究の方法

本研究計画は、歯周病臨床研究を専門とする野村との連携のもと、下記のような研究計画を遂行する。*E. corrodens* から AI-2 不活化酵素の精製を行い、同定する。精製酵素あるいは大腸菌発現酵素を用いて、AI-2 の不活化機構を解析する。さらに、酵素によって不活化 (変換) された AI-2 が *E. corrodens* のクオラムセンシングに及ぼす影響を、AI-2 不活化酵素遺伝子のノックアウト株や高発現株を使って調べる。また、変換された AI-2 が他の口腔細菌のコミュニケーションに及ぼす影響を調べ、この酵素の「バイオフィーム抑制剤」あるいは「歯周病治療薬」としての可能性を探る。

4. 研究成果

(1) 歯周病原性細菌 *E. corrodens* の定常期の培養上清から、オートインデューサーを不活化する因子をイオン交換クロマトグラフィーにより精製した。精製したタンパク質の N 末端アミノ酸配列を解析したところ、外膜ポーリンのものと一致した。そこで、ポーリンの欠損株を作成したところ、欠損株では定常期におけるオートインデューサーの不活化が見られなかった。また、精製したポーリンタンパク質を MHF (Methyl Hydroxy Franone) とインキュベートしたところ、用量依存的に MHF を不活化した。これらのことから、*E. corrodens* において、ポーリンタンパク質がオートインデューサーの不活化に関与することが示唆された。

(2) また、定常期においてポーリンタンパク質の培養上清への分泌量が増加していた。さらに、定常期において、ベシクル中のポーリン

タンパク質量が増加していた。これらの結果から、定常期におけるベシクルによるポーリンタンパク質の放出がオートインデューサーの不活化に関与することが示唆された。

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 6 件)

M. Usui, A. Harada, S. Yasumoto, Y. Sugiura, A. Nishidai, M. Ikarashi, H. Takaba, T. Miyasaki, H. Azakami, M. Kondo: Relationship between the risk for a shrimp allergy and freshness or cooking, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 79:1698-1701 (2015) 査読有
Doi:10.1080/09168451.2015.1045830

H. Azakami, M. Uehara, R. Matsuo, Y. Yamashita, M. Usui, A. Kato: Unstable Mutant Lysozymes are Degraded through the Interaction with Calnexin Homologue Cne1p in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 78:1263-1269 (2014) 査読有
Doi:10.1080/09168451.2014.918486

Y. Asahi, Y. Noiri, J. Miura, H. Maezono, M. Yamaguchi, M. Yamamoto, H. Azakami, S. Ebisu: Effects of the tea catechin Epigallocatechin Gallate on *Porphyromonas gingivalis* biofilms, *J. Appl. Microbiol.*, 116:1164-1171 (2014) 査読有
Doi:10.1111/jam.12458

M. M. Karim, T. Hisamoto, T. Matsunaga, Y. Asahi, Y. Noiri, S. Ebisu, A. Kato, H. Azakami: LuxS Affects Biofilm Maturation and Detachment of the Periodontopathogenic Bacterium *Eikenella corrodens*, *J. Biosci. Bioeng.*, 116:313-318 (2013) 査読有
Doi:10.1016/j.jbiosc.2013.03.013

M. M. Karim, A. Nagao, F. J. Mansur, T. Matsunaga, Y. Akakabe, Y. Noiri, S. Ebisu, A. Kato, H. Azakami: The periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens* produces an autoinducer-2-inactivating enzyme., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77:1080-1085 (2013) 査読有
Doi:10.1271/bbb.130047

M. Usui, A. Harada, T. Ishimaru, E. Sakumichi, F. Saratani, C. Sato, H. Azakami, T. Miyasaki, K. Hanaoka:

Structural reversibility contributes the heat stability of shrimp allergen tropomyosin., *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 77:948-953 (2013) 査読有
Doi:10.1271/bbb.120887

〔学会発表〕(計 17 件)

