

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 19 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670797

研究課題名(和文) 歯肉縁下プラーク細菌叢を改善に導く新規抗菌物質の探索-LPS合成系からの挑戦-

研究課題名(英文) Survey on novel antibiotics to improve subgingival microflora-challenge through LPS biosynthesis

研究代表者

苔口 進 (Kokeyuchi, Susumu)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：10144776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：LpxCはグラム陰性菌に特異的なリポ多糖合成系の第一段階に関わる酵素で、細菌の増殖や生存に必須であるので、新規抗菌薬開発の標的として有力視されている。

本研究ではLpxC 阻害剤CHR-12の各種口腔細菌に対する抗菌活性を調べた。大腸菌LPSやLpxC構造が類似している*A. actinomycetemcomitans*等に対してCHR-12は顕著な増殖阻害やバイオフィーム形成阻害を示したが、*P. gingivalis*等に対する阻害効果は弱かった。*P. gingivalis* リコンビナントLpxCを作製してその酵素活性測定系の確立を目指したが、大腸菌LpxC構造とは異なるためが困難であった。

研究成果の概要(英文)：The bacterial enzyme LpxC catalyzes the first step of LPS biosynthesis in Gram-negative bacteria. It is essential for growth and viability of Gram-negative bacteria, which has no sequence homology with any mammalian protein. So, it is expected a promising target in the development of novel antibiotics against Gram-negative bacteria.

In this study, antibacterial activity of CHR-12, which is one of LpxC inhibitors, on various oral bacteria were investigated. CHR-12 was highly effective in suppressing the growth of *A. actinomycetemcomitans*, *F. nucleatum*, *E. corrodens* and *C. rectus*, which LpxC orthologs structure were resemble to *E. coli* LpxC, but not of *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. nigrescens* and *C. ochracea*. These LpxC orthologs were different from *E. coli* LpxC. CHR-12 was also inhibit *A. actinomycetemcomitans* biofilm formation. *P. gingivalis* recombinant LpxC for X-ray crystal structural study was prepared, but it is difficult to assay the LPS synthesis by fluorescence-based method.

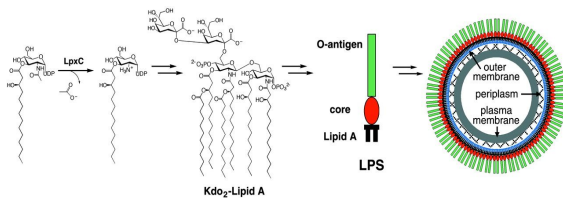
研究分野：歯学

キーワード：感染症 歯学 細菌 ゲノム 抗菌薬

1. 研究開始当初の背景

口腔バイオフィーム感染症は口腔局所のみ慢性感染症に留まらず、肺炎、心臓血管障害、糖尿病さらには妊娠障害等との関連性が明らかとなり、昨今、口腔内細菌特に歯周病細菌の全身健康への影響が注目されている。つまり、口腔バイオフィームは機械的あるいは抗菌薬による化学的除去に抵抗し、難治性感染症としての病態を示す。また長期間の抗菌療法を受けている易感染性患者口腔内には多剤耐性日和見菌も出現することから、口腔バイオフィーム感染症である歯周病に対して新しい発想による制御方策が求められている。

一方、大腸菌では生命現象を解き明かすモデル微生物として、その全ゲノムがいち早く解読され、それぞれの遺伝子の機能の解明が進められ、約 4000 の全予測遺伝子の中で 303 遺伝子が必須であることが確認された。特に下図の細菌 LPS 合成系酵素の中でも第一段階のキーエンザイムである UDP-3-O-(R-3-hydroxymyristoyl)-GlcNAc deacetylase (LpxC) は、グラム陰性菌の増殖・生存に必須であることが判明した。



