

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659985

研究課題名(和文)二相分配法による安定型高次構造リポ多糖の分離と病原性の解析

研究課題名(英文)The analysis of LPS aggregates derived from aqueous phase of two-phase separation system

研究代表者

藤瀬 修 (Fujise, Osamu)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：40315099

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、歯周病原性細菌である歯周病原性細菌から抽出したLPSが二相分配法において界面活性剤相からだけでなく、水相からも検出される理由を解明することである。まず、LPSは液体中で高次構造を形成する際、疎水結合に加えて二価陽イオンを介したイオン結合を形成するため、界面活性剤に対して抵抗性を示し、水相にLPSが残存する可能性が示唆された。さらに、菌体外DNA-LPS複合体を菌体から精製する方法を確立した結果、LPSは菌体外DNAと非イオン性に結合することも界面活性剤抵抗性に示す理由であると考えられた。DNA-LPS複合体は、LPSのみの高次構造体とは異なる病原性を示すかもしれない。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, it was observed that LPS from periodontopathic *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* was detected in aqueous phase, in addition to detergent phase, after two-phase separation system. The aim of this study was to examine how LPS remained in aqueous phase. Our results suggest that LPS in aqueous environment forms aggregations via ionic bridge involving divalent cations, beside hydrophobic association. This ionic force in LPS aggregates might promote resistance against detergent. In addition, this study established the method to purify DNA-LPS complex located cell surface, and the complex formed via non-ionic association was found to be detected in aqueous phase of two-phase separation system. It should be examined if the non-ionic DNA-LPS complex has different virulence from the ionic LPS aggregate.

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：二相分配法 リポ多糖 歯周病原細菌 高次構造 DNA

1. 研究開始当初の背景

(1) 両親媒性の LPS が液体に溶解すると、モノマーからミセル等の高次構造まで多様な形態を示すが、モノマー-LPS より病原性が高いかどうかは意見が二分している。二価陽イオンが介在すると高次構造は安定化するが、その病原性については不明な点が多い。病原性が決定されていない理由は、高次構造 LPS のみを分離・検出する方法がないためである。

(2) LPS をタンパク質等のサンプルから簡便に除去する方法として二相分配法が広く応用されている。二相分配法は温度変化により、水相と界面活性剤相に分離する方法である。その際、LPS 分子が界面活性剤のミセルの中に取り込まれることにより、タンパク質等と分離除去できるといふシステムではある。しかし、その LPS の分離除去の効率がどのような因子により影響を受けるかは不明待てんが多い。

(3) 全てのグラム陰性菌に共通する病原因子として、LPS と非メチル化 CpG を含む細菌 DNA (CpG DNA) がある。各因子は宿主の免疫を活性化する分子として有名である。しかし、細菌自身が、LPS と CpG DNA を複合体 (LPS-DNA 複合体) の状態で産生しているとの報告はこれまでない。もし LPS-DNA 複合体が存在するのであれば、LPS 分子と DNA 分子の結合様式によっては、液体中で安定した高次構造をとる可能性がある。

(4) 歯周病はグラム陰性菌を中心とした複数の細菌感染によって生じる疾患で、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* は主要な歯周病原性細菌である。この細菌は LPS を産生し、歯周病のみならず、冠動脈心疾患にも関与することが報告されている。血流に入った LPS は、高次構造をとると考えられるが、その LPS が生体の免疫システムによりどのように認識されるのかは不明である。また、菌体が産生する LPS-DNA 複合体の報告がないため、*A. actinomycetemcomitans* に関してもその存在は不明である。

2. 研究の目的

(1) 菌体より抽出した LPS が二相分配法において界面活性剤相からだけでなく、水相からも検出される理由を解明することである。

(2) LPS-DNA 複合体を、二相分配法を含む方法により効率よく抽出・精製する方法を確立することである。

3. 研究の方法

(1) 安定型高次構造 LPS を分離する際の条件設定； LPS の高次構造は液体サンプル内外の要素 (温度、pH、LPS 濃度等) に影響を受けて変化する。そこで、LPS サンプルの pH および二価陽イオン濃度を変化させて二相分配法を行い、水層への安定型高次構造 LPS の回収率が最も高い条件設定を検証した。

(2) 現在、界面活性剤 Triton X-114 を用いた二相分配法は、サンプル中に混在している核酸やタンパク質は水相へ、LPS は界面活性剤相へと分離する方法として知られている。我々はこの方法を発展させた Triton-EDTA 二相分配法を開発した。つまり、中性フェノール処理で菌体から抽出した LPS-DNA 複合体を Triton-EDTA 二相分配法で処理すると、イオン結合性の LPS-DNA 複合体は EDTA の作用で解体され、非イオン結合性の複合体を界面活性剤相に分離した。界面活性剤相には LPS の単体も存在するため、さらに精製過程が必要となる。LPS-DNA 複合体は、アガロースゲル電気泳動にて約 23 kb の位置するバンドとして単離し、電気溶出法により回収した。

