

論文内容要旨

コウボクによる *Porphyromonas gingivalis* のメチルメルカプタン

産生の抑制メカニズムの解明に関する研究

主指導教員：栗原 英見 教授

(医歯薬保健学研究科 歯周病態学)

副指導教員：菅井 基行 教授

(医歯薬保健学研究科 細菌学)

副指導教員：二川 浩樹 教授

(医歯薬保健学研究科 口腔生物工学)

佐藤 陽子

(医歯薬保健学研究科 医歯薬学専攻)

[目的]

慢性炎症性疾患である歯周病は嫌気性グラム陰性菌による感染によって発症する。主な原因菌の1つである *Porphyromonas gingivalis* (*Pg*) は揮発性硫黄化合物 (VSC) を産生し、VSCは口臭の原因になる。METase は *Pg* も保有するアミノ酸分解酵素であり、VSC であるメチルメルカプタンを合成する。このメチルメルカプタン産生量は *Pg* の菌株ごとに大きく異なる。また、生薬であるコウボクが METase をコードする *mgl* 遺伝子を mRNA レベルで制御して、*Pg* のメチルメルカプタン産生を抑制する。しかし、*Pg mgl* mRNA 発現量は菌株間で異なっていることから、本研究ではコウボクによる *Pg* のメチルメルカプタン産生抑制メカニズムの解明を目的として、コウボクの *Pg* に対する作用について複数の *Pg* 菌株を用いて検討した。

[材料および方法]

Pg の分離 :

広島大学病院の口臭外来受診患者 (広島大学病院倫理委員会承認済、患者同意取得済) の安静時全唾液およびプラークを採取し、直ちに血液寒天培地に播種後、アネロパックシステム (三菱ガス化学) で 37°C、7日間培養した。生育してきた黒色コロニーを 1% yeast extract 含有 Trypticase Soy Broth にヘミンとメナジオンを添加した液体培地 (TSBYEhm) 中で培養した。*Pg* の同定は生育した菌体から染色体 DNA を InstaGene (Bio Rad) を用いて精製し、16s rRNA を PCR 法で増殖して行った。また、*Pg* の標準株として 33277, W83 株を ATCC から購入した。*Pg* 線毛遺伝子 *fimA* type I-V 型の各菌株は、大阪大学予防歯科学教室 天野敦雄教授から分与して頂いた。

メチルメルカプタン産生量の測定 :

Pg を TSBYEhm 培地で 2 日間嫌気培養後、集菌し PBS で洗浄した。ガラス製試験管内に、*Pg* が PBS 1 ml 中に 10⁸CFU となるよう調製し、メチルメルカプタンの基質として L-メチオニンを最終濃度 1 mM となるよう添加した。また、コウボク (湧永製薬から供与) のメチルメルカプタン産生への影響を検討するために、コウボクを PBS に 1・100 µg/ml になるように調製した。37°C、60 分間嫌気培養後、試験管内の気相部分を 1 ml 回収し、メチルメルカプタン産生量を簡易型ガスクロマトグラフィー (オーラルクロマ、日本歯科商社) で測定した。

遺伝子発現解析 :

Pg を TSBYEhm 培地で 2 日間嫌気培養後、集菌し PBS で洗浄した。ガラス製試験管内に、*Pg* が PBS 1 ml 中に 10⁸CFU となるよう調製し、メチルメルカプタンの基質として L-メチオニンを最終濃度 1 mM となるよう添加した。37°C、10 分間嫌気培養後に集菌し、totalRNA を Single Shot

Cell Lysis Kit (Bio Rad)を用いて精製した。*mgl* mRNA発現量は real-time PCR で16s rRNA 発現量を対照として評価した。細菌の環境応答・細胞内情報制御系で、2種類のタンパク質が関与している2成分制御系、two-component regulatory system (TCS) がある。本研究ではコウボクによる*Pg*のメチルメルカプタン産生抑制メカニズムに TCS が関与しているのではないかと仮定して、TCS遺伝子発現の解析を real-time PCR によって行った。

バイオフィーム形成実験：丸底96穴プレートに *Pg* W83 10^8 CFU、および *Fusobacterium nucleatum* ATCC 24597 (*Fn*、ATCCから購入) 10^6 CFU を TSBYEhm 中で 48 時間共培養し、形成されたバイオフィームを1% クリスタルバイオレットで染色後、エタノールで色素を溶出させ、吸光度測定したものをバイオフィーム量とした。

ヒト上皮細胞に対する付着実験：

96 well プレートに播種した不死化歯肉上皮細胞であるOBA-9 (大阪大学、村上伸也教授からの分与) 培地中に、コウボク 0 - 100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で30分間処理した*Pg* W83 10^7 CFUを2時間CO₂ インキュベーター内で培養後、トリプシン、トリトン X-100 で OBA-9 を破壊し、付着・侵入した *Pg* を血液寒天培地に播種後、7日間培養後生育したコロニー数をカウントした。

[結果]

*Pg*標準株、臨床分離株ともに、L-メチオニンの濃度依存的にメチルメルカプタン産生量が増加した。コウボクの添加によって *Pg* メチルメルカプタンの産生量が抑制された。しかし、その抑制の程度には菌株間で差が認められた。また、コウボクによって *mgl* mRNA 発現量も抑制され、TCS遺伝子にも影響が見られた。センサーキナーゼ (SK) である *rprY REC*、レスポンスレギュレーター (RR) である *porY* が有意に誘導され、RR の *rprY RE G*が有意に抑制された。また、*Pg* の付着に関与する *fimS* (SK) , *fimR* (RR)の抑制が見られた。コウボクの添加によって*Pg* W83株と*Fn* 24597株の共培養によるバイオフィーム形成およびヒト上皮細胞への付着が抑制された。

[結論]

以上の結果から、コウボクが TCS を介して *Pg* のメチルメルカプタン産生を抑制すること、およびバイオフィーム形成抑制、ヒト上皮細胞への付着抑制にも関与することが示唆された。