

Prevotella intermediaおよびPrevotella  
nigrescens由来溶血毒素に関する研究

著者名(日)	鎌口 有秀, 中村 麗子, 岡本 公彰, 馬場 久衛
雑誌名	東日本歯学雑誌
巻	23
号	1
ページ	43-52
発行年	2004-06
URL	<a href="http://id.nii.ac.jp/1145/00008839/">http://id.nii.ac.jp/1145/00008839/</a>

〔原 著〕

## *Prevotella intermedia* および *Prevotella nigrescens* 由来 溶血毒素に関する研究

鎌口 有秀\*, 中村 麗子\*, 岡本 公彰\*\*, 馬場 久衛\*

\*北海道医療大学歯学部口腔細菌学教室

\*\*鶴見大学歯学部口腔細菌学教室

## Study on the hemolysin from *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*

Arihide KAMAGUCHI\*, Reiko NAKAMURA\*,  
Masaaki OKAMOTO\*\* and Hisae BABA\*

\*Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido.

\*\*Department of Oral Bacteriology, School of Dental Medicine, Turumi University.

### Abstract

Hemolysin genes of *Prevotella intermedia* that have been reported were not detected by PCR in many strains of *P. intermedia* and *Prevotella nigrescens*. In both organisms, hemolytic activity was observed in many strains which had not retained the hemolysin genes. Hemolysin was partially purified from the outer membranes of *P. intermedia* and *P. nigrescens*. This hemolysin was activated with SH reagents and inhibited with SH blockers. After heating at 100°C for 10 minutes, the hemolytic activity was almost inhibited, but heat stable hemolysin was also observed. Therefore, it is suggested that *P. intermedia* and *P. nigrescens* have two different hemolysins on the outer membrane which are related to growth in the oral cavity.

**Key word** : hemolysin, *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens*

### 緒 言

口腔内における黒色色素産生菌の1種として *Prevotella intermedia* と *Prevotella nigrescens* が存在する<sup>1)</sup>. *P. intermedia* は正常歯肉溝のみなら

ず、成人性歯周炎、急性壊死性潰瘍性歯肉炎、妊娠性歯肉炎から検出される<sup>2-5)</sup>. 一方 *P. nigrescens* も正常歯肉溝から検出されるのに加え、成人性歯周炎、感染根管から検出される<sup>6-10)</sup>. 両菌は発育するために *Porphyromonas*

受付：平成16年3月23日

*gingivalis*と同様にヘモグロビンやヘミンを必要とする。*P. intermedia*と*P. nigrescens*は溶血毒素を産生し、赤血球よりヘモグロビンやヘミンを獲得しているものと考えられる。また、一般的に細菌の産生する溶血毒素は病原性と何らかの関連性が指摘されている。*P. intermedia*と*P. nigrescens*の産生する溶血毒素が口腔内でどのような作用をするかは不明である。*P. intermedia*と*P. nigrescens*の溶血毒素の精製法は確立されていないことより、既にBeemら<sup>11)</sup>の報告した*P. intermedia*の溶血毒素遺伝子の塩基配列を基にして、組み換え型溶血毒素を作製し、溶血毒素の性状を検討することを試みた。しかし、溶血毒素遺伝子のPCR産物と溶血活性の間に不一致が見られた。そこで、*P. intermedia*と*P. nigrescens*の溶血毒素遺伝子の存在の有無と溶血の関係を検討し、報告されたものとは異なる新たな溶血毒素とその遺伝子の存在の可能性を示唆した。また、*P. intermedia*と*P. nigrescens*の溶血毒素をそれぞれ部分精製し、それらの性状について検討を行った。

## 実験方法

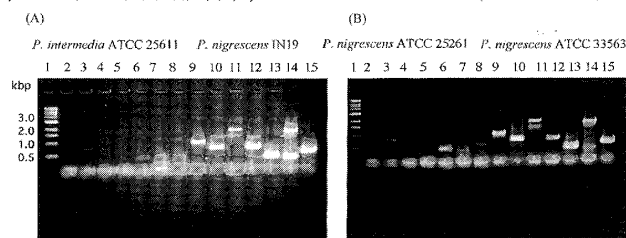
### 供試菌株および培地

*P. intermedia* ATCC 25611 (基準株), JCM 6322, 32 (臨床分離株), 43 (臨床分離株), 87

(臨床分離株), *P. nigrescens* ATCC 25261, ATCC 33563 (基準株), 5 (臨床分離株), 6 (臨床分離株), 8 (臨床分離株), 9 (臨床分離株), 19 (臨床分離株), IN 19 (臨床分離株), 58 (臨床分離株), 65 (臨床分離株), 67 (臨床分離株)を酵母エキス、ヘミン、メナジオン添加トリプティック・ソイ・ブロー (TYHM培地) にて嫌氣的に培養した。

### 溶血毒素遺伝子の検出

Beemら<sup>11)</sup>の報告した*P. intermedia*の溶血毒素遺伝子を検出する為に以下のプライマーを用いてPCRを行った。ORF 1を増幅するプライマーは (P1プライマー (PCR産物: 1,070 bp): P1F; 5' AATATGGTCATAATTTCCG3', P1R; 5' TATCCAGGATAAATAGGATC3', P1-2プライマー (PCR産物: 797bp): P1-2F; 5' ACAAACTTGTGTGAATATAGAG3', P1-2R; 5' GGGATAAGTTGTGAATATAGAG3', P2プライマー (PCR産物: 781bp): P2F; 5' ACTCAA-GAAATGCTTAAGACG 3', P2-R; 5' GCTGCTAATATAATTGCTTGC3', P2-2プライマー (PCR産物: 451 bp): P2-2F; 5' TAGGTGCTGAAGAGAACACG3', P2-2R; 5' ACCATATGTGGCAATAGTGCC3', P3プライマー (PCR産物: 1,927 bp): P3F 5'



