

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009 ～ 2010

課題番号：21890195

研究課題名（和文） *P. gingivalis* から新たに同定されたリガンド Gs1A の機能的解析研究課題名（英文） functional analysis of Gs1A that newly identified of *P. gingivalis*

研究代表者

春山 晃毅 (HARUYAMA KOKI)

長崎大学・大学病院・医員

研究者番号：40549466

研究成果の概要（和文）：歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* について我々はこれまでに、*P. gingivalis* が保有し、TLR2 および TLR4 非依存性に CHO 細胞の転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化させる新奇蛋白性因子を精製・同定した。この分子は *P. gingivalis* が産生する蛋白分解酵素 gingipain によって分解される為、Gingipain-sensitive ligand A (Gs1A) と命名した。Gs1A の部分リコンビナント蛋白で免疫したウサギ抗血清は CHO 細胞 NF- $\kappa$ B 活性化を抑制し、gs1A 遺伝子は試験した *P. gingivalis* 菌株 7 株中 4 株に存在することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We previously purified and identified the protein from cell surface component on *P. gingivalis*, a major periodontal pathogen. This protein was able to induce Toll-like receptor 2 (TLR2)- and TLR4-independent signaling in CHO cells and that this component can be degraded by gingipains. Therefore, we named the protein as gingipain-sensitive ligand A (Gs1A). *P. gingivalis* gingipain-null mutant was partially inhibited by antiserum against a recombinant protein expressed from the first one third of *gs1A*. Furthermore, the *gs1A* gene was present in four of seven *P. gingivalis* strains tested.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,050,000	315,000	1,365,000
2010 年度	950,000	285,000	1,235,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,000,000	600,000	2,600,000

研究分野：歯周病学

科研費の分科・細目：医歯薬学、歯周治療系歯学

キーワード：*P. gingivalis*、gingipain、自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 主要な歯周病原細菌の一つである *Porphyromonas gingivalis* は、菌体表面に病原因子である強力な蛋白分解酵素、

gingipain を保有している。gingipain についてはこれまでに、種々の免疫系エフェクター分子を切断することが報告されており、*P. gingivalis* の宿主免疫機構からの逃避に関

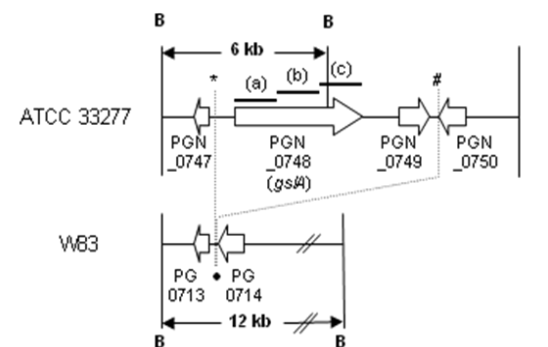
与していることが示唆されている。

(2) 我々はこれまでに、gingipain が宿主由来の分子ばかりでなく、*P. gingivalis* により産生される自然免疫活性化因子も切断することを報告した。この因子は 7.19 細胞 (Chinese Hamster Ovary 細胞由来 MD-2 突然変異株で、Toll-like receptor (TLR) 2 および TLR4 のシグナル伝達経路を欠く) の NF- $\kappa$ B 活性化を誘導する。更に我々はこの自然免疫活性化因子の *P. gingivalis* gingipain 欠損株からの精製・同定を試みた。その結果、この因子は *P. gingivalis* ATCC33277 株ゲノム配列中に存在する PGN\_0748 遺伝子にコードされる蛋白であることが示唆された。そして、この gingipain 感受性自然免疫活性化因子を Gingipain Sensitive Ligand A (GslA) と命名した。

## 2. 研究の目的

(1) 新奇病原性因子 GslA は本当に CHO レポーター細胞の NF- $\kappa$ B を活性化しているのかを確認する必要がある。また 7.19 細胞以外の細胞を刺激する際に凍結乾燥菌体を用いると GslA 以外の菌体成分が TLR などのパターン認識レセプターを刺激してしまう問題がある。それらの問題を解消するために GslA 全長リコンビナント蛋白の作製に取り組んだ。

(2) *P. gingivalis* ATCC33277 株ゲノム配列中に存在する PGN\_0748 (*gsIA*) 遺伝子は、*P. gingivalis* W83 株ゲノム配列中には存在しない (図 1)。このことから、*P. gingivalis* の異なる菌株ごとの *gsIA* 遺伝子の存在様式