この LpxC は、抗菌薬が全く効かない多剤耐性緑膿菌に対する新規抗菌化合物開発の最終ターゲット酵素として有力視されている。グラム陰性細菌である歯周病細菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* や *Porphyromonas gingivalis* などについても全ゲノム解析が進められている。歯周病細菌についてもこの LPS 合成系の中で LpxC を特異的に阻害できれば、グラム陰性歯周病細菌を特異的に減少・消滅させて、歯肉縁下プラーク細菌叢を改善できるばかりでなく、歯周病の治癒に繋がるという着想を長年温めてきた。

2. 研究の目的

歯周病は歯肉縁下プラーク細菌叢が善玉菌を含むグラム陽性菌を主体とする健常な状態から、歯周病細菌と言われるグラム陰性嫌気性細菌の割合が極度に増加した病的な状態に遷移することで発症、進行する。もし、グラム陰性歯周病細菌のみを特異的に減少・消滅させて、プラーク細菌叢を元の健常状態へと改善することができれば、これまでの歯周病治療の概念を根幹から変える画期的な方策となろう。

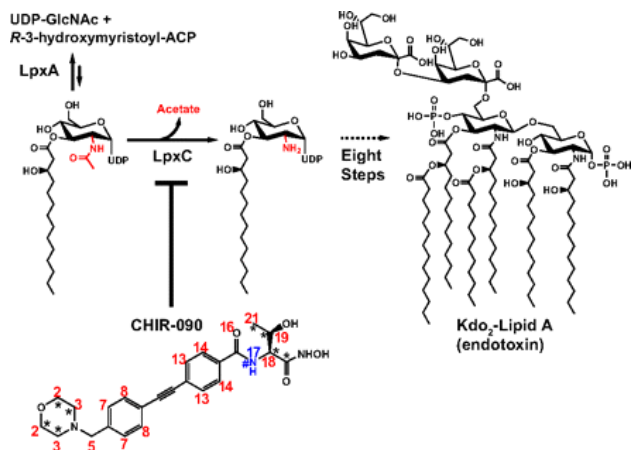
そこで本研究では、グラム陰性菌に共通な病原因子のひとつで、表層に特有かつ必須な構成成分である内毒素、リポ多糖体(LPS)に着目した。この細菌に必須な LPS 合成系を阻害できれば、グラム陰性歯周病細菌が特異的

に減少・消滅し、かつプラーク細菌叢の改善に繋がるという着想に基づき、歯周病細菌 LPS 合成系、特に第一段階のキーエンザイムである LpxC 遺伝子の解析と LpxC に対する新規阻害化合物を探ることを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

(1) LpxC 阻害剤の検討

LpxC を阻害する化合物のひとつ CHIR-090 については大腸菌や多剤耐性緑膿菌に対する研究が進められている。そこでこの CHIR-090 に類似しており合成しやすい化合物 CHR-12 を検討した。



(2) 供試菌と培養

対照の大腸菌として *Escherichia coli* NIH JC-2、口腔内グラム陽性レンサ球菌として *Streptococcus mutans* NCTC10449、*Streptococcus salivarius* JCM5707 を用いた。歯周病細菌として以下の菌株を用いた。*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4、*A. actinomycetemcomitans* ATCC7000685、*A. actinomycetemcomitans* 310a(バイオフィーム形成株)、*Fusobacterium nucleatum* ATCC25586、*Eikenella corrodens* ATCC23834、*Campylobacter rectus* ATCC33238、*Porphyromonas gingivalis* ATCC33277、*P. gingivalis* FDC381、*P. gingivalis* W83、*Prevotella intermedia* ATCC25611、*P. nigrescens* ATCC33563、*Capnocytophaga ochracea* S3

大腸菌と口腔レンサ球菌は 0.5%酵母エキス添加の brain heart infusion (BHI) 培地で、また *A. actinomycetemcomitans* はその BHI 培地にさらに 0.4%NaHCO₃ を添加して好気培養した。その他の歯周病細菌はこれまでの方法に従って変法 GAM 培地で嫌気培養を行うなど最適な培地と培養条件で培養した。

