

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 12 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593147

研究課題名(和文)ホスホプロテオームを用いた新たな歯周病バイオマーカーの探索

研究課題名(英文)Study of new biomarkers for periodontal disease using Phosphoproteome

研究代表者

前田 和彦 (Maeda, Kazuhiko)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：00346165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、歯周病細菌が多菌種間でバイオフィームを形成する際に、菌体内のタンパク質のリン酸化活性が高まることを利用してショットガンホスホプロテオミクス解析手法にてリン酸化されたタンパク質やペプチドのパターンを検出し解析することで、新たなバイオマーカーの探索を行うことが目的である。本研究の成果は、口腔レンサ球菌と*P. gingivalis*とのバイオフィーム形成時、両菌のタンパク質のリン酸化についてショットガンホスホプロテオミクスを用いて検討したところ、単培養に比べてリン酸化および脱リン酸化された複数のタンパク質が同定された。

研究成果の概要(英文)：Porphyromonas gingivalis, a major periodontal pathogen, forms biofilm with other oral bacteria such as streptococci. Here, using shotgun proteomics we examined the molecular basis of mixed-biofilm formation by *P. gingivalis* with *Streptococcus oralis*. We identified a total of 593 bacterial proteins in the biofilm. Compared to the expression profile in the *P. gingivalis* mono-biofilm, the expression of 3 proteins was induced and that of 31 proteins was suppressed in the mixed biofilm. Additionally, the expression of 2 *S. oralis* proteins was increased while that of 2 proteins was decreased in the mixed biofilm, as compared to its monotypic profile. These findings suggest that several functional molecules are involved in biofilm formation between *P. gingivalis* and *S. oralis*.

研究分野：社会系歯学

キーワード：リン酸化タンパク質 バイオフィーム 歯周病 *S. oralis* *P. gingivalis* *S. gordonii* ショットガンプロテオミクス

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ルムの中で、*Actinomyces* や口腔レンサ球菌など、初期デンタルバイオフィルム形成菌への結合が重要であると考えられている。米国の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もしくは形成しない口腔レンサ球菌株と一緒に培養した *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 発現において 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.)。我々の研究室では、それらの遺伝子のうちの一つである *P. gingivalis* の *ltpI* 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を明らかにした (Maeda K et al., Mol. Microbiol., 69(5), 1153-1164, 2008)。*P. gingivalis* の LtpI は菌体内に存在する分子量約 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菌体外多糖の発現増加に関与することを明らかにした。また、*ltpI* 遺伝子をノックアウトした *P. gingivalis* 株を作製し、先に定着させた口腔レンサ球菌とのバイオフィルム形成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バイオフィルム形成量の増加がみられることがわかった。2 菌種間でバイオフィルム形成の際にリン酸化活性が影響していることが明らかとなったことから、多菌種間バイオフィルム形成においてもリン酸化活性が重要な影響を及ぼすのではないかとこの着想に至った。そのリン酸化のパターンを解析することで、歯周病細菌叢に多数存在していると期待されるバイオマーカーを探索し、歯周病の初期診断や創薬ターゲットのリソースとして蓄積することで将来的な大規模解析に使用できる可能性がある。また、DNA マイクロアレイやリアルタイム PCR、次世代シーケンサー等を用いての遺伝子アプローチはすでに数多く報告されているが、慢性疾患のような長期に生理的变化に影響を受けやすい疾患はこれらの方法では解析しにくい。一方で、タンパク質やペプチドの翻訳後修飾の代表的なリン酸化は生理的变化に敏感であり、これらのバイオマーカーの探索は診断や創薬ターゲットに有効であると思われるが前例がない。ショットガンホスホプロテオミクス解析法は、ごく微量な唾液や歯垢等からのリン酸化されたタンパク質やペプチドでの測

定が可能であることから、医学・医療応用の口腔内のデータベースを構築することも十分可能である。さらに、将来歯周病だけではなく、修飾シグナル病などの難病に応用することができる可能性がある。以上のことから、本研究は、病態などに伴って量的あるいは質的に著しく変化するものを、ホスホプロテオームを用いて解析することで、新たなバイオマーカーの探索と解析法の開発に貢献することを目的とする。