**Fig. 1.** Agarose gel electrophoresis patterns of PCR products from *P. intermedia* ATCC 25611, *P. nigrescens* ATCC33563, ATCC25261, and IN19.(A): Lanes 2 to 8 indicate PCR products from *P. intermedia* ATCC25611. Lanes 9 to 15 indicate PCR products from *P. nigrescens* IN19.(B): Lanes 2 to 8 indicate PCR products from *P. nigrescens* ATCC25261. Lanes 9 to 15 indicate PCR products from *P. nigrescens* ATCC33563. Samples of both gel lanes indicate as bellows: lane 1: 1kb ladder. Lane 2 and 9: PCR products by P1 primer pair (1,070bp), lanes 3 and 10: PCR products by P2 primer pair (781bp), lanes 4 and 11: PCR product by P3 primer pair (1,927 bp), lanes 5 and 12: PCR product by P1-2 primer pair (796bp), lanes 6 and 13: PCR product by P2-2 primer pair (451bp), lanes 7 and 14: PCR product by P3-2 primer pair (1,771bp), lane 8 and 15: PCR product by P3-3 primer pair (618bp).

CTTTAAGCAAAAAGCATAACGC3', P3R5'  
CAAACACATTCTTAATCTCTC3', P3-2プライ  
マー (PCR産物: 1,771 bp): P3-2F; 5'  
TGGAATGGGCAGACGGTTAGG3', P3-2R;  
5' CAGCCACAAAGACGAATTGTTCTCG3',  
P3-3プライマー (PCR産物: 610 bp): P3-3F;  
5' CCTAATCTTGCATTGGTGGC3', P3-3R;  
5' TTGATGAGTTCAGCAGCTCC3')である。  
PCRの条件は前加熱94℃, 5分 (1 cycle), 変  
成92℃, 1分, アニーリング55℃, 1分, 増幅  
72℃, 1分 (35サイクル), 増幅72℃, 5分  
(1サイクル)で行った。各菌株からのDNA  
の抽出はSmithら<sup>12)</sup>の方法に準じて行った。

#### 外膜画分の分画方法

2 LのTYHM培地に*P. intermedia* ATCC 25611  
または*P. nigrescens* ATCC 25261を接種し, 5  
日間培養後, 10,000 gにて30分遠心し, 菌体  
を得た。この菌体を100 mlのPBSに懸濁し, 氷冷  
下でブレンダーにより2分処理した。これを  
10,000 gにて30分遠心し, その上清をさらに  
100,000 gにて60分遠心し沈殿を得た。この沈  
殿を外膜画分とした。

#### 外膜画分の可溶化と溶血毒素の部分精製方法

外膜画分に100 mM n-Heptyl-β-D-thiogluco-  
side (HTG)を加え, 室温で30分振とうして可溶化  
した。これを100,000 gで60分遠心し, 上清を  
DEAE-Sephadex A-50にかけ, 30 mM HTG含有  
50 mM Tris-HCl (pH8.5)にて溶出した。吸着  
物を0.1 M NaCl, 0.2 M NaClを含む30 mM  
HTG含有50 mM Tris-HCl (pH8.5)にて溶出し  
た。各フラクションの溶血活性を測定し, 活性  
画分を透析後, 凍結乾燥した。これを部分精製  
溶血毒素とした。

#### 溶血活性の測定方法

1. 菌体の溶血活性の測定方法: 菌液の600  
nmにおけるODを1.5にPBSにて調製した。この

菌液2 mlを15,000 gにて10分遠心し, 沈殿に  
PBSを1,000 μl添加し, 再懸濁した。これに  
2%家兎赤血球を1,000 μl加え, 37℃にて60分  
振とうした。ついで, 2,000 gで5分遠心し,  
さらに菌体を除くために上清を15,000 gにて5  
分遠心した。この上清の540 nmにおける吸光  
度を測定した。家兎赤血球を蒸留水にて溶血さ  
せたものの540 nmの吸光度測定値を100%溶血  
活性とし, 各試料の溶血活性を%で表わした。

2. 溶液の溶血活性の測定方法: 溶液 (100  
μl)にPBSまたは阻害剤含有PBSを900 μl添加  
し, さらに2%家兎赤血球を1,000 μl加えた。  
これを37℃にて60分振とう後, 2,000 gで5分  
遠心し, 上清の540 nmのODを測定した。溶血  
活性は1と同様に%で表わした。

3. 血液寒天培地上での溶血活性の測定方  
法: TYHM家兎血液寒天培地に各菌を塗抹し,  
嫌気培養後, コロニーの周囲にベーター溶血環  
が観察された時は+, 溶血環が観察されない  
ときは-とした。

#### N末端アミノ酸配列の解析

SDS-PAGE後のゲルをPVDF膜に転写後, ク  
マーシーブリリアントブルーにて染色した。つ  
いで, 目的のタンパク質バンドを切り出しプロ  
テインシークエンサー (ProCise492, Applied  
Biosystems)を用いてアミノ酸配列を決定し  
た。また, この配列をBLAST searchにてホモ  
ロジーのあるタンパク質とその遺伝子を検索し  
た。

