

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：34408

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11404

研究課題名(和文) ペプチド核酸を応用した選択的細菌抑制による微生物叢コントロール法の確立

研究課題名(英文) Growth inhibition of selected bacterial species by peptide nucleic acids for control of oral microflora

研究代表者

前田 博史 (MAEDA, Hiroshi)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：00274001

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的はアンチセンスPNAを口腔微生物に対して応用し、特定細菌種の増殖抑制を行うことである。歯周病原細菌Porphyromonas gingivalis、ならびにAggregatibacter actinomycetemcomitansのHSP遺伝子ならびにAcpP遺伝子を標的としてアンチセンスPNAを設計・合成し、増殖抑制効果を調べた。結果、P. gingivalisに対しては、両遺伝子を標的としたアンチセンスPNAによって、増殖を効果的に抑制することができた。A. actinomycetemcomitansに対しては、PNAによる顕著な増殖抑制効果はみられなかった。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we aimed to inhibit the growth of selected bacterial species in oral microflora by using antisense PNA (peptide nucleic acids). By targeting the HSP and AcpP genes of Porphyromonas gingivalis and Aggregatibacter actinomycetemcomitans, the antisense PNAs were designed and synthesized with carrier peptide (KFFKFFKFFK). For P. gingivalis, both antisense PNAs effectively inhibited the growth. Especially, anti-HSP PNA completely inhibited the growth for 5 hours. Comparing to P. gingivalis, the inhibit effect was weak for A. actinomycetemcomitans. Anti-HSP PNA slightly inhibit the growth, while anti-AcpP PNA did not show the effect. The cause of the low effect may be due to the small uptake of the PNA in A. actinomycetemcomitans. Antisense PNA may have the potential to reduce the population of P. gingivalis in oral microflora. New designs for carrier peptide and the target genes will be required for A. actinomycetemcomitans.

研究分野：微生物学

キーワード：細菌叢 ペプチド核酸 アンチセンス

1. 研究開始当初の背景

口腔内には約 600 種類に及ぶ微生物種が存在し、微生物叢が形成されている。これらの微生物の中には齲蝕や歯周炎を引き起こす原因菌が存在し、口腔内の慢性感染症は全身の健康にも大きく関与する事が知られている。しかしながら、腸内細菌と同様に、多くの口腔微生物は常在菌として生体に必要であり、これらを完全に排除することはできない。

近年、次世代シーケンサーをはじめとした分子生物学的手法の発達によって、口腔内や腸内微生物叢の詳細な解析が進められている。今後は解析されたデータをもとに、微生物叢のコントロール方法に関する研究が重要視されてくると予測できる。

微生物叢をコントロールする方法としては、ヨーグルトに代表されるプロバイオティクスの概念が主流となっている。すなわち、いわゆる“善玉菌”を微生物叢に供給する方法である。現在の抗菌療法では標的とする微生物種を選択的に排除することはできないが、これが可能になれば微生物叢を効果的にコントロールできる可能性が高い。

ペプチド核酸 (PNA)、モルフォリノオリゴマーなどの核酸アナログは、天然核酸である DNA と RNA にハイブリダイズし、核酸同士との 2 重鎖結合よりも強い結合力を示す。このため PNA を応用した核酸医療の研究はすでに様々な領域での試みがなされている。微生物に対しては、細菌検出のための蛍光標識プローブとして応用されている。また、大腸菌、サルモネラ、あるいは黄色ブドウ球菌などにおいて、アンチセンス鎖として mRNA に作用させることによって特定遺伝子の発現制御、あるいは細菌の増殖抑制の可能なことが示されている。

以上の背景から、特異的な遺伝子制御、選択的な微生物種の増殖抑制が可能なアンチセンス医療の技術を口腔微生物叢のコントロールに応用することによって、ヒトの健康増進に寄与できるのとも考え、研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究の目的はアンチセンス PNA を口腔微生物に対して応用し、病原遺伝子の発現抑制、あるいは特定細菌種の増殖抑制を行うことである。これによってアンチセンス PNA を応用した細菌叢コントロール法を開発するための基礎を確立する。

