

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 5月31日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22792114

研究課題名（和文）バイオフィーム形成における歯周病細菌表層タンパクの高次構造解析
 研究課題名（英文）High resolution structure analysis of *Porphyromonas gingivalis* membrane proteins in the biofilm.

研究代表者

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

研究成果の概要（和文）：

口腔レンサ球菌 GAPDH と相互作用する *Porphyromonas gingivalis* の新たな因子がプルダウン法、2次元電気泳動、質量分析およびピアコアにて RagA4、AbfD、GAPDH、GDH 及び MDH と同定された。両菌の凝集は濁度と蛍光顕微鏡の解析にて、RagA4、AbfD 及び GDH の添加で促進し、GAPDH と MDH の添加で阻害した。さらに、これらの因子が LuxS に関与していることがわかった。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to identify and characterize new *Porphyromonas gingivalis* components that interact with *Streptococcus oralis* GAPDH. Pull-down assay was performed to detect potential interactions between *P. gingivalis* client proteins and *S. oralis* recombinant GAPDH. The proteins were separated by 2D-gel electrophoresis, and the five proteins; RagA4, AbfD, GAPDH, GDH and MDH were identified by a proteomic-tandem mass spectrometry. Interaction between these *P. gingivalis* client proteins and *S. oralis* GAPDH was analyzed via a biomolecular interaction analysis system. *S. oralis* GAPDH demonstrated high affinity with five client proteins. Coaggregation between *P. gingivalis* and *S. oralis* was measured by turbidimetric method and fluorescence microscope. Recombinant RagA4, AbfD and GDH enhanced the coaggregation, whereas recombinant GAPDH and MDH inhibited in a dose-dependent manner. Furthermore, recombinant RagA4, AbfD and GDH regulated expression of *luxS* in *P. gingivalis*. These results indicate that five client membrane proteins of *P. gingivalis* might be regulators in *P. gingivalis* biofilm formation with oral streptococci.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：予防歯科学

1. 研究開始当初の背景

P. gingivalis が口腔内に定着するためには、複雑な菌叢によって構成されるバ

イオフィームの中で、*Actinomyces* や口腔レンサ球菌など、初期デンタルバイオフィーム形成菌への結合が重要であると考

えられている。口腔レンサ球菌への *P. gingivalis* の付着のメカニズムについては、我々の研究室が明らかにした *P. gingivalis* の長線毛と口腔レンサ球菌の菌体表層に存在する Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) との結合によるものや (Maeda K *et al.*, *Infect Immun* 72, 5475-5477, 2004. Maeda K *et al.*, *Infect Immun* 72, 1341-1348, 2004. Maeda K *et al.*, *Microbes Infect*, 6(13), 1163-1170, 2004.)、米国の研究グループが明らかにした *P. gingivalis* の短線毛と口腔レンサ球菌の菌体表層成分 SspA/B (抗原 I/II) との結合によるもの (Park Y *et al.*, *Infect Immun* 73, 3983-3989, 2005.) が報告されている。さらに、米国の同じ研究グループがバイオフィルムを形成する口腔レンサ球菌株と形成しない口腔レンサ球菌株とあらかじめ培養した *P. gingivalis* の遺伝子発現の差を DNA マイクロアレイとリアルタイム PCR を使って調べた結果、*P. gingivalis* の RNA において 33 個の遺伝子に変化があることが報告されている (Simionato MR *et al.*, *Infect Immun* 74, 6419-6428, 2006.)。それらの遺伝子のうちの一つである *P. gingivalis* の *ltp1* 遺伝子が口腔レンサ球菌へのバイオフィルム形成に関係していることが報告されている (Maeda K *et al.*, *Mol. Microbiol.*, 69(5), 1153-1164, 2008)。*P. gingivalis* の Low Molecular Phosphotyrosine phosphatase 1 (Ltp1) は菌体内に存在する分子量 20kDa の低分子タンパク質で、情報伝達因子としてクオラムセンシングに関与することやエキソポリサッカライドの発現増加に関与することを、*ltp1* 遺伝子をノックアウトした *P. gingivalis* 株を作製し、初期定着した口腔レンサ球菌と形成させたバイオフィルムを共焦点顕微鏡によって蛍光観察したところ、野生株と比較して著しい凝集増加がみられることがわかった。以上のことから、口腔レンサ球菌の表層タンパク質 GAPDH や SspA/B が *P. gingivalis* の線毛にただ結合するだけでなく、バイオフィルム形成の情報伝達因子の関与や *P. gingivalis* の病原性タンパク質に重要な役割を果たしている可能性が高く、表層タンパク質の新たな役割を明らかにすることにより、*P. gingivalis* のバイオフィルムへの定着発達メカニズムの一端を解明できるのではないかとこの着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*P. gingivalis* における口腔レンサ球菌の表層タンパク質 GAPDH の役割を進展させることである。これにより、*P. gingivalis* における口腔レンサ球菌の表層タンパク質 GAPDH の新たな役割を明らかにし、バイオフィルム形成を制御する情報伝達系の一端を解明することができる。

