

平成21年 5 月22日現在

研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2007～2008
 課題番号： 19592129
 研究課題名 (和文) LPS による B 細胞の増殖活性に関する細胞内リン酸化基質タンパク質の同定
 研究課題名 (英文) Identification of phosphorylated proteins in murine B cells in relation to the LPS-induced proliferative response
 研究代表者 木村重信 (KIMURA SHIGENOBU)
 岩手医科大学・歯学部・教授
 研究者番号： 10177917

研究成果の概要：

LPS による B 細胞の増殖活性にかかわる細胞内シグナル伝達系を明らかにする目的で、LPS 刺激後の B 細胞の増殖反応と細胞内リン酸化反応について検討を行った結果、増殖反応がみられた場合には 25 kDa の基質タンパク質 (p25) のチロシンリン酸化反応が誘導された。そこで、p25 の性状解析を行った結果、p25 は Ran であること、また無刺激でも複数の p25 のスポットが観察されることが明らかとなった。さらに、LPS 刺激により p25 のチロシンリン酸化総量が増加し、且つその最も酸性側のスポットの量が増加することが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：LPS, B 細胞, 細胞内リン酸化反応

1. 研究開始当初の背景

歯周炎の発症・病状の進行には、*Porphyromonas gingivalis* をはじめとする歯周病原性細菌の LPS による B 細胞の活性化反応が深く関与することが強く示唆されるが、その詳細は依然不明な点が数多く残されている。我々はこれまでに、LPS による B 細胞の活性化機構には CD14 依存性および非依存性の活性化経路が存在すること、CD14 依存性の活性化経路では TGF- β 、IgA の産生が誘導されること、CD14 非依

存性の活性化経路では細胞増殖、IL-6 産生および IgM 産生が誘導されることを報告してきた (Kimura S ら, 2000)。また、CD14 非依存性の活性化である LPS による B 細胞の増殖活性には、B 細胞内チロシンリン酸化反応が重要な役割を演じていることを報告してきた (Kimura S ら, 1995)。しかし、LPS 刺激後に誘導される B 細胞内リン酸化基質タンパク質を含め、そのシグナル伝達系の詳細については依然不明な点が数多く残されている。

2. 研究の目的

C3H/HeN および腸内細菌の LPS に低応答性の C3H/HeJ マウス B 細胞を用いて, *Escherichia coli* LPS および C3H/HeJ マウス B 細胞に対しても増殖反応を誘導する *P. gingivalis* LPS による B 細胞の増殖反応の特異性と B 細胞内リン酸化反応, すなわち, チロシン, セリンおよびスレオニンリン酸化反応について検討を行う。さらに, LPS による B 細胞の増殖活性に関する特異的基質タンパク質を同定するとともにその動態についても検討し, LPS による B 細胞の増殖活性にかかわる細胞内シグナル伝達系の詳細を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) *P. gingivalis* LPS は *P. gingivalis* ATCC 33277 株より hot phenol water 抽出法を用いて調製した。 *E. coli* LPS は市販の精製 *E. coli* LPS を再度精製したものをを用いた。
- (2) B 細胞は C3H/HeN および C3H/HeJ マウス脾細胞より調製した。
- (3) LPS による B 細胞の増殖活性は刺激後 48 時間での細胞数から測定した。
- (4) LPS 刺激後の B 細胞からのサイトカイン産生については, Real-time PCR を用いて IL-6 および TGF- β mRNA 発現から検討した。
- (5) 細胞内リン酸化基質タンパク質の検出には, LPS で刺激, 培養した B 細胞よりライセートを調製し, 二次元電気泳動で分離した。二次元電気泳動後, ゲル内のタンパク質を PVDF 膜に転写し, 抗ホスホチロシン, 抗ホスホセリンおよび抗ホスホスレオニン抗体を用いたウエスタンブロットティングにより検出した。
- (6) 検出したタンパク質スポットをゲル内消化後, 飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF MS 分析) および peptide mass fingerprinting 解析により, LPS による B 細胞の増殖活性に関する B 細胞内リン酸化基質タンパク質の同定を行った。
- (7) 当該スポットの解析およびリン酸化の定量化は PDQuest™ を用いて行った。