\* ATCC33277 815368 GAAGGGGTGTTCTCTTTTATAACGCCAGTTTGTATCTA 815405  
|||||

● W83 767987 GAAGGGGTGTTCTCTTTTATAAGGGTGTATATATCTCT 768024  
|||||

# ATCC33277 823039 TATATCGAAGTCAACGTTTATAAGGGTGTATATATCTCT 823076

の違いを調査した。

図 1 *P. gingivalis* ATCC33277 株と W83 株のゲノム配列中における *gsIA* 遺伝子の存在様式の違い

(3) また、GslA が具体的にどのような刺激伝達経路で CHO の NF- $\kappa$ B を活性化しているのかも分かってはいない。そこで NF- $\kappa$ B 上流の刺激伝達分子の阻害剤を用いての抑制試験を行い、刺激伝達経路の解析を試みた。

## 3. 研究の方法

(1) *gsIA* 遺伝子全長を His tag を付与した発現ベクターにクローニングし、大腸菌に発現させ、ニッケルカラムを用いての蛋白精製を行った。得られたリコンビナント蛋白で 7.19 レポーター細胞を刺激し、NF- $\kappa$ B 活性化度をレポーター分子の発現量として、フローサイトメトリー法にて解析した。

さらに得られたリコンビナント蛋白でウサギを免疫 (フロイントのインコンプリートアジュバンドにてリコンビナント蛋白を 250  $\mu$ g/回で 2 週間おきに 2~3 回投与) した。血清中の抗体価は ELISA 法により測定し、力価の上昇を確認したところで、追加免疫を行った後にウサギより血清を回収し、セファロース 4B カラムを用いて、リコンビナント蛋白に対する抗体を精製した。

(2) *P. gingivalis* の異なる菌株ごとの *gsIA* 遺伝子の存在様式の違いはサザンハイブリダイゼーションを行って調査した。*gsIA* 遺伝子の内部プローブ 3 種をラベルし、ゲノム DNA を制限酵素 BamHI もしくは PstI にて切断後、0.8% アガロースゲルにて電気泳動し、Hybond-N+ membrane に転写、CDP-Star detection reagent にて検出した。

(3) *P. gingivalis* gingipain 欠損株凍結乾燥菌体で CHO 細胞を刺激する際、CytochalasinD、Nocodazole などの細胞内取り込み阻害剤で CHO 細胞を処理した場合とそうでない場合との NF- $\kappa$ B 活性化の差を、フローサイトメトリー法にて解析した。

## 4. 研究成果

(1) *gsIA* 遺伝子全長のリコンビナント蛋白作製は、大腸菌での蛋白発現量が十分でない為、実験に必要な量の作製には至らなかった。結果的に、*gsIA* の 5' 側より 1/3 をコードした部分リコンビナント蛋白の精製に留まった。得られた部分リコンビナント蛋白では CHO 細胞 NF- $\kappa$ B 活性化を誘導できなかった。しかし、この部分リコンビナント蛋白で免疫したウサギ血清より得られた抗体を用いて行ったウェスタンブロット解析では、*P. gingivalis* 野生株および gingipain 欠損株の全菌体溶解物、細胞外膜画分に部分リコンビナント蛋白に対する抗体に反応したが、*P. gingivalis* GslA 欠損株のそれには反応しなかった (図 2 GslA 欠損株は CHO 細胞 NF- $\kappa$ B 活性化を殆ど誘導しない)。またこの抗体

は、*P. gingivalis* gingipain 欠損株凍結乾燥菌体による CHO 細胞 NF- $\kappa$ B 活性化を抑制することができた (図 3)。これらの結果から *P. gingivalis* Gs1A 欠損株による 7.19 細胞の NF- $\kappa$ B 活性化は Gs1A 蛋白によって担われていることが示唆された。