3. 研究の方法

(1) 二次元電気泳動による口腔レンサ球菌の GAPDH の影響による *P. gingivalis* の内在性タンパク質の発現

口腔レンサ球菌の rGAPDH を *P. gingivalis* ATCC 33277 の野生株と一晚培養し、全菌体タンパク質をプルダウン法および二次元電気泳動にて、タンパク質を解析した後、スポットを質量分析によって、タンパク質の同定を行った。

(2) 同定されたタンパク質のリコンビナントタンパク質作製

上記にて同定されたタンパク質が同定されたタンパク質の遺伝子を検索し、プライマー設計し、PCR 法にて増幅した PCR 産物を精製し、消化酵素 *Bam*HI または *Sa*II または *Sph*I にて一晚消化後、pQE30 に導入しプラスミドを構築した。構築されたプラスミドを *E. coli* M15(pREP4) 株に導入した。IPTG 添加し、リコンビナントタンパク質発現を誘導した。ニッケルカラムにアプライ後、1M イミダゾールにて溶出し、リコンビナントタンパク質を精製した。得られた画分の純度と分子量を SDS-PAGE により確認した。

(3) タンパク質同士の相互結合作用

作製したリコンビナントタンパク質と口腔レンサ球菌の GAPDH との結合特性の評価は生体分子間相互作用解析装置 BIAcore2000 により行った。CM5 センサーチップ上にアナライトとして 10 mM PBS (pH 6.0) で可溶化した *P. gingivalis* リコンビナントタンパク質を固着した口腔レンサ球菌の rGAPDH とコントロールの未固着チップとに同時に流速 10 μ l/min, 37°C で反応させ、コントロールの値を差し引いた値のセンサーグラムを解析した。反応解析は、解析用ソフトウェア BIAevaluation version 3.1 を用い、線形解析法により行った。

(4) 濁度法による共凝集活性の測定

同じコロニー数の *P. gingivalis* ATCC 33277 株菌体と *Streptococcus oralis* ATCC 9811 株菌体を加え、分光光度計を用いて 37°C で攪拌しながら、波長 550nm の吸光度 (A_{550}) の変化を 7.5 分間測定した。計測後、1 分間あたりの最

大の吸光度変化量を読み取り, *P. gingivalis* の自己凝集を差し引いた値を共凝集活性とした。

(5) 蛍光顕微鏡による口腔レンサ球菌とのバイオフィームアッセイ

ヘキシジウムイオダイドで染色した口腔レンサ球菌をウェルに培養したバイオフィームを形成させ、次に、フルオレセインイソチオシアネート染色した *P. gingivalis* とリコンビナントタンパク質を加え、形成した混合バイオフィームを蛍光顕微鏡により観察した。

(6) クオラムセンシングへの影響

リコンビナントタンパク質添加による *P. gingivalis* の *luxS* 遺伝子の影響をリアルタイム RT-PCR によって mRNA レベルの発現解析を行った。

