

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22791822

研究課題名(和文) Porphyromonas gingivalis のバイオフィーム関連分子の探索

研究課題名(英文) Investigation of biofilm-related molecules in Porphyromonas gingivalis

研究代表者

中尾 龍馬 (Nakao, Ryoma)

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官

研究者番号：10370959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 0円

研究成果の概要(和文)：Porphyromonas gingivalisの血球凝集素HagBが糖修飾を受け、バイオフィーム形成に関与することを明らかにした。また、P. gingivalis培養上清から外膜ヴェシクルを精製し、これを解析したところ、その構成要素には、Rgp、Kgp等の病原因子のほか、メジャー線毛、およびマイナー線毛の構成タンパクFimA、MfaIが豊富に含まれていた。外膜ヴェシクルは口腔上皮細胞に対しRgpIに依存した強力な脱離活性を示した。以上より、P. gingivalisのHagBを介したバイオフィーム形成や、外膜ヴェシクルを介した組織傷害が、歯周病の病態形成に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：In the present study, Porphyromonas gingivalis hemagglutinin HagB was found to be glycosylated and involved in biofilm formation of this microorganism. We also found that outer membrane vesicles (OMVs) isolated from the culture supernatant of P. gingivalis contained not only several virulence factors such as gingipains including Rgp and Kgp, but also the major and minor fimbrial proteins such as FimA and MfaI. We further demonstrated that the OMVs caused detachment of oral epithelial cells from the cell culture plate, which is gingipain-dependent. Taken together, we suggest a possible role of HagB and OMVs in biofilm formation and destruction of periodontal tissue, respectively, during development of periodontal diseases.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：歯周病 Porphyromonas gingivalis バイオフィーム 外膜ヴェシクル

1. 研究開始当初の背景

歯周病は高い罹患率を示す生活習慣病の一つであり、成人の歯牙喪失の最大の原因となっている。近年は、歯周病が口腔のみならず、心循環器系疾患、糖尿病、肺炎等の全身疾患の危険因子となることが報告されている。高齢社会を迎えた我が国の現状を鑑みるに、歯と口腔の健康を長く維持していくことの重要性は増している。このような背景のもと、歯周病は、その病因解明と新たな予防・治療法の確立が望まれる重要疾患の一つとなっている。

Porphyromonas gingivalis は、グラム陰性偏性嫌気性細菌に分類される主要な歯周病原細菌である。歯周病は、歯周病原細菌による歯肉縁下部でのバイオフィーム形成とこれに引き続く慢性炎症によって成立する。このバイオフィーム形成において、細菌のどのような因子が関与するのかということについては、LPS やある種の外膜タンパク、線毛などの関与が考えられている。しかしながら、*P. gingivalis* のバイオフィーム形成が歯周病の発症や進展にどのように関わるかについては未知な部分が多い。

2. 研究の目的

歯周病原細菌 *P. gingivalis* を研究対象とし、バイオフィーム形成という観点から、その病原因子を決定すること。本細菌による歯周病の発症・進展機構の理解を深めること。

3. 研究の方法

(1) 使用した菌株、変異株の作成

P. gingivalis ATCC 33277 株を親株として、各種変異株を作成し、実験に用いた。また、大腸菌 K-12 株である BW25113 を親株として、LPS 変異株シリーズを作成し、使用した。各種遺伝子のクローニングや変異導入は、Molecular Cloning, 3rd edition (Sambrook & Russell) 等に従い、通法通り行われた。

(2) バイオフィームアッセイ

ポリエチレン製 96 穴プレート等を使い、プレートに形成されたバイオフィームを定量した。また、共焦点レーザー顕微鏡によりバイオフィームの形態を観察した。

(3) 外膜ヴェシクル、外膜タンパクの精製。

P. gingivalis の 48 時間培養後の細胞から外膜画分が精製された。また培養上清は 0.22 μm PVDF 膜で濾過し、その濾液を超遠心後、沈渣として得られたものを外膜ヴェシクルとした。精製度は SDS-PAGE および電子顕微鏡により確認された。