(3) CHR-12 の増殖阻害効果

液体培地に希釈した CHR-12 を加えてその培地における菌の増殖状態を OD660nm の濁度を測定して比較した。

(4) CHR-12 のバイオフィルム形成阻害効果
A. actinomycetemcomitans 310a 株に対する CHR-12 のバイオフィルム形成阻害効果を山本らの方法 (環境感染誌, Vol. 24, no.2, p85-92) を参考にクリスタルバイオレット法を用いて検討した。

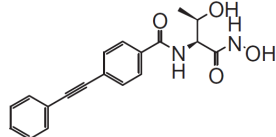
(5) 各種歯周病細菌の LpxC ホモログの探索
 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) のデータベースから大腸菌 *lpxC* 塩基配列やアミノ酸配列と各種歯周病細菌の全ゲノムデータとを比較して各種歯周病細菌 *lpxC* ホモログ遺伝子候補を選出し比較した。

(6) *P. gingivalis* のリコンビナント LpxC の作製
P. gingivalis W83 の *lpxC* 候補遺伝子の全長(1389bp)を PCR 法によって増幅した。大腸菌では LpxC リコンビナントタンパク発現の困難が予想されるので、*Brevibacillus* タンパク発現系 (TAKARA) を選択した。増幅した *P. gingivalis* W83 *lpxC* 遺伝子断片を *Brevibacillus* Expression System ベクター pROXb3 に連結し、発現ベクター pROXb3-LpxC を構築した。

(7) LpxC 酵素活性測定
 LpxC 酵素活性測定系は Hernick M の方法 (Fluorescence-based methods to assay inhibitors of lipopolysaccharide synthesis. Methods Mol Biol. 2011;739:123-33.) を参考に行った。

4. 研究成果

(1) CHR-12 の合成
 東京化成化学株式会社の協力を得て、下図の化学構造を持つ CHR-12 (右図) を数百 mg 合成できた。



(2) CHR-12 の各種口腔細菌に対する阻害効果
 表 1 に CHR-12 の各種口腔細菌に対する阻害効果をまとめた。

表 1. CHR-12 の各種細菌に対する増殖阻害効果

CHR-12濃度と細菌種	0.1 µg/mL	1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL
<i>E. coli</i> NIH JC-2	++	+ *	-	-
<i>S. mutans</i> NCTC10449	++	++	++	++
<i>S. salivarius</i> JCM5707	++	++	++	++
Aa Y4	++	+ *	-	-
Aa ATCC700685(ゲノム解析株)	++	-	-	-
Aa 310a(バイオフィルム形成株)	++	++	-	-
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	++	++	++	+ *
<i>P. gingivalis</i> FDC381	++	++	++	+ *
<i>P. gingivalis</i> W83	++	++	++	+ *
<i>F. nucleatum</i> ATCC25586	++	+ *	-	-
<i>E. corrodens</i> ATCC23834	++	+ *	-	-
<i>C. rectus</i> ATCC 33238	++	+ *	-	-
<i>P. intermedia</i> ATCC 25611	++	++	++	+ *
<i>P. nigrescens</i> ATCC 33563	++	++	++	+ *
<i>C. ochracea</i> S3	++	++	++	+ *

++: 菌の増殖が認められる(阻害なし) +: ある程度増殖阻害 -: 増殖阻害

CHR-12 はグラム陽性菌である口腔レンサ球菌に対して阻害効果は認められなかったが、グラム陰性菌 *A. actinomycetemcomitans* に対しては大腸菌と同等の阻害効果が認められた。しかしながら、LPS 構造の異なる *P. gingivalis* などの歯周病細菌に対してはその阻害効果が弱かった。ちなみに、CHR-12 の MIC は 大腸菌では 0.16~1.25 µg/mL、緑膿菌では 0.63~10 µg/mL である。

