

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月11日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592624

研究課題名（和文） 古細菌シャペロニン分子の交差反応性と歯周病ならびに自己免疫疾患への関与

研究課題名（英文） Cross reactivity of archaeal chaperonin with human CCT involved in the pathogenesis of periodontitis and autoimmune disease

研究代表者

前田 博史 (MAEDA HIROSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：00274001

研究成果の概要（和文）：

歯周病は口腔内細菌の感染によって発症する疾患である。ところが近年、細菌とは異なる微生物の古細菌が歯周病の原因となるが報告された。古細菌はヒトのシャペロニンと類似した蛋白質を保有している。このため、この分子に対する免疫応答が誘導された場合には、自己のシャペロニンが免疫応答の標的となり、自己免疫応答が誘導される可能性が高い。本研究では、歯周病患者と自己免疫疾患患者のシャペロニンに対する応答性を解析し、シャペロニンに対する自己免疫応答が誘導されている可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Periodontitis is known to be an infectious disease caused by oral bacteria. Besides bacteria, it has recently been reported that methanogenic Archaea is also involved in the pathogenesis of periodontitis. Archaea possess group II chaperonin that is homologous to human chaperonin CCT. Due to the sequence similarity, archaeal chaperonin has the potential to be a cross-reactive antigen of human CCT. We examined the reactivity of sera from patients with periodontitis or autoimmune diseases to the chaperonins. Antibody to the archaeal chaperonin and human CCT was detected in some patients. The results demonstrated the possible induction of autoimmune reaction targeting the group II chaperonin. Cross reaction between the archaeal and human chaperonin may be a trigger for autoimmune reaction.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010年度 | 900,000 | 270,000 | 1,170,000 |
| 2011年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周病、古細菌、シャペロニン、自己免疫応答、自己免疫疾患

1. 研究開始当初の背景

歯周病と古細菌に関する研究は1988年に始まり、歯周炎局所からメタン産生菌である

Methanobrevibacter 属が検出されることが報告されている。(Belay *et al.*, Appl Environ Microbiol, 1988) その後も PCR 法によって古細菌を検出する研究が行われた

が (Kulik *et al.*, FEMS Microbiol Lett, 2001), 歯周病の病態との関連性を示唆するには至らなかった。ところが Lepp らによって, *Methanobrevibacter* 属を主体とした古細菌種が重度な歯周病変部での主要な微生物種であることや, 古細菌が歯周ポケット内の細菌叢に影響を与えることが示され, 古細菌が歯周病の病態に関与していることが示唆されるようになった。(Lepp *et al.*, PNAS, 2004)

我々の研究グループは日本人歯周病患者における古細菌の分布状況を調べ, *M. oralis* とその類縁菌種が, 日本人の歯周病患者に分布していること, さらに, 歯周病患者は *M. oralis* に対する免疫応答を惹起していることを示唆する結果を得た。(Yamabe *et al.*, FEMS Microbiol Lett, 2008) さらに, *M. oralis* にはヒトの CCT と分子相同性の高いグループ II シャペロニンが抗原分子として存在していることが明らかになってきた。グループ I シャペロニンである熱ショック蛋白質 (HSP) については自己免疫応答を誘導する分子として, これまで多くの研究が展開されてきた。グループ II シャペロニンの抗原性については, ほとんど明かにされていないが, HSP と同様に自己免疫応答の誘導に関与している可能性がある。そこで本研究では, グループ II シャペロニンの交差反応性と自己免疫応答誘導の可能性について検討する計画を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は古細菌シャペロニンの抗原性と歯周病, 自己免疫疾患への関与について調べることであり, 具体的には以下の計画を立案した。

- (1) 歯周病関連古細菌の保有するシャペロニン遺伝子情報の解析
- (2) 古細菌シャペロニンならびにヒト CCT 組み換え蛋白質の構築
- (3) 古細菌シャペロニンとヒトシャペロニン CCT との交差反応性の解析
- (4) グループ II シャペロニンに対する歯周病ならびに自己免疫疾患患者血清の応答性の解析
- (5) 患者血清の認識するシャペロニンエpiteopeの解析

3. 研究の方法

(1) シャペロニン遺伝子のクローニング

遺伝子クローニングは PCR 法とゲノム Walker 法によって行った。PCR のためのプライマーはゲノム解析が終了している

Methanobrevibacter 属の Cpn 遺伝子の塩基配列を参考に, Genetyx software (version 8) を用いて設計した。クローニングした遺伝子の塩基配列を通法に従って解読し, 他のシャペロニンホモログとの分子相同性を調べた。

