様式Ｃ－１９

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２５年　５月　１日現在

機関番号：３２６６５
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2010～2012
課題番号：22592078
研究課題名（和文）　**歯周病原細菌ゲノム解析による新規治療戦略**

研究課題名（英文）　Strategy of newly treatment for periodontal disease using the pathogenic bacterial genome information

研究代表者
柴田　恭子（SHIBATA YASUKO）
日本大学・松戸歯学部・講師
研究者番号：９０１３３４３８

研究成果の概要（和文）：日本人の歯周炎患者にはFimA線毛II型*P. gingivalis*が多いという報告から、II型TDC60株の全遺伝子配列解析し、公開した。TDC60株に特異的に発現する分子として、マイナー線毛分子Mfa1、コラーゲン代謝酵素Dap2，ジペプチダーゼ PepD-2について解析した。TDC60株では、Mfa1の発現量が多いことを示した。PepD-2の立体構造解析を行い、ベスタチンによるPepD-2活性阻害が、菌の増殖をも抑制することを見いだした。*P. gingivalis*のエネルギー獲得経路としてのジペプチダーゼの重要性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Analyzing the genomic information for TDC60 is expected to provide new insights into the mechanisms underlying the onset and progression of periodontitis. For that reason, we searched for the specific virulence factor in the TDC60 strain using the complete genome sequences, and found higher levels of a dipeptidase PepD-2, a minor fimbire-1 (Mfa1), a collagenolysis-related peptidase Dap2 compared to the W83 strain using 2-DE and MALDI-TOF mass spectrometry. The crystal structure of PepD showed that the overall folding and dimeric organization. Bestatin has the ability to dose-dependently inhibit the *P. gingivalis* growth. Dipeptidases play a general role in the final breakdown of peptide fragments produced by other peptidases during the protein degradation process in *P. gingivalis*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総　計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学
科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学
キーワード：歯周病、*P. gingivalis*、ゲノムプロジェクト、プロテアーゼ、マイナー線毛、抗体

１．研究開始当初の背景

細菌/ウィルスとの戦いは、ここ数年新たな展開を迎え、新規、或は脅威的な変異を伴った細菌/ウィルスの出現は、人類の存在を危うくしている感がある。事実、エイズ、サーズ、新型インフルエンザと新たに強力になったウ

ィルスの人類への攻撃は激しい。宿主との攻防の中で、変異を繰り返す細菌/ウィルスとの戦いに終わりはないように見える。歯周病原菌である*P. gingivalis*もまた変異を繰り返している菌であることがゲノム解析によって解ってきた。2001年に米国でW83株(線毛Ⅳ型)が、2008年に日本の長崎大学のグループがATCC33277株(線毛Ⅰ型)のゲノムの塩基配列解析を終了させており、この２つの株についての比較ゲノム解析により、変異、ゲノム内での遺伝子組換え、移動が頻繁に起こっている菌であることが判明してきている。申請者のグループは、線毛Ⅱ型 *P. gingivalis* (TDC60)のゲノムプロジェクトを開始しており、この終了をもって、３種類の*P. gingivalis*株のゲノムを比較することが可能となる。

生命科学分野の進歩は、ここ数十年の間に加速度的に発展している。ヒト遺伝子を構成しているヒトゲノムの塩基配列が明らかになったことによって、終了前に想像していたように全て明らかになる訳ではなかったが、生命の仕組み、疾病の機序などの解明に計り知れない恩恵があることは疑いない事実であり、歯周病原細菌 *P. gingivalis* の３株のゲノム情報をもとにした治療法開発に新たな展開が望めると考えた。