(7) 同定されたタンパク質をコードする遺伝子の発現解析

口腔レンサ球菌 rGAPDH 添加による *P. gingivalis* の同定されたタンパク質をコードする遺伝子の影響をリアルタイム RT-PCR によって mRNA レベルの発現解析を行った。

4. 研究成果

(1) *S. oralis* ATCC 9811 株 GAPDH に対する *P. gingivalis* のクライアントタンパク質の抽出と 2 次元電気泳動

プルダウン法により, *S. oralis* GAPDH と結合する *P. gingivalis* の菌体表層成分を抽出した。抽出画分を 2 次元電気泳動にて解析したところ, *P. gingivalis* の共凝集素は 7 つのタンパク質があり, 30-110kDa の分子量をもつと推定された (図 1)。

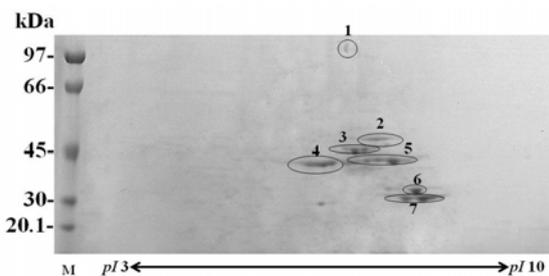


図 1

(2) *P. gingivalis* のクライアントタンパク質の同定

ゲル内消化によりスポットを質量分析で解析したところ, TonB-dependent receptor protein (RagA4), 4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (AbfD), lysine-specific cysteine proteinase (Kgp), arginine-specific cysteine proteinase B (RgpB), NAD-dependent glutamate dehydrogenase (GDH), GAPDH および malate dehydrogenase (MDH) であると同定した。(表)

表

Spot#	Name
Spot1	TonB-dependent receptor protein (RagA4)
Spot2	4-hydroxybutyryl-CoA dehydratase (AbfD)
Spot3	lysine-specific cysteine proteinase (Kgp)
Spot4	arginine-specific cysteine proteinase B (RgpB)
Spot5	NAD-dependent glutamate dehydrogenase (GDH)
Spot6	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, Typel (GAPDH)
Spot7	malate dehydrogenase (MDH)

(3) *P. gingivalis* の同定したリコンビナントタンパク質の精製

ニッケルカラムにアプライ後, 1 M イミダゾールにて溶出した画分を SDS 電気泳動にて約 35-110kDa の位置に単一のバンドとして認められた (図 2)。

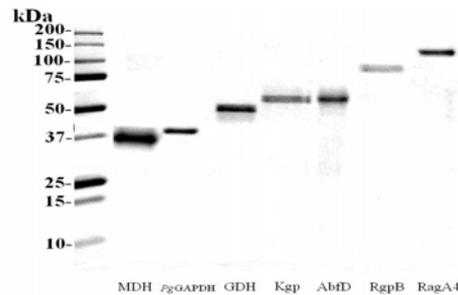


図 2

(4) *S. oralis* ATCC 9811 株 GAPDH と *P. gingivalis* リコンビナントタンパク質の結合特性の評価

S. oralis の GAPDH と *P. gingivalis* リコンビナントタンパク質の結合特性を, 生体分子間相互解析装置 (BIAcore) を用いて解析した。センサーチップ上に固定化した精製 rGAPDH を, 種々の濃度のリコンビナントタンパク質と反応させて得られたセンサーグラムをもとに反応速度論的解析を行ったところ, 親和定数 (K_A) は RagA4, AbfD, GDH, GAPDH および MDH で $3.38 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, $8.44 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, $1.49 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, $2.2 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$, $1.78 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ と高い親和性であることが示された。一方で, Kgp および RgpB で $4.3 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, $2.62 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$ と算出されたことから, この結合は親和性が低いことが示された (図 3)。

