

平成 22 年 4 月 8 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20592453
 研究課題名（和文） 歯周病原性バイオフィルムモデルにおける発現タンパク質のプロテオーム解析
 研究課題名（英文） Proteomics of *Porphyromonas gingivalis* within a model oral microbial community
 研究代表者
 久保庭 雅恵（MASAE KUBONIWA）
 大阪大学・大学院歯学研究科・助教
 研究者番号：00303983

研究成果の概要（和文）：歯周病原性細菌 *Porphyromonas gingivalis* が、口腔内早期定着菌および中期定着菌と共存している条件下での、菌体構成タンパク質発現を網羅的に解析したところ、チアミン・コバラミン・ピリミジン合成に関連する酵素群に顕著な減少が認められた。このことから、*P. gingivalis* は混合バイオフィルム中において、ビタミン B 類やピリミジン塩基などの栄養成分を共存他菌種から供給され、合成活性を低下させている可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：*P. gingivalis* can assemble into a heterotypic community with a middle colonizer *F. nucleatum* and an early colonizer *S. gordonii*, and that a community lifestyle provides physiologic support for *P. gingivalis*. 1156 *P. gingivalis* proteins, including 403 down-regulated and 89 up-regulated proteins, were detected qualitatively during comparison of the three species model community with *P. gingivalis* incubated alone under the same conditions. Significant decreases were seen in proteins involved in thiamine, cobalamin, and pyrimidine synthesis. These results indicate that a community lifestyle provides physiologic support for *P. gingivalis*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
2009 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・社会系歯学

キーワード：バイオフィルム, プロテオミクス, 歯周病原性細菌, 代謝経路, ビタミン B

1. 研究開始当初の背景

申請者らは、本研究開始時点で、初期定着菌 *Streptococcus gordonii* のランダムノックアウトライブラリを用い、*S. gordonii* のどの様な分子が歯周病原性菌 *P. gingivalis* との混合バイオフィルム形成に関与するか

を、新規開発した分子生物学的大量スクリーニング方法を用いて網羅的に解析し、混合バイオフィルム形成に関与する *S. gordonii* 側の 10 個の遺伝子を明らかにしていた。しかし、*F. nucleatum* や *P. gingivalis* といった生育の遅い中期～後期定着菌において、混合

バイオフィーム形成に関与する分子を同様の手法で網羅的に検出することに関しては技術的困難が伴う。そこで、これらの菌を口腔内バイオフィームモデルとしての多菌種混合培養環境下で生育させ、コントロールとして純粋培養条件下で生育させた菌との菌体構成タンパク質の発現量の差異を、最新のプロテオーム解析の2つの手法を用いて包括的に検討することにより、混合バイオフィーム形成に関与する *F. nucleatum* および *P. gingivalis* 側の分子をタンパク質レベルで明らかにすることを着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究においては、初期定着菌 *S. gordonii*, 中期定着菌 *F. nucleatum*, 後期定着菌 *P. gingivalis* というそれぞれの定着時期別代表的プラーク構成菌を使用し、これらの菌が相互に接触している条件下での、歯周病原性菌 *P. gingivalis* のタンパク質発現プロファイルの解析を目的とする実験を行う。コントロールとして、単一菌種のみで培養している状態の *P. gingivalis* からタンパク質サンプルを調整することから、他菌種と共存することが引き金となって同菌にどのような変化がおこるのかが明らかとなる。

3. 研究の方法

(1) *P. gingivalis* 単一菌種, *S. gordonii* と *P. gingivalis* の2菌種混合, および *S. gordonii*, *F. nucleatum* と *P. gingivalis* の3菌種混合の培養サンプルからそれぞれに菌体タンパク質を調製し、トリプシン処理の後、2Dキャピラリー高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法(2D capillary HPLC/MS/MS)を用いて定量的ペプチド解析を行った。

(2) SEQUESTを用いてThe Comprehensive Microbial Resource (TIGR-CMR)に掲載されている *P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *S. gordonii* のゲノム配列情報に対する相同性検索を行い、タンパク質分子を同定した。

(3) 混合菌種培養条件下で発現が亢進もしくは抑制された *P. gingivalis* 菌体構成タンパク質について、The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)を用いて、遺伝子オンロジー解析を実施した。