２．研究の目的

日本人の歯周病患者に多くみられる *P. gingivalis* type strain として、線毛 II 型が圧倒的に多いという報告の一方、健常者口腔内に多く存在する *P. gingivalis* が、線毛Ⅰ型であるという事実は非常に興味深い。どのような発現遺伝子が病原性の発揮に関与し、歯周病発症／悪化にプロテクティブに働いているのかをゲノム比較することから明らかにすることが歯周病発症解明への近道と考えられ、予防/治療法開発に結びつくと考えられる。すでに終了している線毛Ⅰ型 33277 株およびⅣ型 W83 株 *P. P. gingivalis* のゲノム情報とⅡ型 TDC60 株で特異的にみつかる遺伝子についての比較情報は、線毛 II 型の病原性解明に強力なツールとなると思われる。

３．研究の方法

(1) *P. gingivalis* TDC60（II 型）全ゲノム情報を利用した研究

① *P. gingivalis* TDC60 遺伝子間の関係を検索する。大きなブロックで組換えが起っている場合、遺伝子発現開始位置がそれぞれの遺伝子の発現に大きく関与することが考えられる。*P. gingivalis* TDC60 の環境変化により変動する発現遺伝子の探索を行なう。酸素ストレス、ヘミン存在の有無などの物理的環境変化による変動遺伝子をプロテオーム解析する。

② *P. gingivalis* TDC60（II 型）の病原因子のクローニングを行う。W83, TDC60 と比較した結果、TDC60 においてのみ存在する遺伝子、発現変動が大きい遺伝子について優先的にクローニングを開始する。構造解析を目指す目的から、His や GTS といった tag のないリコンビナントタンパク質の大量精製を目指すため、tag 切り離しが容易な clone 作製を行う。(Bio-Rad Profina eXact を使用)。

(2) *P. gingivalis* TDC60（II 型）抗体作製に関する研究

① 網羅的に作製したモノクローナル抗体の抗原分子の特定を行う。II 型 *P. gingivalis* TDC60 の全タンパク質を免疫し、網羅的に作製したモノクローナル抗体のうち、多くは LPS 抗体であったが、他の抗体については抗原認定が終了していない。ゲノムプロジェクトの終了と共に、供与可能なクローンと抗体のデーター整備を行っていく計画であるため、抗原決定を行う。

②上記の研究で得られたリコンビナントタンパク質分子に対する抗体（poly/mono）の作製を行ない、特定分子群の抗体群を準備する。

③ ヒト型単鎖Fv抗体の作製に関する研究

日本大学医学部田中寅彦講師が開発したヒト単鎖Fv抗体のファージライブラリーを用いて、抗原とのパンニングによりヒト型単鎖Fv抗体を作製する。

４．研究成果

本申請研究内で、歯周病原菌*P. gingivalis* II型TDC60株の全遺伝子配列解析が終了し、NCBI databaseにて公開した。一方、免疫療法開発のための新規標的分子の探索を目的とし、W83株、ATCC33277株と比べてTDC60株に特異的に発現する分子の探索と解析を行った。タンパク質発現の比較は、二次元電気泳動を行って比較解析し、MALTI-TOF-MSにて同定した。その結果、TDC60 で発現が増大している分子として、 マイナー線毛分子Mfa1、コラーゲン代謝に関わるDap2, aminoacyl-histidine dipeptidase (PepD-2) 等を同定した。さらに、TDC60においてのみ存在する遺伝子、或は他株と比べた時に発現変動が大きい遺伝子につい

て、60遺伝子を選択し、優先的にクローニングを行った。

ATCC33277株にて、マイナーな短線毛と呼ばれるMfa1は、TDC60株では発現量が多く、さらに、*P. gingivalis*菌体からの精製法を工夫することによってインタクトな線毛を抽出し、電気泳動行い、Mfa1はTDC60株においては、決して短毛ではないことを明らかにした。TDC60株において、Mfa1は、短毛でもマイナーでもないというMfa1線毛の違いが、TDC60株の病原性との関連性がある可能性が示唆された。そこで、TDC60株のII型rFimA とrMfa1分子を抗原として、数種のモノクローナル抗体とポリクローナル抗体（ウサギ血清抗体）を作製した。さらに、リコンビナント抗体ScFvの作製を検討した。