Fariha Jasin Mansur: Autoinducer-inactivation mechanism in periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens*. 日本細菌学会、2016年3月24日、大阪国際交流センター(大阪府大阪市)

森重なつみ: 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* におけるオートインデューサー不活化機構の解析、日本生物工学会、2015年10月28日、城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

阿座上弘行: 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* におけるオートインデューサー不活化機構の解析、日本微生物生態学会、2015年10月19日、土浦亀城プラザ(茨城県土浦市)

Fariha jasin Mansur: 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* におけるオートインデューサー不活化機構の解析、日本農芸化学会中四国・西日本合同支部大会、2015年9月18日、愛媛大学(愛媛県松山市)

Fariha Jasin Mansur: Autoinducer-2 inactivation by outer membrane porin in periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens*. 日本農芸化学会、2015年3月29日、岡山大学(岡山県岡山市)

高原沙里: 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* におけるゲノム再編による溶血活性の発現、日本農芸化学会、2015年3月27日、岡山大学(岡山県岡山市)

高原沙里: 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* の X-プロリルアミノペプチダーゼが溶血に与する? 日本生物工学会、2014年9月10日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

森重なつみ: 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* の外膜ポーリンによるオートインデューサー 2 の不活化機構、日本生物工学会、2014年9月10日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

Hiroyuki Azakami: Purification and characterization of autoinducer-2 inactivating enzyme in periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens*. IUMS2014、2014年7月30日、モントリオール(カナダ)

ール(カナダ)

阿座上弘行: 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のポーリンがオートインデューサーの不活化に与する、日本農芸化学会、2014年3月28日、明治大学生田キャンパス(神奈川県川崎市)

Fariha Jasin Mansur: Involvement of porin in inactivation of autoinducer 2 in *Eikenella corrodens*. 日本細菌学会、2014年3月27日~28日、タワーホール船堀(東京都江戸川区)

Hiroyuki Azakami: The periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens* produces an autoinducer-2- inactivating enzyme. 日本微生物生態学会、2013年11月25日、鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)

阿座上弘行: 歯周病原性細菌の可溶性ポーリンがオートインデューサーを不活化する? 日本生物工学会、2013年9月18日、広島国際会議場(広島県広島市)

Fariha Jasin Mansur: *Eikenella corrodens* produces an autoinducer-2-inactivating enzyme. Nobel Conference on Biofilm formation, its clinical impact and potential treatment、2013年8月29日、ストックホルム(スウェーデン)

Mohammad Minnatul Karim: LuxS affects biofilm maturation and detachment of the periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens*. Nobel Conference on Biofilm formation, its clinical impact and potential treatment、2013年8月29日、ストックホルム(スウェーデン)

Hiroyuki Azakami: The periodontopathogenic bacterium *Eikenella corrodens* produces an autoinducer-2- inactivating enzyme. Gordon Conference (Bacterial Adhesion & Signal Transduction) 2013年7月22日~23日、ニューポート(USA)

Karim Minnatul: 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* の AI-2 不活化酵素の精製と解析、Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会、2013年7月12日、東京ガーデンパレス(東京都文京区)

〔図書〕(計 1 件)

阿座上弘行、恵比須繁之: 「細胞間コミュニケーションと口腔細菌バイオフィーム」特集『バイオフィーム研究の最前線』、化学療法の領域(医薬ジャーナル社) Vol. 31, No.11, 2015, 180 (53-61).

〔その他〕
ホームページ等
<http://web.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~azakami/>

6．研究組織

(1)研究代表者

阿座上 弘行 (AZAKAMI, Hiroyuki)
山口大学・農学部・教授
研究者番号：40263850

(2)連携研究者

野杵 由一郎 (NOIRI, Yuichiro)
大阪大学・歯学研究科・准教授
研究者番号：50218286

(3)研究協力者

Fariha Jasin Mansur
森重 なつみ (MORISHIGE, Natsumi)
高原 沙里 (TAKAHARA, Sari)
Mohammad Minnatul Karim