(4) SDS-PAGE, イムノプロット、質量分析。

サンプルは SDS-PAGE で展開後、イムノプロットやタンパクバンドの切り出しが行われた。タンパクのトリプシン消化後、LC-MS/MS 解析とペプチドマスフィンガープリンティ

ングにより、分子を同定した。

(5) 細胞脱離アッセイ

P. gingivalis の外膜ヴェシクル等のサンプルを口腔扁平上皮がん由来細胞 Ca9-22 株に振り掛けて、細胞脱離の有無を検討した。

4. 研究成果

(1) バイオフィーム形成に関わる血球凝集素 HagB に関する検討

HagB タンパクは糖修飾を受ける。

P. gingivalis の血球凝集素 HagB に着目し、これが糖鎖修飾を受けるかどうかを検討した。*P. gingivalis* ATCC 33277 野生株 (WT)、糖鎖を欠損する *galE* 変異株 (*galE*)、*galE* 相補株 (*galE*⁺) から外膜タンパクを調べた。その結果、図 1 に見られるように、HagB 抗体によるウエスタンブロットにおいて、*galE* 変異株においては、野生株や相補株と比べ、HagB タンパクが低い分子量のバンドとして検出された。さらに野生株の HagB をトリフルオロメタンスルホン酸 (TFMS) を用いて化学的脱糖鎖処理すると、分子量は数 kDa 減少した。以上より、HagB は糖タンパクであることが明らかとなった。

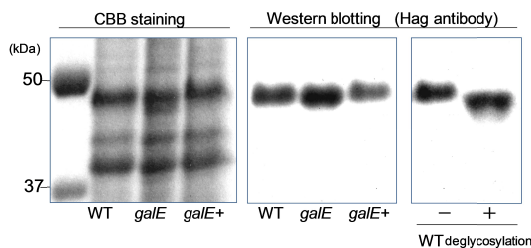


図 1. HagB タンパクの糖修飾の有無の検討。糖鎖修飾変異株 (*galE*)、および TFMS 処理により、HagB 分子量が減少している。

HagB はバイオフィーム形成に関連する。

hagB 変異株、および *hagB* 相補株を構築し、それらのバイオフィーム形成能を 96 穴プレートによるアッセイで、野生株と比較した。

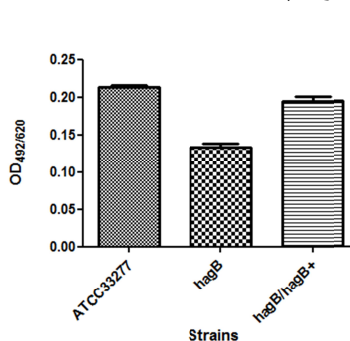


図 2. *hagB* 変異株のバイオフィーム形成試験。*hagB* 変異株のバイオフィーム形成は、野生株や *hagB* 相補株に較べ有意に減少した。

図 2 のように野生株 (ATCC 33277) に比べ、*hagB* 変異株ではバイオフィーム形成が有意に低下した。一方、*hagB* 遺伝子を相補した株は、バイオフィーム形成能が野生株のレベルに近似的に回復した。

(2) *P. gingivalis* の培養上清から回収した外膜ヴェシクルに関する検討

外膜ヴェシクルの口腔上皮細胞への作用
 バイオフィーム中には、菌体外へ放出された小胞、すなわち外膜ヴェシクルが豊富に存在する。外膜ヴェシクルは様々な病原因子を内包する。このヴェシクルの口腔上皮細胞に対する影響を検討した。外膜ヴェシクルを口腔上皮細胞単一層へ添加すると、プレートから細胞が脱離した(図3上)。その脱離効果はジンジパイン抗体により完全に阻害された(図3下)。以上より、外膜ヴェシクルは、ジンジパインに依存した細胞脱離活性を有することが明らかとなった。