4. 研究成果

- (1) *P. gingivalis* LPS は, C3H/HeN および C3H/HeJ マウス B 細胞に対し増殖活性を示した。その際, 25 kDa タンパク質 (p25) を含む細胞内基質タンパク質のチロシンリン酸

化反応が誘導された。一方, *E. coli* LPS は, C3H/HeN マウス B 細胞に対してのみ増殖活性を示し, B 細胞の増殖がみられた場合には, p25 のチロシンリン酸化反応が誘導された。

- (2) セリンおよびスレオニンリン酸化反応については, *P. gingivalis* LPS あるいは *E. coli* LPS による B 細胞の増殖活性に関する特異的な細胞内基質タンパク質が確認されなかった。
- (3) p25 をさらに検討する目的で MALDI-TOF MS および peptide mass fingerprinting 解析を行ったところ, p25 の候補となるタンパク質スポット 8 個のうち 2 個のスポットは, small GTPase である Ran と同定された。
- (4) 抗 p25 抗体 (抗 Ran 抗体) を用いた二次元ウエスタンブロットティングから, B 細胞には無刺激で複数の p25 のスポットが観察されること, LPS 刺激によりその総量が増加し, 且つその最も酸性側のスポットの量が増加することが明らかとなった。

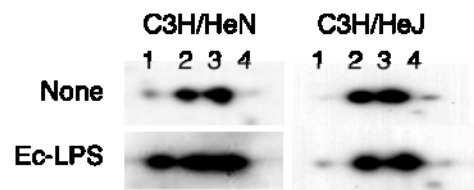


Fig. 1. Alteration of quantity of phosphorylated p25 in LPS-stimulated B cells. Whole cell lysates were prepared from B cells from C3H/HeN and C3H/HeJ mice stimulated with *E. coli* LPS for 48 h, and aliquots (150 μ g proteins) were separated with 2D-PAGE. The p25 was detected by ECL immunoblotting using a monoclonal anti-Ran antibody. The amount of the most acidic spot of p25 (#1) increased in response to the B cell proliferation.

- (5) C3H/HeN および C3H/HeJ マウス B 細胞に対し増殖活性を示す *P. gingivalis* LPS, ならびに C3H/HeN マウス B 細胞にのみ増殖活性を示す *E. coli* LPS を用いた検討から, 上記の p25 のスポットの変化は, LPS 刺激後の B 細胞の増殖反応と一致することが強く示唆された。
- (6) LPS 刺激後の B 細胞内チロシンリン酸化反応阻害剤であるハービマイシン処理を行うと, いずれのマウス B 細胞についても増殖反応および p25 のスポットの変動 (総量および

最も酸性側のスポット量の増加)が完全に抑制されたことから、p25 のチロシンリン酸化が増殖反応に関与することが明らかとなった。

- (7) LPS による B 細胞のサイトカイン産生との関連性について 3 種類の MAP キナーゼ (ERK1/2, p38, JNK) の阻害剤を用いて検討した結果、*P. gingivalis* LPS 刺激後の p25 のスポットの変動はサイトカイン (IL-6, TGF- β) 産生と関与することが示唆された。

これらの結果より、B 細胞内チロシンリン酸化基質タンパク質、p25 の総量および最も酸性側のスポット量の増加は、*P. gingivalis* LPS および *E. coli* LPS による B 細胞の増殖反応およびサイトカイン産生に関与していることが強く示唆された。

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 9 件)

