

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870505

研究課題名(和文) グラム陰性菌によるLPS-DNA複合体産生の証明と歯周炎におけるその強毒性の解明

研究課題名(英文) Certification of LPS-DNA complex production by gram-negative bacteria and its high-toxicity in periodontitis

研究代表者

三浦 真由美 (Miura, Mayumi)

九州大学・大学病院・研究員

研究者番号：00404054

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病原細菌からリポ多糖(LPS)および非メチル化CpGを含むDNA(CpG DNA)の複合体(LPS-DNA複合体)を抽出し、その病原性を解析することを目的に本研究を行った。中性フェノールを用いた抽出法により、DNA-LPS複合体を抽出することに成功し、さらに結合様式がイオン性・非イオン性の両方であることが示された。また、複合体形成にはLPSの構造が関わる可能性が示唆された。さらに、LPS-DNA複合体による炎症性サイトカインTNF- $\alpha$ の産生量は高純度のLPSに比べ少なかった。LPS-DNA複合体の毒性についてはさらなる解析が必要であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to extract LPS-DNA complex from periodontal bacteria, and to analyze the pathogenicity. We succeeded in extracting DNA-LPS complex by using neutral phenol. It also cleared that bonding mode of LPS-DNA complex was both ionic and non-ionic bond. In addition, it was suggested that structure of the LPS affected to form LPS-DNA complex. Furthermore, comparing with the high-purity LPS, inflammatory cytokine TNF- $\alpha$  production by LPS-DNA complex was lower value. Further analysis is necessary for toxic expression of LPS-DNA complex.

研究分野：歯周病学

キーワード：グラム陰性菌 LPS-DNA複合体 歯周炎

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 関連する国内・国外の研究動向及び位置づけ；LPSとCpG DNAは各々が細菌由来の病原因子として宿主に影響を与えるが、両者で宿主細胞を同時に刺激すると免疫活性は相乗的に高まる(\*1)。in vitro 実験にてLPSとDNAは二価陽イオンを介して人工的に結合できることが証明されている(\*2)。しかし、細菌自身がLPS-DNA複合体を産生しているとの報告はない。つまり、LPS-DNA複合体を抽出する適切な方法を確立して、その存在を認知する必要がある。

(2) これまでの研究成果；

これまで我々は、歯周病原細菌である *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*Aa*) の培養上清中に存在するLPS-DNA複合体を超遠心にて回収し、電気溶出法にて単離することに世界で初めて成功した(データ未発表)。

単離された物質がLPSとDNAの複合体であることは、KDO測定やDNase I酵素処理等により確認された。興味深いことに、単離されたLPS-DNA複合体はタンパク分解酵素処理とEDTA処理に対して抵抗性を示し安定していたが、煮沸処理にて分解されてしまうことが判明した。

LPS-DNA複合体を *Aa* 菌体からも抽出することを試みた。現在、煮沸処理を含まない細菌細胞壁分解法の一つとして、界面活性剤 Triton シリーズとEDTAにより疎水結合やイオン結合を分断する方法が知られている(\*3)。我々はこの Triton-EDTA 処理法を応用して、*Aa* 菌体からLPS-DNA複合体を抽出することに成功した(データ未発表)。

培養上清より菌体からの方がLPS-DNA複合体を多量に回収できたことから、今後の実験には菌体由来のLPS-DNA複合体を用いることで効率性が高まると考えられる。

## 2. 研究の目的

歯周炎は多種類のグラム陰性菌が関連して発症・進行する混合感染症である。全てのグラム陰性菌に共通して存在するリポ多糖(LPS)と、細菌由来の非メチル化 CpG を含む DNA (CpG DNA) 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の複合体(LPS-DNA複合体)を産生しているとの報告はない。本研究の目的は、歯周病原細菌からLPS-DNA複合体を Triton-EDTA 処理法により抽出し、その病原性を解明することである。

## 3. 研究の方法

(1) 菌体からLPS-DNA複合体を効率よく回収する方法の確立；LPSの高次構造は様々な形態があり、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(\*4)。また、その高次構造は二価陽イオンの存在により安定し、Triton X-114 に対して抵抗性を示す(\*5)。Triton X-114 とEDTAを用いたLPS-DNA複合体の回収効率方法は上記因子により左右されると考えられるので、回収率が最も高い条件設定を検証する。