## 結 果

### 1. *P. intermedia*と*P. nigrescens*からの溶血 毒素遺伝子の検出

*P. intermedia*と*P. nigrescens*の基準株および  
臨床分離株の計16株よりBeemら<sup>11)</sup>の報告した  
溶血毒素遺伝子のORF1, ORF2, ORF3領域の  
検出をPCRで行った。しかし, 全てが検出され

たのは *P. nigrescens* ATCC 33563 と IN19 の 2 株のみであった。その他の株は ORF 2 のみが検出されたものが 6 株、これらの領域が全く検出されないものが 8 株あった (Table 1)。これらの菌株のうち基準株の *P. intermedia* ATCC 25611, *P. nigrescens* ATCC 25261 および ORF 1, ORF 2, ORF 3 が検出された *P. nigrescens* ATCC 33563 と IN19 株についてさらに検討を加えた。これらの 4 株について ORF 1 は 2 種のプライマー (P1 and P1-2 プライマー)、ORF 2 は

2 種のプライマー (P2 and P2-2 プライマー)、ORF 3 は 3 種のプライマー (P3, P3-2, P3-3 プライマー) の異なるプライマーを用いて各領域の検出についてさらに検討した。この結果、*P. intermedia* ATCC 25611 および *P. nigrescens* ATCC 25261 において ORF 2 以外は検出されなかった。*P. nigrescens* ATCC 33563 および *P. nigrescens* IN19 は ORF 1, ORF 2, ORF 3 がいずれのプライマーでも検出された (Fig. 1 と Table 2)。

Table 1. Detection of hemolysin gene (ORF1, 2, 3 regions) from various *P. intermedia* and *P. nigrescens* strains with PCR

Bacteria	ORF1	ORF2	ORF3
<i>P. intermedia</i> ATCC 25611	-	+	-
<i>P. intermedia</i> JCM 6322	-	-	-
<i>P. intermedia</i> 32	-	+	-
<i>P. intermedia</i> 43	-	-	-
<i>P. intermedia</i> 87	-	-	-
<i>P. nigrescens</i> ATCC 25261	-	+	-
<i>P. nigrescens</i> ATCC 33563	+	+	+
<i>P. nigrescens</i> 5	-	+	-
<i>P. nigrescens</i> 6	-	+	-
<i>P. nigrescens</i> 8	-	+	-
<i>P. nigrescens</i> 9	-	+	-
<i>P. nigrescens</i> 19	-	+	-
<i>P. nigrescens</i> IN19	+	+	+
<i>P. nigrescens</i> 58	-	-	-
<i>P. nigrescens</i> 65	-	-	-
<i>P. nigrescens</i> 67	-	-	-

+: PCR product positive, -: PCR product negative

## 2. 血液寒天培地と試験管での溶血性について

*P. intermedia* ATCC 25611, *P. nigrescens* ATCC 25261, *P. nigrescens* ATCC 33563, *P. nigrescens* IN19 の血液寒天培地と試験管内での溶血反応を測定した。その結果 4 株とも血液寒天培地での溶血性は示したが、ORF 1, ORF 2, ORF 3 をもつ *P. nigrescens* ATCC 33563 と *P. nigrescens* IN19 は試験管内での溶血性は示さなかった。これに対して ORF 2 のみしかもたない *P. intermedia* ATCC 25611 と *P. nigrescens* ATCC

25261 は試験管内溶血性を示した (Table 2)。このことより ORF 1, ORF 2, ORF 3 の存在と試験管内での溶血性は一致しなかった。

## 3. 培養経過と試験管内溶血性

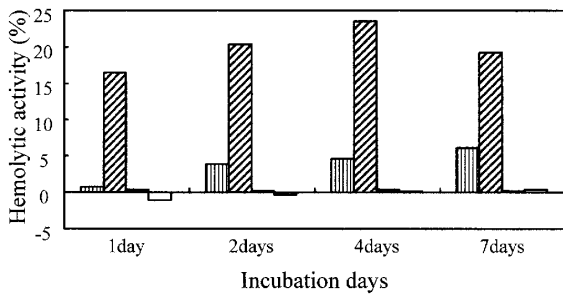
*P. intermedia* ATCC 25611, *P. nigrescens* ATCC 25261, *P. nigrescens* ATCC 33563, *P. nigrescens* IN19 の培養日数と各菌体の試験管内溶血性について検討した。その結果、*P. intermedia* ATCC 25611 および *P. nigrescens* ATCC 25261 は培養 1 日目より溶血活性がみられ、培

Table 2. Relationship between hemolysin gene and hemolysis of *P. intermedia* ATCC 25611, *P. nigrescens* ATCC 25261, ATCC 33563, and IN 19