TDC60株で発現量の多いとされるPepD-2は、Alaに特異性を示すアミノペプチダーゼでありながら、遷移金属イオン存在下、carnosine（β-alanylhistidine)を基質とし、β-alanineとL-histidineへの代謝活性を有していたことから、生体のヒスチジン含有ペプチド代謝に影響を及ぼす可能性が示唆された。

PepD-2の立体構造解析を行った。*P. gingivalis* PepDは、M20に分類される酵素で、二量体分子として構造解析された。（図１）二量体の構造は、*Vibrio alginolyticus*のPepDとほとんどインポーズした分子であった。一方、mouse CN2のとは同一の反応を触媒する酵素でM20に分類されるが、基質結合に違いが認められた。金属元素結合部位は、^{75}His, ^{114}D, ^{145}E, ^{168}Dであった。アミノペプチダーゼNの阻害剤として知られるBestatin 結合mouse CN2の構造比較から推定した*P. gingivalis* PepDの基質結合部位は、^{144}Eであった。（図２）基質結合時に、結合部位の隙間が縮まるように分子に揺らぎが起こるのは、図１に示すように、Doamin AとDoamain Bとの間に構造上存在しているループによるものと示唆された。

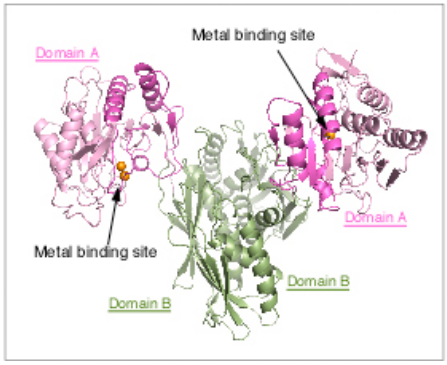

図1. *P. gingivalis* PepD二量体の構造

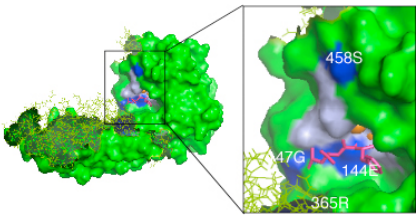

図2. *P. gingivalis* PepDの基質結合部位（ベスチン結合と重ねて）

また、図２には、アミノペプチダーゼ阻害剤として知られるBestatinの *P. gingivalis* PepD-2への結合様式を、構造から類推した結果を示す。この結果をもとに、*P. gingivalis* PepD-2の阻害を検討した結果、Bestatin による酵素活性抑制は、PepD-2のAla-アミノペプチダーゼ活性への抑制効果は少ないが、カルノシナーゼ活性に対する抑制がより強く、LD_{50} = 7 nMであった。（図３）さらに、*P. gingivalis* の増殖をBestatinが強く抑制する結果が得られた。（図４）

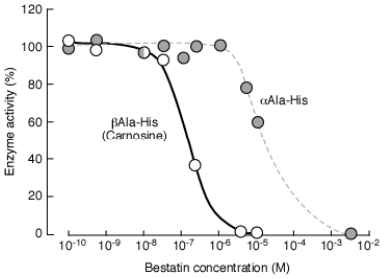

図3. rPepD活性のBestatinによる阻害

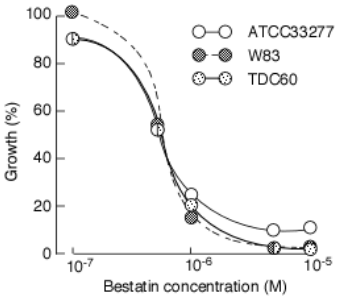

図4. Bestatinによる*P. gingivalis*増殖抑制

P. gingivalis は、エネルギー源を窒素含有物質から得ている嫌気性菌であり、ペプチダーゼの役割は重要である。*P. gingivalis* の増殖抑制効果が報告されているBestatinの標的酵素は明らかになっていなかったが、PepD活性がBestatinで強く阻害されたことから、Bestatinによる増殖抑制にジペプチダーゼPepDが関与していることが示唆された。また、Bestatinによる阻害が、基質がCarnosineの時により強かったことから、*P. gingivalis* の利用ペプチドとしてのCarnosineの重要性が示唆された。

