

歯周病進行におけるインドールの効果 ～*Treponema denticola* の視点から～

Effect of Indole on Periodontal Disease Progression ~ From the Perspective of *Treponema denticola* ~

森田晶葉¹⁾, 小野田空¹⁾, 山崎亮太²⁾, 前田憲成¹⁾

¹⁾九州工業大学 大学院生命体工学研究科, ²⁾九州歯科大学 健康増進学講座 感染分子生物学分野
Akiha Morita¹⁾, Sora Onoda¹⁾, Ryota Yamasaki²⁾, Toshinari Maeda¹⁾

¹⁾ Department of Biological Functions Engineering, Graduate School of Life Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology,

²⁾ Division of Infections and Molecular Biology, Department of Health Promotion,, Kyushu Dental University
E-mail address: toshi.maeda@life.kyutech.ac.jp

1. はじめに

歯周病は、細菌感染により歯肉や歯槽骨が破壊される炎症性疾患であり、う蝕よりも歯の喪失リスクが高いため、歯を失う主な原因とされている。日本では成人の約半数が罹患しており、全身疾患との関連も報告されていることから、健康寿命を延ばすためには歯周病ケアが重要である^[1]。口腔内には約 700 種の細菌が存在し、腸内に次ぐ複雑な細菌叢を形成している。その中でも、*Porphyromonas gingivalis* (*P.g.*)、*Treponema denticola* (*T.d.*)、*Tannerella forsythia* (*T.f.*) の 3 菌種は「レッドコンプレックス」と呼ばれ、重度歯周病との関連が特に深いとされている。歯周病はまず *Streptococcus* 属などの好気性菌が唾液由来のペリクルに付着して初期バイオフィルムを形成し、その後レッドコンプレックスなどの嫌気性菌が加わってデンタルプラークが成熟する。プラークが蓄積すると、細菌の産生する病原因子により歯肉炎症や歯槽骨破壊が進行し、最終的に歯の喪失に至る。当研究室の先行研究では、健常者にも歯周病患者と同程度の歯周病原菌が存在していることが判明しており、歯周病発症を左右する要因としてクォーラムセンシングの関わりが疑われている^[2]。クォーラムセンシングとは細菌が AI-2 やアシルホモセリンラクトン (AHL) などのオートインデューサーと呼ばれる物質を放出し、それにより周囲の菌密度を感知することで、それに応じた遺伝子発現や表現型を制御する仕組みのことである。さらに、口腔内に存在しているインドールも、細菌間のシグナル分子として、病原性やバイオフィルム形成能を制御するオートインデューサーである可能性も指摘されている。

そこで、本研究では、レッドコンプレックスの中でも、その培養の難しさから病原性発現制御に関する知見の少ない *T.d.* 菌に着目し、その増殖と病原性の発現に与えるインドールの影響を調査することを目的として研究を行った。

2. 材料と方法

2. 1 材料

本研究では、*Treponema denticola* ATCC35405 株を使用した。*T.d.* 菌は New Oral Spirochetes (NOS) 培地で培養し、初期濁度 0.05 となるよう調整し、嫌気条件下のもと CO2 インキュベーター内で 37°C で 4 日間培養した。

2. 2 方法

T.d. 菌が有するオートインデューサー関連遺伝子を調べるため、NCBI から LasI、LasR (AHL 関連)、LuxS (AI-2 関連)、TnaA、SdiA (インドール関連) のアミノ酸配列を取得し、BLASTP による相同性解析を実施した。その後インドール生産能を評価するため、インドール濃度を測定した。培養上清中のインドール濃度は、培養液を遠心分離 (13,000 rpm, 4°C, 1 min) 後、上清をフィルター滅菌し、酢酸エチルによる 3 回抽出と硫酸ナトリウム脱水を経て HPLC で定量した。インドール存在下での増殖解析では、NOS 培地にインドール (DMSO 溶液) を 0、0.5、1、2 mM 添加し、各日ごとに OD₆₀₀ を測定した。その後、同一条件培養液を遠心・濾過滅菌して得た上清を用いて、プロテアーゼ活性を Bz-GGR-MCA および Suc-AAPF-MCA を基質として測定した。基質 (16 mg) を DMSO 12.77 mL に溶解して 2 mM 一次溶液を作製し、Tris buffer (ProClin™ 300 0.5 mL 添加) で 10 倍希釈して 0.2 mM 二次溶液を調製した。基質 50 μL に同量のサンプル溶液を加え、最終基質濃度 0.1 mM、37.5°C で EAAS 測定を行った。また同サンプルでカゼインザイモグラフィを行い、インドール存在下での生成酵素の変化を評価した。

3. 結果と考察

3. 1 *T.d.* 菌のオートインデューサー

BLASTP 解析により、*T.d.* 菌はインドール生産遺伝子 TnaA を有することが示唆された。一方、AHL や AI-2 関連遺伝子では有意な相同性は認められなかったことから、*T.d.* 菌はインドールを介した微生物間コミュニケーションを行っている可能性がある。TnaA はトリプトファン

を分解してインドールを生産するトリプトファナーゼという酵素をコードするため、*T.d*菌はインドール生産能を有すると考えられる。実際に HPLC で培養液中のインドール濃度を測定した結果、濃縮後試料中のインドール濃度は 2.25 mM で、培養液換算では約 0.56 mM であった。これらの結果より、BLASTP 解析の予測通り、*T.d*菌はインドール生産能を有することが確認された。