3. 研究の方法

(1) アンチセンス PNA の設計・合成

アンチセンス PNA の塩基配列は *Porphyromonas gingivalis*、ならびに *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* の保有する熱ショックタンパク質 (hsp60)、そ

して acyl carrier protein (acpP) 遺伝子を標的として設計した。すなわち、両遺伝子の翻訳開始点から上流の 12 塩基に対するアンチセンス鎖をもつ PNA を合成した。また、細菌内への PNA の導入効率をあげるため、アンチセンス PNA にはキャリアーペプチド (KFFKFFKFFK) を付加した。

(2) 供試菌と培養

P. gingivalis FDC381, *A. actinomycetemcomitans* ATCC 29523, *Rothia mucilaginosa* DY-18, *Escherichia coli* K-12 を実験に供試した。*P. gingivalis* は変法 GAM 培地を、*E. coli* は Luria-Bertani 培地を、*A. actinomycetemcomitans* は 5% 重炭酸ナトリウムを添加した TSB 培地を、そして *R. mucilaginosa* は TSB 培地を使用し、通常に従って培養した。

(3) 増殖抑制試験

10ml の培養液に対し、1ml の各菌の前培養液を添加し、培養を開始した。培養開始時にアンチセンス PNA を 1 μ M、3 μ M、あるいは 10 μ M の濃度で添加した。細菌培養液の吸光度を 1 時間ごとに測定し、アンチ hspPNA ならびにアンチ acpPPNA が各菌の増殖に与える影響を評価した。

(4) 遺伝子発現抑制試験

アンチセンス PNA による特異遺伝子の発現抑制の検証はウエスタンブロット法によって行った。抗原にはアンチセンス PNA を添加して培養した *A. actinomycetemcomitans*、ならびに無添加で培養した同菌を対数増殖期に回収した全菌体を使用した。一次抗体には抗 HSP60 ポリクロナール抗体を使用し、二次抗体にはペルオキシダーゼ標識した抗ラビット IgG 抗体を使用した。予備実験として市販の抗 hsp60 抗体 4 種類を使用し、*P. gingivalis* の保有する hsp60 と反応性を示す一次抗体のスクリーニングを行ったが、反応性を示す抗体はなかった。このため、hsp の発現様態は *A. actinomycetemcomitans* のみで検証した。

4. 研究成果

(1) キャリアーペプチドの菌体内導入効率の検証

PNA による特異細菌の増殖抑制試験に先立って KFFKFFKFFK の配列を持つキャリアーペプチドの菌体内導入効率を *P. gingivalis* と *A. actinomycetemcomitans* で比較した。結果、蛍光標識したキャリアーペプチドの導入効率は *A. actinomycetemcomitans* に比較して *P. gingivalis* が約 2.5 倍高い値を示した。

(2) 増殖抑制試験

P. gingivalis に対する抗 hspPNA の効果 *P. gingivalis* の培養液に抗 hspPNA を添加し

た場合の増殖曲線を図 1 に示す。

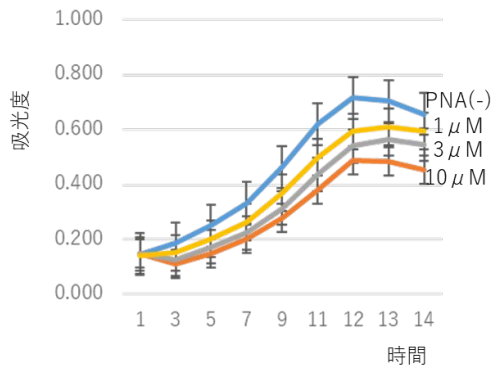


図 1. *P. gingivalis* の増殖曲線 (抗hspPNA添加時)

PNA 添加によって *P. gingivalis* の増殖は濃度依存的に抑制された。1 μM, あるいは 3 μM の濃度では約 3 時間, そして 10 μM の濃度では約 5 時間, 菌の増殖を抑制できた。