2. 研究の目的

本研究では、歯周病細菌が多菌種間でバイオフィルムを形成する際に、菌体内のタンパク質のリン酸化活性が高まることを利用してショットガンホスホプロテオミクスの解析手法にてリン酸化されたタンパク質やペプチドのパターンを検出し解析することで、新たなバイオマーカーの探索を行うことが目的である。

そのため、まず有力な歯周病細菌である *P. gingivalis* や *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*、*Fusobacterium nucleatum* 等、口腔常在細菌である *Actinomyces* や口腔レンサ球菌等を培養し、菌体のタンパク質を抽出する。抽出物を次の 2 つの方法で解析する。

3. 研究の方法

(A) 二次元電気泳動解析法による従来のプロテオーム解析法

(B) ショットガンホスホプロテオミクスによる解析法

この 2 つの解析結果に共通するパターンを有用なバイオマーカーとして選出する。まず、あらかじめ *in vitro* で複数の菌体からバイオマーカーをできるかぎり探索し、選出する。これにより、多くの新たなリン酸化タンパク質やペプチドが検出されることが予測されることからショットガンホスホプロテオミクスによる解析法の有用性が明らかとなると考えられる。さらに、細菌感染したヒト歯肉細胞や唾液成分のリン酸化タンパク質やペプチドが口腔内の成分として含まれる可能性があるため、これらの試料についてもショットガンホスホプロテオミクスによる解析法を応用することでリン酸化タンパク質やペプチドを選出する。以上のことより、*in vitro* でのバイオマーカーとなるリン酸化パターンを大量のデータとして蓄積する。その後、実際の歯周病の患者から採取した微量な歯垢や唾液に、この解析法を適用する。これにより、新たなバイオマーカーを探索し、歯周病の初期診断や創薬ターゲットのリソースとして蓄積することで将来的な大規模解析に使用

できる可能性がある。このように、歯周病におけるリン酸化タンパク質やペプチドの新たなバイオマーカーを明らかにし、データベース化することで、医学・医療応用のための口腔内データベースを構築することができる。

4. 研究成果

二次元電気泳動解析法による従来のプロテオーム解析法を用いて、*P. gingivalis* と *S. oralis* との共培養、*P. gingivalis* 単培養および *S. oralis* 単培養を比較したところ、明らかに共培養に変化が認められた。*S. oralis* GAPDH に結合する *P. gingivalis* タンパク質は線毛以外で RagA4、AbfD、Rgp、Kgp、GAPDH、GDH、MDH と同定された。ピアコアを用いてタンパク質相互間結合力を解析したところ、*S. oralis* GAPDH に結合する *P. gingivalis* タンパク質のうち、RagA4、AbfD、Rgp、GAPDH、GDH、MDH の親和性が高いとわかった。これらのリコンビナントタンパク質を複製しバイオフィルムに添加したところ、これらのタンパク質がオートインデューサーや表層タンパク質を調整することでレギュレーター役をもつことを発見した。さらに、リン酸化部位を同定しようとしたが、従来の方法では、濃度が薄すぎて同定が困難であった。

ショットガンホスホプロテオミクスによる解析法を用いての解析をする前に普通のショットガンプロテオミクスによる解析を用いて、*P. gingivalis* と *S. oralis* との共培養、*P. gingivalis* 単培養および *S. oralis* 単培養を解析した。

1) *P. gingivalis* のショットガンプロテオミクス

本研究では、口腔レンサ球菌との混合培養が *P. gingivalis* のタンパク質発現に及ぼす影響について検討したところ、分子量 300kDa 以下で、等電点 3-12 の範囲に 343 のタンパク質が同定された。COGs データベースで検索した結果、同定したタンパク質は 19 種類に分類できた。*P. gingivalis* 単培養群と混合培養群との群間解析の結果、混合バイオフィルム群では、3つのタンパク質が増加し、28のタンパク質が減少した($p < 0.05$)。

