

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11634

研究課題名(和文) 口腔細菌のメタボローム解析を利用した歯周疾患の診断法の開発と制御の試み

研究課題名(英文) Development of diagnosis and trial of control for periodontitis using metabrotome of oral bacteria

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) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病は多くの国民が罹患する国民的疾患と言える。歯周病のATP産生機構について十分な知見を得ていないが、アスパラギン酸やグルタミン酸を基質に短鎖脂肪酸を合成する経路から分岐する経路が関与することが予測されてきた。phosphoacetyl transferase (PTA)は無機リン酸存在下において、Acetyl-CoAから acetyl phosphateを産生し、その後acetate kinase (ACK)はacetyl phosphateとADPから酢酸とATPを産生する。本研究では、そらの酵素の分子生物学的解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病を制御するために、抗菌薬や消毒薬を口腔内に適用しても、細菌叢の構成比が同じなので、時間を経れば、もとの状態に戻る。この問題を解決するためには、特定の歯周病関連細菌に特異的な抗菌薬を開発する必要がある。本研究成果は、歯周病細菌の代謝機構を阻害する抗菌薬の開発に通じ、歯周病原因細菌を排除することで歯周病を制御することに利用される可能性がある。

研究成果の概要(英文)：It is reasonable to regard periodontitis as a nation-wide disease gotten by many of Japanese people get. Although sufficient knowledge about the ATP production mechanism of periodontal disease has not been obtained, it has been predicted that there is a pathway diverging from the pathway synthesizing short-chain fatty acids using aspartic acid and glutamic acid as substrates. Phosphoacetyl transferase (PTA) produces acetylphosphate from Acetyl-CoA in the presence of inorganic phosphate, and then acetate kinase (ACK) produces acetic acid and ATP from acetyl phosphate and ADP. In this study, we performed a molecular biological analysis of these enzymes.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：歯周病

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病原細菌のうち酪酸やプロピオン酸を合成するもの、プロピオン酸のみを合成するものが知られている。大部分の口腔細菌は酢酸以外の短鎖脂肪酸を産生しない。これらのことから、歯周組織の状態と短鎖脂肪酸の濃度を多変量解析し、歯周病の状態を唾液から診断できる手法を模索することができれば、歯周病の診断法の開発に役立つ。また、短鎖脂肪酸以外の歯周病マーカーはあまり知られていない。

2. 研究の目的

歯周病細菌が産生する代謝産物には、通常細菌が産生しない短鎖脂肪酸等が多く含まれる。重度の歯周病患者の歯周ポケット内においては、健康人と大きく細菌叢が異なるので、代謝産物の組成や量が異なる。GC-MS/MS を用いると、唾液が 100・L あれば十分に、歯周病細菌が産生する代謝産物を定性的かつ定量的に測定できる。本課題では、①歯周病細菌における短鎖脂肪酸の産生機構の解明、②歯周病細菌が産生する代謝産物と歯周病の臨床症状との関連性の探索、③代謝産物の歯周病の診断ツールとしての開発、④短鎖脂肪酸産生酵素のリード化合物を利用した短鎖脂肪酸産生の抑制薬物の開発を目指す。

3. 研究の方法

短鎖脂肪酸合成における歯周病原細菌特異的な分子の同定、歯周病マーカーとしての短鎖脂肪酸の利用の検討、歯周病診断における新規代謝産物の検討、酪酸合成タンパク質を標的にした阻害薬の開発の 4 つのサブプロジェクトから構成される。3 年間の研究期間において、歯周病細菌の短鎖脂肪酸産生機構に関する基礎科学的な知見を得ながら、短鎖脂肪酸および新規代謝物の量的、質的解析を行い、最終的に歯周病の診断ツールや制御薬の開発を目指すものである。

