

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23390477

研究課題名(和文)細胞メンブレントラフィック機構からみた歯周病感受性

研究課題名(英文)Periodontal disease susceptibility evaluated on membrane traffic machinery

研究代表者

天野 敦雄 (Amano, Atsuo)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50193024

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円、(間接経費) 4,380,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、*P. gingivalis*の歯周組織内感染を拡大している。この分子機構機構の解析を行った。本菌は歯肉上皮細胞に侵入後、細胞輸送小胞の融合に関わるSNAREタンパク質VAMP2を介した輸送経路により、細菌の約半数は細胞外に脱出する。細胞内に残った細菌の大半はオートファジー経路に輸送される。さらに細菌を捕獲するオートファゴソームは小胞体とミトコンドリアの接触点で生成されていた。以上の結果より、*P. gingivalis*の細胞内移動の分子基板の一端が明らかにされたと共に、オートファゴソームは2つの全く異なるオルガネラが協働して形成されるというユニークな知見も得られた。

研究成果の概要(英文)：Gingival epithelial cells function as innate host defense barriers to prevent intrusion by periodontal bacteria. Nevertheless, *Porphyromonas gingivalis* can enter these cells and pass through the epithelial barrier into deeper tissues. In this study, *P. gingivalis* induced cellular invagination to internalize the pathogen. The bacteria were sorted to early endosomes, and the half of them were transported to recycling pathway via SNARE protein VAMP2, which allowed the bacterial exit to the extracellular circumstances, a mechanism of cell-to-cell spread within periodontal tissues. The intracellular pathogens impaired fundamental cellular functions within the cargo. While, remaining half were sorted to lytic compartments, including autophagosomes. The machinery was found to be formed in contact sites between endoplasmic reticulum and mitochondria, which is a very unique finding indicating that 2 different organelle make a concerted effort to the formation of another organelle.

研究分野：医歯薬学

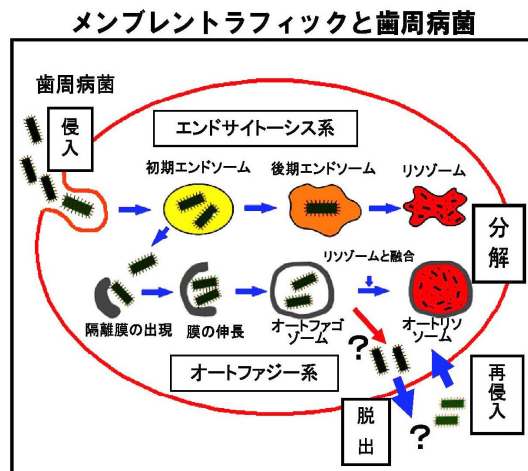
科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯学 歯周病菌 歯周病 細菌・組織 メンブレントラフィック 細胞内侵入

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病菌は歯肉上皮細胞や歯肉線維芽細胞に侵入し、感染の進行と慢性化を図る。一方、宿主細胞はエンドサイトーシス経路などのメンブレントラフィック機構を用いて侵入細菌を分解する。この「細菌 vs メンブレントラフィック」の戦いの転機が歯周病の発症において大きな影響を与えている。

メンブレントラフィックとは、細胞内の物質輸送ネットワークであり、細胞内外への物質輸送により免疫系などの高次生体機能を支える。メンブレントラフィックの自然免疫機能としては、マクロファージによる細菌貪食がよく知られている。歯肉上皮細胞などでも、メンブレントラフィックを利用して細胞内に侵入してきた細菌を分解し、対細菌戦の最前線として働いていると推測されるが、その詳細は不明である(下図 Amano, Front Biosci, 2007)。さらに、歯周病菌は歯周組織の細胞間を往来し、増殖し、感染を慢性化している可能性もある。



### 2. 研究の目的

*P. gingivalis*は、細胞メンブレントラフィック機構を利用して、細胞侵入と細胞からの脱出を行っている。申請者らは、エンドサイトーシス系を利用して*P. gingivalis*は歯周細胞に侵入し、細胞シグナル分子を分解し、細胞障害を与えていることを示した(Kato *et al*, Cell Microbiol, 2007)。

