

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月28日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659984

研究課題名（和文） 歯周病細菌の増殖や病原因子に影響を及ぼす口腔常在菌の探索と原因成分の解明

研究課題名（英文） Search for oral predominant bacteria and clarification of causative components which affect growth and virulence factors of 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）・准教授

研究者番号：50260641

研究成果の概要（和文）：歯周病細菌が口腔内に定着するためには、口腔常在菌との相互作用が重要な役割を果たしている。代表的な口腔常在菌である *Streptococcus oralis* の培養上清は歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* の増殖を抑制した。*P. gingivalis* 線毛と結合する *S. oralis* glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の存在下では、*P. gingivalis* のバイオフィーム形成に関連する種々の遺伝子の発現に影響を受けた。

研究成果の概要（英文）：Interaction with oral predominant bacteria plays an important role in colonization of periodontopathic bacteria. Culture supernatant of *Streptococcus oralis* repressed growth of *Porphyromonas gingivalis*. *S. oralis* glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), which binds *P. gingivalis* fimbriae, affected expression of *P. gingivalis* gene related to biofilm formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：歯周病細菌、口腔常在菌、病原因子、バイオフィーム

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病細菌が口腔内に定着し、病原性を発揮するためには、歯の表面に早期に定着する口腔レンサ球菌など口腔常在菌との相互作用が重要な役割を果たしている。我々は、これまでに、主要な歯周病細菌である *Porphyromonas gingivalis* の線毛は口腔レンサ球菌菌体表層に存在する glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) と特異的で高親和性の結合能を有し、その結合部位は *Streptococcus oralis* GAPDH のアミノ酸残基 166-183 に存在することを明らかにした。最近、*P. gingivalis* は、共存する早期定着菌との組み合わせにより混合バイオフィーム形成量に差があることが報告されているが、口腔常在菌が歯周病細菌

の病原因子やバイオフィーム形成に及ぼす影響については未だ不明な点が多い。また、浮遊状態にある細菌とバイオフィームを形成している細菌では、その病原性に差があることがわかってきている。したがって、口腔常在菌およびその菌体成分が、共存する歯周病細菌の病原因子の発現やバイオフィーム形成能に影響を及ぼす可能性は十分考えられることから、本研究の着想に至った。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、歯周病細菌と口腔常在菌との相互作用について解析し、口腔常在菌あるいは口腔常在菌成分が歯周病細菌の病原因子やバイオフィーム形成に及ぼす影響を明らかにすることである。

本研究では、まず、口腔常在菌との共培養が、歯周病細菌の増殖に及ぼす影響について検討した。次に、口腔常在菌成分と相互作用する歯周病細菌成分を探索した。さらに、口腔常在菌成分との相互作用が、歯周病細菌の病原因子やバイオフィーム形成などに関わる成分の発現に及ぼす影響について検討した。

### 3. 研究の方法

(1) 口腔常在菌との共培養が歯周病細菌の増殖に及ぼす影響

代表的な口腔常在菌の一つである *S. oralis* と歯周病細菌 *P. gingivalis* を 37°C で 24 時間、嫌気条件下で共培養し、*P. gingivalis* の増殖に及ぼす影響を調べた。また、*S. oralis* を一晩培養し、遠心操作により培養上清を得た。培地に濾過滅菌した *S. oralis* 培養上清を添加することにより、*S. oralis* 成分が *P. gingivalis* の増殖に及ぼす影響を調べた。*P. gingivalis* の菌数は、200  $\mu$ g/ml ゲンタマイシンを含む血液寒天培地を用いてコロニー数を計測することにより求めた。予備実験で、200  $\mu$ g/ml ゲンタマイシンを含む血液寒天培地では、*S. oralis* はコロニーを形成できないが、*P. gingivalis* はコロニーを形成できることを確認した。