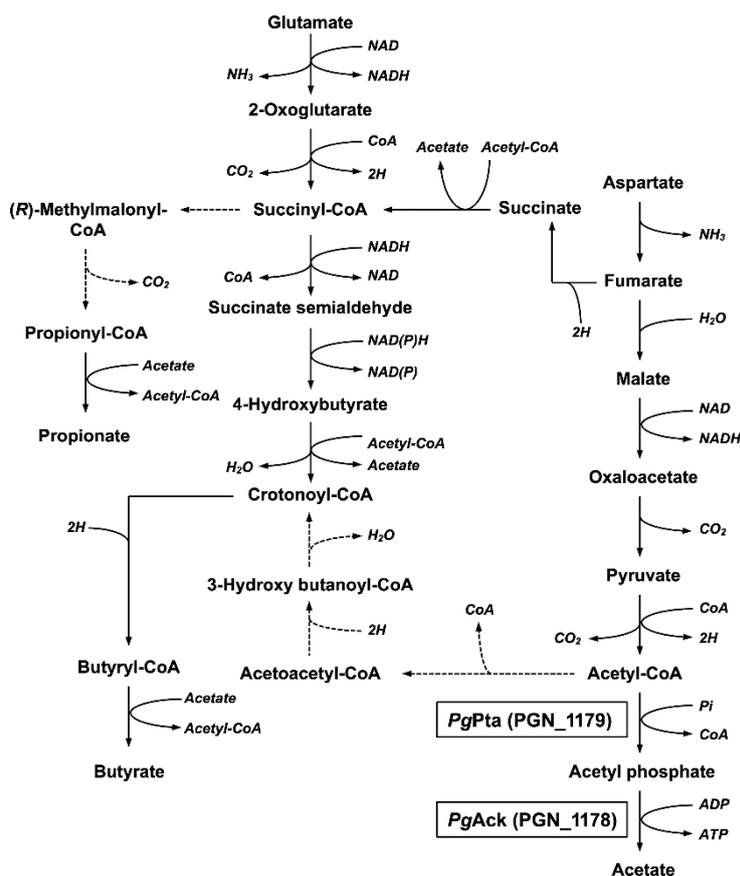


図 1. *Porphyromonas gingivalis* の短鎖脂肪酸産生経路

#### 4. 研究成果

歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* はグルコースのみを炭素源にした場合、ほとんど成長できず、主にアミノ酸やペプチドを炭素源に生命活動を維持している。この細菌の ATP の産生は、アスパラギン酸やグルタミン酸を基質に短鎖脂肪酸を合成する経路 (図 1) から分岐する経路が関与することが予測されてきた。phosphoacetyl transferase (PTA) は無機リン酸存在下において、Acetyl-CoA から acetyl phosphate を産生し、その後 acetate kinase (ACK) は acetyl phosphate と ADP から酢酸と ATP を産生する。まず、本研究では、それらの酵素の精製酵素を作成し (図 2)、ゲル濾過法にてそれらの酵素はホモ二量体であることが明らかとなった。さらに、それらの酵素の酵素学的に解析を進め、酵素学的なパラメーターの算出を行った (図 3, 4)。

PTA の  $K_m$  および  $k_{cat}$  値は、 $0.072 \pm 0.008$  mM および  $1544 \pm 109$  s<sup>-1</sup> であった。この酵素の最適 pH は 9.0 であった。一方、ACK の acetyl phosphate に対する  $K_m$  および  $k_{cat}$  値は、 $0.177 \pm 0.051$  mM および  $435.5 \pm 32.2$  s<sup>-1</sup> であり、ADP に対する  $K_m$  および  $k_{cat}$  値は、 $0.585 \pm 0.19$  mM および  $421 \pm 160$  s<sup>-1</sup> であった。ACK の最適 pH は 8.0 であり、反応に Mn および Mg イオンが必要であった。これらの遺伝子の RNA を抽出しランダムプライマーを用い、Reversed Transcriptase-PCR 法を用いた実験より、それらの 2 つの遺伝子はオペロンを形成しており、オペロンとして転写されることが示唆された。

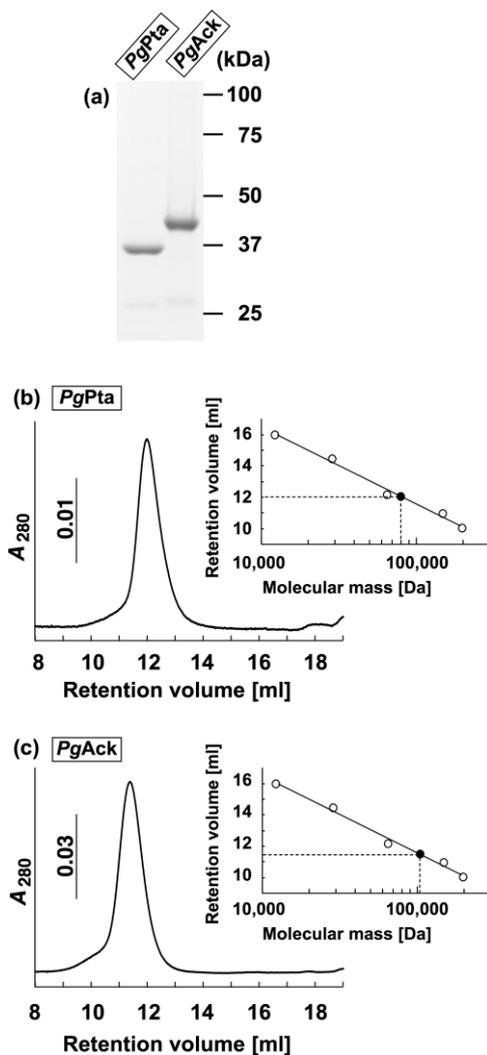


図 2. Pta および Ack 酵素の精製

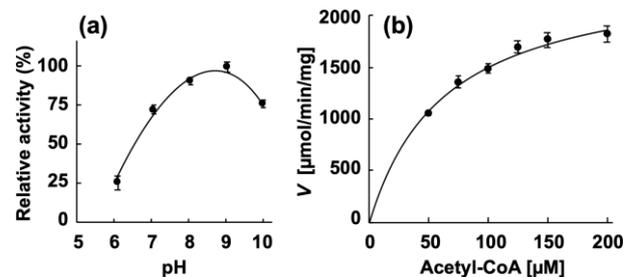


図 3. Pta 酵素の酵素学的性質の決定

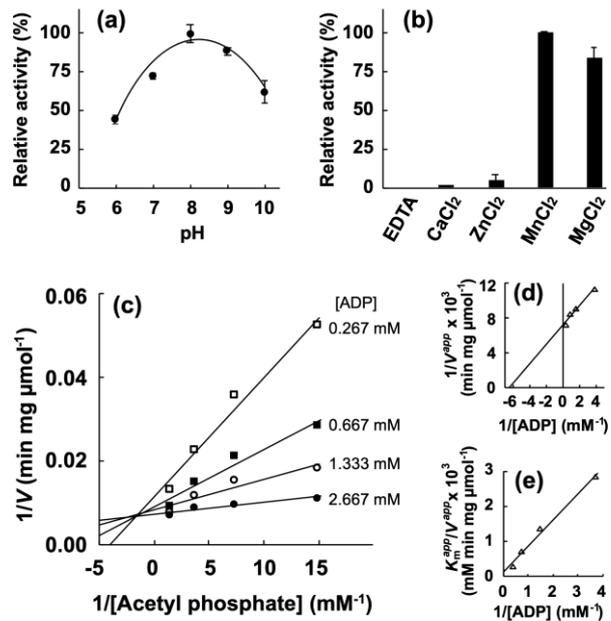


図 4. Ack 酵素の酵素学的性質の決定

これらの遺伝子はエリスロマイシンやカナマイシンなどの一般的な薬剤耐性遺伝子を使用する一般的な不活化できなかった(表 1)。一方、予めプラスミドの形で遺伝子を導入したのちは、不活化できるので、必須遺伝子であることが示唆された。それらの酵素の結晶化を行い、X 線結晶解析にて立体構造を決定するとともに、点置換によって重要なアミノ酸残基について、明らかにしたところ、PTA においては 309 アスパラギン酸、311 セリン、312 アルギニン、318 アルギニンが、ACK に関しては、91 アルギニン、241 アルギニン、385 グルタミン酸がそれぞれの酵素反応に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

表 1. *ack* および *pta* の不活化

Recipient strain	Gene targeted for inactivation	Transformation efficiency (no of transformants/ $\mu$ g DNA)
ATCC 33277	PGN_1180	19.3 $\pm$ 5.18
	<i>ack</i>	0
	<i>pta</i>	0
	PGN_1177	33.2 $\pm$ 11.8
ATCC 33277 harboring <i>ack</i> in the plasmid	<i>ack</i>	10.9 $\pm$ 3.13
ATCC 33277 harboring <i>pta</i> in the plasmid	<i>pta</i>	15.7 $\pm$ 2.46

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Y. Yoshida, M. Sato, T. Nonaka, Y. Hasegawa, and Kezuka	4. 巻 11
2. 論文標題 Characterization of the phosphotransacetylase-acetate kinase pathway for ATP production in <i>Porphyromonas gingivalis</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Oral Microbiol	6. 最初と最後の頁 1588086
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/20002297.2019.1588086	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 H. Konno, Y. Yoshida, K. Nagano, J. Takebe, and Y. Hasegawa	4. 巻 9
2. 論文標題 Biological and biochemical roles of two distinct cyclic dimeric adenosine 3',5'-monophosphate-associated phosphodiesterases in <i>Streptococcus mutans</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front Microbiol	6. 最初と最後の頁 2347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2018.02347	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 W. Sato, Y. Yoshida, S. Komasa, Y. Hasegawa, and J. Okazaki	4. 巻 8
2. 論文標題 Antimicrobial effect of titanium hydroxyapatite in denture base resin	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 App. Sci.	6. 最初と最後の頁 963
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/app8060963	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 K. Nagano, Y. Hasegawa, Y. Yoshida, and F. Yoshimura	4. 巻 102
2. 論文標題 Comparative analysis of motility and other properties of <i>Treponema denticola</i> strains	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Microb Pathog	6. 最初と最後の頁 82-88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.micpath.2016.11.021	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 K. Nagano, Y. Hasegawa, Y. Yoshida, and F. Yoshimura	4. 巻 12(3)
2. 論文標題 A novel fimbrilin of PGN_1808 in Porphyromonas gingivalis	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 PLoS ONE	6. 最初と最後の頁 e0173541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 0.1371/journal.pone.0173541	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Y. Kezuka, T. Ishida, Y. Yoshida, and T. Nonaka	4. 巻 475
2. 論文標題 Structural insights into the catalytic mechanism of cysteine (hydroxyl) lyase from the hydrogen-sulfide producing oral pathogen, Fusobacterium nucleatum	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem J	6. 最初と最後の頁 733-748
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1042/BCJ20170838	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 ¥Y. Kezuka, Y. Yoshida, and T. Nonaka	4. 巻 36
2. 論文標題 Structure of a phosphotransacetylase from Porphyromonas gingivalis, a keystone pathogen of periodontitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Photon Factory Activity Rep. Part B	6. 最初と最後の頁 89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 ¥Y. Kezuka, Y. Yoshida, and T. Nonaka	4. 巻 36
2. 論文標題 Structure of an acetate kinase from Porphyromonas gingivalis, a keystone pathogen of periodontitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Photon Factory Activity Rep. Part B	6. 最初と最後の頁 90
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yasuo Yoshida, Keiji Nagano, Yoshiaki Hasegawa
2. 発表標題 Oral streptococcal fimbriae related to coaggregation with other oral streptococci
3. 学会等名 日本細菌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuo Yoshida, Yuichiro Kezuka, Yoshiaki Hasegawa
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis のATP合成に関与するphosphotransacetylase (Pta)およびacetate kinase (Ack)の遺伝学および酵素学的解析
3. 学会等名 歯科基礎医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 毛塚雄一郎、吉田康夫
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisのATP産生に関与するphosphotransacetylaseおよびacetate kinaseの立体構造解析と生化学的解析
3. 学会等名 歯科基礎医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshida Y, Sato M, Kezuka Y, Hasegawa Y, Nagano K, Takebe J, Yoshimura F.
2. 発表標題 Phosphotransacetylase and acetate kinase for ATP biosynthesis are essential in Porphyromonas gingivalis.
3. 学会等名 第90回日本細菌学会総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Y. Kezuka, Y. Yoshida
2. 発表標題 Searching for novel inhibitors to a hydrogen sulfide-producing enzyme from <i>Fusobacterium nucleatum</i>
3. 学会等名 歯科基礎医学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	毛塚 雄一郎  (Kezuka Yuichiro)  (50397163)	岩手医科大学・薬学部・助教    (31201)	