本研究では、歯肉上皮細胞への*P. gingivalis*の侵入に関与するメンブレントラフィック機構の分子基盤を明らかにし、メンブレントラフィック機能と歯周病の慢性化の関連を明らかとすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

*P. gingivalis*の細胞内選別輸送へのSNARE分子の関与解析

細胞内の輸送小胞の融合に深く関与するSNARE分子は、細胞内*P. gingivalis*の選別輸送を制御する可能性が高い。そこで、SNAREタンパク群のうち、細胞膜または初期エンドソームに局在するSNAREに焦点を当て、RNAiノックダウン法によるスクリーニングにより、全ての輸送経路へのSNAREの関与を解析した。さらに、GFP融合SNAREタンパク質と細胞内細菌との共局在観察、当該SNAREタンパクのdominant-negativeとactive-formを作成し、解析を行った。

細胞内*P. gingivalis*を捕獲するオートファジー形成メカニズムの解析

*P. gingivalis*を内包するオートライソソームの形成メカニズムをAtg14、Atg5、SNAREタンパク質Syntaxin 17、小胞体とミトコンドリアのマーカータンパクを用いて解析した。また、Syntaxin 17ノックダウン細胞を用い、オートファゴソーム形成への影響を評価した。

### 4. 研究成果

*P. gingivalis*は歯肉上皮細胞に侵入後、初期エンドソームに存在し、細菌の約半数は細胞外に脱出した。一方、細胞内に残った細菌の大半はオートファジー経路に輸送されることが示された。細胞内*P. gingivalis*はリソソームに輸送、オートファジー経路に輸送、細胞内寄生、細胞外への脱出、の4つの細胞内動態を示すことが示された(図1)。

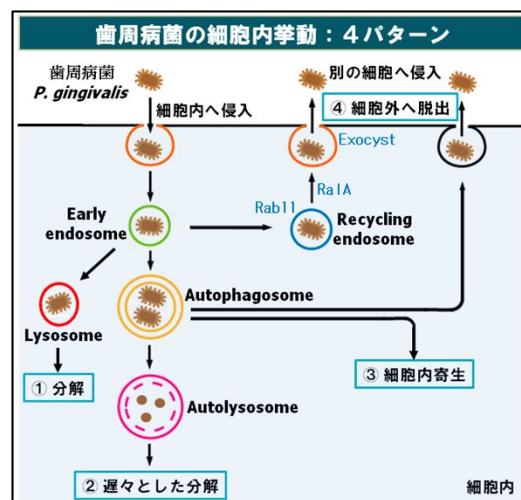


図1. *P. gingivalis*の細胞内挙動パターン

さらに、これら分別輸送の制御機構を明らかとするため、細胞輸送小胞の融合に関わる SNARE の働きについて解析を行ったところ、図 2 に示すように、幾つかの SNARE の関与が示された。