3. 2 増殖曲線

インドール存在下での *T.d*菌の増殖を比較した結果、*T.d*菌はインドール濃度に依存して増殖が抑制されることが明らかとなった (Fig. 1)。インドール濃度 0.5 mM では、培養 4 日目まではコントロールとほぼ同等の増殖を示したが、7 日目にはわずかに減少した。1.0 mM では増殖が約半分に低下し、2.0 mM ではほとんど増殖が認められなかったことから、定常期への到達が早まることが示唆された。

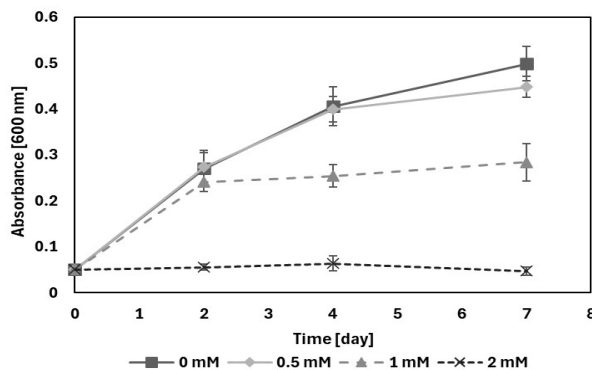


Fig. 1 インドール存在下での増殖曲線

3. 3 プロテアーゼ活性

*T.d*菌は病原因子としてセリンプロテアーゼを有し、特にキモトリプシン様およびトリプシン様プロテアーゼが病原性に関与している。本研究ではこれらの基質を用いて、インドール添加時の酵素活性を測定した。増殖にほとんど影響を与えない 0.5 mM インドール条件では、キモトリプシン様プロテアーゼは減少し、トリプシン様プロテアーゼは増加した (Fig. 2)。特にトリプシン様プロテアーゼ活性は顕著に増加し、インドールが *T.d*菌の病原性発現に影響を与える可能性が示唆された。カゼインザイモグラフィでは、全サンプルで約 100 kDa のバンドが確認され、インドール添加による差は見られなかったことから、生成されるプロテアーゼはインドールの存在に依存しないと考えられる。

キモトリプシン様プロテアーゼは宿主タンパク質や生理活性ペプチドを分解することで栄養源の獲得や上皮細胞への浸透を助ける。そのため、インドール添加による活性低下は栄養獲得の阻害につながり、増殖抑制に寄与すると考えられる。また、この酵素はタンパク質分解活性に関わらず他の歯周病原菌との付着を媒介することも知られており、活性の変化はトリプシン様プロテアーゼ

ほど顕著ではないと考えられる。一方、トリプシン様プロテアーゼは、歯周病患者の歯肉縁下プラークで同定されており、プラークの重症度レベルとスピロヘータの割合に関与することが知られている。一方、トリプシン様プロテアーゼは歯肉縁下プラークで同定され、プラーク重症度レベルやスピロヘータの割合に関与するとされる。また、口腔内での活性増加は歯周炎関連細菌の毒性上昇とも関連していることから、インドールは歯周病におけるプラーク形成に大きく関与する可能性がある。

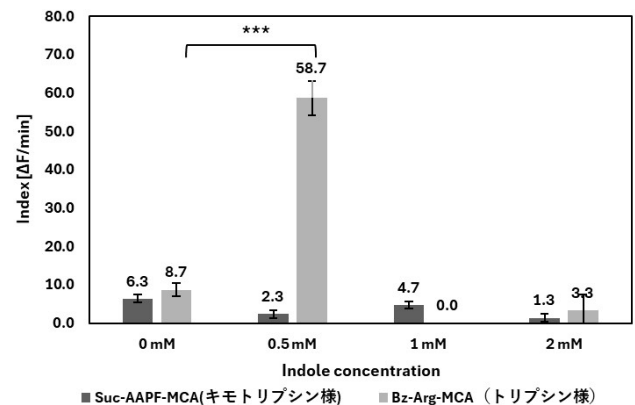


Fig. 2 インドール存在下でのプロテアーゼ活性

4. おわりに

本研究では、*T.d*菌の病原性発現におけるインドールの影響を調査するため、*T.d*菌の増殖および病原因子であるプロテアーゼ活性に対するインドールの影響を評価した。結果、外因性インドールは高濃度で *T.d*菌の増殖を抑制する一方、増殖に差が見られない濃度では、病原因子であるトリプシン様プロテアーゼ活性を顕著に増加することがわかった。このことは、*T.d*菌がインドールを介した微生物間コミュニケーションを行っている可能性を示唆し、歯周病進行における病原性発現の制御にインドールが関与することを示している。今後はレッドコンプレックス間のインドールの影響を調査することで、歯周病進行メカニズムの解明につながると考えられる。

参考文献

- [1] 厚生労働省 「令和 4 年歯科疾患実態調査結果の概要」
<https://www.mhlw.go.jp/content/10804000/001112405.pdf>
- [2] 西田周平 (2020). 健康長寿の秘訣を探る異文化間口腔内フローラと歯周病原性の比較調査, 九州工業大学大学院生命体工学研究科 修士論文(未公開)
- [3] Valentina Cogoni et al., *Treponema denticola* chymotrypsin-like proteinase (CTLP) integrates spirochaetes within oral microbial communities. *Microbiology*, 2012, 158(Pt 3), 759-770.
- [4] J. Christopher Fenno et al., The *opdB* Locus Encodes the Trypsin-Like Peptidase Activity of *Treponema denticola*, *Infection and Immunity*, 2001, Vol 69, Issue 10, 6193-6200