(2) シャペロニン組み換え蛋白質の構築
組み換え蛋白質の構築・精製には, 当初ヒスチジンタグテクノロジーを応用した pET101 プラスミドベクターの使用を計画していた。しかし, ヒトシャペロニン CCT 組み換え蛋白質の可溶化が困難であった。このため, 一部の計画を変更し, pCold ベクターシステム, ならびに小麦胚芽無細胞発現系システムを応用して組み換え蛋白質の構築と精製を行った。

(3) 古細菌シャペロニンとヒトシャペロニン CCT の交差反応性の解析

ヒト CCT サブユニットタンパク質 (CCT 1 ~ CCT8) に対する抗体と古細菌シャペロニンの反応性をウエスタンブロット法によって調べた。

(4) 古細菌シャペロニンに対する歯周病患者血清の反応

組み換えシャペロニン蛋白質に対する歯周病患者血清の反応性をウエスタンブロット法で調べた。

(5) ヒトシャペロニン CCT に対する自己抗体の検出

歯周病患者血清ならびに自己免疫疾患患者血清中の抗ヒト CCT 抗体をウエスタンブロット法で検出した。

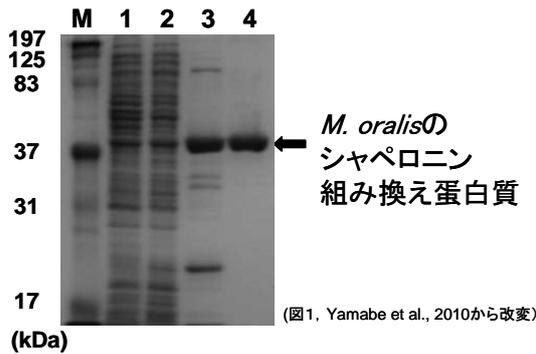
4. 研究成果

(1) *M. oralis* シャペロニン遺伝子のクローニングと塩基配列の解析

歯周病関連古細菌である *M. oralis* からグループ II シャペロニンの遺伝子 (2 遺伝子) 構造を解析した。*M. oralis* の保有しているシャペロニンはヒトの CCT 各サブユニットタンパク質とアミノ酸配列において 28.8% ~ 40.0% の相同性を示した。*M. oralis* が保有するシャペロニンはヒト CCT と分子相同性が高く, 交差反応抗原となる可能性が高いことが明かとなった。*M. oralis* のシャペロニン遺伝子の情報はこれまでに報告がなく, 解析した遺伝子情報は遺伝子データベースに登録・公開した。

(2) シャペロニン組み換え蛋白質の構築

得られた遺伝子情報を利用して, *M. oralis* のシャペロニン組み換え蛋白質を構築・精製した。さらにヒトシャペロニン CCT3, 4, 8 についても, 組み換え蛋白質を構築・精製した。精製した組み換え蛋白質票品のうち, *M. oralis* の組み換えシャペロニンを代表例として図 1 に示す。



(図1, Yamabe et al., 2010から改変)

(3) *M. oralis* シャペロニンの抗原性の解析

M. oralis のシャペロニン組み換え蛋白質と患者血清の反応性を解析した結果、重度の歯周炎患者が高頻度に反応性を示した(図2)。古細菌に対する免疫応答が歯周病患者に惹起されていることはこれまでに明らかになってきたが、これまでに抗原分子を同定した報告はなく、世界で初めてヒトの認識する古細菌の抗原分子を同定することができた。

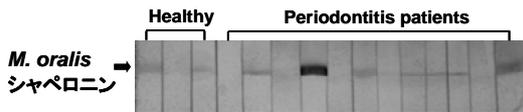


図2. 古細菌シャペロニンに対する患者血清の反応 (Yamabe et al., 2010から改変)

(4) 古細菌シャペロニンとヒトシャペロニン CCT の交差反応性の解析

市販されている抗ヒトシャペロニン CCT 抗体と構築した *M. oralis* 組み換えシャペロニン蛋白質、古細菌菌体抗原を使用して、ヒト CCT と古細菌シャペロニンの交差反応性を調べた結果、ヒト CCT3, 4, 8 が *M. oralis* シャペロニンの交差反応抗原である可能性が示唆された。これによって、重度な歯周病によって *M. oralis* の感作が起こった場合、交差反応からヒト CCT に対する自己免疫応答が誘導される可能性が示された(図3, 4)。