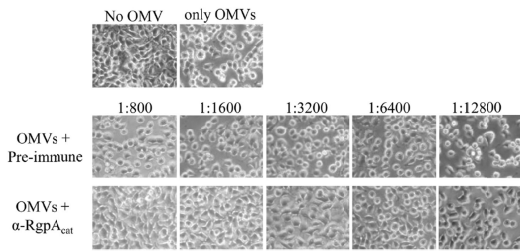


図3. 外膜ヴェシクル(OMVs)の細胞脱離作用。OMVは上皮細胞をプレートから脱離させるが、その脱離作用はジンジパイン抗体 α -RgpA_{cat}により阻害された。

外膜ヴェシクルのタンパクバンドの同定
 SDS-PAGEにより展開した外膜ヴェシクルタンパクのバンドを質量分析により同定した。下のTable.1に示したように、Rgp, Kgp, FimA, MfaI, CPG70, HagA, PAD, HBP35といった様々な病原因子が同定された。バイオフィーム内部において、様々な病原因子を含む外膜ヴェシクルが、歯周病の発症や進展に関与している可能性が示唆された。

Table 1
 The list of proteins identified by MS analysis.

Rank#	Molecular weight (kDa)	Protein name	Rank 1	Rank 2	Rank 3	Rank 4	Rank 5	Rank 6	Rank 7	Rank 8	Rank 9
#1	115	CPG70	RGN_0035								
#2	70	HAD	RGN_0088								
#3	65	HAD	RGN_0088								
#4	45	RgpA	RGN_0015								
#5	40	HagA	RGN_0080								
#6	36	RgpA	RGN_0015								
#7	28	RgpA	RGN_0015								
#8	25	RgpA	RGN_0015								
#9	17	RgpA	RGN_0015								
#10	15	Kgp	RGN_0015								

#1: The conserved C-terminal domain (CTD) proteins are shown in bold.
 #2: All candidates with Mascot score greater than 200 and more than three peptide hits are shown.
 #3: The amino acid sequence of the catalytic domain of RgpA is identical to that of RgpB, except for the C-terminal conserved domain. Therefore, both RgpB and RgpA (A45) are denoted as identified proteins.
 #4: More than three peptides were found matching each domain of RgpA, the catalytic domain (A45) and hemagglutinin (HA) domain.
 #5: Peptides were found matching the catalytic domain (A45) and the HA-1 and HA-2 domains of RgpA.
 #6: Peptides were found matching the catalytic domain (A45) and the HA-1, HA-2, and HA-3 domains of RgpA.
 #7: Peptides were found matching the catalytic domain (A45) and the HA-2 domain of RgpA.

(3)リポ多糖(LPS)の糖鎖とバイオフィーム形成との関連性についての検討
 LPS糖鎖変異株の作成
 下の図4のような様々なLPSを持つ大腸菌のLPS変異株を作成した。

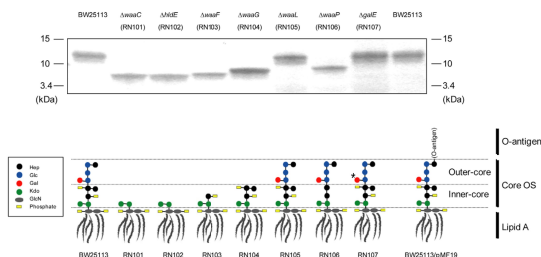


図4. 大腸菌 BW25113株を親株とするLPS糖鎖変異株シ

リーズ、そのLPS構造の模式図。

LPS糖鎖変異株のバイオフィーム形成試験
 下の図5には、LPS糖鎖変異株のバイオフィーム形成能を定量した結果を示した。結果として、LPSの内部コア多糖が、バイオフィーム形成において重要であることが明らかとなった。