TDC60株のPepD発現は、W83株、ATCC33277株に比べて多い傾向を示すことから、TDC60の病原性に関わる可能性も示唆される。

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 Shoji M, Yukitake H, Sato K, Shibata Y, Naito M, Aduse-Opoku J, Abiko Y, Curtis MA, Nakayama K. Identification of an O-antigen chain length regulator, WzzP, in *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiologyopen*. Epub, 2013. 査読有 DOI: 10.1002/mbo3.84

② Aoki A, Shibata Y, Okano S, Maruyama F, Amano A, Nakagawa I, Abiko Y. Transition metal ions induce carnosinase activity in PepD homologous protein from *Porphyromonas gingivalis*. *Microb Pathog*, 52: 17-24, 2012 査読有 DOI: 10.1016/j.micpath

③ Shibata Y, Okano S, Shiroza T, Tahara T, Nakazawa K, Kataoka S, Ishida I, Kobayashi T, Yoshie H, Abiko Y. Characterization of human-type monoclonal antibodies against reduced form of hemin binding protein 35 from *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodontal Res*, Vol.46: 673-681, 2011, 査読有, DOI: 10.1111/j.1600-0765.2011.01389.x

④ Watanabe T, Maruyama F, Nozawa T, Aoki A, Okano S, Shibata Y, Oshima K, Kurokawa K, Hattori M, Nakagawa I, Abiko Y Complete genome sequence of the bacterium *Porphyromonas gingivalis* TDC60, which causes periodontal disease. *J Bacteriol,* Vol 193:4259-4260 2011, 査読有 DOI: 10.1128/JB.05269-11

⑤ Tabata K, Sakai H, Nakajima R, Saya-Nishimura R, Motani K, Okano S, Shibata Y, Abiko Y, Suzuki T, Acute application of cisplatin affects methylation status in neuro blastoma cells. *Oncol Rep*, Vol.25: 1655-1660, 2011, 査読有 DOI: 10.3892/or.2011.1222

⑥ Shibata Y, Zhang L, Kuboyama N, Abiko Y, Periodontal pathogen *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* LPS induces mitochondria-dependent-apoptosis in human placental trophoblasts. Li Y,, *Placenta*, Vol 32:11-19, 2011査読有 DOI: 10.1016/j.placenta.2010.10.007

⑦ Toyoda T, Okano S, Shibata Y, Abiko Y. Oxidative stress induces phosphorylation of the ABC transporter, ATP-binding protein, in *Porphyromonas gingivalis*. *J Oral Sci*, Vol 52:561-566 2010.査読有 PMID:21206157

⑧ Hijiya T, Shibata Y, Hayakawa M, Abiko Y. A monoclonal antibody against fimA type II *Porphyromonas gingivalis* inhibits IL-8 production in human gingival fibroblasts. *Hybridoma (Larchmt)*, 29:201-204 2010 査読有 DOI: 10.1089/hyb.2009.0109

⑨ Mikio Shoji, Shibata Y, Shiroza T, Yukitake H, Peng B, Chen Y-Y, Sato K, Naito M, Abiko Y, Reynolds EC, Nakayama K, Characterization of hemin-binding protein 35 (HBP35) in *Porphyromonas gingivalis*: its cellular distribution, thioredoxin activity and role in heme utilization. *BMC Microbiol*, Vol 10:152 (12 page), 2010. 査読有 DOI: 10.1186/1471-2180-10-152

〔学会発表〕（計１１件）

① 鈴木守、柴田恭子、藤原芳江、安孫子宜光「新規歯周病治療標的分子PepDの結晶構造解析」構研サイエンスフェスタ つくば国際会議場エポカル 2013年3月14日～3月15日,つくば国際会議場（茨城）