(3) CHR-12 の阻害効果と各種口腔細菌の LpxC の大きさとの関連性

大腸菌必須遺伝子のひとつである *lpxC* 塩基配列と KEGG からの各種歯周病細菌の全ゲノムデータとを比較して、*lpxC* ホモログ遺伝子候補を選出し、その遺伝子がコードする LpxC タンパク質構造を比較した。その結果、大腸菌 LpxC は 305 aa であり、大腸菌 LPS とその構造が類似している *A. actinomycetemcomitans* や *F. nucleatum* や *E. corrodens* および *C. rectus* の LpxC はそれぞれ、305 aa、283 aa、318 aa、294 aa から構成されていた。一方、大腸菌 LPS とその構造が異なっている *P. gingivalis*、*P. intermedia*、*P. nigrescens*、*C. ochracea* の LpxC は 462~465 aa から構成され、LpxC の C 末端に -hydroxyacyl-acyl carrier protein dehydratase (FabZ) が融合した bifunctional タンパク質構造であった。そのため、CHR-12 の阻害効果が弱かったのかもしれない。*P. gingivalis* 等の LpxC の構造と機能は興味深い。

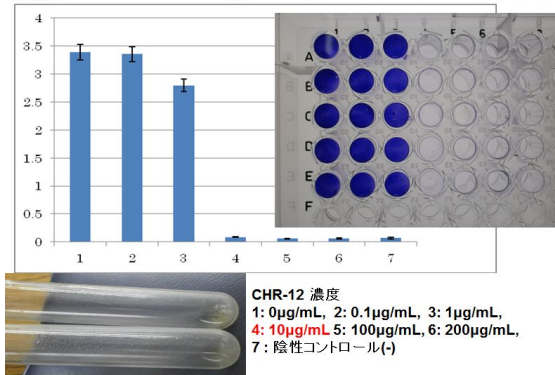
表 2. 各種細菌におけるCHR-12による増殖阻害効果とLpxCの大きさ

細菌種	CHR-12による増殖阻害効果	LpxCの大きさ(aa)
<i>E. coli</i> NIH JC-2	++	305
<i>S. mutans</i> NCTC10449	-	-
<i>S. salivarius</i> JCM5707	-	-
Aa Y4	++	305
Aa ATCC700685	++	305
Aa 310a(バイオフィルム形成株)	++	305
<i>F. nucleatum</i> ATCC25586	++	283
<i>E. corrodens</i> ATCC23834	++	318
<i>C. rectus</i> ATCC 33238	++	294
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	-	462
<i>P. gingivalis</i> FDC381	-	462
<i>P. gingivalis</i> W83	-	462
<i>P. intermedia</i> ATCC 25611	-	462
<i>P. nigrescens</i> ATCC 33563	-	462
<i>C. ochracea</i> S3	-	462-5

(4) CHR-12 のバイオフィルム形成阻害効果
A. actinomycetemcomitans 310a 株に対する CHR-12 のバイオフィルム形成阻害効果についてクリスタルバイオレット法を用いて検討した。

その結果、LpxC 阻害化合物である CHR-12 では 10 µg/mL の濃度で *A. actinomycetemcomitans* のバイオフィルム形成の阻害を認めた (図 1)。

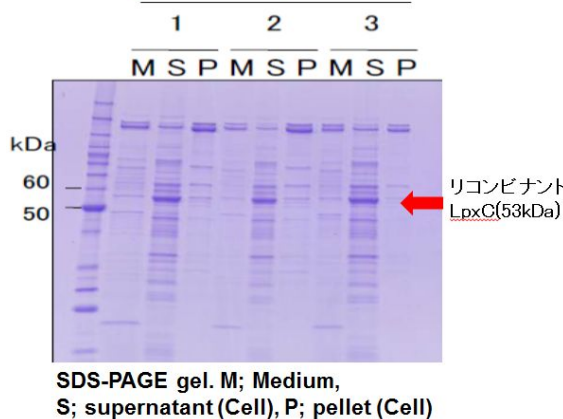
570nm 図1. CHR-12のAa 310a株バイオフィーム形成阻害



(5) *P. gingivalis* のリコンビナント LpxC の作製と活性測定

PCR 増幅した *P. gingivalis* W83 LpxC 遺伝子断片を *Brevibacillus* Expression System ベクター-pROXb3 に連結し、発現ベクター-pROXb3-LpxC を構築し、スクリーニングを行ったところ数株の陽性クローンを得た。それらについて発現試験を行ったところ、LpxC の発現が細胞内の可溶性画分に確認できた(図2)。また培養培地として用いた TMN 培地でのリコンビナント *P. gingivalis* W83 LpxC タンパクの発現量は 50mg/L 程度であった。大腸菌や緑膿菌タイプの LpxC とは異なるこれまでにない LpxC を得て、蛋白結晶化、X線結晶解析などからその構造や機能について今後調べてゆきたい。