(2) 口腔常在菌成分と相互作用する歯周病細菌成分の探索

我々は、これまでに、口腔レンサ球菌の菌体表層に存在する GAPDH は、*P. gingivalis* 線毛と結合し、バイオフィーム形成に関与することを報告している。そこで、本研究では、*P. gingivalis* 線毛以外に口腔レンサ球菌 GAPDH と相互作用する成分を pull-down assay により同定した。線毛結合領域（アミノ酸残基 166-183）を欠除させた His-tag リコンビナント GAPDH (rGAPDH  $\Delta$  166-183) を作製し、rGAPDH  $\Delta$  166-183 存在下で *P. gingivalis* を一晩培養した。その後、菌体を溶解し、溶解液を HisTrap HP カラムにかけ、rGAPDH  $\Delta$  166-183 を吸着させた。rGAPDH  $\Delta$  166-183 に結合した *P. gingivalis* 成分は、0.85M NaCl により溶出した。溶出液を二次元電気泳動により分離し、目的とするプロットのタンパク質は、MALDI-TOF/TOF-MS により解析し、NCBI Inr Bacteria database を用いて同定した。また、同定した成分のリコンビナントタンパク質を作製し、*P. gingivalis* との結合能を BIAcore により解析した。さらに、口腔レンサ球菌と *P. gingivalis* のバイオフィーム形成に及ぼすリコンビナントタンパク質の影響を蛍光顕微鏡により調べた。

(3) 口腔常在菌成分が歯周病細菌の病原因子の発現やバイオフィーム形成に及ぼす影

響

口腔レンサ球菌 rGAPDH 存在下で培養した *P. gingivalis* と rGAPDH 非存在下で培養した *P. gingivalis* を比較し、*P. gingivalis* の病原因子の発現に及ぼす GAPDH の影響を real-time quantitative RT-PCR 法により解析した。*P. gingivalis* ( $5 \times 10^8$  CFU/ml) と rGAPDH (5  $\mu$ g) を 3 時間反応させ、抽出した RNA から cDNA を作製し、real-time RT-PCR により mRNA 量を測定した。mRNA 量は 16S rRNA を用いて標準化した。rGAPDH と反応させなかった *P. gingivalis* をコントロールとして用い、mRNA の発現量の比を求めた。

### 4. 研究成果

(1) 口腔常在菌との共培養が歯周病細菌の増殖に及ぼす影響

*S. oralis* と *P. gingivalis* を同時に培養すると、*S. oralis* は増殖したが、*P. gingivalis* の増殖はほぼ完全に抑制された。これは、培養中に *S. oralis* が産生した酸により培地中の pH が酸性になったために、*P. gingivalis* が増殖できなくなったものと考えられた。そこで、pH をほとんど変化させない量の *S. oralis* 培養上清を加えて *P. gingivalis* の増殖を調べた結果、*S. oralis* 培養上清の存在により *P. gingivalis* の増殖が抑制される傾向が認められた。この結果は、口腔常在菌の産生成分が *P. gingivalis* の増殖に影響を及ぼしていることを示唆している。

(2) 口腔常在菌成分と相互作用する歯周病細菌成分の探索

Pull-down assay にて、*S. oralis* GAPDH と結合する *P. gingivalis* 成分を調べた結果、TonB-dependent receptor protein (RagA4)、4-hydroxybutyryl-CoA dehydrogenase (AbfD)、lysine-specific cysteine protease (Kgp)、arginine-specific cysteine proteinase (RgpB)、NAD-dependent glutamate dehydrogenase (GDH)、GAPDH および malate dehydrogenase (MDH) が同定された。同定した成分のリコンビナントタンパク質を作製し、*S. oralis* rGAPDH との結合能を BIAcore で調べた結果、Kgp と RgpB を除き、いずれも高親和性の結合を示した。次に、同定した成分のリコンビナントタンパク質を用いて、*S. oralis* と *P. gingivalis* のバイオフィーム形成に及ぼす影響を調べたところ、MDH と GAPDH はバイオフィーム形成を濃度依存的に抑制したが、RagA4、AbfD および GDH はバイオフィーム形成を濃度依存的に促進することが示された。Kgp と RgpB はバイオフィーム形成にあまり影響を及ぼさなかった。*P. gingivalis* の GDH は菌体表層と関連していることが報告されており、*P.*

*gingivalis*のRagA4も菌体表層に露出していることが報告されている。したがって、口腔レンサ球菌菌体表層に存在する GAPDH と *P. gingivalis* の菌体表層に存在する RagA4 や GDH が結合し、混合バイオフィーム形成を促進していることが考えられた。*P. gingivalis* MDH も菌体表層に存在することが報告されており、さらに、口腔レンサ球菌 rGAPDH と高親和性の結合を示したことから、MDH も *P. gingivalis* と *S. oralis* とのバイオフィーム形成を促進することが予想された。しかし、蛍光顕微鏡による観察では、MDH や *P. gingivalis* GAPDH は混合バイオフィーム形成を抑制した。上記のタンパク質がバイオフィーム形成に及ぼすメカニズムを詳細に明らかにするためには、さらなる研究が必要だが、口腔レンサ球菌と歯周病細菌の表層タンパク質の相互作用には、バイオフィーム形成に正に働くものと負に働くものがあることが示唆された。そこで、次に、口腔常在菌成分との相互作用により、本研究で同定した *P. gingivalis* のタンパク質や遺伝子の発現がどのような影響を受けるのかを検討した。