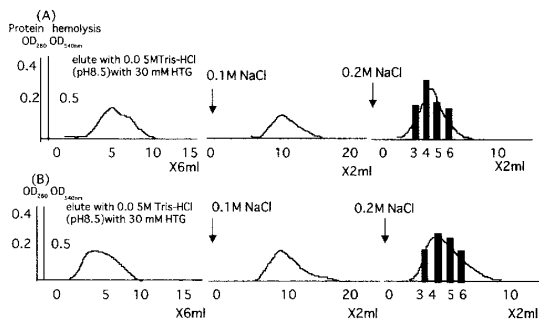
Bacteria	hemolysin gene			hemolysis	
	ORF1	ORF2	ORF3	plate	tube
<i>P. intermedia</i> ATCC 25611	-	+	-	+	+
<i>P. nigrescens</i> ATCC 25261	-	+	-	+	+
<i>P. nigrescens</i> ATCC 33563	+	+	+	+	-
<i>P. nigrescens</i> IN 19	+	+	+	+	-

hemolysin gene: +: PCR product positive, -: PCR product negative

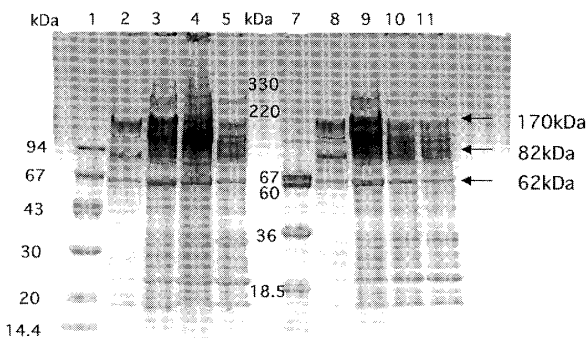
hemolysis: plate: +: B-hemolysis zone positive, tube: +: hemolysis positive, -: hemolysis negative



**Fig. 2.** Effect of incubation on hemolytic activity of cells of *P. intermedia* and *P. nigrescens*.  
 □: *P. intermedia* ATCC 25611, ▨: *P. nigrescens* ATCC 25261, ■: *P. nigrescens* ATCC 33563, ◻: *P. nigrescens* IN19



**Fig. 3.** Anion-exchange chromatography (DEAE-Sephadex A-50) pattern of hemolysin from the outer membrane of *P. intermedia* ATCC25611(A) and *P. nigrescens* ATCC25261(B). Abbreviation: HTG; n-heptyl-β-D-thioglucoiside. Line indicates protein at 280nm of OD. Column indicates the hemolytic activity at 540 nm of OD.



**Fig. 4.** SDS-PAGE of hemolytic activity positive fractions of DEAE-Sephadex chromatography. Lane1: low molecular weight marker; lane2: fraction3; lane3: fraction4; lane4: fraction5; lane5: fraction6. Lane7: high molecular weight marker; lane8: fraction3; lane9: fraction4; lane10: fraction5; lane11: fraction6. Arrows indicate the putative hemolysin of *P. intermedia*.

養の経過と共に増加する傾向がみられたが、*P. nigrescens* ATCC 33563および*P. nigrescens* IN 19は7日培養の菌体においても溶血活性はみられなかった (Fig.2). このことより、長期培養しても*P. nigrescens* ATCC 33563および*P. nigrescens* IN19の菌体は試験管溶血活性を示さないことがわかった。

#### 4. *P. intermedia*と*P. nigrescens*の溶血毒素の部分精製とその性状

*P. intermedia* ATCC 25611と*P. nigrescens* ATCC 25261から得られたOM画分を透析により分離可能なHTGにより可溶化し、溶血毒素を部分精製することを試みた。Fig.3に示す様に両菌株の外膜画分からの可溶化した溶液をDEAE-Sephadex A-50にかけ、平衡化緩衝液(30 mM HTG含有0.05 M Tris-HCl (pH8.5))と同じ緩衝液にて溶出した。溶出された画分と0.1 M NaClにて溶出した画分には溶血活性は見られなかった。ついで、0.2 M NaClにて溶出した画分に溶血活性がみられた。0.3 M NaClから1 M NaClにて溶出した画分には溶血活性はみられなかった。両菌株の外膜画分の溶血毒素の溶出パターンはほぼ同様であった。*P. intermedia*の染色体DNAのシーケンスの殆どが解析され公開されていることより、*P. intermedia*の部分精製溶血毒素のSDS-PAGEのメジャーなバンドのN末端アミノ酸分析を行いデータベースよりホモロジーのあるタンパク質とその遺伝子を推定することを試みた。*P. intermedia*の溶血毒素の部分精製の各フラクションを透析後、SDS-PAGEを行った。その結果4つのフラクションにおいて共通に存在するメジャーなバンドは62 kDa, 82 kDa, 170 kDaの3つのバンドであった (Fig.4)。そこで、測定可能であった2バンドのN末端アミノ酸分析を行ったところ、82 kDaのバンドのN末端アミノ酸配列はRQSGEIであり、62 kDaのバンドのN末端アミノ酸配列はRAYDNQRVETVであった。170

kDaのバンドはPVDF膜に解析に必要な量がブロッティングできず解析できなかった。前2者をデータベースによりホモロジー検索を行ったが、いずれもホモロジーのあるタンパク質は見いだせなかった。ついで、*P. intermedia*と*P. nigrescens*の部分精製の溶血毒素の溶血活性に対する種々の物質および加熱による影響をみた。各部分精製物のタンパク質量を1 mg/mlに調整し、この外膜画分溶液の100  $\mu$ lに種々の物質を添加しその影響をみた。その結果Dithiothreitol, 2-mercaptoethanol, L-cysteineの還元剤を加え