図2. リコンビナント *P. gingivalis* LpxC の *B. choshinensis* における発現



またさらにこの LpxC リコンビナント蛋白を用いて、酵素活性測定系の確立を Hernick M の方法を基に進めた。

しかしながら、既存の基質の脂肪酸構造が異なるためか、活性測定系の確立には至らなかった。LpxC 活性系の確立は今後の新規の LpxC 阻害物質の探索に有用と考える。

< 引用文献 >

Mansoor UF, Vitharana D, Reddy PA, Daubaras DL, McNicholas P, Orth P, Black T, Siddiqui MA :Design and synthesis of potent Gram-negative specific LpxC inhibitors. Bioorg Med Chem Lett. 21(4): 1155-61, 2011.

山本満寿美, 狩山玲子, 光畑律子, 公文裕巳, 千田好子: メタロ - ラクタマーゼ産生緑膿菌のバイオフィーム形成能および分子疫学的解析. 環境感染誌 24 (2): 85-92, 2009.

Hernick M. Fluorescence-based methods to assay inhibitors of lipopolysaccharide synthesis. Methods Mol Biol. 2011;739:123-33.

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 8件)

狩山玲子, 泌尿器科領域における緑膿菌感染症の治療戦略 - 基礎的アプローチ、緑膿菌感染症研究会講演記録、査読無、2015、49、39-41

Okui A, Soga Y, Kokeguchi S, Nose M, Yamanaka R, Kusano N, Morita M. Detection of Identical Isolates of *Enterococcus faecalis* from the Blood and Oral Mucosa in a Patient with Infective Endocarditis. Intern Med. 査読有, 2015;54(14):1809-1814, doi:10.2169/internalmedicine.54.3223.

Tamaki N, Yoshino F, Fukui M, Hayashida H, Yoshida A, Kitamura M, Iwasaki T, Furugen R, Kawasaki K, Nakazato M, Maeda T, Kokeguchi S, Yamamoto T, Lee MC, Ito HO, Saito T. Relationship among salivary antioxidant activity, cytokines, and periodontitis: the Nagasaki Island study. J Clin Periodontol. 査読有, 2015;42:711-718. doi:10.1111/jcpe.12438.

Hagiya H, Kokeguchi S, Ogawa H, Terasaka T, Kimura K, Waseda K, Hanayama Y, Oda K, Mori H, Miyoshi T, Otsuka F. Aortic vascular graft infection caused by *Cardiobacterium valvarum*: a case report. J Infect Chemother. 査読有, 2014; 20(12):804-809. doi: 10.1016/j.jiac.2014.07.008.

Sugiura Y, Soga Y, Tanimoto I, Kokeguchi S, Morishige-Nishide S, Itami-Kono K, Takahashi K, Fujii N, Ishimaru F, Tanimoto M, Yamabe K, Tsutani S, Nishimura F, Takashiba S. With regard to our manuscripts on the commercial saliva substitute, Oralbalance®--its formula has been changed. Support Care Cancer. 査読有, 2014;22(12):3121-3122. doi: 10.1007/s00520-014-2432-8.