② 鈴木守、柴田恭子、藤原芳江、安孫子宜光「新規歯周病治療標的分子PepDの結晶構造解析」第26回日本放射光学会年会放射光科学合同シンポジウム, 2013年1月12日～1月14日,名古屋大学（愛知）

③ M Shoji, H Yukitake, K Sato, Y Shibata, M Naito, J Aduse-Opoku, Y Abiko, MA Curtis, K Nakayama,「Identification of a component of LPS biosunthesis in *Porphyromonas gingivalis*」60 years of the JADR-Future Perspectives of the Dental Science (JADR 2012), 2012年12月14日～12月15日, 新潟コンベンションセンター（新潟）

④ 鈴木守、柴田恭子、藤原芳江、安孫子宜光,「新規歯周病標的分子PepDのＸ線結晶構造解析」平成24年度 日本結晶学会年会および総会, 2012年10月25日～10月26日, 東北大学片平キャンパス（宮城）

⑤ 柴田恭子、鈴木守、安孫子宜光 「FimA II型*P. gingivalis* (TDC60)新規治療標的分

子の探索-新規標的分子PepDの構造および機能解析-」,第54回歯科基礎医学会, 学術大会ならびに総会2012年9月14日～9月16日奥羽大学（福島）

⑥ Y Shibata, M Arai, S Okano, K Pugdee, T Sato, Y Otsuka-Tanaka, J Mega, H J Majima, Y Ogata, Y Abiko, Mitochondrial oxidative stress and less mineralization by hydrogen peroxide treatment in MC3T3-E1 cell line. 5th Biennial Meeting of Society for Free Radical Research-Asis (SFRR-Asia) and Conference of Asian Society for Mitochondrial Research and Medicine (ASMRM), 2011年 9月2日, 鹿児島市民文化ホール（鹿児島）

⑦ 柴田恭子、安孫子宜光 「振興感染症・再興感染症への地球規模の取り組み『歯周病原細菌ゲノム解析による新規治療戦略』」平成22年度 日本大学学部連携研究シンポジウム2010年12月３日日本大学会館（東京）

⑧ Y. Li, Y. Shibata, Y. Abiko「Enhanced HSPs Gene Expression in *Aggregatibacter actinomycetemcomi*tans LPS-challenged Human Trophoblasts」The 58th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2010年11月20日, 九州歯科大学キャンパス(福岡)

⑨ 青木暁宣、柴田恭子、岡野総一郎、中川一路、丸山史人、天野敦雄、安孫子宜光「fimAII型*P. gingivalis* (TDC60)新規治療標的分子の探索- PepD-2の機能について」第52回歯科基礎医学会学術大会・総会、2010年9月22日, タワーホール船堀(東京)

⑩ L Zhang, Y Shibata, Y Abiko,「Monoclonal antibodies neutralizing fimA type II *Prophyromonas gingivalis* virulent factors」American Society for Microbiology (ASM) 110th General Meeting, 2010年5月24日, San Diego, CA (USA)

⑪ Y Li, Y Shibata, Y Abiko「Monoclonal antibodies neutralizing fimA type II *Prophyromonas gingivalis* virulent factors」American Society for Microbiology (ASM) 110th General Meeting, 2010年5月24日, San Diego, CA (USA)

〔図書〕（計３件）

① 柴田恭子,安孫子宜光,レーザー照射による炎症性シグナル伝達系の抑制効果,光アライアンス,22巻 8-12, 2012［解説執筆依頼］

② 安孫子宜光、平塚浩一、柴田恭子,歯周病菌のゲノム科学と臨床応用(6-3)「ビジュアル 歯周病を科学する」, クインテッセンス出版株式会社 p.220-22、2012.［執筆依頼］

③ Yasuko Shibata, Yoshimitsu Abiko,Profiling inflammatory genes and signaling pathways in rheumatoid synoviocytes for RA light therapy. *Rheumatoid Arthritis; (Chapter9)* INTECH Open Access Publisher, 153-170, 2011, 査読有

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 恭子 (SHIBATA YASUKO)

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：90133438