ることにより溶血活性の増加とN-ethylmaleimide, 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)のSH基の阻害剤を添加することにより溶血活性の著しい低下がみられた (Table 3)。このことより、溶血毒素のSH基が溶血活性に関与していることが示唆された。また、100°C, 10分の加熱により、活性の低下がみられたが、完全に失活しなかった。このことより、溶血毒素の殆どは易熱性であるが、耐熱性の部分も存在するものと思われた。これは複数の溶血毒素が存在する可能性を示唆するものと思われた。

Table 3. Effect of various compounds and heat treatment on hemolytic activity of partially purified fraction from outer membrane fraction of *P. intermedia* ATCC 25611 and *P. nigrescens* ATCC 25261

Compounds and heat treatment	Hemolytic activity (mean $\pm$ SD %)	
	partially purified fraction of <i>P. intermedia</i> ATCC 25611	<i>P. nigrescens</i> ATCC 25261
None	16.0 $\pm$ 1.5	15.1 $\pm$ 2.0
DTT (50 mM)	18.2 $\pm$ 0.8	24.0 $\pm$ 1.2
2ME (50 mM)	20.0 $\pm$ 0.5	18.8 $\pm$ 0.9
L-Cysteine (50 mM)	23.9 $\pm$ 0.4	21.7 $\pm$ 0.8
NEM (1 mM)	2.6 $\pm$ 0.1	3.2 $\pm$ 0.2
DTNB (1 mM)	7.7 $\pm$ 0.3	7.3 $\pm$ 0.1
heat (100 °C, 10min)	6.7 $\pm$ 0.3	4.3 $\pm$ 0.1

One hundred  $\mu$ g/100  $\mu$ l each partially purified hemolysin was added 900  $\mu$ l of PBS or 900  $\mu$ l of each reagents in PBS, and added 1,000  $\mu$ l of 2% rabbit red blood cell. After incubation for 60min at 37 °C, these were centrifuged at 5,000 g for 5min. OD of supernatant was measured at 540 nm. Hemolytic activity was indicated as a percent of the positive control (distilled water plus erythrocytes). All samples were assayed in triplicate. Abbreviation, DTT, Dithiothreitol, 2ME: 2-mercaptoethanol, NEM; N-ethylmaleimide, DTNB, dithiobis(2-nitrobenzoic acid)

## 考 察

*P. intermedia*と*P. nigrescens*は溶血毒素を産生することは知られているが<sup>13,14)</sup>、それらの溶血毒素は精製されておらず、生物学的性状や生体における役割については明確にされていない。Beemら<sup>11)</sup>は溶血活性の強い臨床分離株である*P. intermedia* 27よりその遺伝子を*E. coli*で発現させ、*P. intermedia*の溶血毒素の遺伝子とした。彼らによると、その溶血毒素の遺伝子は3つの領域よりなり、それぞれの領域からのオープン・リーディング・フレームをORF1, ORF2, ORF3とした。*P. intermedia*と*P. nigrescens*は1995年に*P. intermedia*より再分類されるまでほぼ同一に扱われてきた様にその性状は類似しており、溶血毒素を含めた一般的な生化学的性状による分類はできない。Shahら<sup>15)</sup>によりDNA

-DNAハイブリダイゼーションにて*P. intermedia*と*P. nigrescens*に分類することが可能になり、また、最近では16S rDNAに対するそれぞれの特異的プライマーを用いてPCR産物により同定が可能になった<sup>14)</sup>。この様に*P. intermedia*と*P. nigrescens*は生物学的性状が類似していることより、両菌種からBeemら<sup>11)</sup>の報告した溶血毒素の遺伝子のDNAシーケンスをもとに各ORFに対するプライマーを作製した。ついで、これらのプライマーを用いてPCR産物より組み換え型溶血毒素を作製し、その性状を検討することを計画した。しかし、*P. intermedia*と*P. nigrescens*の基準株および臨床分離株の計16株の染色体DNAを鋳型としてPCRを行ったがORF1, ORF2, ORF3の3つが検出されたものは2株のみであり、その他はORF2のみが検出されるか、全く検出されないかであった。また、

ORF1, ORF2, ORF3が検出された菌株は試験管内での溶血反応を示さなかった。Beemら<sup>11)</sup>は溶血毒素遺伝子を大腸菌で発現させ、その遺伝子の短縮化と溶血活性の関係を検討した結果、ORF1が血液寒天培地上での溶血活性に関与し、ORF2, ORF3が試験管内溶血反応に関与する遺伝子であると報告した。しかし、今回行った実験ではORF1と血液寒天培地での溶血活性との関連性はみられず、ORF2とORF3と試験管内溶血反応との関連性もみられなかった。また、溶血反応を示さなかった菌株のORF1, ORF2, ORF3のDNAシーケンスは*P. intermedia* 27のシーケンスと殆ど一致していた。これとは逆にORF1, ORF3が検出されないか、またはORF1, ORF2, ORF3の全てが検出されない菌株は試験管内溶血反応を示した。この様に保有する遺伝子と溶血活性の間には矛盾が生じることになった。このことよりBeemら<sup>11)</sup>の報告を基に組み換え型の溶血毒素を作製することは我々が保有する菌株では不可能であることがわかった。この様な現象が生じる原因として3つのことが想定された。1: 細菌は菌株の相違により生物学的性状が異なる場合があり、溶血毒素の性状も菌株の違いにより異なる場合も報告されている<sup>16~20)</sup>。2: 溶血活性がない*E. coli*において遺伝子を発現させると*E. coli*の潜在的な溶血毒素遺伝子が活性化される場合があり、あたかも溶血毒素遺伝子をクローニングしたと思われることが報告されている<sup>21~23)</sup>。3: 構造遺伝子は正常であるが、プロモーター領域に変異がある場合。以上のことよりBeemら<sup>11)</sup>の*P. intermedia* 27は特異的な性状を持つ株である可能性が示唆された。これよりBeemら<sup>11)</sup>の報告した溶血毒素と異なる性状の溶血毒素が存在する可能性が想定された。そこで、*P. intermedia*と*P. nigrescens*の基準株より溶血毒素を部分精製することを試みた。溶血活性は培養上清には存在せず、菌体の外膜画分に存在した。他の口

