

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 9 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893120

研究課題名(和文) 歯肉上皮細胞に侵入した歯周病原性細菌の細胞内動態の解析

研究課題名(英文) Analysis of intracellular localization of periodontal pathogen in gingival epithelial cells

研究代表者

竹内 洋輝 (TAKEUCHI, HIROKI)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：40572186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、初期エンドソームへ輸送された *P. gingivalis* (Pg) がどのように次のオルガネラへ輸送されるのか解析した。その結果、Pg は歯肉上皮細胞へ侵入後に初期エンドソームに存在し、宿主細胞内の輸送小胞の融合に関わるとされる SNARE タンパク質の1つである VAMP2 と共局在を示した。また、歯肉上皮細胞の VAMP2 の発現をノックダウンさせると、細胞内に存在する Pg の生菌数が増加し、感染後5時間においても Pg と初期エンドソームの共局在が多く認められた。これらの結果より、Pg の初期エンドソームから次のオルガネラへの輸送に VAMP2 が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：<Objective> In this study, we focused on the molecular basis underlying intracellular localization of *Porphyromonas gingivalis* (Pg), a pathogenic bacterium of periodontitis, in gingival epithelial cells. It has been reported that vesicle-associated membrane protein (VAMP2), one of the soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor, has a key role in the fusion of transport vesicles to their target membrane. The objective of study is to determine the involvement of VAMP2 in intracellular localization of Pg. <Results> At 1 hour post-infection (hpi), about half of intracellular Pg was co-localized with VAMP2 in early endosomes in human immortalized gingival epithelial cells (HIGECs). Knockdown of VAMP2 increased accumulation of Pg in HIGECs, and caused accumulation of Pg in early endosomes even up to 5 hpi. <Conclusion> VAMP2 is suggested to be involved in the intracellular trafficking of Pg from early endosomes to distinct organelles in gingival epithelial cells.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯学

1. 研究開始当初の背景

研究代表者の研究室による分子免疫学的調査で、歯周炎患者から *Porphyromonas gingivalis* が最高頻度で検出された。しかし、*P. gingivalis* と歯周病発症との因果関係については未解明の部分が多い。

これまで研究代表者は、*P. gingivalis* がエンドサイトーシス経路を利用し歯肉上皮細胞へ侵入し、菌の一部はライソソームやオートファゴソームにより分解され、一部はリサイクリング経路を利用し宿主細胞外へ脱出することを報告した。

P. gingivalis は歯周組織を構成する歯肉上皮細胞に侵入することにより、宿主免疫からの攻撃を回避している可能性がある。しかし、*P. gingivalis* の細胞侵入機構、細胞内で利用するオルガネラ、細菌侵入に対する細胞応答、そして感染後の *P. gingivalis* の転機に関しては不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、歯周病の原因菌である *P. gingivalis* を対象とし、細菌が侵入した細胞の防御機構に焦点を当て、歯周病の慢性化に至る経路を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

不死化ヒト歯肉上皮細胞に *P. gingivalis* ATCC 33277 株を multiplicity of infection (MOI) 100 で感染。

P. gingivalis の細胞内動態は、細胞を固定後 DAPI で染色し、共焦点顕微鏡で観察。

歯肉上皮細胞内または培養培地中の *P. gingivalis* 生菌数の測定は、colony formation unit (CFU) assay を使用。

4. 研究成果

●歯肉上皮細胞へ侵入した *P. gingivalis* と SNARE タンパク質との関連の解析

SNARE タンパク質は N 末端側に 60-70 アミノ酸からなる SNARE ドメインを有し、小胞体、ゴルジ体、分泌小胞、エンドソーム、リソソーム、細胞膜などとの間の膜融合を仲介することが知られている。片側の膜には中心部にグルタミンを含む Q-SNARE が 3 つ、もう一方の膜には中心部にアルギニンを含む R-SNARE が 1 つ、合わせて 4 つの SNARE ドメインが 4 本の複合体を形成すると膜融合が誘導される。

そこで、どの SNARE タンパク質が歯肉上皮細胞へ侵入した *P. gingivalis* に影響を及ぼすのか調べるため、siRNA によるノックダウンを用い、CFU assay によるスクリーニングを行った。その結果、エンドソームに存在することが知られている VAMP2 が *P. gingivalis* の生菌数に影響を及ぼすことを確認した。VAMP2 をノックダウンした細胞では、感染後 4 時間において細胞内に存在する *P. gingivalis* 生菌数の増加を確認した(Figure 1 and 2)。