Sako S, Kariyama R, Mitsuhashi R, Yamamoto M, Wada K, Ishii A, Uehara S, Kokeguchi S, Kusano N, Kumon H. Molecular epidemiology and clinical implications of metallo-β-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* isolated from urine. Acta Med Okayama. 査読有, 2014;68(2):89-99. <http://ousar.lib.okayama-u.ac.jp/amo/>

Hagiya H, Onishi N, Ebara H, Hanayama Y, Kokeguchi S, Nose M, Kusano N, Otsuka F. Disseminated gonococcal infection in an elderly Japanese man. Intern Med. 査読有, 2013;52(23):2669-2673. <http://www.naika.or.jp/imonline/>

Hirai K, Maeda H, Omori K, Yamamoto T, Kokeguchi S, Takashiba S. Serum antibody response to group II chaperonin from *Methanobrevibacter oralis* and human chaperonin CCT. Pathog Dis. 査読有, 2013;68(1):12-19. doi: 10.1111/2049-632X.12041.

〔学会発表〕(計 7件)

蒼口 進、渡辺朱理、横田憲治、口腔内におけるメトロニダゾール耐性歯周病細菌の調査、第31回日本環境感染学会総会・学術会議、2016年2月19-20日、京都府京都市

蒼口 進、狩山玲子、渡辺朱理、横田憲治、細菌必須遺伝子を標的とする阻害リード化合物の口腔細菌に対する効果、第30回日本環境感染学会総会・学術会議、2015年2月20-21日、兵庫県神戸市

蒼口 進、狩山玲子、渡辺朱理、横田憲治、細菌必須遺伝子 *lpxC* を標的とする阻害リード化合物の口腔細菌に対する効果、第67回日本細菌学会中国・四国支部総会、2014年10月4-5日、徳島県徳島市

蒼口 進、前田博史、歯科医療におけるドラッグラグ(ギャップ)を考える-ピロリ菌除去のためのメトロニダゾール服用は将来の歯周病治療に影響するか? 口腔内メトロニダゾール耐性嫌気性菌について、第30回「歯科医療を中心とした総合的な研究を推進する集い」、2014年8月30日、東京都千代田区

Tamaki N, Yoshino F, Fukui M, Hayashida H, Yoshida A, Kitamura M, Iwasaki K, Nakazato M, Maeda T, Kokeguchi S, Lee MC, Saito T, Ito H-O. Salivary Antioxidant Activity, Cytokines and Periodontitis: The Nagasaki Island Study. 2nd IADR-APR(Asia pacific region)、2013年8月20-23日、Bangkok, Thailand

狩山玲子、堀賢司、光畑律子、村上圭史、和田耕一郎、石井亜矢乃、渡辺豊彦、三宅洋一郎、公文裕巳、マウスを用いた緑膿菌性尿路バイオフィーム感染症モデルの作製、第27回 Bacterial Adherence & Biofilm 学術集会、2013年7月12日、東京都文京区

平井公人、前田博史、山城圭介、大森一弘、峯柴淳二、山本直史、蒼口 進、高柴正悟、*Methanobrevibacter oralis* およびヒトのグループ シャペロニンに対する免疫応答の解析、第56回春季日本歯周病学会学術総会、2013年5月30日-6月1日、東京都江戸川区

〔図書〕(計 1件)

蒼口 進、渡辺朱理、佐藤法仁(泉福英信編)(株)ヒョーロン・パブリッシャーズ(東京)、患者が求める「医療安全」「院内感染」対策(第2部歯科医院に勤める効果的な「院内感染」対策 環境への対策) 2014、94-103

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)
該当なし

取得状況(計 0件)
該当なし

〔その他〕

ホームページ等
岡山大学歯学部
<http://www.okayama-u.ac.jp/user/dent/>

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科
<http://www.hsc.okayama-u.ac.jp/mdps/>

医歯学系総合研究業績
http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/Gyoseki/Gyoseki_md/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

苔口 進 (KOKEGUCHI SUSUMU)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：10144776

(2) 研究分担者

前田 博史 (MAEDA HIROSHI)
大阪歯科大学・歯学部・教授
研究者番号：00274001

玉木 直文 (TAMAKI NAOFUMI)
徳島大学・大学院医歯薬学研究部・准教授
研究者番号：20335615

狩山 玲子 (KARIYAMA REIKO)
岡山学院大学・人間生活学部・准教授
研究者番号：40112148

(3) 連携研究者

該当なし