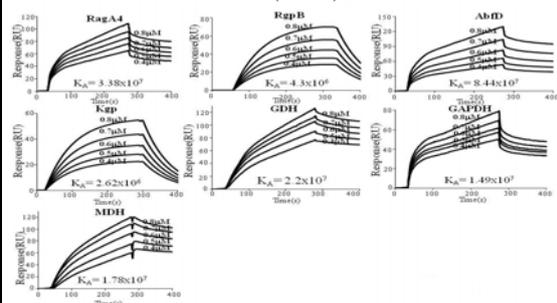


図 3

(5) *P. gingivalis* と *S. oralis* ATCC 9811 株との共凝集活性

S. oralis ATCC 9811 株と *P. gingivalis* ATCC 33277 株との共凝集において各リコンビナントタンパク質を導入した。GAPDH および MDH は濃度依存的に凝集を阻害した。Kgp および RgpB は濃度依存的に変化がなかった。RagA4、AbfD および GDH は濃度依存的に凝集を促進した (図 4)。

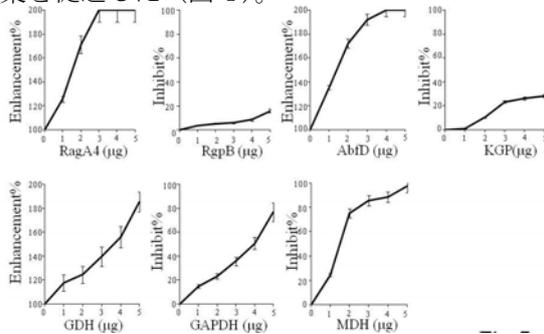


図 4

(6) 蛍光顕微鏡による凝集像

P. gingivalis と *S. oralis* の共凝集におけるクライアントタンパク質の効果を、蛍光顕微鏡を用いて確認した。図 5 A に *P. gingivalis* ATCC33277 株と *S. oralis* ATCC 9811 株の共凝集像を示す。GAPDH および MDH の添加により、*P. gingivalis* ATCC33277 株と *S. oralis* ATCC 9811 株の共凝集はほぼ完全に阻害された。また、RagA4、AbfD および GDH の添加により、*P. gingivalis* ATCC33277 株と *S. oralis* ATCC 9811 株の共凝集は促進された。*P. gingivalis* の Volume を Control、RgpB および Kgp に比べて、RagA4、AbfD および GDH は有意に増加し、GAPDH および MDH は有意に減少した (図 5 B)。

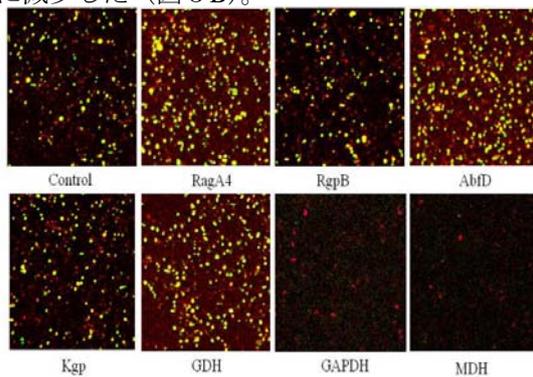


図 5 A

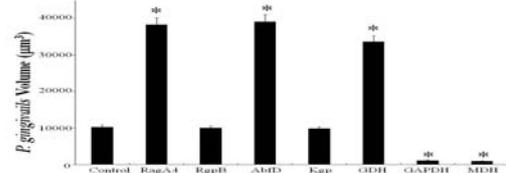


図 5 B

(7) 蛍光顕微鏡による自己凝集像

P. gingivalis の自己凝集におけるクライアントタンパク質の RagA4、AbfD および GDH の効果を、蛍光顕微鏡を用いて確認した。図 6 A に *P. gingivalis* ATCC33277 株と *S. oralis* ATCC 9811 株の共凝集像を示す。Control に比べて、RagA4、AbfD および GDH の添加により、*P. gingivalis* ATCC33277 株の共凝集は促進された。*P. gingivalis* の Volume を Control に比べて、RagA4、AbfD および GDH は有意に増加した (図 6 B)。