(2) LPS-DNA複合体生合成の解明；LPS-DNA複合体はTriton X-114やEDTAにより分解されなかったため、LPS分子とDNA分子との結合は疎水結合やイオン結合ではないと考える。DNAとの複合体形成に必要なLPS分子の化学構造を決定し、両分子間の結合について検討する必要がある。よって、以下の方法を試みる。

LPS-DNA複合体中のLPSとそれ以外で存在するLPSについて化学構造を比較；菌体はTriton-EDTA処理法により可溶化され、その後のアガロースゲル電気泳動にてLPS-DNA複合体のバンドを切り出して、電気溶出へと移行する。この切り出し後の残りのゲルにはLPS-DNA複合体に属さないLPSが存在すると考える。このLPSも電気溶出にて回収し、LPS-DNA複合体由来のLPSとの間で化学構造を比較する。

LPS-DNA複合体の非産生変異株と野生株とでLPS化学構造を比較；LPS-DNA複合体を形成できないLPS変異株を作成し、野生株との間で化学構造を比較して、複合体形成に必要な部位を特定する。*Aa*の染色体DNAの全塩基配列は既に公開されているので、それらデータベース上で様々なLPSの生合成遺伝子を同定し、欠失変異株を作製する。

(3) LPS-DNA複合体の病原性の解析；LPS-DNA複合体に関する病原性の解析は、リムルス反応、好中球に対するプライミング反応、LBPを介したマクロファージの活性化(\*6)により行われる。LPS-DNA複合体形成が完全なものと不完全なものを準備し病原性を比較する。

## <引用文献>

- \*1; J. J. Gao 等, *J Immunol* 2001, 166:6855-6860.
- \*2; S. Panja 等, *Biomacromolecules* 2008, 9(9):2501-2509.
- \*3; C.A. Schnaitman, *J Bacteriol* 1971, 108(1):553-563.
- \*4; K. Brandenburg 等, *Carbohydr Res* 2003, 338:2477-2489
- \*5; O. Fujise 等, *Microbiol Immunol* 2012, 56:680-691.
- \*6; PO. Magalhaes 等, *J Pharm Pharmaceut Sci* 2007, 10(3):388-404.

#### 4. 研究成果

まず、*Aa* の菌体外 DNA のサイズを再確認するため、集菌した *Aa* を Tris-HCl で洗浄し、約 23 kb の位置にバンドが検出されることを確認した (Fig.1)。さらに、*Aa* の菌体外 DNA が 2 価陽イオンにより菌体表面に付着していることを、Tris-HCl と各塩により洗浄することで確認し (Fig.2) 以降の実験を行った。