### (3) 口腔常在菌成分が歯周病細菌の病原因子の発現やバイオフィーム形成に及ぼす影響

口腔レンサ球菌の rGAPDH と 3 時間反応させた *P. gingivalis* 成分の遺伝子発現量を rGAPDH と反応させていないものと比較すると、線毛をコードする遺伝子である *fimA* の発現量には有意な差はみられなかったが、バイオフィーム形成に関与する *luxS* の発現量は約 6 倍に増加することが示された。

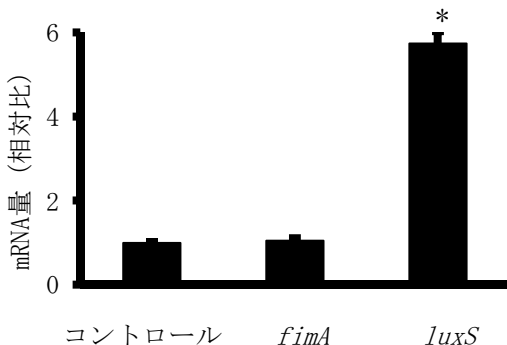


図1 *S. oralis* GAPDH 存在下における *P. gingivalis* *fimA* および *luxS* 発現量  
\*:  $P < 0.01$  (n = 3)

また、口腔レンサ球菌の rGAPDH と 3 時間反応させると、本研究で同定した *P. gingivalis* 成分のうち、*ragA4*、*abfD* および *gdh* の mRNA 発現量は、約 2-4 倍と有意に増加し、逆に、*gapdh* および *mdh* の発現量は有意に抑制された。タンパク質レベルでの発現量を検討するため、菌体表層に関連する NADH、GDH および MDH の酵素活性を調べた結果、口

腔レンサ球菌の rGAPDH と反応させた *P. gingivalis* では、菌体表層に関連する NADH および GDH 活性はそれぞれ約 3 倍および約 2.4 倍と有意に増加し、MDH 活性は約 3 割に低下したことから、タンパク質レベルにおいても、mRNA 発現量と同様の変化がみられることが示された。さらに、同定した *P. gingivalis* タンパク質のリコンビナントタンパク質を作製し、同タンパク質存在下における *P. gingivalis* *luxS* mRNA 発現量を調べた結果、RagA4、AbfD および GDH のリコンビナントタンパク質は *luxS* mRNA の発現を 3-8 倍と有意に増加させたが、MDH は *luxS* mRNA の発現量を有意に抑制した。

本研究により、口腔レンサ球菌の GAPDH は、*P. gingivalis* の線毛、AbfD、RagA4、GDH、GAPDH および MDH 結合することがわかった。本研究で同定された *P. gingivalis* 成分のうち、AbfD、RagA4 および GDH は *P. gingivalis* と *S. oralis* の混合バイオフィーム形成を促進する方向に働き、GAPDH および MDH はバイオフィーム形成を抑制する方向に作用することが示された。さらに、口腔レンサ球菌菌体表層 GAPDH は、*P. gingivalis* の RagA4、AbfD、GDH および *luxS* の発現を増加させ、バイオフィーム形成を促進させるが、*P. gingivalis* の MDH や GAPDH の発現を減少させ、バイオフィーム形成を抑制することが示された。

本研究の結果は、口腔常在菌と歯周病細菌の菌体表層に存在するタンパク質が相互に作用し、バイオフィーム形成に影響を与えていることを示している。また、この相互作用には、バイオフィーム形成を促進する方向に働くものと抑制する方向に働くものが存在し、*S. oralis* と *P. gingivalis* のバイオフィーム形成にはフィードバック機構が存在する可能性があること示唆している。

本研究は、口腔常在菌と歯周病細菌との相互作用に新たな知見を加え、歯周病細菌の口腔定着機構の一端を解明し、将来的に、歯周病細菌の口腔内定着阻害を目的とした歯周病予防法へ展開できるものである。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者および連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

① Maeda Kazuhiko, Nagata Hideki, Kuboniwa Masae, Ojima Miki, Osaki Tsukasa, Minamino Naoto, Amano Atsuo, Identification and characterization of *Porphyromonas gingivalis* client proteins that bind to *Streptococcus oralis* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, Infection and Immunity, 査読有, 81,

(2013), 753-763.