Figure 1

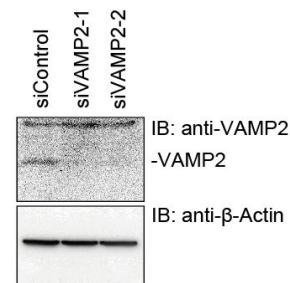
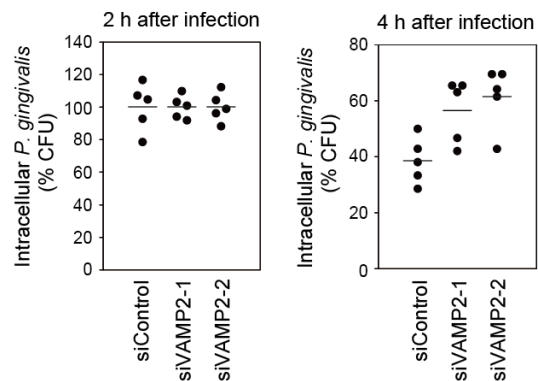


Figure 2



次に VAMP2 が歯肉上皮細胞内でどのコンパートメントに存在するか調べるため、VAMP2 と蛍光タンパク質との融合タンパク質を歯肉上皮細胞へ発現させ *P. gingivalis* を感染し、共焦点顕微鏡によりその局在を観察した。その結果、VAMP2 は *P. gingivalis* を含む初期エンドソームと非常によく共局在を示すことを確認した(Figure 3 and 4)。

Figure 3

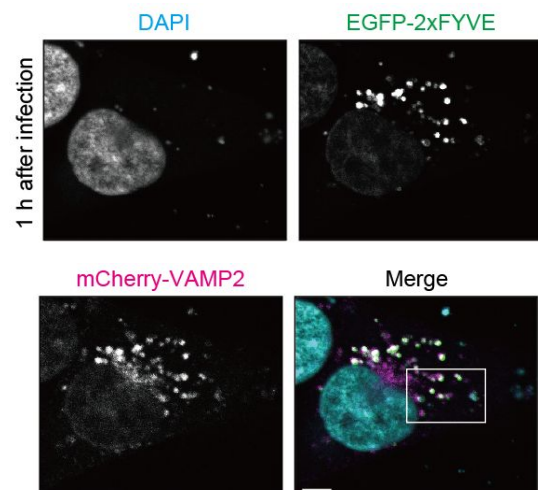
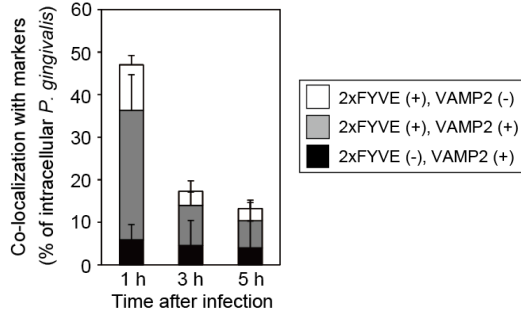


Figure 4



さらに、VAMP2 をノックダウンした細胞では、感染後5時間においても *P. gingivalis* と初期エンドソームとの共局在が多く認められた(Figure 5 and 6)。

Figure 5

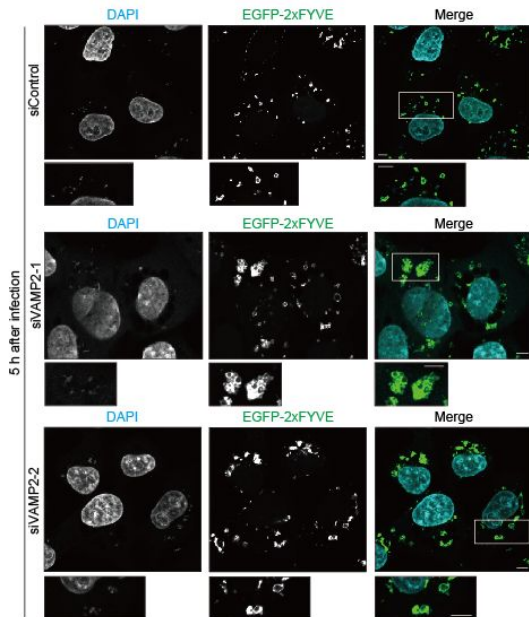
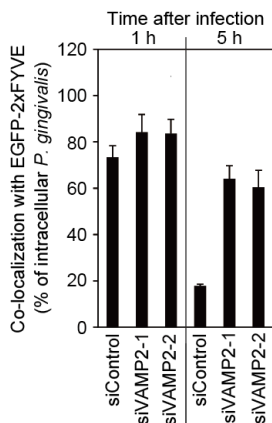