腔細菌においても外膜画分またはvesicle画分に溶血毒素が結合している例は報告されている<sup>18,24)</sup>。*P. intermedia*および*P. nigrescens*はシドロフォアをもたず、周囲から生体成分に結合した鉄イオンを直接利用することができない。両菌は赤血球から遊離したヘモグロビン、ヘミン等を鉄源として利用する。溶血毒素により赤血球が破壊され、ヘモグロビンやヘミンが遊離しても生体中ではハプトグロブリンやヘモペキシンに素早く結合して細菌が利用できない状態になる。溶血毒素が外膜に結合していることの意義は外膜に結合した溶血毒素が赤血球に作用した場合に溶血と同時にヘモグロビンやヘミンを菌体に結合することができる可能性が想定される。膜結合の溶血毒素として*Shigella flexneri*等のcontact溶血毒素と呼ばれる溶血毒素が報告されている<sup>25)</sup>。これは菌体表面の溶血毒素が赤血球に結合することが必要であり、*P. intermedia*と*P. nigrescens*の溶血毒素と類似の性状であるが、*S. flexneri*等のcontact溶血毒素と呼ばれている溶血毒素は菌が生きることが必要であり、*S. flexneri*の食作用の誘導等と関連があるとされる。このことより、*P. intermedia*と*P. nigrescens*の溶血毒素は外膜結合性であるが菌が生きていなくても作用すること、また可溶化しても溶血活性を示すことより、*S. flexneri*等のcontact溶血毒素とは異なる性状の溶血毒素であった。*P. intermedia*と*P. nigrescens*の外膜画分を透析により脱塩可能なデタージェントにより可溶化し、溶血毒素を部分精製した。溶血活性を示したそれぞれのフラクションをSDS-PAGEにかけたところ62kDa, 82kDa, 170kDaの3つのメジャーなタンパクバンドが関与している可能性が示唆された。これら3バンドのうち2バンドのN末端アミノ酸シーケンスはデターベース上ではホモロジーがある物質は検出されず、またBeemら<sup>11)</sup>の報告した溶血毒素ともホモロジーは無かった。部分精製した溶血毒素は



SH基還元剤にて活性の増加とSH基阻害剤にて活性の著しい低下がみられたことよりチオール活性型の溶血毒素であると推察された。チオール活性型の溶血毒素としては*Streptococcus pyogenes*の産生するストレプトリジンO、*Streptococcus pneumoniae*の産生するニューモリシン、*Clostridium perfringens*の産生するツエター毒素など<sup>26-28)</sup>グラム陽性菌が産生すると報告されている。これに対して*P. intermedia*や*P. nigrescens*のグラム陰性菌の産生するチオール活性型の溶血毒素はあまり報告がない。

溶血毒素は酵素型、穴形成型、界面活性型の3つに分類されている。酵素型は*Staphylococcus aureus*の $\beta$ 毒素のスフィンゴミエリナーゼ、*C. perfringens*の $\alpha$ 毒素のホスホリパーゼC等である<sup>29,30)</sup>。これらの型の毒素は37°Cで反応後、溶血を生じさせるためには0~4°Cにすることが必要でホット・コールド型溶血毒素である。*P. intermedia*と*P. nigrescens*の溶血毒素は37°Cにおける反応で溶血することより酵素型ではないことがわかった。穴形成型は*E. coli*のRTX溶血毒素や*Streptococcus pyogenes*のストレプトリジン等である<sup>31-33)</sup>。これらの溶血毒素は膜に穴を形成し溶血する。*P. intermedia*と*P. nigrescens*の溶血毒素が膜に穴を形成するかどうかは今後の検討課題である。界面活性型は*S. aureus*のデルタ毒素や*Pseudomonas aeruginosa*の耐熱性溶血毒素は疎水性の高い界面活性作用により、溶血を引き起こす<sup>34,35)</sup>。*P. intermedia*と*P. nigrescens*がこの性状を有するかは不明である。

口腔内において歯周病の進行に伴い溶血毒素を産生する細菌が増加することが指摘されている<sup>36)</sup>。この報告では溶血毒素を産生する菌として*Actinomyces*属、*Streptococcus*属、*Staphylococcus*属、*Prevotella*属、*Actinobacillus*属が増加するとしている。その他に溶血毒素を産生する菌として*Porphyromonas gingivalis*や*Treponema*