② Ojima Miki, Hanioka Takashi, Tanaka Hideo, Necessity and readiness for smoking cessation intervention in dental clinics in Japan, *Journal of Epidemiology*, 査読有, 22, (2012), 57-63.

③ 岩崎未央、永田英樹、口腔レンサ球菌の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase から同定された *Porphyromonas gingivalis* の線毛に結合するペプチドによるバイオフィルム形成の阻害、大阪大学歯学雑誌、査読無、55 巻、(2011)、91-96.

④ 雫石聰、田中宗雄、永田英樹、細菌の歯周保健のための機能性食品に関するエビデンス、口腔衛生学会雑誌、査読有、61 巻、(2011)、192-202.

[学会発表] (計 12 件)

① Nagata Hideki, Maeda Kazuhiko, Amano Atsuo, Effect of streptococcal GAPDH on expression of *Porphyromonas gingivalis* proteins, 60th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, December 15, 2012, 新潟コンベンションセンター.

② 永田英樹、歯周病予防のための機能性食品、第 8 回神戸薬科大学食品講座 (招待講演)、2012 年 11 月 11 日、神戸薬科大学.

③ 永田英樹、前田和彦、関根伸一、天野敦雄、歯周病原性細菌の生育に及ぼす口腔常在菌の影響、第 23 回近畿・中国・四国口腔衛生学会、2012 年 10 月 7 日、滋賀県立県民交流センター.

④ 前田和彦、永田英樹、久保庭雅恵、小島美樹、天野敦雄、*Porphyromonas gingivalis* の AbfD はバイオフィルム形成に関与する、第 61 回日本口腔衛生学会・総会、2012 年 5 月 27 日、神奈川歯科大学.

⑤ 関根伸一、橋野恵衣、永田英樹、天野敦雄、歯肉由来 iPS 細胞を利用した樹状細胞は抗原特異的な抗体産生を誘導する、第 61 回日本口腔衛生学会・総会、2012 年 5 月 27 日、神奈川歯科大学.

⑥ 永田英樹、歯周組織の健康の保持増進を目的とした機能性食品の可能性、第 9 回日本機能性食品医学会総会 (招待講演)、2011 年 12 月 10 日、大阪大学.

⑦ 橋野恵衣、久保庭雅恵、黒田裕美子、前田和彦、小島美樹、永田英樹、天野敦雄、メタ

ボロミクス解析によるエリスリトール存在下での *Porphyromonas gingivalis* 代謝プロファイルの検討、第 60 回日本口腔衛生学会・総会、2011 年 10 月 10 日、日本大学松戸歯学部.

⑧ 前田和彦、久保庭雅恵、永田英樹、小島美樹、黒田裕美子、橋野恵衣、東江正裕、*Porphyromonas gingivalis* GAPDH は *Streptococcus oralis* GAPDH に特異的に結合する、第 60 回日本口腔衛生学会・総会、2011 年 10 月 9 日、日本大学松戸歯学部.

⑨ 前田和彦、永田英樹、小島美樹、久保庭雅恵、天野敦雄、*Porphyromonas gingivalis* のリンゴ酸デヒドロゲナーゼはバイオフィルム形成に関与する、第 22 回近畿・中国・四国口腔衛生学会、2011 年 10 月 2 日、徳島大学.

⑩ 関根伸一、岩崎未央、永田英樹、天野敦雄、歯肉由来 iPS 細胞を利用した樹状細胞の免疫誘導能解析、第 22 回近畿・中国・四国口腔衛生学会、2011 年 10 月 2 日、徳島大学.

⑪ Maeda Kazuhiko, Nagata Hideki, Kubonisa Masae, Ojima Miki, *Porphyromonas gingivalis* NAD-dependent glutamate dehydrogenase binds to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus oralis*, International Union of Microbiological Societies 2011 Congress, September 10, 2011, Sapporo.

⑫ 永田英樹、歯周組織関連の特定保健用食品開発の可能性、口腔保健用機能性食品研究会 (招待講演)、2011 年 8 月 21 日、鶴見大学.

## 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)・准教授  
研究者番号：50260641

### (2) 研究分担者

小島 美樹 (OJIMA MIKI)  
大阪大学・歯学研究科 (研究院)・助教  
研究者番号：20263303

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

田中 宗雄 (TANAKA MUNEKO)  
大阪大学・歯学部附属病院・講師  
研究者番号：90263300

(H23年10月31日まで研究分担者として参画)