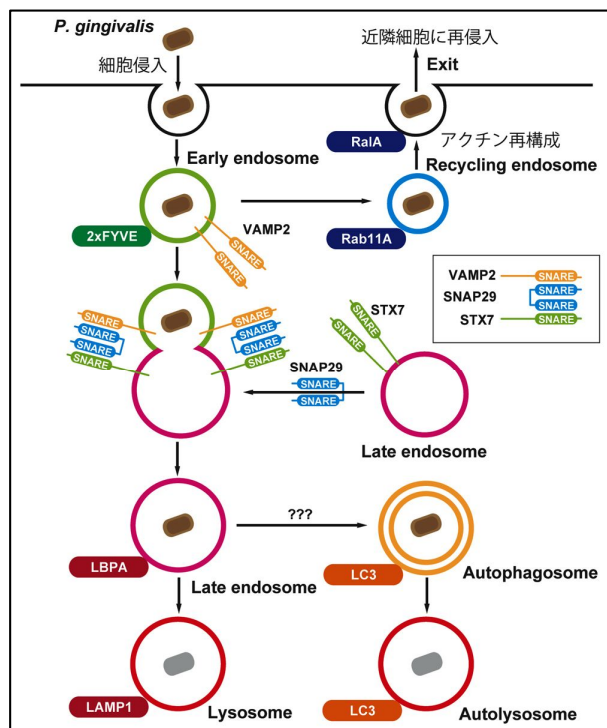


図 2 . *P. gingivalis* の細胞内移動を制御する SNARE タンパク質

さらに、*P. gingivalis* を内包したオートファゴソームの形成が Syntaxin 17 のノックダウンにより著しく阻害されることが示された。電子顕微鏡観察の結果、Syntaxin 17 ノックダウン細胞でのオートファゴソーム形成は初期段階で阻害されおり、また *P. gingivalis* の細胞内生存率がコントロール細胞と比較して顕著に上昇していることから、Syntaxin 17 はオートファゴソーム形成の必須因子であることが明らかとなった(図3)。

オートファゴソーム形成初期段階に関与する Atg14 が小胞体とミトコンドリアとの接触部位に集積していることが示された。さらに、隔離膜のマーカーである Atg5 はその接触部位においてオートファゴソームの形成への明確な関与を示した。また、飢餓条件において細胞分画を行うと、Atg14 はミトコンドリアに結合した小胞体膜と同一画分に検出された。小胞体に存在する SNARE タンパク質 stx17 は Atg14 と結合し、オートファゴソーム形成に伴って、小胞体とミトコンドリアとの接触部位へと移動した。これらの結果から、オートファゴソームは小胞体とミトコンドリアとの接触部位において形成されていることが示唆された(図3)。

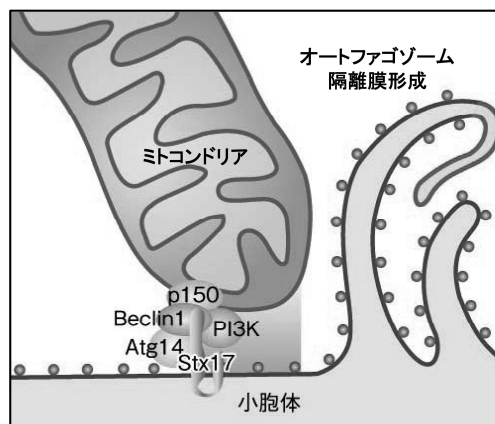


図 3. オートファゴソームの形成機構

## 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 34 件)

### Original Articles

- Inaba H\*, Sugita H, Kuboniwa M, Iwai S, Hamada M, Noda T, Morisaki I, Lamont RJ, Amano A (2014): *Porphyromonas gingivalis* promotes invasion of oral squamous cell carcinoma through induction of proMMP9 and its activation. **Cellular Microbiology**, 16(1):131-145. doi: 10.1111/cmi.12211
- Hashino E, Kuboniwa M\*, Alghamdi S, Yamaguchi M, Yamamoto R, Cho H, Amano A (2013): Erythritol alters microstructures and metabolomic profiles of biofilm composed of *Streptococcus gordonii* and *Porphyromonas gingivalis*. **Molecular Oral Microbiology**, 28(6):435-451. doi: 10.1111/omi.12037
- Kawai S\*, Michikami I, Kitagaki J, Hashino E, Amano A (2013): Expression pattern of zinc-finger transcription factor *Odd-skipped related 2* in murine development and neonatal stage. **Gene Expression Patterns**, 13(8): 372-376. doi: 10.1016/j.gep.2013.06.007
- Moon J-H, Herr Y, Lee H-W, Shin S-I, Kim C, Amano A, Lee J-Y\* (2013): Genotype analysis of *Porphyromonas gingivalis fimA* in Korean adults using new primers. **Journal of Medical Microbiology**, 62:1290-1294.
- Hamasaki M<sup>†</sup>, Furuta N<sup>†</sup>, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Ohmori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano

- A\***, Yoshimori T\* (2013): Autophagosome forms at the ER-mitochondria contact sites. **Nature**, 495(7441):389-393. doi: 10.1038/nature11910 †Equal contributors.
6. Takeuchi H, Hirano T, Whitmore SE, Morisaki I, **Amano A**, Lamont RJ\* (2013): The serine phosphatase SerB of *Porphyromonas gingivalis* suppresses IL-8 production by dephosphorylation of NF-κB RelA/p65. **PLoS Pathogens**, 9(4): e1003326. doi: 10.1371/journal.ppat.1003326
  7. Watanabe T, Nozawa T, Aikawa C, **Amano A**, Maruyama F\*, Nakagawa I (2013): CRISPR regulation of intraspecies diversification by limiting IS transposition and intercellular recombination. **Genome Biology and Evolution**, 5(6):1099-1114. doi: 10.1016/j.gep.2013.06.007
  8. Maeda K\*, Nagata H, **Kuboniwa M**, Ojima M, Osaki T, Minamino N, **Amano A** (2013): Identification and characterization of *Porphyromonas gingivalis* client proteins that bind to *Streptococcus oralis* Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. **Infection and Immunity**, 81(3):753-763. doi: 10.1128/IAI.00875-12
  9. Aoki A\*, Shibata Y, Okano S, Maruyama F, **Amano A**, Nakagawa I, Abiko Y\* (2012): Transition metal ions induce carnosinase activity in PepD-homologous protein from *Porphyromonas gingivalis*. **Microbial Pathogenesis**, 52(1):17-24. doi: 10.1016/j.micpath.2011.09.003
  10. Moon JH, Shin SI, Chung JH, Lee SW, **Amano A**, Lee JY\* (2012): Development and evaluation of new primers for PCR-based identification of type II *fimA* of *Porphyromonas gingivalis*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**, 64(3):425-428. doi: 10.1099/jmm.0.054247-0
  11. Yoneda M, Naka S, Nakano K, Wada K, Endo H, Mawatari H, Imajo K, Nomura R, Hokamura K, Ono M, Murata S, Tohna I, Sumida Y, Shima T, Kuboniwa M, Umemura K, Kamisaki Y, **Amano A**, Okanoue T, Ooshima T, Nakajima A\* (2012): Involvement of a periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis* on the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. **BMC Gastroenterology**, 12(1):16. doi: 10.1186/1471-230X-12-16
  12. Kawai S\*, **Amano A** (2012): BRCA1 regulates microRNA biogenesis via the DROSHA microprocessor complex. **Journal of Cell Biology**, 197(2): 201-208. doi: 10.1083/jcb.201110008
  13. Kawai S\*, **Amano A** (2012): Negative regulation of *Odd-skipped related 2* by TGF-β achieves the induction of cellular migration and the arrest of cell cycle. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 421(4):696-700. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.04.064
  14. Inaba H\*, **Kuboniwa M**, Sugita H, Lamont RJ, **Amano A** (2012): Identification of signaling pathways mediating cell cycle arrest and apoptosis induced by *Porphyromonas gingivalis* in human trophoblasts. **Infection and Immunity**, 80(8):2847-2857. doi: 10.1128/IAI.00258-12
  15. Yamasaki Y, Nomura R, Nakano K\*, Inaba H, **Kuboniwa M**, Hirai N, Shirai M, Kato Y, Murakami M, Naka S, Iwai S, Matsumoto-Nakano M, Ooshima T, **Amano A**, Asai F (2012): Distribution and molecular characterization of *Porphyromonas gulae* carrying a new *fimA* genotype. **Veterinary Microbiology**, 161(1): 196-205. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.07.026
  16. Inaba H\*, Tagashira M, Kanda T, **Amano A** (2011): Proliferation of smooth muscle cells stimulated with *Porphyromonas gingivalis* is inhibited by apple polyphenol. **Journal of Periodontology**, 82(11):1616-1622. doi: 10.1902/jop.2011.100785
  17. Nakano K, Hokamura K, Taniguchi N, Wada K\*, Kudo C, Nomura R, Kojima A, Naka S, Muranaka Y, Thura M, Nakajima A, Masuda K, Nakagawa I, Speziale P, Shimada N, **Amano A**, Kamisaki Y, Tanaka T, Umemura K, Ooshima T (2011): The collagen-binding protein of *Streptococcus mutans* is involved in hemorrhagic stroke. **Nature Communications**, 2:485. doi: 10.1038/ncomms1491
  18. Takeuchi H, **Furuta N**, Morisaki I, **Amano A\*** (2011): Exit of intracellular *Porphyromonas gingivalis* from gingival epithelial cells is mediated by endocytic recycling pathway. **Cellular Microbiology**, 13(5):677-691. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01564.x
  19. Sugita A, Kawai S, Hayashibara T, **Amano A**, Ooshima T, Michigami T, Yoshikawa H, Yoneda T\* (2011): Cellular ATP synthesis mediated by type III sodium-dependent phosphate transporter *Pit-1* is critical to chondrogenesis. **Journal of Biological Chemistry**, 286(4): 3094-3103. doi: 10.1074/jbc.M110.148403
  20. Nakano K, Wada K\*, Nomura R, Nemoto