*denticola*が報告されている<sup>18,37)</sup>。細菌における溶血毒素は病原性と関連があるとされている。これは溶血毒素の変異株は動物、培養細胞、*in vivo*において病原性が低下すると報告されていることより推測されている<sup>38-41)</sup>。また、溶血毒素は赤血球以外の種々の細胞に対しても傷害を与えるとされている<sup>42-46)</sup>。しかし、*P. intermedia*や*P. nigrescens*の口腔細菌の溶血毒素が歯周病においてどのような役割をしているかは明確にされていない。しかし、現在最も強く推測されていることの1つとして、発育にヘモグロビンやヘミンを必要とする細菌においては赤血球を溶血毒素により破壊し、それらを獲得することが必要不可欠であり、また、溶血毒素は歯周病の初期に関与するよりは菌の増殖に伴う歯周病の進行時に重要であると考えられている。その他の溶血毒素の病原性については*P. intermedia*と*P. nigrescens*からの溶血毒素を精製し、その遺伝子を特定し、さらにその変異株から溶血毒素の生体内での作用について検討することが必要である。

以上のことより*P. intermedia*と*P. nigrescens*において既に報告された溶血毒素およびその遺伝子と異なるものの存在が想定された。部分精製した溶血毒素は外膜結合性で、チオール活性型の性状を示した。また、溶血毒素の推定分子量は62 kDaから170 kDaの間の高分子タンパク質である可能性が示唆された。

## 謝 辞

N末端アミノ酸配列を解析するにあたりご協力くださいました東京農業大学の渡部俊弘教授および大山 徹教授に心より感謝申し上げます。

## 文 献

1. Shah HN and Gharbia SE : Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia*

- and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. Nov., *Int J Syst Bacteriol*, **42** : 542-546, 1992.
2. Slots J and Listgarten MA : *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases., *J Clin Periodontol*, **15** : 85-93, 1988.
  3. Van der Weijden GA, Timmerman MF, Reijerse E et al. : The prevalence of *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *P. intermedia* in selected subjects with periodontitis., *J Clin Periodontol*, **21** : 583-588, 1994.
  4. Riggio MP, Lennon A and Roy KM : Detection of *Prevotella intermedia* in subgingival plaque of adult periodontitis patients by polymerase chain reaction., *J Periodontal Res*, **33** : 369-376, 1998.
  5. Loesche WJ, Syed SA, Laughon BE et al. : The bacteriology of acute necrotizing ulcerative gingivitis., *J Periodontol*, **53** : 223-230, 1982.
  6. Bae KS, Baumgartner JC, Shearer TR et al. : Occurrence of *Prevotella nigrescens* and *Prevotella intermedia* in infections of endodontic origin., *J Endod*, **23** : 620-623, 1997.
  7. Conrads G, Mutters R, Fischer J et al. : PCR reaction and dot-blot hybridization to monitor the distribution of oral pathogens within plaque samples of periodontally healthy individuals., *J Periodontol*, **67** : 994-1003, 1996.
  8. Gharbia SE, Haapasalo M, Shah HN et al. : Characterization of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens* isolates from periodontic and endodontic infections., *J Periodontol*, **65** : 56-61, 1994.
  9. Matto J, Saarela M, von Troil-Linden B et al. : Distribution and genetic analysis of oral *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*., *Oral Microbiol Immunol*, **11** : 96-102, 1996.
  10. Teanpaisan R, Douglas CWI and Walsh TF : Characterisation of black-pigmented anaerobes isolated from diseased and healthy periodontal sites., *J Periodontal Res*, **30** : 245-251, 1995.
  11. Beem JE, Nesbitt WE and Leung K-P : Cloning of *Prevotella intermedia* loci demonstrating multiple hemolytic domains., *Oral Microbiol Immunol*. **14** : 143-152, 1999.
  12. Smith GL, Socransky SS and Smith CM : Rapid method for the purification of DNA from subgingival microorganisms., *Oral Microbiol Immunol*, **4** : 47-51, 1989.
  13. Beem JE, Nesbitt WE and Leung K-P : Identification of hemolytic activity in *Prevotella intermedia*., *Oral Microbiol Immunol*, **13** : 97-105, 1998.
  14. Okamoto M, Maeda N, Kondo K et al. : Hemolytic and hemagglutinating activities of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*., *FEMS Microbiol Lett*, **178** : 299-304, 1999.
  15. Shah HN and Gharbia SE : Biochemical and chemical studies on strains designated *Prevotella intermedia* and proposal of a new pigmented species, *Prevotella nigrescens* sp. Nov., *Int J Syst Bacteriol*, **42** : 542-546, 1992.
  16. Hoshi M, Kato I, Goto N et al. : Hemolytic toxin produced by *Porphyromonas gingivalis*., *FEMS Microbiol Lett*, **114** : 273-278, 1993.
  17. Deshpande RG and Khan MB : Purification and characterization of hemolysin from *Porphyromonas gingivalis* A7436., *FEMS Microbiol Lett*, **176** : 387-394, 1999.
  18. Chu L, Bramanti TE, Ebersole JL et al. : Hemolytic activity in the periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis* : kinetics of enzyme release and localization., *Infect Immun*, **59** : 1932-1940, 1991.
  19. Kay HM, Birss AJ and Smalley JW : Haemagglutinating and haemolytic activity of the extracellular vesicles of *Bacteroides gingivalis* W50., *Oral Microbiol Immunol*, **5** : 269-274, 1990.
  20. Karunakaran T and Holt SC : Cloning of two distinct hemolysin genes from *Porphyromonas (Bacteroides) gingivalis* in *Escherichia coli*., *Microb Pathog*, **15** : 37-49, 1993.
  21. Green J, Sharrocks AD, MacInnes JI et al. : Purification of HlyX, a potential regulator of haemolysin synthesis, and properties of HlyX : FNR hybrids., *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, **248** : 79-84, 1992.
  22. Lian CJ, Rosendal S and MacInnes JI : Molecular cloning and characterization of a hemolysin gene from *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae*., *Infect Immun*, **57** : 3377-3382, 1989.
  23. Ludwig A, Tengel C, Bauer S et al. : Sly A, a regulatory protein from *Salmonella typhimurium*, induces a haemolytic and pore-forming protein in *Escherichia coli*., *Mol Gen Genet*, **249** : 474-486, 1995.
  24. Sela MN : Role of *Treponema denticola* in peri-