(4) 混合バイオフィーム中で発現量が顕著に亢進したTonB依存性菌体表層レセプター分子HmuRについて、その役割の詳細な解析を行うため、HmuR遺伝子ノックアウト株を作製し、上記3菌種よりなる混合バイオフィーム形成実験に供した。コントロールとして、HmuY遺伝子ノックアウト株および野生株ATCC33277株を用いた3種混合バイオフィームを形成させ、比較定量を行った。

4. 研究成果

(1) 3菌種混合培養条件下での *P. gingivalis* 菌体構成タンパク質の発現状態を網羅的に解析したところ、解析可能であった1156分子のうち、403分子で発現抑制が、一方89分子で発現亢進が観察された。

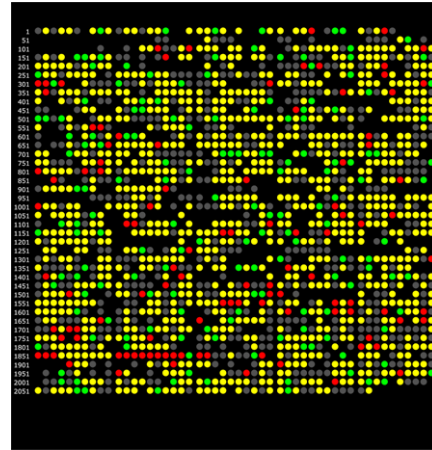


図1. *P. gingivalis* 菌体構成タンパク質発現状態の網羅的解析

タンパク質をコードする遺伝子の ORF 番号 (PGN 番号) に従い、ドットの色で発現状態を表示している。

赤: 混合培養条件下で発現が亢進していた遺伝子

緑: 混合培養条件下で発現が抑制されていた遺伝子

(2) DAVIDによるオンロジー解析の結果、共培養下で発現が抑制されたタンパク質には、菌体の形態・菌体外エンベロップ形成に関わるタンパク質、チアミン・コバラミンといったビタミンB群やピリミジン合成経路を構成する酵素群やDNA修復に関与するものなどが多く含まれることが明らかとなった。一方、ヘミンとの結合能を有し、鉄取り込みに重要な役割を果たしていると考えられるTonB依存性菌体表層レセプターHmuRの発現は顕著に亢進していた。

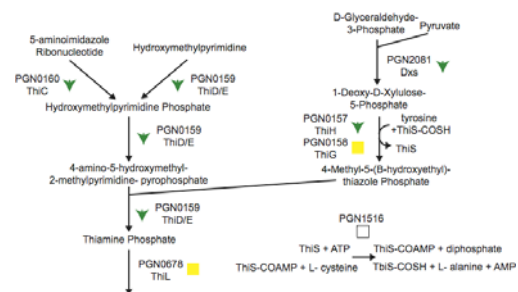


図2. 混合培養条件下でのチアミン合成経路酵素群の発現抑制

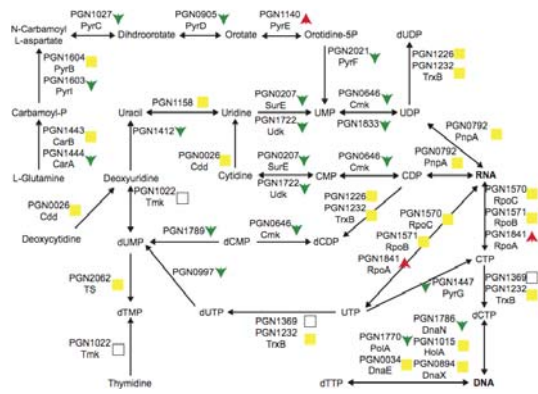


図3. 混合培養条件下でのピリミジン合成経路酵素群の発現抑制

- 赤：混合培養条件下で発現が亢進していた酵素
- 緑：混合培養条件下で発現が抑制されていた酵素
- 黄：発現量に変化が見られなかった酵素

(3) HmuR の混合バイオフィーム形成における役割の解析

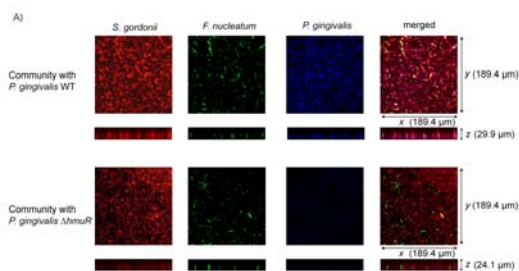


図4. hmuR 変異株における混合バイオフィーム形成能の低下

- 赤：HIにて生染色した *S. gordonii*
- 緑：FITCにて生染色した *F. nucleatum*
- 青：DAPIにて生染色した *P. gingivalis*