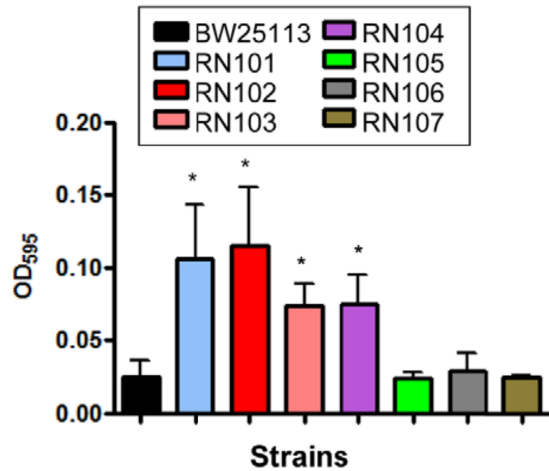


図5. LPS糖鎖変異株シリーズによる96穴プレート上バイオフィーム形成能の比較

さらに図6に示したように、最もバイオフィーム形成能の高かったRN102株と野生株(BW25113)のバイオフィーム構造を共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析した。蛍光試薬は、DNAを赤色に染めるアクリジンオレンジを用いた。その結果、RN102株は赤色に染色された細胞外基質、つまり細胞外DNAを含むバイオフィームを形成することがわかった。以上より、LPS糖鎖の特に内部コア多糖がバイオフィーム形成に関与する事、バイオフィームには細胞外DNAが含まれることが示された。

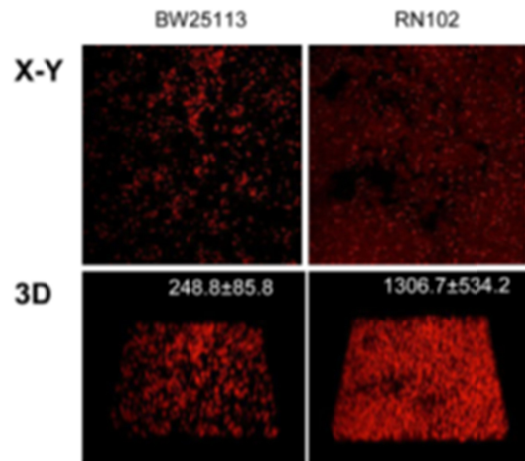


図6. アクリジンオレンジ染色によるBW25113株とRN102株のバイオフィーム構造の比較。上はXY平面像、下は3D像(図内に記載の数値は3つの異なる視野における蛍光輝度の合計値±SD)の図の一つをそれぞれ示す。

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 5 件)

Nakao R, Kikushima K, Higuchi H, Obana N, Nomura N, Bai D, Ohnishi M, Senpuku H. A Novel Approach for Purification and Selective Capture of Membrane Vesicles of the Periodontopathic Bacterium, *Porphyromonas gingivalis*: Membrane Vesicles Bind to Magnetic Beads Coated with Epoxy Groups in a Noncovalent, Species-Specific Manner. PLoS ONE.9(5):e95137. 2014.

Nakao R, Takashiba S, Kosono S, Yoshida M, Watanabe H, Ohnishi M, Senpuku H. Effect of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles on gingipain-mediated detachment of cultured oral epithelial cells and immune responses. Microbes and Infection.16(1):6-16. 2014.

Nakao R, Ramstedt M, Wai SN, Uhlin BE. Enhanced biofilm formation of *Escherichia coli* LPS mutants defective in Hep biosynthesis. PLoS ONE. 7(12):e51241,2012

Nakao R, Hasegawa H, Ochiai K, Takashiba S, Ainai A, Ohnishi M, Watanabe H, Senpuku H. Outer Membrane Vesicles of *Porphyromonas gingivalis* Elicit a Mucosal Immune Response. PLoS ONE. 6,e26163,2011

Ramstedt M, Nakao R, Wai SN, Uhlin BE, and Boily JF. Monitoring surface chemistry changes in the bacterial cell wall - multivariate analysis of Cryo-X-ray photoelectron spectroscopy data. Journal of Biological Chemistry. 286,12389-96,2011

〔学会発表〕(計 22 件)

Ryoma Nakao, Nozomu Obana, Nobuhiko Nomura, Makoto Ohnishi, Hidenobu Senpuku. *P. gingivalis* Membrane Vesicles Bind to Epoxy Groups on Magnetic Beads in a Species-Specific Manner. 第 87 回日本細菌学会総会、2014 年 3 月、東京。