H, Inaba H, Kojima A, Naka S, Hokamura K, Mukai T, Nakajima A, Umemura K, Kamisaki Y, Yoshioka H, Taniguchi K, **Amano A**, Ooshima T (2011): Characterization of aortic aneurysms in cardiovascular disease patients harboring *Porphyromonas gingivalis*. **Oral Diseases**, 17(4):370-378. doi: 10.1111/j.1601-0825.2010.01759.x

### Review

21. **Amano A\***, **Kuboniwa M**, Takeuchi H (2014): Transcellular offensive weapons of *Porphyromonas gingivalis* in host-parasite interactions. **Journal of Oral Bioscience**, 56(3) in press.
  22. **Amano A\***, Chen C, Honma K, Li C, Settem RP, Sharma A (2014): Genetic characteristics and pathogenic mechanisms of periodontal pathogens. **Advances in Dental Research**, 26(1):15-22. doi: 10.1177/0022034514526237
  23. Enersen M\*, Nakano K, **Amano A** (2013): *Porphyromonas gingivalis* fimbriae. **Journal of Oral Microbiology**, 5: 10. doi: 10.3402/jom.v5i0.20265
  24. **Kuboniwa M\***, Tribble GD, Hendrickson EL, **Amano A**, Lamont RJ, Hackett M (2012): Insights into the virulence of oral biofilms: discoveries from proteomics. **Expert Review of Proteomics**, 9(3):311-323. doi: 10.1586/ep.12.16
  25. **Furuta N\***, **Amano A** (2012): SNARE mediates autophagosome-lysosome fusion. **Journal of Oral Bioscience**, 54(2):83-85.
  26. Klionsky DJ\*, **Amano A**, and 1268 others (2012): Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. **Autophagy**, 8(4):1-100.
  27. **Amano A\***, **Furuta N** (2012): Cell entry and exit by periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. **Journal of Oral Bioscience**, 54(1):54-57.
  28. Takeuchi H, **Furuta N**, **Amano A\*** (2011): Cell entry and exit by periodontal pathogen via recycling pathway. **Communicative & Integrative Biology**, 4(5): 587-589. doi: 10.4161/cib.4.5.16549
- [学会発表] (計 65 件)  
招待講演、シンポジウムのみ記載
1. **Amano A**: Unique strategic system of *Porphyromonas gingivalis* in periodontitis. **Kyudai Oral Bioscience 2014, 8<sup>th</sup> International Symposium**, 2014/3/1 (Hakata).
  2. **Amano A**: Molecular basis of periodontal destruction by periodontal bacteria. **Exchange seminar between Osaka University and National Taiwan University**, 2013/12/24 (Taipei).
  3. **天野敦雄**: *P. gingivalis* の歯周組織破壊戦略 - 変貌する歯周病因論 - サテライトシンポジウム 10 歯周病菌による歯周組織破壊メカニズム:現状と展望 **第55回歯科基礎医学会学術大会**, 2013年9月20日(岡山市).
  4. **Amano A**: Molecular basis of periodontal destruction by periodontal bacteria. JADR-sponsored symposium. **2<sup>nd</sup> meeting of IADR-Asia Pacific Region**, 2013/8/21 (Bangkok).
  5. **天野敦雄**: 口腔から挑む BioResearch: Dental Science のときめき. シンポジウム「トレンドメーカーによるサイエンティフィック・エクステンジ」**第62回口腔衛生学会**, 2013年5月16日(松本).
  6. **Amano A**: Strategy of periodontal bacteria for periodontal destruction. **Seminar at School of Dentistry University of Louisville**, 2013/3/18 (Louisville, Kentucky).
  7. **Amano A**: Strategy of periodontal bacteria for periodontal destruction. **Seminar at Penn Dental**, 2013/3/15 (Philadelphia, Pennsylvania).
  8. **Amano A**: Strategy of *P. gingivalis* for periodontal destruction. **First international conference on Porphyromonas gingivalis and related bacterial species**. 2012/8/28 (Nagasaki)
  9. **天野敦雄**: 基礎研究が指し示す歯周病因論自由集会5「歯科における健康を科学する」**第61回口腔衛生学会**, 2012年5月27日(横須賀)
  10. **天野敦雄**: 病因論から再考する歯周治療障害者歯科学会教育講座、**第28回日本障害者歯科学会学術大会**, 平成23年11月5日(福岡)
  11. **Amano A**: Strategy of periodontal bacteria for periodontal destruction. Periodontik Terkini, Universitas Gadjah Mada, 2011/7/4 (Yogyakarta, Indonesia).
  12. **Amano A**: Outer membrane vesicles function as offensive weapons of *Porphyromonas gingivalis*. 13rd International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, 2011/9/3 (Sapporo)
  13. **Amano A**: Outer membrane vesicles function as offensive weapons of *Porphyromonas gingivalis*. The Second Osaka Mahidol Chulalongkorn Joint Symposium. 2011/10/25 (Bangkok).