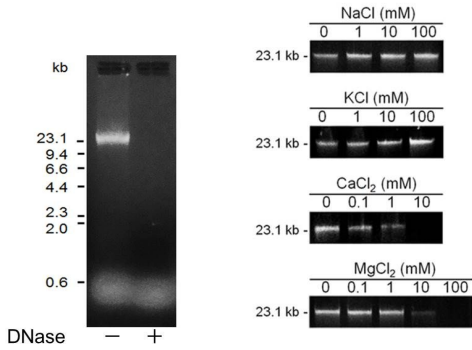


Fig.1 *Aa* の菌体外 DNA は、表面洗浄により約 23 kb の位置に検出される

Fig.2 菌体外 DNA は、2 価の陽イオンにより菌体表面に付着している

(1) 菌体から LPS-DNA 複合体を効率良く回収する方法の確立: Triton-EDTA 処理法の回収効率の検索をまず行った。LPS に対して EDTA 処理を行うと、LPS の凝集も解除され、この状態で Triton-X114 による二層分配法を行うと、上相の LPS-DNA 複合体の回収量が総合的に減少した。このように Triton-EDTA 処理法および電気泳動法による細菌の菌体外構造物を回収する方法には、操作の煩雑さと回収効率が課題となっていた。そこで、DNA の抽出に用いる中性フェノールを用いた DNA 抽出方法を併用して、それを菌体に対して行い、その後のアガロース電気泳動にて確認できた LPS-DNA 複合体のバンド (23 kb) を切り出した。切り出したバンドを電気溶出し、さらに複合体を形成していない LPS を除去するために二相分配法を用いて、複合体を精製した。精製した複合体には LPS-DNA の他にナトリウムイオン等が多量に含まれるため、限外ろ過にてイオンを除去した。KDO 測定法および吸光度測定を行うことで、精製した溶液内を確認した。(Fig.3) これにより、DNA と 2 価の陽イオンを介さず複合体を形成している LPS の存在が示唆された。

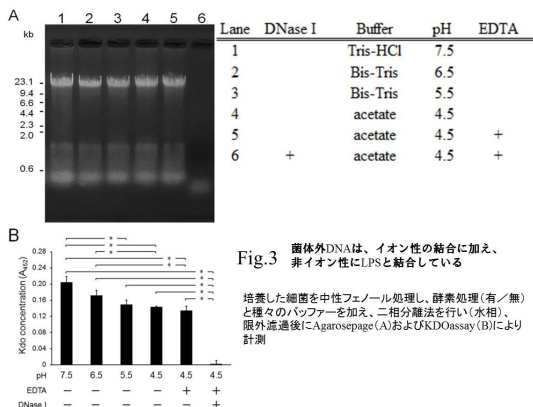


Fig.3 菌体外 DNA は、イオン性の結合に加え、非イオン性に LPS と結合している

培養した細菌を中性フェノール処理し、酵素処理 (有/無) と種々のバッファーを加え、二相分配法を行い (水相)、限外ろ過後に Agarsepage (A) および KDO assay (B) により計測

(2) LPS-DNA 複合体の病原性の解明: LPS-DNA 複合体の病原性を比較研究するために、粗精製したものではなく、DNA などの不純物の少ない LPS を精製する必要があった。そこで、従来の LPS 精製法であるホットフェノール法に加え、DNase、RNase、proteinase K による処理法を併用し、更に重複させることで精製率を上げる試みを行った。3 回のホットフェノール法および、2 回の各酵素処理を行ったところ、ホットフェノール単独法に比べはるかに核酸・タンパク質の不純物の少ない LPS の精製に成功した (Fig.4)。これにより LPS-DNA 複合体と純 LPS の病原性を比較検討する前処理ができた。

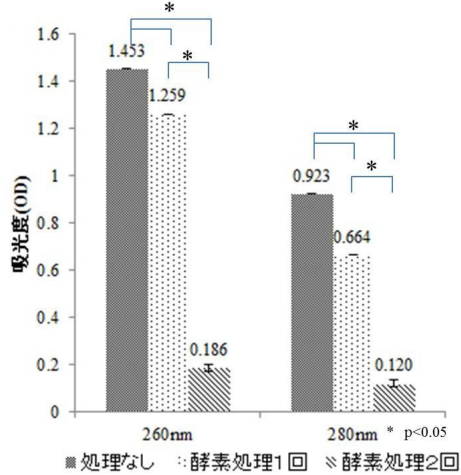


Fig.4 ホットフェノール法と酵素処理を繰り返すことにより LPS が高純度に精製される

(3) LPS-DNA 複合体生成の解明: 前年度より、純度の高い LPS の精製を行ったが、LPS-DNA 複合体の病原性を検討するにあたり、結合様式の解明が必要であった。そこで、ATCC29523 株の LPS 生合成遺伝子変異株 WQ13L を作成し、さらにすでに作成していた凝集因子変異株 HM23ML を比較対象に用いた。まず、菌体外 DNA と結合する LPS が、細菌表面に存在する遊離していない LPS であることを確認した (Fig.5)。