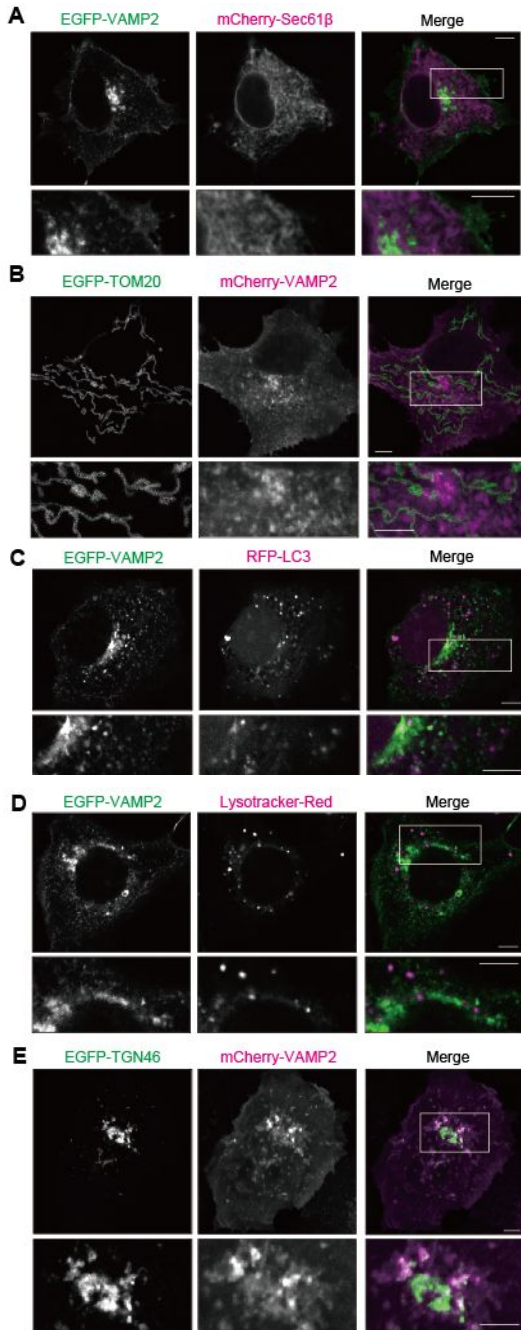
Figure 6



歯肉上皮細胞における、初期エンドソーム以外のオルガネラとVAMP2 の関係を調べるため、Sec61 β (endoplasmic reticulum)、TOM20 (mitochondria) 、 LC3

(autophagosome)、Lysotracker (lysosome)、および TGN46 (Golgi bodies) の局在を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、VAMP2 は Sec61 β 、TOM20、LC3、および Lysotracker とはほとんど共局在を示さない一方(Figure 7A-D)、TGN46 とは一部共局在を示した(Figure 7E)。

Figure 7



これらの結果より、VAMP2 は歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* の細胞内輸送に相關する可能性が示唆された。また、*P. gingivalis* の初期エンドソームから次のオルガネラへの輸送に、ゴルジ体から輸送されるVAMP2 が関与する可能性が考えられ、その分子機構を明らかにすることが今後の課題

である。

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 1 件)

Amano, A., Kuboniwa, M., Takeuchi, H. (2014). Transcellular invasive mechanisms of *Porphyromonas gingivalis* in host-parasite interactions. J. Oral. Biosci. 56, 58-62.

[学会発表](計 3 件)

Takeuchi, H., Takada, A., Amano, A. Involvement of VAMP2 in intracellular localization of *Porphyromonas gingivalis*. International Association for Dental Research General Session & Exhibition, 2014/6/28, Cape Town, South Africa.

Takeuchi, H., Amano, A. Involvement of VAMP2 in intracellular localization of *Porphyromonas gingivalis* in recycling endosomes. 第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2014/9/25, 福岡.

Takeuchi, H., Amano, A. Involvement of Rab4A and VAMP2 in intracellular *Porphyromonas gingivalis* in gingival epithelial cells. 62nd Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 大阪.

[その他]

ホームページ等

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

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 洋輝 (TAKEUCHI HIROKI)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号 : 40572186

Abbreviations used in this report: SNARE, soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor; VAMP, vesicle associated membrane protein; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; EGFP, enhanced green fluorescent protein; mCherry, monomeric Cherry; TOM, translocase of outer membrane; RFP, red fluorescent protein; LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3; TGN, trans-Golgi network.