A. actinomycetemcomitans に対する抗 hspPNA の効果

A. actinomycetemcomitans の培養液に抗 hspPNA を添加した場合の増殖曲線を図 2 に示す。

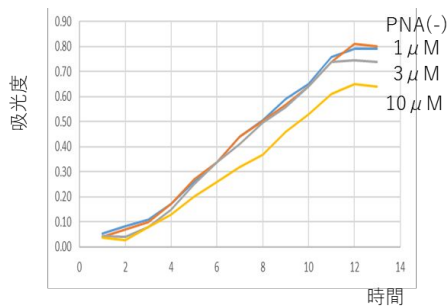


図 2. *A. actinomycetemcomitans* の増殖曲線 (抗hspPNA添加時)

P. gingivalis に比べ, PNA による増殖抑制効果は低かった。1 μM, 3 μM の PNA では大きな増殖抑制効果は見られなかった。しかしながら, 3 μM, あるいは 10 μM の PNA は約 2 時間, *A. actinomycetemcomitans* の増殖を抑制した。

抗 hspPNA の標的菌種以外への作用
標的菌種以外への抗 hspPNA の影響を大腸菌を代表例として図 3 と 4 に示す。

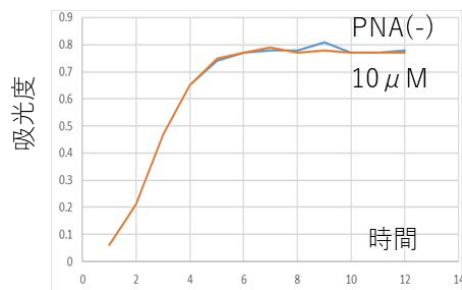


図 3. 大腸菌に対する抗PghspPNAの作用

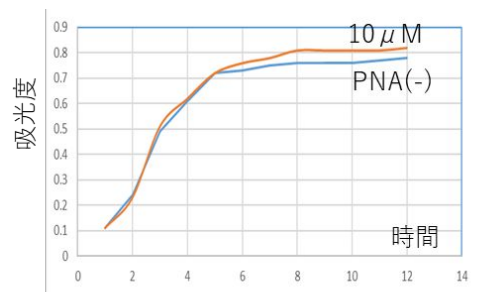


図 4. 大腸菌に対する抗AahspPNAの作用

抗 hspPNA は標的菌種以外に対しては増殖抑制効果を示さなかった。大腸菌以外についても同様の結果だった。

P. gingivalis に対する抗 acpPPNA の効果
P. gingivalis の培養液に抗 acpPPNA を添加した場合の増殖曲線を図 5 に示す。

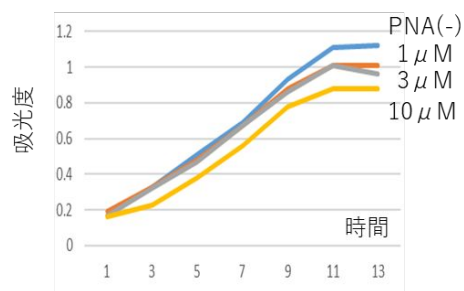


図 5. *P. gingivalis* の増殖曲線 (抗acpPPNA添加時)

抗 acpPPNA の増殖抑制効果は抗 hspPNA に比べやや弱い結果となった。10 μM の PNA 添加では約 3 時間, マイルドに *P. gingivalis* の増殖が抑制された。

A. actinomycetemcomitans に対する抗 acpPPNA の効果

A. actinomycetemcomitans の培養液に抗 acpPPNA を添加した場合の増殖曲線を図 6 に示す。

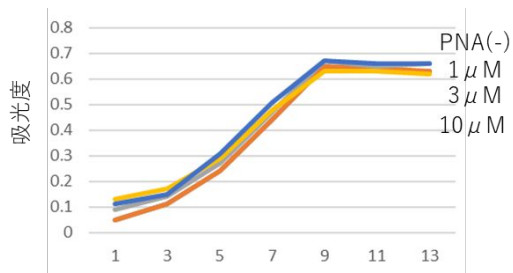


図 6. *A. actinomycetemcomitans* の増殖曲線 (抗acpPPNA添加時)