4. 研究成果

(1) LPS が液体中で高次構造を形成する際、疎水結合に加えてイオン結合を介するために、界面活性剤による高次構造の分解に対して抵抗性を示し、水相に LPS が残存する可能性がある。その事を示唆する結果として、歯周病原性細菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* から抽出した LPS 水溶液の条件を高い pH あるいは二価陽イオン存在下にすると、LPS は界面活性剤抵抗性を示した。

(2) 菌体表面には菌体外 DNA が存在することは、これまで多くの細菌で観察されてきた。*A. actinomycetemcomitans* においても菌体外 DNA の存在は既に確認されている。本研究では、菌体外 DNA がイオン性に LPS と架橋を形成し、菌体表面に存在していることを判明した。

(3) 本研究ではさらに菌体外 DNA を菌体から抽出する方法として、中性化フェノールを用いる方法を確立した。この方法で抽出された *A. actinomycetemcomitans* の菌体外 DNA 水溶液から LPS を除去するために二相分配法を応用したが、低い pH かつ EDTA 存在下でも水相に LPS が菌体外 DNA と共に残存していた。抽出液を DNase I 処理して二相分配法に応用すると、LPS のほとんどを界面活性剤相に移行できた。つまり、LPS は菌体

外 DNA と非イオン性に結合することで界面活性剤抵抗性を示したと考えられる。

(4) 非イオン性に結合した DNA-LPS 複合体を中性化フェノールと二相分配法で抽出した後、その精製のためにアガロースゲル電気泳動と電気溶出法を応用した。その結果、切り出した同一アガロース片に DNA と LPS の両者を検出した。

(5) DNA-LPS 複合体は非イオン性に結合していると考えられるので、LPS のみの高次構造体とは異なる病原性を示す可能性がある。

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 5 件)

Tanaka A, Fujise O, Chen C, Miura M, Hamachi T, Maeda K, A novel gene required for natural competence in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, Journal of Periodontal Research, 査読有、47 巻、2012 年、129-134

Kikuchi H, Fujise O, Miura M, Tanaka A, Hisano K, Haraguchi A, Hamachi T, Maeda K, Serotype-dependent expression patterns of stabilized lipopolysaccharide aggregates in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* strains, Microbiology and Immunology, 査読有、56 巻、2012 年、680-691

Takasaki K, Fujise O, Miura M, Hamachi T, Maeda K, *Porphyromonas gingivalis* displays a competitive advantage over *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* in co-cultured biofilm, Journal of Periodontal Research, 査読有、48 巻、2013 年、286-292

Hisano K, Fujise O, Miura M, Hamachi T, Matsuzaki E, Nishimura F, The *pga* gene cluster in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is necessary for the development of natural competence in Ca²⁺-promoted biofilms, Molecular Oral Microbiology, 査読有、29 巻、2014 年、79-89

Haraguchi A, Miura M, Fujise O, Hamachi T, Nishimura F, *Porphyromonas gingivalis* gingipain is involved in the detachment and aggregation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm, Molecular Oral Microbiology, 査読有、29 巻、2014 年、131-143

〔学会発表〕(計 4 件)

原口 晃、三浦真由美、藤瀬 修、高崎 敬、田中 絢子、濱地 貴文、前田勝正、*Porphyromonas gingivalis* による *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* のバイオフィーム剥離に関する研究、第 54 回日本歯周病学会秋季学術大会、2011 年 9 月 24 日、下関市

田中絢子、藤瀬 修、三浦真由美、高崎 敬、濱地 貴文、前田勝正、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* 菌体表面構造物の natural competence への関与、第 54 回日本歯周病学会秋季学術大会、2011 年 9 月 24 日、下関市

久野恭子、藤瀬 修、三浦真由美、濱地 貴文、前田勝正、二価の陽イオンは *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* のバイオフィーム形成を促進する、平成 24 年度日本歯周病学会九州 5 大学・日本臨床歯周病学会九州支部共催合同研修会、2012 年 10 月 28 日、福岡市

久野恭子、藤瀬 修、三浦真由美、濱地 貴文、前田勝正、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* における *pga* 遺伝子クラスターの凝集能と natural competence に対する役割について、日本歯科保存学会平成 25 年度春季学術大会(138 回)、2013 年 6 月 27 日、福岡市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
無し

6 . 研究組織

(1)研究代表者

藤瀬 修 (FUJISE, Osamu)
九州大学・大学病院・講師
研究者番号：40315099

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

三浦真由美 (MIURA, Mayumi)
九州大学・歯学研究院・助教
研究者番号：404054