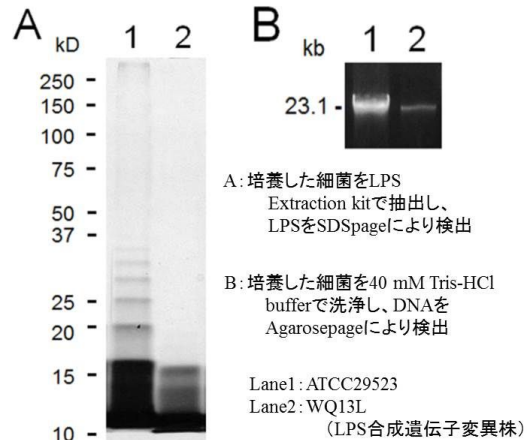


Fig.5 菌体外 DNA は細菌表面の LPS に関与する

次に、抽出時に使用するバッファの pH および EDTA の添加を行い、菌体外 DNA がイオン性だけでなく、非イオン性に結合している可能性が示唆された。また、変異株を用いて菌体外 DNA - LPS 複合体の抽出操作を、EDTA を加えて行い、陰性コントロールとしてボーリング操作を行ったところ、LPS 生合成遺伝子変異株では菌体外 DNA も検出されなかったことから、菌体外 DNA が非イオン性に LPS と結合していることが示された (Fig.6)。

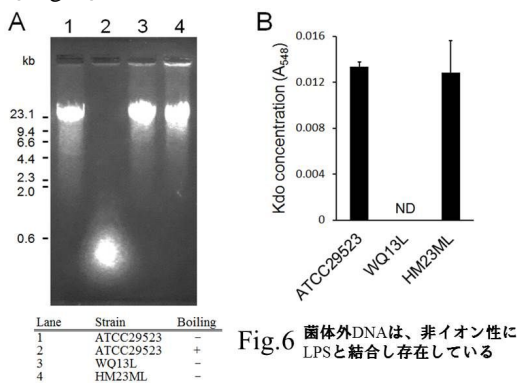


Fig.6 菌体外DNAは、非イオン性に LPS と結合し存在している

(4) 菌体外 DNA-LPS 複合体の病原性の解析: 菌体外 DNA-LPS 複合体との比較として、純 LPS を用いて病原性の検討を行った。予定していた LPS 生合成因子欠損株に関しては、複合体の形成がほぼ見られなかったため除外して行った。今回の検討では炎症性サイトカインである TNF- $\alpha$  を対象として行い、THP-1 細胞に対して純 LPS および菌体外 DNA-LPS 複合体を加え、産生される TNF- $\alpha$  を ELISA 法にて測定した。両者とも KDO 法により LPS の総量を揃えた場合、DNA-LPS 複合体を用いた場合の TNF- $\alpha$  産生量が減少して示された (Fig.7)。これは、複合体をしている状態では LPS のレセプター結合が阻害されているためであると考えられるが、LPS-DNA 複合体の毒性についてはさらなる解析が必要である。

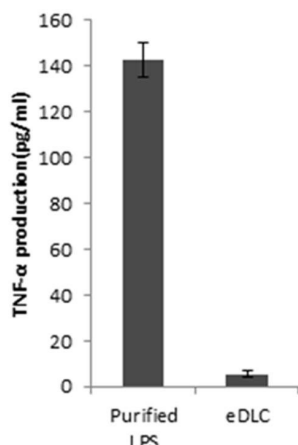


Fig.7 非イオン性菌体外DNA-LPS複合体は、純精製したLPSに比べTNF- $\alpha$ の産生量は低い

## 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2件)

A. Haraguchi, M. Miura, O. Fujise, T. Hamachi and F. Nishimura

*Porphyromonas gingivalis* gingipain is involved in the detachment and aggregation of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* biofilm. *Mol Oral Microbiol*, 2014;29(3); 131-43.

K. Hisano, O Fujise, M. Miura, T Hamachi, E Matsuzaki, F Nishimura

The pga gene cluster in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* is necessary for the development of natural competence in Ca(2+)-promoted biofilms.

*Mol Oral Microbiol*, 2014;29(2); 79-89.

〔学会発表〕(計1件)

竹下正章、その他

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* は菌体外に DNA-LPS 複合体を産生し、その病原性は LPS 単体よりも低い、第 57 回秋季日本歯周病学会、2014.10.19、神戸国際会議場、神戸市

〔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：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

三浦 真由美 (MIURA, Mayumi)

九州大学・きらめきプロジェクト・学術研究員

研究者番号：00404054

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：