(図書) (計 8 件)

1. Kuboniwa M, Amano A\* (2012): Genotyping of periodontal anaerobic bacteria in relationship to pathogenesis. p. 149-166. *In de Filipis I, McKee ML (ed.), Molecular typing in bacterial infections.* Springer, NY, U.S.A..
2. **天野敦雄** (2012): 歯周病の発症 ビジュアル歯周病を科学する (**天野敦雄**, 村上伸也, 岡賢二 編)クインテッセンス出版, 東京, 12-32.
3. **天野敦雄** (2012): 歯周組織内に生息する歯周病菌 ビジュアル 歯周病を科学する (**天野敦雄**, 村上伸也, 岡賢二 編)クインテッセンス出版, 東京, 139-154.
4. **天野敦雄** (2012): 歯周病原菌 red complex の宿主傷害戦略 ビジュアル 歯周病を科学する (**天野敦雄**, 村上伸也, 岡賢二 編)クインテッセンス出版, 東京, 155-180.
5. **天野敦雄** (2012): オートファジーと感染・免疫 オートファジー (水島 昇・吉森 保 編)化学同人, 京都, 150-164.
6. 橋野恵衣, **天野敦雄** (2013): 糖アルコールバイオフィルムへの効果 オーラルヘルスケア機能性食品の開発と応用: アンチエイジングを目指した口腔ケアを中心に (坂上 宏 監修)シーエムシー出版, 東京, p.101-108.

(産業財産権)

- 出願状況(計 0 件)
- 取得状況(計 0 件)

(その他)

ホームページ

<http://web.dent.osaka-u.ac.jp/~prevent/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

天野 敦雄 (AMANO ATSUO)  
大阪大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号: 50193024

### (2)研究分担者

久保庭 雅恵 (KUBONIWA MASAE)  
大阪大学・歯学部附属病院・講師  
研究者番号: 00303983

古田 信道 (FURUTA NOBUMICHI)  
大阪大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号: 50452446  
平成 25 年 4 月 17 日削除

### (3)連携研究者

なし