予測に反して, 抗 acpPPNA は全く増殖抑制効果を示さなかった。抗 hspPNA に関しても, *P. gingivalis* に比して, *A. actinomycetemcomitans* への増殖抑制効果は低く, 菌体内への PNA の取り込み率が影響している可能性がある。

抗 acpPPNA の標的菌種以外への作用
抗 acpPPNA は抗 hspPNA と同様に標的菌種以

外に対しては増殖抑制効果を示さなかった。
(結果省略)

(3) 標的遺伝子の発現抑制試験

ウエスタンブロット法によって、抗 hspPNA を *A. actinomycetemcomitans* に作用させた際の hsp 発現量を解析した。結果を図 7 に示す。

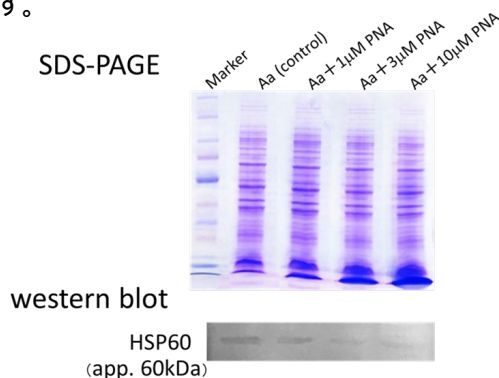


図 7. PNA 添加による *A. actinomycetemcomitans* hsp 発現量の変化

hsp の発現量は添加した PNA の濃度に依存して低下した。SDS - PAGE 像では PNA 添加によってタンパク質の発現パターンに大きな変化は見られず、標的遺伝子の発現が特異的に抑制されていることが示唆された。

(4) まとめ

抗 hspPNA によって、特異的に *P. gingivalis* ならびに *A. actinomycetemcomitans* の増殖を抑制することができた。また、抗 acpPPNA によって *P. gingivalis* の増殖を抑制することができた。アンチセンス PNA の応用によって、標的遺伝子の発現を特異的に抑制し、細菌叢中の標的菌種の増殖を抑制できる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 3 件)

Nakai K, Maeda H, Ikenaga H, Tsuji N. Simple and rapid detection of *Rothia mucilaginosa* by loop-mediated isothermal amplification method.

日本口腔検査学会雑誌 in press.

<http://ir.tdc.ac.jp/irucaa/handle/10130/1941/bulletin/> 査読有.

Sonoi N, Maeda H, Murauchi T, Yamamoto T, Omori K, Kokeguchi S, Naruishi K, Takashiba S.

IS1598 (IsPg4) distributed to abscess-forming strains of *Porphyromonas gingivalis* may enhance virulence through upregulation of *nrdD*-like gene expression.

New Microbiologica.41, 52-60, 2018.
http://www.newmicrobiologica.org/PUB/allegati_pdf/2018/1/52.pdf 査読有.

May AC, Ohta H, Maeda H, Kokeguchi S, Cugini C.

Draft Genome Sequences of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Strains 310a and 310b.

Genome Announcements. e01282-17, 2017.
DOI: 10.1128/genomeA.01282-17 査読有.

[学会発表](計 1 件)

Keisuke Nakai, Hiroshi Maeda, Hideaki Ikenaga, Norimasa Tsuji.

Simple and rapid detection of *Rothia mucilaginosa* by loop-mediated isothermal amplification method.

平成 29 年度日本歯科保存学会春季学術大会, 2017.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 博史 (MAEDA, Hiroshi)

大阪歯科大学・歯学部・教授

研究者番号: 00274001

(2) 研究分担者

荅口 進 (KOKEGUCHI, Susumu)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号: 10144776

高柴 正悟 (TAKASHIBA, Shogo)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号: 50226768

北松 瑞生 (KITAMATSU, Mizuki)

近畿大学・理工学部・講師

研究者番号: 60379716