2) *S. oralis* のショットガンプロテオミクス

本研究では、*P. gingivalis* が *S. oralis* のタンパク質発現に及ぼす影響についてショットガンプロテオミクスを用いて検討したところ、分子量 305kDa 以下で、等電点 3-13 の範囲に 250 のタンパク質が同定された。*S. oralis* 単培養群と *P. gingivalis*-*S. oralis* 混合培養群との群間解析の結果、混

合群では単培養群と比べ 2 つのタンパク質が増加し、2 つのタンパク質が減少した ($p < 0.05$)。

3) Choi 法による解析

1) と 2) のショットガン解析は Vera 法にて解析を行ったが、その有効性を調べるため、Choi 法にて調べたところ、有意であった。(FDR < 0.05)

従来のショットガン解析ではリン酸化部位はほとんど同定することができなかった。

そこで、酸化チタンカラムを用いてサンプルを濃縮して、ショットガンホスホプロテオミクスを行った。

1) *P. gingivalis* のショットガンホスホプロテオミクス

本研究では、口腔レンサ球菌との混合培養が *P. gingivalis* のタンパク質のリン酸化への影響についてショットガンホスホプロテオミクスを用いて検討したところ、単培養に比べてリン酸化されたタンパク質が 3 つ、脱リン酸化されたタンパク質が 6 つ同定された。

2) *S. oralis* のショットガンホスホプロテオミクス

本研究では、*P. gingivalis* との混合培養が *S. oralis* のタンパク質のリン酸化への影響についてショットガンホスホプロテオミクスを用いて検討したところ、

単培養に比べてリン酸化されたタンパク質が 6 つ、脱リン酸化されたタンパク質が 34 個同定された。

3) *S. gordonii* のショットガンホスホプロテオミクス

本研究では、*P. gingivalis* との混合培養が *S. gordonii* のタンパク質のリン酸化への影響についてショットガンホスホプロテオミクスを用いて検討したところ、単培養に比べてリン酸化されたタンパク質が 8 つ、脱リン酸化されたタンパク質が 69 個同定された。

これにより、歯周病におけるリン酸化タンパク質やペプチドの新たなバイオマーカーを明らかにし、データベース化することで、医学・医療応用のための口腔内データベースの構築の一端に寄与することができた。

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 2 件)

Maeda K, Nagata H, Kuboniwa M, Ojima M, Osaki T, Minamino N, Amano A. Identification and characterization of *Porphyromonas gingivalis* client proteins that bind to *Streptococcus oralis* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. Infect Immun., 査読有、81(3)、2013、753-63.

DOI: 10.1128/IAI.00875-12.

Maeda K, Nagata H, Ojima M, Amano A.
Proteomic and Transcriptional Analysis of
Interaction between Oral Microbiota
Porphyromonas gingivalis and *Streptococcus*
oralis.

J Proteome Res., 査読有、14(1)、2015、82-94.
DOI: 10.1021/pr500848e.

〔学会発表〕(計4件)

前田和彦、永田英樹、久保庭雅恵、小島美樹、天野敦雄

Porphyromonas gingivalis の AbfD はバイオフィルム形成に
関与する 第61回日本口腔衛生学会・総会、2012年5月27日、
神奈川

前田和彦、永田英樹、小島美樹、天野敦雄

Porphyromonas gingivalis MDHの混合バイオフィルム形成に及ぼす
阻害効果 第62回口腔衛生学会、2013年5月17日、松本。

前田和彦、永田英樹、小島美樹、天野敦雄
口腔レンサ球菌との混合培養における

Porphyromonas gingivalis タンパク質発現のショットガン
プロテオミクス 第24回近畿・中国・四国口腔衛生学会総会、
2013年10月6日、岡山

前田和彦、永田英樹、小島美樹、関根伸一、泉井秀介、天野敦雄

Porphyromonas gingivalis が *Streptococcus oralis* のタンパク質発現に及ぼす影響

第63回口腔衛生学会、2014年5月30日(熊本)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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

(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

永田 英樹 (NAGATA, Hideki)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：50260641

関根 伸一 (SEKINE, Shinichi)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：70506344