(5) ヒトシャペロニン CCT に対する自己抗体の検出

構築したヒトシャペロニン CCT 組み換え蛋白質、ならびに市販されている各 CCT サブユニットタンパク質に対する歯周病患者ならびに自己免疫疾患患者血清の反応性を調べた結果、CCT4, 5, 6 に対する自己抗体が患者から検出された(図5)。これによって、ヒト CCT に対する自己免疫応答が、歯周病ならびに自己免疫疾患の病態に関与している可能性が示唆された(図6)。

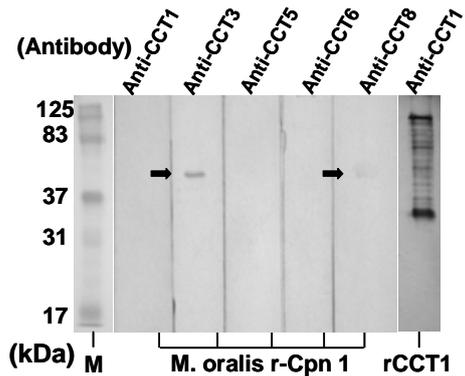
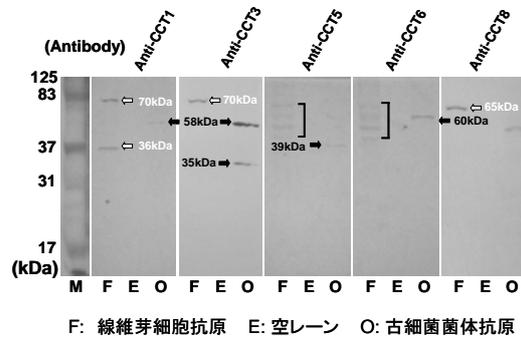


図3. *M. oralis* に対する抗CCT抗体の反応 (Yamabe et al., 2010から改変)



F: 線維芽細胞抗原 E: 空レーン O: 古細菌菌体抗原

図4. 古細菌菌体に対する抗CCT抗体の反応

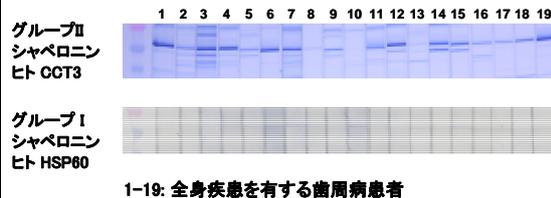


図5. ヒトシャペロニンCCTに対する自己抗体の検出

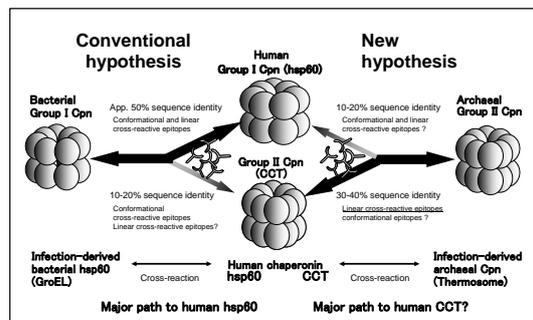


図6. 古細菌シャペロニンとヒトCCTの交差反応を起因とした自己免疫応答の発症(仮説)

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3件)

① Yamabe K, Maeda H, Kokeguchi S, Soga Y, Meguro M, Naruishi K, Asakawa S, Takashiba S. Antigenic group II chaperonin in *Methanobrevibacter oralis* may cross-react with human chaperonin CCT. *Mol Oral Microbiol*, 25: 112-122, 2010. (査読有)

② 苔口 進, 山部こころ, 前田博史. メタン産生古細菌 *Methanobrevibacter* の口腔疾患への関わり. 日本臨床腸内微生物学会誌, 12: 17-25, 2010. (査読無)

③ 山部こころ, 苔口 進, 前田博史. メタン生成古細菌は歯周病の病原因子? 化学と生物, 48: 463-470, 2010. (査読無)

[学会発表] (計2件)

① 前田 博史. プラークを再考する. 第135回日本歯科保存学会秋季学術大会、2011/10/20 大阪市

② 苔口進、山部こころ、前田博史. メタン産生古細菌 *Methanobrevibacter* の口腔疾患へのかかわり. 第12回日本臨床腸内微生物学会総会 教育講演、2009/9/5 岐阜市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 博史 (MAEDA HIROSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：00274001

(2) 研究分担者

高柴 正悟 (TAKASHIBA SHOGO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50226768

苔口 進 (KOKEGUCHI SUSUMU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：10144776

谷本 一郎 (TANIMOTO ICHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：00280686

(3) 連携研究者