写真上段の *P. gingivalis* ATCC33277 野生株は混合バイオフィーム中に多く定着しているが、下段 *hmuR* 変異株はほとんど存在が確認出来ないことから、3菌種混合バイオフィーム形成において HmuR が重要な役割をはたしていることが示唆された。

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11件)

1) Kuboniwa, M. and R. J. Lamont. Subgingival biofilm formation. *Periodontol* 2000, 52(1): 38-52, 2010.

(査読有)

2) Kuboniwa, M., E. L. Hendrickson, Q. Xia, T. Wang, H. Xie, M. Hackett, and R. J. Lamont. Proteomics of *Porphyromonas gingivalis* within a model oral microbial community. *BMC Microbiol* 19(9):98, 2009. (査読有)

3) Kuboniwa, M., A. Amano, H. Inaba, E. Hashino, and S. Shizukuishi. Homotypic biofilm structure of *Porphyromonas gingivalis* is affected by FimA type variations. *Oral Microbiol Immunol* 24(3):260-3, 2009. (査読有)

4) Kuboniwa, M., A. Amano, E. Hashino, Y. Yamamoto, H. Inaba, N. Hamada, K. Nakayama, G. D. Tribble, R. J. Lamont, and S. Shizukuishi. 2009. Distinct roles of long/short fimbriae and gingipains in homotypic biofilm development by *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiol* 26(9):105, 2009. (査読有)

5) Inaba, H., M. Kuboniwa, B. Bainbridge, O. Yilmaz, J. Katz, K. T. Shiverick, A. Amano, and R. J. Lamont. *Porphyromonas gingivalis* invades human trophoblasts and inhibits proliferation by inducing G1 arrest and apoptosis. *Cell Microbiol* 11(10):1517-32, 2009. (査読有)

6) Nagata, H., M. Iwasaki, K. Maeda, M. Kuboniwa, E. Hashino, M. Toe, N. Minamino, H. Kuwahara, and S. Shizukuishi. Identification of binding domain of *Streptococcus oralis* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for *Porphyromonas gingivalis* major fimbriae. *Infect Immun*, 77(11):5130-8, 2009. (査読有)

- 7) Kuboniwa, M., Y. Hasegawa, S. Mao, S. Shizukuishi, A. Amano, R. J. Lamont, and O. Yilmaz. *P. gingivalis* accelerates gingival epithelial cell progression through the cell cycle. **Microbes Infect** 10(2):122-8, 2008. (査読有)
- 8) Inaba, H., K. Nakano, T. Kato, R. Nomura, S. Kawai, M. Kuboniwa, K. Ishihara, T. Ooshima, and A. Amano. Heterogenic virulence and related factors among clinical isolates of *Porphyromonas gingivalis* with type II fimbriae. **Oral Microbiol Immunol** 23(1):29-35, 2008. (査読有)
- 9) Nagata, H., Y. Inagaki, M. Tanaka, M. Ojima, K. Kataoka, M. Kuboniwa, N. Nishida, K. Shimizu, K. Osawa, and S. Shizukuishi. Effect of eucalyptus extract chewing gum on periodontal health: a double-masked, randomized trial. **J Periodontol** 79(8):1378-85, 2008. (査読有)
- 10) Maeda, K., G. D. Tribble, C. M. Tucker, C. Anaya, S. Shizukuishi, J. P. Lewis, D. R. Demuth, and R. J. Lamont. A *Porphyromonas gingivalis* tyrosine phosphatase is a multifunctional regulator of virulence attributes. **Mol Microbiol** 69(5):1153-64, 2008. (査読有)
- 11) Sekine, S., K. Kataoka, Y. Fukuyama, Y. Adachi, J. Davydova, M. Yamamoto, R. Kobayashi, K. Fujihashi, H. Suzuki, D. T. Curiel, S. Shizukuishi, J. R. McGhee, and K. Fujihashi. A novel adenovirus expressing Flt3 ligand enhances mucosal immunity by inducing mature nasopharyngeal-associated lymphoreticular tissue dendritic cell migration. **J Immunol** 180(12):8126-34, 2008. (査読有)
- [学会発表] (計 10 件)
- 1) Kuboniwa, M., Hendrickson, E. L., Xie, H., Hashino, E., Shizukuishi, S., Hackett, M., and Lamont, R. J. Proteomics of *Porphyromonas gingivalis* within a model oral microbial community. The 2009 Gordon Research Conference on Periodontal Disease. Aug 2-7, 2009, Colby-Sawyer College, NH, USA
- 2) 岩崎未央, 橋野恵衣, 東江正裕, 永田英樹, 久保庭雅恵, 雫石聡
デンタルバイオフィルム形成に及ぼす *Streptococcus oralis* GAPDH ペプチドの影響
第 20 回日本口腔衛生学会近畿・中国・四国地方会総会, 2009 年 6 月 21 日, 広島市
- 3) 橋野恵衣, 久保庭雅恵, 東江正裕, 関根伸一, 田中宗雄, 雫石聡
エリスリトールは歯周病原性細菌の揮発性硫化物産生を抑制する
第 20 回日本口腔衛生学会近畿・中国・四国地方会総会, 2009 年 6 月 21 日, 広島市
- 4) 橋野恵衣, 久保庭雅恵, 山本裕美子, 末松和博, 長 洋, 雫石聡
エリスリトールによる *Porphyromonas gingivalis* 発現タンパク質の変化に関する網羅的解析
第 5 2 回春季日本歯周病学会学術大会, 2009 年 5 月 15-16 日, 岡山市
- 5) Nagata, H., Iwasaki, M., Kuboniwa, M., Maeda, K., Sekine, S., and Shizukuishi, S.
Streptococcus oralis GAPDH peptide

- inhibits *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation.
- The 87th General Session & Exhibition of the IADR, April 1-4, 2009, Maiami, FL, USA
- 6) Kuboniwa, M., Amano, A., Hashino, E. and Shizukuishi, S.
- Distinct roles of major/minor fimbriae and gingipains in homotypic biofilm development by *Porphyromonas gingivalis*.
- Biofilms III: 3rd International Conference. Oct 6-8, 2008, Munich, Germany
- 7) 岩崎未央, 永田英樹, 久保庭雅恵, 前田和彦, 橋野恵衣, 雫石聡
- Porphyromonas gingivalis*のバイオフィルム形成に及ぼすGAPDHペプチドの阻害効果, 第57回日本口腔衛生学会・総会, 2008年10月2-4日, さいたま市
- 8) 岩崎未央, 永田英樹, 前田和彦, 久保庭雅恵, 橋野恵衣, 雫石聡
- Porphyromonas gingivalis*線毛への口腔レンサ球菌菌体表層 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase の結合部位の解析
- 大阪大学歯学会第106回例会, 2008年7月17日, 吹田市
- 9) Tucker, C. M., Maeda, K., Tribble, G. D., Hagerty D., Bainbridge B. and Lamont R. J.
- Role of *P. gingivalis* PtpA tyrosine phosphatase in exopolysaccharide production.
- 86th General session & exhibition of the IADR, July 2-5, 2008, Toronto, Canada
- 10) Kuboniwa, M., Hashino, E., Yamamoto, Y., Lamont, R. J. and Shizukuishi, S.
- Role of *Streptococcus gordonii* Cbe protein in periodontopathic biofilm development.
- 86th General session & exhibition of the IADR, July 2-5, 2008, Toronto, Canada
- [図書] (計1件)
- 1) Kuboniwa, M. and R. J. Lamont
- Chapter "Heterotypic *Streptococcus gordonii* - *Porphyromonas gingivalis* communities: formation, gene regulation and development", in Genomic inquiries into oral bacterial communities (ed. Paul E. Kolenbrander), *in press* 2010.
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
- 久保庭 雅恵 (KUBONIWA MASAE)
- 大阪大学・大学院歯学研究科・助教
- 研究者番号: 00303983
- (2) 研究分担者
- 前田 和彦 (MAEDA KAZUHIKO)
- 大阪大学・大学院歯学研究科・助教
- 研究者番号: 00346165
- 関根 伸一 (SEKINE SHINICHI)
- 大阪大学・大学院歯学研究科・助教
- 研究者番号: 70506344