- odontal diseases., *Crit Rev Oral Biol Med*, **12** : 399-413, 2001.
25. Clerc P, Baudry B and Sansonetti PJ : Plasmid-mediated contact haemolytic activity in *Shigella* species : correlation with penetration into HeLa cells., *Ann Inst Pasteur Microbiol*, **137** : 267-278, 1986.
  26. Bhakdi S, Trantum-Jensen J and Sziegoleit A : Mechanism of membrane damage by streptolysin-O., *Infect Immun*, **47** : 52-60, 1985.
  27. Boulnois GJ, Paton JC, Mitchell TJ et al. : Structure and function of pneumolysin, the multifunctional, thiol-activated toxin of *Streptococcus pneumoniae*., *Mol Microbiol*, **5** : 2611-2616, 1991.
  28. Iwamoto M, Ohno-Iwashita Y and Ando S : Role of the essential thiol group in the thiol-activated cytolysin from *Clostridium perfringens*., *Eur J Biochem*, **167** : 425-430, 1987.
  29. Ikezawa H and Murata R : Comparative kinetics of hemolysis of mammalian erythrocytes by *Clostridium perfringens* alpha-toxin (phospholipase C)., *J Biochem*, **55** : 217-224, 1964.
  30. Doery HM, Magnusson BJ, Cheyne IM et al. : A phospholipase in staphylococcal toxin which hydrolyses sphingomyelin., *Nature*, **198** : 1091-1092, 1963.
  31. Welch RA : Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria., *Mol Microbiol*, **5** : 521-528, 1991.
  32. Coote JG : Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria., *FEMS Microbiol Rev*, **8** : 137-161, 1992.
  33. Braun V, Focareta T : Pore-forming bacterial protein hemolysins (cytolysins)., *Crit Rev Microbiol*, **18** : 115-158, 1991.
  34. Caird JD and Wiseman GM : Purification of the delta toxin of *Staphylococcus aureus*., *Can J Microbiol*, **16** : 703-708, 1970.
  35. Liu PV : Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*., *J Infect Dis*, 130 Suppl : S94-99, 1974.
  36. Hillman JD, Maiden MFJ, Pfaller SP et al. : Characterization of hemolytic bacteria in subgingival plaque., *J Periodont Res*, **28** : 173-179, 1993.
  37. Chu L, Burgum A, Kolodrubetz D et al. : The 46-kilodalton-hemolysin gene from *Treponema denticola* encodes a novel hemolysin homologous to aminotransferases., *Infect Immun*, **63** : 4448-4455, 1995.
  38. Gross MK, Au DC, Smith AL et al. : Targeted mutations that ablate either the adenylate cyclase or hemolysin function of the bifunctional cyaA toxin of *Bordetella pertussis* abolish virulence., *Proc Natl Acad Sci USA*, **89** : 4898-4902, 1992.
  39. Hyatt DR, ter Huurne AA, van der Zeijst BA et al. : Reduced virulence of *Serpulina hyodysenteriae* hemolysin-negative mutants in pigs and their potential to protect pigs against challenge with a virulent strain., *Infect Immun*, **62** : 2244-2248, 1994.
  40. Alfa MJ, Degagne P and Totten PA : *Haemophilus ducreyi* hemolysin acts as a contact cytotoxin and damages human foreskin fibroblasts in cell culture., *Infect Immun*, **64** : 2349-2352, 1996.
  41. Nishibuchi M, Fasano A, Russell RG et al. : Enterotoxigenicity of *Vibrio parahaemolyticus* with and without genes encoding thermostable direct hemolysin., *Infect Immun*, **60** : 3539-3545, 1992.
  42. Cavalieri SJ, Snyder IS : Cytotoxic activity of partially purified *Escherichia coli* alpha hemolysin., *J Med Microbiol*, **15** : 11-21, 1982.
  43. Haque MA, Ohki K, Kikuchi M et al. : Contact hemolysin production by strains of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea., *J Clin Microbiol*, **32** : 1109-1111, 1994.
  44. Jonas D, Schultheis B, Klas C et al. : Cytocidal effects of *Escherichia coli* hemolysin on human T lymphocytes., *Infect Immun*, **61** : 1715-1721, 1993.
  45. Stevens DL, Mitten J and Henry C : Effects of alpha and theta toxins from *Clostridium perfringens* on human polymorphonuclear leukocytes., *J Infect Dis*, **156** : 324-333, 1987.
  46. Walev I, Weller U, Strauch S et al. : Selective killing of human monocytes and cytokine release provoked by sphingomyelinase (beta-toxin) of *Staphylococcus aureus*., *Infect Immun*, **64** : 2974-2979, 1996.