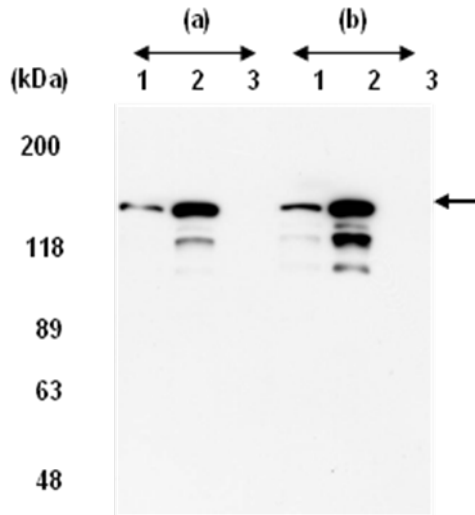


図 2 Gs1A 部分リコンビナント蛋白に対する抗体を用いたウェスタンブロット解析結果。(a)全菌体溶解物 (b)細胞外膜画分。(a)(b)とも、レーン 1 (*P. gingivalis* 野生株) およびレーン 2 (*P. gingivalis* gingipain 欠損株) で 123kDa の Gs1A に相当する部分にバンドが検出されたが、レーン 3 (*P. gingivalis* Gs1A 欠損株) では反応が検出されていない。

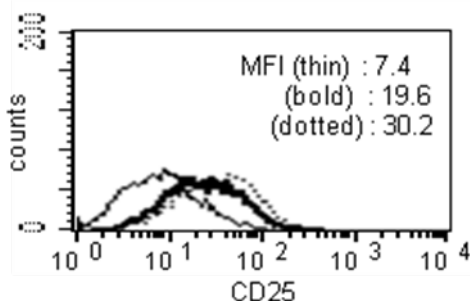


図 3 7.19 細胞 NF- $\kappa$ B 活性化能のフローサイトメトリー解析結果。(thin=未刺激, bold=*P. gingivalis* gingipain 欠損株凍結乾燥菌体+Gs1A リコンビナント蛋白に対する抗体, dotted=*P. gingivalis* gingipain 欠損株凍結乾燥菌体+ウサギ免疫前血清)。菌体による NF- $\kappa$ B 活性化が Gs1A リコンビナント蛋白に対する抗体によって抑制されている。

(2) サザンブロット解析に用いられた *P. gingivalis* 7 菌株中 ATCC33277、TDC117、TDC275、SU63 の 4 種で gs1A プロンプ 3 種 (図 1 参照) に対する反応が見られたが、W83、TDC60、GAI-7802 の 3 種では反応が見られなかった (図 4)。

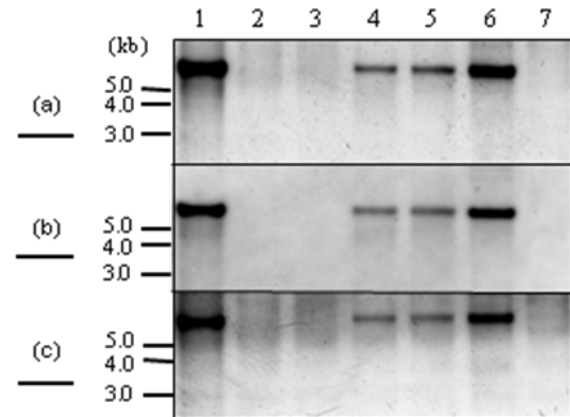


図 4 サザンブロット解析結果。1: *P. gingivalis* ATCC33277 2: W83 3: TDC60 4: TDC117 5: TDC275 6: SU63 7: GAI-7802

このような *gs1A* の存在様式の違いは、菌株間における病原性の違いに影響を与えている可能性もある。

(3) *P. gingivalis* gingipain 欠損株による NF- $\kappa$ B 活性化は、CytochalasinD、Nocodazole などの細胞内取り込み阻害剤で CHO 細胞を前処理した場合の方が、未処理のそれと比較して抑制されていた。このことより、Gs1A は CHO 細胞内に取り込まれた上で認識をされている可能性が示唆された。

#### 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 1 件)

Koki Haruyama, Atsutoshi Yoshimura, Mariko Naito, Mami Kishimoto, Mikio Shoji, Yoshimitsu Abiko, Yoshitaka Hara, Koji Nakayama, Identification of a Gingipain-Sensitive Surface ligand of *Porphyromonas gingivalis* That Induces Toll-Like Receptor 2- and 4- Independent NF- $\kappa$ B Activation in CHO cells, Infection and Immunity, 査読有, 77, 2009, 4414-4420

[学会発表] (計 1 件)

Atsutoshi Yoshimura *et al.*, A

gingipain-sensitive surface ligand of *Porphyromonas gingivalis* that induces TLR2- and TLR4- independent NF- $\kappa$ B activation in CHO cells, The 14th International Congress of Immunology, 2010年8月25日, 神戸コンベンションセンター (神戸)

[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:

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

春山 晃毅 (HARUYAMA KOKI)

長崎大学・大学病院・医員

研究者番号: 40549466

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: