

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究 (C)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18580079  
 研究課題名 (和文) *Eikenella corrodens* のプラスミドが本菌の歯周病原性に及ぼす影響  
 研究課題名 (英文) Effect of the plasmid in *Eikenella corrodens* on its periodontopathogenicity.

研究代表者  
 阿座上 弘行 (AZAKAMI HIROYUKI)  
 山口大学・農学部・准教授  
 研究者番号：40263850

研究成果の概要：プラスミドの導入によって組換えが起こった株では、グローバルなタンパク質発現の変化が起こり、口腔上皮細胞への付着能が増していることを明らかにした。今回の研究結果は、リコンビナーゼによるゲノムの再編が本菌の高病原化を引き起こすことを改めて示し、本研究の更なる遂行により歯周病の診断や治療へと応用できることが期待された。リコンビナーゼ遺伝子導入株のタイプ 4 線毛遺伝子領域をクローニングし、その塩基配列を解析した。その結果、このようなリコンビナーゼによるゲノムの組換えが起こり、口腔内で高病原化株が出現している可能性が示唆された。そこで、ゲノムの組換えが起こった株をリアルタイム PCR による検出方法を検討し、確立した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,600,000	0	1,600,000
2007 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	540,000	3,940,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：Eikenella corrodens, biofilm, genomic recombination, bacterial adherence, periodontal disease, quorum sensing

## 1. 研究開始当初の背景

統計によれば、35 歳以上の 80%以上が歯周組織に疾患があると言われ、歯周病は国民病とまで言われている。また、近年、歯周病と全身疾患との関係も示唆されており、単なる口腔疾患とも言えなくなってきており、その対策が望まれている。

歯周病の発症の第一段階は、デンタルプラ

ーク（歯垢）を構成する細菌が歯面や歯周組織に付着することである。また、付着した細菌はバイオフィームと呼ばれるコミュニティを形成することで、口腔内で定着する。

*Eikenella corrodens* は歯周病患者の病変部から頻りに分離され、無菌動物への単一感染でも重度の歯周疾患を惹起することから、歯周病原性細菌の一つと考えられている。E.

*corrodens* は菌体表層に *N*-アセチルガラクトサミンに特異的に結合するレクチン様の付着因子を有し、これを介して口腔内上皮細胞へ付着したり、プラーク構成細菌と共凝集する。さらに、このレクチン物質を介して、唾液由来糖タンパク質と異種細菌との架橋や、マウスB細胞の活性化、炎症性サイトカインの誘導などが行われる。したがって、本菌による歯周病の発症と進行にこのレクチン様物質が大きく関わっている。

最近、我々は *E. corrodens* の臨床分離株の一つ1073株にプラスミドDNAを発見した。このプラスミド pMU1 をレクチン活性の低い株に導入すると、レクチン活性が上昇することがわかった。さらに、pMU1上のORF4がタイプ4線毛遺伝子特異的に組換えを起こすリコンビナーゼと高い相同性を示すことが明らかとなった。このORF4遺伝子の導入により、ゲノム上のタイプ4線毛遺伝子領域に組換えが起こった。また、バイオフィーム形成能が低い株にORF4遺伝子を導入すると、バイオフィーム形成能が上昇した。このように、*E. corrodens* がプラスミドの獲得によってレクチン活性を増加させ、歯周病原性を増すことが明らかになりつつある。

## 2. 研究の目的

本研究では、*E. corrodens* のプラスミドDNAが本菌の歯周病原性に及ぼす効果を明らかにするために、pMU1による線毛遺伝子領域の組換え機構を解明し、プラスミドによるゲノムの組換えとレクチン活性の上昇との関わりを明らかにすることを目的とする。また、このプラスミドと歯周病原性との関わりを明らかにするために、プラスミド導入株の口腔内上皮細胞への付着、プラーク構成細菌との共凝集、マウスB細胞の活性化、炎症性サイトカインの誘導などを調べる。さらに、プラスミドDNAと *E. corrodens* の歯周病原性との関

係を臨床レベルで明らかにするために、大阪大学大学院歯学研究科の恵比須繁之教授、野村由一郎助手の協力を得て歯周病患者の病変部から分離した臨床サンプルを分与いただき、実際の歯周病患者の病変部に pMU1 様のプラスミドをもった株、線毛遺伝子領域に組換えが起こった株がどの程度存在するのか、その存在比率と病態に相関は見られるのかを調べる。

本研究により、*E. corrodens* における歯周病原性とプラスミドの相関が明らかになれば、これをプローブにした新たな歯周病の診断が可能となり、さらにワクチン開発といった新たな予防や治療法の開発が可能となるかもしれない。

## 3. 研究の方法

### (1) 菌株および培養条件

*E. corrodens* 1073株は S. S. Socransky (Forsyth Dental Center, Boston, USA) から分与された。*E. corrodens* 1073株より *luxS* 遺伝子をクローニングしカナマイシン耐性遺伝子を挿入後、相同的組換えにより *luxS* 欠損株 1073 *luxS* を作成した。1073株および1073 *luxS* 株は 2mg/ml の硝酸カリウムおよび 5  $\mu$ g/ml のヘミンを含むトリプティックソイブロスで、37°C で培養した。欠損株の培養には、50  $\mu$ g/ml のカナマイシンを添加した。また、*Vibrio harveyi* は AB 最少培地 (10あたり3gのリン酸二カリウム, 1gのリン酸一ナトリウム, 1gの塩化アンモニウム, 0.3gの硫酸マグネシウム, 0.15gの塩化カリウム, 0.01gの塩化カルシウム, 2.5mgの硫酸鉄, および0.5%グルコースを含む) で、30°C で培養した。クローニングおよびシーケンス解析の宿主として *E. coli* XL-1株をベクターとして pHSG298および pMW219を用いた。大腸菌は LB 培地で培養した。上皮細胞への付着アッセイにはヒト咽頭ガン由来でのKB細胞を用い、10%ウシ血清アルブミンを加えたMEM培地で培養した。

### (2) バイオフィームアッセイ (静置系)

*E. corrodens*を上述の培地を分注した96穴マイクロタイタープレートに接種し、37°Cで36時間静置培養した。培地および浮遊菌を除去し、精製水で洗浄乾燥したプレート底面の付着菌を1%クリスタルバイオレットで染色した。99%エタノールで抽出後、595nmの波長の吸光度を測定し、この値をバイオフィルム量とした。

### (3) フローセルを用いたバイオフィルム観察

Modified Robins Deviceの各カセット内に唾液でコーティングしたハイドロアパタイトディスクを固定し、ここに*E. corrodens*の培養液を一定の流速で循環させた。37°Cで1週間還流させた後ディスクを取り出し、ディスク上に形成したバイオフィルムを走査電子顕微鏡により観察した。

### (4) AI-2アッセイ

センサー株 *V. harveyi* BB170をAB培地で30°C一晩培養した。これをAB培地に5,000倍希釈したものを1.8mlずつ試験管に分注し、これに試料を添加し、30°Cで培養した。一定時間後の培養液の発光をMicroLumat LB96Pルミノメーター (Berthold, ドイツ)で測定した。*V. harveyi* BB170の培養上清およびAB培地を添加した場合をそれぞれ陽性対照、陰性対照とし、陰性対照に対する相対値から試料中のAI-2量を求めた。

### (5) オートインデューサー2の精製

*E. corrodens*を培養後、AI-2の生成量が最大となる培養15時間後に集菌した。培養上清をメンブランフィルター(孔径0.22  $\mu$ m)でろ過し、これを酢酸エチルで抽出した。ロータリーエバポレーターにて酢酸エチルを蒸発させ、得られた乾固物を少量の酢酸エチルに溶解させた。これをC18逆相カラムにかけ、60%メタノールにて溶出を行った。この画分をシリカゲルプレートにアプライし、60%メタノールを展開溶媒に薄層クロマトを行った。観察されたそれぞれのバンドをシリカゲ

ルプレートごと削り取り、酢酸エチルによりそれぞれのバンド成分をシリカゲルより溶出した。各溶出液をろ過し酢酸エチルを蒸発させた後、少量のジメチルスルホキシドに溶解させた。各精製段階における画分を *V. harveyi*を用いたバイオアッセイを行い、AI-2を含む画分を得た。

### (6) 線毛遺伝子領域のクローニング

ORF4 の導入によりゲノムの組換えが起こった株からゲノム DNA を抽出し、これを制限酵素 *EcoR* I により完全消化した。これをアガロースゲル電気泳動で分離後、以前タイプ4線毛遺伝子 (*ecpAB*)領域をプローブとしてサザンブロットを行った際に検出されたバンドの位置(約 7kb)のDNA を切り出した。これらを *EcoRI* 消化した pMW219 につなぎ、大腸菌 XL1-Blue 株に導入した。得られたコロニーに対し、*ecpAB* 領域をプローブとしたコロニーハイブリダイゼーションを行い、組換えの起こった線毛遺伝子領域をクローニングした。

### (7) 上皮細胞への付着アッセイ

同じ CFU の値になるように菌液を調節した *E. corrodens* を、KB 細胞に 1 時間感染させた。感染後に菌液を除去し、細胞を PBS で洗浄した。洗浄後に、滅菌水を加えることでKB細胞をバーストさせ、その懸濁液を希釈してヒツジ血液寒天培地にプレーティングした。生えてきたコロニーの数を計測し、上皮細胞への付着菌数として算出した。

### (8) 上皮細胞への侵入アッセイ

同じ CFU の値になるように菌液を調節した *E. corrodens* を、KB 細胞に 3 時間感染させた。感染後に菌液を除去し、細胞を PBS で洗浄した。付着している菌を取り除くために、ストレプトマイシン(50  $\mu$ g/ml)とペニシリン(50IU/ml)を加えた MEM 培地で 90 分間処理し殺菌した。その後培

地を除去し、PBS で洗浄した。付着アッセイと同様に滅菌水を加えてKB 細胞をバーストさせ、その懸濁液を 5%ヒツジ血液寒天培地にプレーティングした。生えてきたコロニーの数を計測し、上皮細胞への侵入菌数として算出した。

#### 4. 研究成果

##### (1) *E. corrodens* のバイオフィーム抑制

カテキン類の一種であるエピガロカテキンガレート(EGCg)が歯周病原性細菌 *E. corrodens* のバイオフィームを有効に抑制することを発見した。EGCg は本菌の増殖には影響せず、この効果は殺菌効果ではないことが示唆された。(特願 2006-184392) また、カテキンやイソフラボンなどのポリフェノール類によって、本菌のバイオフィーム形成が抑制されることがわかった。その阻害効果から、本菌のバイオフィーム形成にはレクチン活性以外の因子が関与することが示唆された。

##### (2) *E. corrodens* のクオラムセンシングがバイオフィーム形成に及ぼす影響

本菌が対数増殖期中期から後期にかけてオートインデュサー2 (AI-2) を生産することを示した。AI-2 の生産に必須な *luxS* 遺伝子を欠損させた株を作成し、この欠損株では野生株に比べてバイオフィーム形成量が 1.3 倍に増加することがわかった。また、相補株では野生株と同程度のバイオフィーム形成量であった。これらの結果から、本菌においてAI-2を介したクオラムセンシング機構がバイオフィーム形成に影響を及ぼすことが示唆された。(J. Biosci. Bioeng. 2006)

クオラムセンシングを制御する AI-2 を *E. corrodens* の培養上清から精製し、解析を行った。精製した AI-2 を本菌の培養液に加え、バイオフィーム形成に及ぼす影響を調べた。その結果、AI-2 が本菌のバイオフィーム形成

を促進することを明らかにした。

##### (3) *E. corrodens* の菌体外産物が炎症応答に及ぼす影響

本菌が菌体外に生産する可溶性物質が口腔上皮細胞の炎症性サイトカインIL-8や接着因子の発現を誘導することを明らかにした。これらの誘導はMAPキナーゼの経路を介して行われることも明らかにした。これらの結果より、本菌が歯周病の炎症応答の進行にも関与することが示唆された(Oral Microbiol. Immun. 2007)。

##### (4) リコンビナーゼによる *E. corrodens* のゲノムの組換えの解析

本研究助成金にて購入した二次元電気泳動装置を用いたプロテオーム解析により、プラスミドの導入によって組換えが起こった株では、かなりグローバルなタンパク質発現の変化が起こっていることが示唆された。さらに、プラスミド導入株は口腔上皮細胞への付着能が増していることを明らかにした。

また、pMU1 の遺伝子構成や配列が *Neisseria* 属のゲノムへの感染、溶原化が報告されている線状ファージに高い相同性が見られることから、pMU1 を口腔内での水平伝播により獲得することにより高病原化した可能性が示唆された。さらに、リコンビナーゼ遺伝子の導入により、溶血活性の上昇や口腔上皮細胞への付着能の増加が見られた。これは、以前報告したレクチン活性の上昇に伴うものと考えられる。これらの知見は、リコンビナーゼの導入によるレクチン活性の上昇とバイオフィーム形成能との間の相関を示唆した。今回の研究結果は、リコンビナーゼによるゲノムの再編が本菌の高病原化を引き起こすことを改めて示し、本研究の更なる遂行により歯周病の診断や治療へと応用できることが期待された。

リコンビナーゼ遺伝子導入株のタイプ4線毛遺伝子領域をクローニングし、その塩基配列を解析した。その結果、リコンビナーゼ遺伝子導入株では線毛遺伝子領域内に別の線毛遺伝子の挿入が起こっていることがわかった。また、その組換えの起きた線毛遺伝子領域は他の臨床分離株で報告されているものとほぼ同一であった。したがって、このようなリコンビナーゼによるゲノムの組換えが起こり、口腔内で高病原化株が出現している可能性が示唆された。そこで、ゲノムの組換えが起こった株をリアルタイム PCR による検出方法を検討し、確立した。

#### 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)

- ① **Y. Noiri, T. Katsumoto, H. Azakami, S. Ebisu:** Effects of Er:YAG laser irradiation on biofilm-forming bacteria associated with endodontic pathogens in vitro. *Journal of Endodontics*, 34:826-829, (2008) 査読有
- ② **A. Harada, H. Azakami, A. Kato:** Amyloid Fibril Formation of Hen Lysozyme Depends on the Instability of the C-Helix (88-99)., *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 72:1523-1530, (2008) 査読有
- ③ **阿座上弘行, 恵比須繁之:** クオラムセンシングをターゲットとした新たな歯周病治療法の開発, *実験医学*(羊土社), 26: 945-949, (2008) 査読無
- ④ **A. Harada, H. Yagi, A. Saito, H. Azakami, A. Kato:** Relationship between the stability of hen egg-white lysozymes mutated at sites designed to

interact with alpha-helix dipoles and their secretion amounts in yeast. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.*, 71:2952-2961, (2007) 査読有

- ⑤ **H. Yumoto, M. Yamada, C. Shinohara, H. Nakae, K. Takahashi, H. Azakami, S. Ebisu, T. Matsuo:** Soluble products from *Eikenella corrodens* induce cell proliferation and expression of interleukin-8 and adhesion molecules in endothelial cells via mitogen-activated protein kinase pathways. *Oral Microbiology and Immunology*, 22:36-45, (2007) 査読有
- ⑥ **H. Azakami, I. Teramura, T. Matsunaga, H. Akimichi, Y. Noiri, S. Ebisu, A. Kato:** Characterization of autoinducer 2 signal in *Eikenella corrodens* and its role in biofilm formation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 102:110-117 (2006) 査読有

[学会発表] (計33件)

- ① **松永哲郎:** 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のオートインデューサーがバイオフィーム形成に及ぼす影響, 日本農芸化学会 (福岡市, 2009年3月29日)
- ② **仲行あゆみ:** 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のゲノム再編による高病原化機構, 日本農芸化学会 (福岡市, 2009年3月28日)
- ③ **松永哲郎:** 歯周病関連細菌 *Eikenella corrodens* のデンタルプラークからの高病原化株の検出, 日本細菌学会 (名古屋市, 2009年3月12日)
- ④ **仲行あゆみ:** 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* はゲノム再編により上皮細胞

への付着を高める, 日本微生物生態学会  
(札幌市, 2008年11月16日)

- ⑤ **阿座上弘行**: 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のオートインデューサー 2 の精製と解析, 日本生物工学会 (仙台市, 2008年8月28日)
- ⑥ **仲行あゆみ**: 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のゲノム再編による高病原化, 日本生物工学会 (仙台市, 2008年8月28日)
- ⑦ **久本達格**: 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のオートインデューサーがバイオフィーム形成に及ぼす影響, 日本農芸化学会 (名古屋市, 2008年3月28日)
- ⑧ **仲行あゆみ**: 歯周病原性細菌ゲノム再編が病原性に及ぼす影響, 日本農芸化学会 (名古屋市, 2008年3月28日)
- ⑨ **T. Hisamoto**: Purification and characterization of autoinducer of periodontopathogenic bacterium, *Eikenella corrodens*., 日本微生物生態学会 (松山市, 2007年9月16日)
- ⑩ **H. Azakami**: Type 2 quorum sensing in *Eikenella corrodens* and relationship with biofilm formation., 日本微生物生態学会 (松山市, 2007年9月16日)
- ⑪ **A. Nakayuki**: Genomic recombination and pathogenicity by the infection of filamentous phage in periodontopathogenic bacteria., 日本微生物生態学会 (松山市, 2007年9月17日)
- ⑫ **松永哲郎**: *Eikenella corrodens* のタイプ 2 クオラムセンシングとバイオフィーム形成との関わり, 日本生物工学会 (東広島市, 2007年9月26日)
- ⑬ **H. Azakami**: Type 2 Quorum Sensing in *Eikenella corrodens* and Relationship with Biofilm Formation., Gordon

Conference (Bacterial Adhesion & Signal Transduction), (Newport, USA, 2007年7月24日)

- ⑭ **久本達格**: 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* のオートインデューサー 2 の精製と解析, 日本農芸化学会 (東京, 2007年3月26日)

〔図書〕 (計1件)

**阿座上弘行** 歯周病菌の生き残り戦略 未来をつくるバイオ 酒づくりから再生医療まで 60 話, 日本生物工学会編 (学進出版) p70-71 (2008).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計1件)

名称: バイオフィーム抑制剤  
発明者: 阿座上弘行, 加藤昭夫, 松永哲郎  
権利者: 国立大学法人山口大学  
種類:  
番号: 特願 2006-184392  
出願年月日: 平成 18 年 7 月 4 日  
国内外の別: 国内

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

## 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・准教授  
研究者番号: 40263850

### (2) 研究分担者 (2006~2007 年度)

加藤 昭夫 (KATO AKIO)  
山口大学・名誉教授  
研究者番号: 00035114

### (3) 連携研究者 (2008 年度)

加藤 昭夫 (KATO AKIO)  
山口大学・名誉教授  
研究者番号: 00035114

### (4) 研究協力者

松永哲郎, 仲行あゆみ, 久本達格  
山口大学・大学院農学研究科・大学院生