Ryoma Nakao, Shogo Takashiba, Saori Kosono, Minoru Yoshida, Haruo Watanabe, Makoto Ohnishi, Hidenobu Senpuku: Effect of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles on gingipain-mediated detachment of cultured oral epithelial cells and immune responses. British Society for Immunology BSI2013. Dec. 2013. Liverpool, UK

DongYing Bai, Ryoma Nakao, Hidenobu Senpuku: Immunoreactive antigens recognized by sera of mice intranasally immunized with outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis*. British Society for Immunology BSI2013. Dec. 2013. Liverpool, UK

Ryoma Nakao, Sun Nyunt Wai, Bernt Eric Uhlin: Enhanced biofilm formation by *Escherichia coli* carrying a commonly occurring plasmid gene, "kil". Nobel conference on biofilm formation, its clinical impact and potential treatment. Aug. 2013. Stockholm, Sweden

Madeleine Ramstedt, Ryoma Nakao, Laura Leone, Andrey Shchukarev, Per Persson, Jean-Francois Boily, Sun Nyunt Wai, Bernt Eric Uhlin: X-ray photoelectron spectroscopy of intact bacterial cells can help evaluate changes in cell wall composition with respect to lipid, sugar, and peptide. Nobel conference on biofilm formation, its clinical impact and potential treatment. Aug. 2013. Stockholm, Sweden

中尾龍馬: 普遍的なプラスミド遺伝子 *kil* は、大腸菌のバイオフィルム形成を増す。日本細菌学会第 7 回若手研究者育成のためのワークショップ「若手研究者によるバイオフィルム研究」。2013 年 6 月、東京都。

Ryoma Nakao, Makoto Ohnishi, Hidenobu Senpuku: Ig responses in mice after intranasal immunization of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles. 第 86 回日本細菌学会総会。2013 年 5 月、千葉市。

Ryoma Nakao, Dongying Bai, Makoto Ohnishi, Hiroshi Uematsu, Akira Ainai, Hideki Hasegawa, Hidenobu Senpuku: Humoral immunity against *Porphyromonas gingivalis* in mice intranasally vaccinated with combination of outer membrane vesicles and synthetic double-stranded RNA. 第 16 回日本ワクチン学会学術集会。2012 年 11 月、横浜市。

Ryoma Nakao, Shogo Takashiba, Hideki Hasegawa, Haruo Watanabe, Makoto Ohnishi, Hidenobu Senpuku: Role of Outer Membrane Vesicles of *Porphyromonas gingivalis* in Immunopathology of Periodontitis in Human. 第 34 回内藤カンファレンス 感染・炎症・免疫。2012 年 10 月、札幌市。

中尾龍馬, 泉福英信: Outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* carry a variety of antigens and virulence factors. 第 54 回歯科基礎医学会学術集会・総会、2012 年 9 月、郡山市。

Dongying Bai, Ryoma Nakao, Hidenobu Senpuku: Humoral immunity against *Porphyromonas gingivalis* in mice intranasally vaccinated with outer membrane vesicles. First International Conference on *Porphyromonas gingivalis* and Related Bacterial Species. Aug. 2012. Nagasaki.

Hidenobu Senpuku, Ryoma Nakao:

Role of outer membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis* for a mucosal immune response. First International Conference on *Porphyromonas gingivalis* and Related Bacterial Species. Aug. 2012. Nagasaki.

中尾龍馬、大西真、渡邊治雄、泉福英信: *Porphyromonas gingivalis* 外膜ヴェシクルに反応するヒト血清抗体 第85回日本細菌学会総会、2012年3月、長崎市。

Ryoma Nakao: I. Effect of deletion of LPS core oligosaccharides on Biofilm formation and OMV formulation. II. Immunological Properties of Outer Membrane Vesicles from *Porphyromonas gingivalis*. 1st Cell Adhesion Workshop. Dec. 2011. Umeå, Sweden

Madeleine Ramstedt, Ryoma Nakao, Sun Nyunt Wai, Bernt Eric Uhlin, Jean-Francois Boily: Monitoring bacterial cell wall composition using cryo-XPS and multivariate analysis. 5th National Infection Biology Meeting. Nov. 2011. Umeå, Sweden.