- 1, Taira, M., Nezu, T., Sasaki, M., Kimura, S., Kagiya, T., Harada, H., Narushima T. and Araki, Y. : Gene expression analyses of human macrophage phagocytizing sub-micron titanium particles by allergy DNA chip (Genopal™). *Biomed. Mater. Eng.* 19, 2009 (in press).
2. Ichinohe, N., Ohara-Nemoto, Y., Nemoto, T. K., Kimura, S. and Ichinohe, S. : Effects of fosfomycin on Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: quantification of copy numbers of Shiga toxin genes and their expression levels using real-time PCR. *J. Med. Microbiol.*, 2009 (in press).
3. Nemoto, T. K., Ono, T., Shimoyama, Y., Kimura, S. and Ohara-Nemoto, Y. : Determination of three amino acids that caused the alteration of proteolytic activities of staphylococcal glutamyl endopeptidases. *Biol. Chem.*, 390, 277-285, 2009.
4. Nemoto, T. K., Ohara-Nemoto, Y., Ono, T., Kobayakawa, T., Shimoyama, Y., Kimura, S. and Takagi, T. :

Characterization of the glutamyl endopeptidase from *Staphylococcus aureus* expressed in *Escherichia coli*. *FEBS J.* 275, 573-587, 2008.

5. Nemoto, T. K., Ono, T., Shimoyama, Y., Kimura, S. and Ohara-Nemoto, Y. : An *Escherichia coli* expression system for glutamyl endopeptidases optimized by complete suppression of auto-degradation. *Anal. Biochem.* 381, 74-80, 2008.
6. Ohara-Nemoto, Y., Ono, T., Shimoyama, Y., Kimura, S. and Nemoto, T. K. : Homologous and heterologous expression and maturation processing of extracellular glutamyl endopeptidase of *Staphylococcus epidermidis*. *Biol. Chem.*, 389, 1209-1217, 2008.
7. Taira, M., Sasaki, K., Saitoh, S., Nezu, T., Kagiya, T., Harada, H., Sasaki, M., Kimura, S., Hirata, I. and Araki, Y. : TEM/EDX observation of micro-beads of magnetically activated cell sorting (MACS) system and separation trial of mouse mesenchymal stem cells from bone marrow cells by MACS system. *J. Oral Tissue Engin.*, 6, 33-40, 2008.
8. Ohara-Nemoto, Y., Haraga, H., Kimura, S. and Nemoto, T. K. : Occurrence of staphylococci in the oral cavities of healthy adults and nasal-oral trafficking of the bacteria. *J. Med. Microbiol.*, 57, 95-99, 2008.
9. Taira, M., Sasaki, M., Kimura, S. and Araki, Y. : Dose-dependent effects of Ni (II) ions on production of three inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and IL-6), superoxide dismutase (SOD) and free radical NO by murine macrophage-like RAW264 cells with or without LPS-stimulation. *J. Mater. Sci: Mater. Med.*, 19, 2173-2178, 2008. (EPub 2007, Nov 28).

[学会発表] (計 10 件)

1. Sasaki, M., Tajika, S., Kodama, S., Shimoyama, Y. and Kimura, S. : Rapid identification of HACEK group bacteria

- using 16S rRNA gene PCR-RFLP. The 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science. January 16, 2009, Sendai. Japan.
2. Haraga, H., Ohara-Nemoto, Y., Nemoto, T. K., Shimoyama, Y., Sasaki, M. and Kimura, S.: A novel aspartate-specific dipeptidylpeptidase produced from *Porphyromonas endodontalis*. The 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science. January 16, 2009, Sendai. Japan.
 3. Ishikawa, T., Ohara-Nemoto, Y., Tajika, S., Sasaki, M. and Kimura, S.: The production of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) from gingival epithelial cells in response to *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharides. The 3rd International Symposium for Interface Oral Health Science. January 16, 2009, Sendai. Japan.
 4. Nemoto, T. K., Ono, T., Shimoyama, Y., Kimura, S. and Ohara-Nemoto, Y.: Three amino acid substitutions are sufficient for the alteration of the activities among three members of Staphylococcal glutamic-acid-specific endopeptidase. 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会 合同大会. 2008年12月12日, 神戸.
 5. Taira, M., Kagiya, T., Harada, H., Sasaki, M., Kimura, S. and Araki, Y.: Effects of high-concentration ID10% copper ions on macrophage. Annual Meeting 2008 of the Academy of Dental Materials. October 2, 2008, Würzburg, Germany.
 6. Taira, M., Nezu, T., Sasaki, M., Kimura, S., Kagiya, T., Harada, H., Narushima, T. and Araki, Y.: Gene expression analyses of human macrophage phagocytizing sub- μ titanium particles by allergy DNA chip (Genopal™). International Symposium on Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application of Fine Particles and Nanotubes ISNT2008. June 16, 2008, Sapporo, Japan.
 7. Ohara-Nemoto, Y., Ono, T., Shimoyama, Y., Kimura, S. and Nemoto, T. K.: Maturation processing of glutamyl endopeptidase of *Staphylococcus epidermidis*. 108th General Meeting of the American Society for Microbiology. June 5, 2008, Boston, USA.
 8. Sasaki, M., Tajika, S., Kodama, S. and Kimura, S.: Acid tolerance of *Streptococcus anginosus*. 18th European Congress of Clinical Microbiology. April 20, 2008, Barcelona, Spain.
 9. Taira, M., Sasaki, M., Kimura, S. and Araki, Y.: Macrophage reaction against sub- μ titanium particle. Annual Meeting of the Academy of Dental Materials 2007. October 23, 2007, Fort Lauderdale, FL, USA.
 10. Haraga, H., Ohara-Nemoto, Y., Nemoto, T. K., Sasaki, M., Tajika, S., Hamada, S. and Kimura, S.: Pathogenic factors of *Porphyromonas endodontalis*. 107th General Meeting of the American Society for Microbiology. May 22, 2007, Toronto, Canada.
- [図書] (計5件)
1. 木村重信, 浜田茂幸: 基礎-I-1. 口腔臨床に必要な細菌学. *In* 口腔内科学 (尾崎登喜雄), 飛鳥出版室, 高知, pp 1-10, (2008)
 2. Kimura, S., and Ohara-Nemoto, Y.: Early childhood caries and childhood periodontal diseases. *In* Pediatric Infectious Diseases Revisited (H. Schroten, & S. Wirth, eds.), Birkhäuser-Verlag AG, Basel. pp 177-197, (2007)
 3. Tajika, S., Sasaki, M., Agato, S., Harada-Oikawa, R., Hamada, S. and Kimura, S.: Proinflammatory cytokine production and leukocyte adhesion molecule expression of endothelial cells in response to *Abiotrophia defectiva* infection. *In* Interface Oral Health Science 2007 (M. Watanabe, N. Takahashi, & H. Takada, eds.), Springer Japan, Tokyo. pp 285-286, (2007)
 4. Taira, M., Sasaki, M., Kimura, S. and Araki, Y.: Genome-wide gene expression

- analysis of human myelomonocytic cell line THP-1 exposed to lipopolysaccharide (LPS). *In* Interface Oral Health Science 2007 (M. Watanabe, N. Takahashi, & H. Takada, eds.), Springer Japan, Tokyo. pp 293-294, (2007)
5. Shimoyama, Y., Ohara-Nemoto, Y., Yamada, A., Kato, H., Tajika, S. and Kimura, S. : CD14-dependent and independent B-cell activations by stimulation with lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *In* Interface Oral Health Science 2007 (M. Watanabe, N. Takahashi, & H. Takada, eds.), Springer Japan, Tokyo. pp 295-296, (2007)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 重信 (KIMURA SHIGENOBU)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号：10177917

(2) 研究分担者

根本 優子 (OHARA-NEMOTO YUKO)
長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・
准教授
研究者番号：10164667

(3) 連携研究者

佐々木 実 (SASAKI MINORU)
岩手医科大学・歯学部・准教授
研究者番号：40187133

田近 志保子 (TAJIKI SHIHOKO)
岩手医科大学・歯学部・講師
研究者番号：20048531

下山 佑 (SHIMOYAMA YU) (2008年のみ)
岩手医科大学・歯学部・助教
研究者番号：90453331