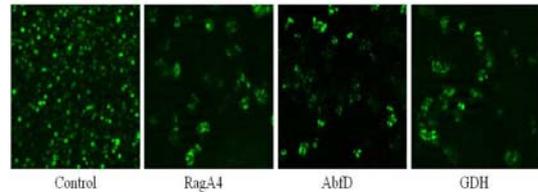


図 6 A

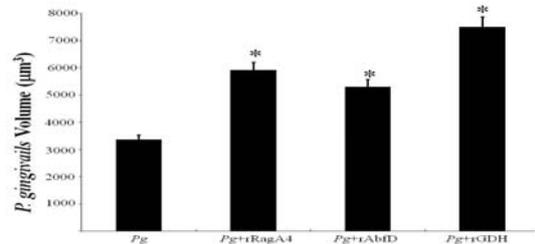


図 6 B

(8) リアルタイム PCR による遺伝子発現

S. oralis rGAPDH を添加したことによる *P. gingivalis* の遺伝子発現を、リアルタイム PCR を用いて確認した。*Pg16s* に比べて、*ragA4*、*abfD* および *gdh* の遺伝子発現が有意に増加し、*Pggapdh* および *mdh* の遺伝子発現が有意に減少した (図 7 : $p < 0.01$)。

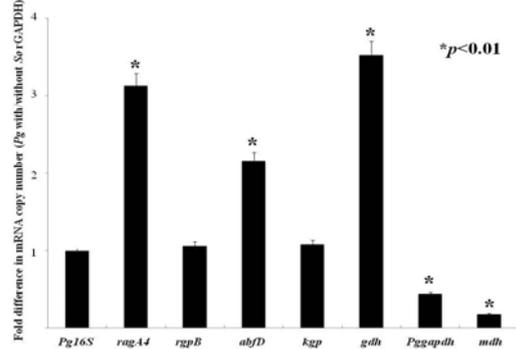


図 7

(9) オートインデューサーによる凝集の影響

RagA4、AbfD および GDH を添加したことによる *P. gingivalis* の *luxS* 遺伝子発現が有意に増加した (図 8 : $p < 0.01$)。また、*PgGAPDH* を添加したことによる *luxS* 遺伝子発現の変化はなく、MDH を添加したことによる *luxS*

遺伝子発現は有意に減少した。

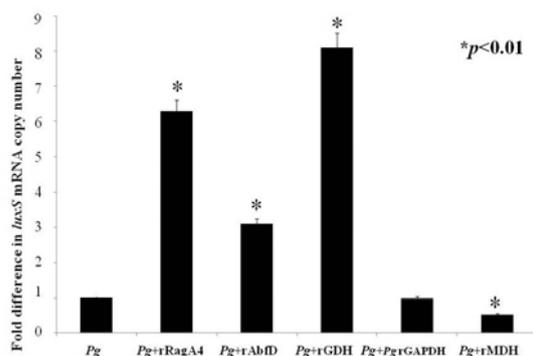


図 8

本研究では、バイオフィーム形成における口腔レンサ球菌の表層タンパク質が、*P. gingivalis* の菌表層タンパク質の高次構造の変化を解析することで、*P. gingivalis* のバイオフィームへの新たな定着メカニズムの一端を明らかにすることに貢献するかもしれない。

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)

[学会発表] (計 3 件)

①前田和彦、久保庭雅恵、小島美樹、黒田裕美子、橋野恵衣、東江正裕、永田英樹、天野敦雄:*Porphyromonas gingivalis* GAPDH は口腔レンサ球菌 GAPDH に特異的に結合する, 第 60 回口腔衛生学会総会, 2011 年 10 月 9 日, 千葉

②前田和彦、永田英樹、小島美樹、久保庭雅恵、天野敦雄: *Porphyromonas gingivalis* のリンゴ酸デヒドロゲナーゼはバイオフィーム形成に関与する, 平成 23 年度近畿・中国・四国口腔衛生学会, 2011 年 10 月 2 日, 徳島

③Maeda K., Nagata H., Kuboniwa M., Ojima M.: *Porphyromonas gingivalis* NAD-dependent glutamate dehydrogenase binds to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus oralis*, IUMS, September 10, 2011, Sapporo.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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