Ryoma Nakao, Hideki Hasegawa, Akira Ainai, Makoto Ohnishi, Haruo Watanabe, Hidenobu Senpuku: Immunological properties of outer membrane vesicles from *Porphyromonas gingivalis*. 5th National Infection Biology Meeting. Nov. 2011. Umeå, Sweden.,

Ryoma Nakao, Hideki Hasegawa, Akira Ainai, Haruo Watanabe, Makoto Ohnishi, Hidenobu Senpuku: Immunological properties of outer membrane vesicles from *Porphyromonas gingivalis*. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress. Sep. 2011. Sapporo, Japan

Ryoma Nakao, Bai Dong Yng, Hideki Hasegawa, Akira Ainai, Makoto Ohnishi, Hidenobu Senpuku: Feasibility of intranasal vaccine for periodontal diseases using outer membrane vesicles. Gordon Research Conference: Periodontal Diseases. July 2011. Davidson, NC

Ryoma Nakao, Madeleine Ramstedt, Sun Nyunt Wai, and Bernt Eric Uhlin: Dose-dependent effect of the *kil* gene on biofilm formation of *E. coli*. Eurobiofilms 2011. July 2011. Copenhagen, Denmark.

Madeleine Ramstedt, Ryoma Nakao, Sun Nyunt Wai, Bernt Eric Uhlin, Jean-Francois Boily: Characterizing Bacterial Cell Wall Composition using cryo-XPS and Multivariate Analysis. MRS Spring Meeting and Exhibition. April 2011. San Francisco, CA.

21 成澤直規、伊藤龍朗、鈴木奈央未、

佐藤裕、落合邦康、中尾龍馬、泉福英信: う蝕原性 *Streptococcus mutans* smooth-colony-variant 出現メカニズムと病原性発現に関する検討。第52回歯科基礎医学学会学術集会・総会、2010年9月、東京。

22 成澤直規、中尾龍馬、泉福英信: *Streptococcus mutans*におけるバイオフィルム非形成自然変異株の出現機構。バイオフィルム研究会。2010年9月、静岡県富士宮市

23 Ryoma Nakao, Madeleine Ramstedt, Sun Nyunt Wai, and Bernt Eric Uhlin: Effect of the *kil* gene in plasmid ColE1 on *E. coli* biofilm formation. Biofilms 4. September 2010. Winchester, UK

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計3件)

1. 名称: Methods of inspecting periodontal disease causing bacteria using outer membrane vesicle

発明者: Ryoma Nakao, Hidenobu Senpuku, Makoto Ohnishi, Kazuto Takayama, Hiroki Naito, Tetsuo Sakuma.

権利者: GC corp. and Natl. Inst. Infect. Dis

種類: European patent

番号: 13001113.3-1405

出願年月日: 2013/5/7

国内外の別: 国外

2. 名称: Methods of inspecting periodontal disease causing bacteria using outer membrane vesicle

発明者: Ryoma Nakao, Hidenobu Senpuku, Makoto Ohnishi, Kazuto Takayama, Hiroki Naito, Tetsuo Sakuma.

権利者: GC corp. and Natl. Inst. Infect. Dis

種類: US patent

番号: EFS ID: 15143237

出願年月日: 2013/3/8

国内外の別: 国外

3 名称: 外膜ヴェシクルを用いた歯周病原細菌の検査方法

発明者: 中尾龍馬、泉福英信、大西真、高山和人、内藤裕樹、佐久間徹郎

権利者: 株式会社GC、国立感染症研究所

種類: 特願

番号: 2012-049148

出願年月日: 2012/3/6

国内外の別: 国内

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究代表者

国立感染症研究所 細菌第一部
中尾龍馬
研究者番号：10370959