

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893244

研究課題名(和文) 歯周病原細菌リポタンパク質の貪食回避機能について

研究課題名(英文) Involvement of lipoprotein of periodontal related pathogens in evasion of phagocytosis.

研究代表者

張 家誠 (Chou, Kasei)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：80710681

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)：歯周炎は、細菌が引き起こす慢性炎症である。歯周病の慢性化には貪食という、細菌を食べる消化する宿主免疫細胞機能を、細菌が回避する能力が重要となる。

そこで申請者らは、歯周炎と関連が深いといわれる細菌 *Streptococcus gordonii* が有する貪食抵抗因子 PpiA の細胞への結合性を検討し、貪食との関連を調べていくこととした。その結果、PpiA タンパクはマクロファージの膜タンパクと一部結合することが分かった。PpiA と膜タンパク質との結合が、PpiA の貪食抵抗性の何らかの因子となっている可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Periodontitis is chronic disease caused by bacteria. These periodontal pathogen must avoid host immune defence like "Phagocytosis". It is important to established chronic infection.

In this study, we researched *Streptococcus gordonii* a periodontal related bacteria. *S. gordonii* have a protein PpiA, it plays an important role in inhibiting phagocytic engulfment and in evasion of the host immune response. But, we didn't know the mechanism of inhibiting phagocytosis by PpiA protein. So, we examine the PpiA protein and macrophage cell membrane protein interaction. The result showed that PpiA protein can combined with 22kDa and 27kDa size cell membrane protein. The protein may have one of the role to inhibition phagocytosis by PpiA.

研究分野：歯周病学

キーワード：貪食

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周炎は、デンタルプラーク内の歯周病原細菌が引き起こす慢性炎症である。歯周病原細菌の歯周組織への感染成立には、マクロファージ、好中球による免疫からの回避が重要になる。結核などの慢性的な感染症は細菌が貪食に抵抗することで、体内の免疫機構を回避する機能を有している。よって歯周病を引き起こすデンタルプラーク由来の細菌が、貪食などの宿主免疫を回避する機構は重要な意味合いを持つ。

(2) 本研究で使用した *P.gingivalis* と *S.gordonii* はいずれもデンタルプラーク内に存在する菌であり、歯周病の発症に大きく関与していると考えられている。そこで菌の有する貪食抵抗性を検討することにより、歯周病の発症及び慢性炎症化する機構を解明する一助になると考えられる

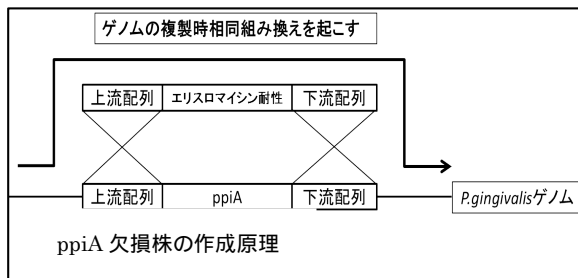
2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、歯周病に関連する細菌である、*Porphyromonas gingivalis* およびその関連細菌である *Streptococcus gordonii* の2菌種について、宿主貪食細胞からの貪食作用への抵抗性の検討およびその作用機序の解明である。

3. 研究の方法

***P.gingivalis***

(1) *P.gingivalis ppiA* 遺伝子欠損株作成  
過去に我々は、*Streptococcus mutans* の貪食抵抗因子 PpiA を見出し、その貪食抵抗機能を報告した。そこで *P.gingivalis*33277 株における *ppiA* 遺伝子欠損株作成を試みた。使用したプライマー配列を以下に示す。



使用プライマー配列  
上流配列(テンプレート:*P.gingivalis* ゲノム)  
F:ATACGCCGATCCACAAGTTG  
R:GCAATAGCGGAAGCTATCGGTCTCTGTTCCAGATGTCGC

エリスロマイシン耐性遺伝子(PVA2198プラスミド)  
F:GCGACATCTGAACAGAGACCGGATAGCTTCCGCTATTGC  
R:GTGTGTCGCGAGTGGTCTTTCCAAATTTACAAAAGCGACTCATAG

下流配列(テンプレート:*P.gingivalis* ゲノム)  
F:CTATGAGTCGCTTTTGTAAATTTGGAAAGGACCACTGCCGAACACAC  
R:GGTTCTCCATATCGGTATTG

***S.gordonii***

(1)*S.gordonii* の貪食に関与する貪食受容体の検索  
過去に我々は、細胞の貪食受容体として代表的な MARCO SR-A が *S.gordonii*10558 株

への細胞の貪食を担っていることを報告した。しかし細胞の貪食受容体は他にもいくつか報告があり、今回はさらに2つの貪食受容体 LOX-1 マンノース受容体が、貪食作用を担っているかを貪食実験を用いて調べた。貪食実験の概要を以下に示す。

使用細胞：THP-1(マクロファージ様細胞)  
貪食実験の手順

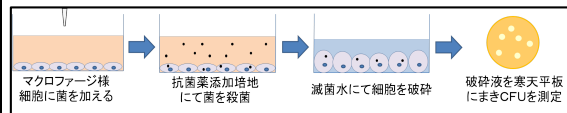
6well プレートに  $1 \times 10^6$  個の THP-1 細胞を培養し、マクロファージへの分化誘導因子 PMA を 10 nM の終濃度になるように加え、24 時間分化させてから使用する。

各貪食受容体の阻害剤を細胞に加え1時間インキュベートする。

OD0.1 に調整した菌液を細胞培養液の総量の 1/20 になるように加え、45 分貪食させる。

ペニシリン G とストレプトマイシンにて細胞外の菌を1時間殺菌する。

細胞を蒸留水を作用させることにより破碎させ、細胞破碎液を細菌培養寒天培地に撒き、最終的に CFU を計測する。



(2)*S.gordonii* における複数の菌株における PpiA の貪食抵抗性の違いについての検討  
*S.gordonii* には複数の菌株があり、我々は過去に 10558 株において貪食抵抗性を検討してきた。しかし一般的によく知られている菌株として 12396 株と challis 株が存在しており、株による違いで PpiA による貪食抵抗性に違いが出るかを貪食実験を用いて検討することとした。

(3) *S.gordonii ppiA* 遺伝子欠損株の貪食抵抗性の作用機序の検討

*S.gordonii* の *ppiA* 遺伝子欠損株はマクロファージからの貪食作用を回避する機能を有している。我々は PpiA が細胞にどのような影響を及ぼしているか検討するため、*S.gordonii* の野生株と *ppiA* 欠損株を用いてマクロファージ様細胞 THP-1 を刺激し、その細胞の貪食に関与する分子の遺伝子発現がどのように変化するかをマイクロアレイを用いて調べた。

(4)PpiA タンパクと相互作用を起こす可能性のあるマクロファージ細胞 THP-1 のタンパクの検索

PpiA 分子は、THP-1 細胞表面の膜たんぱく質と相互作用を及ぼして THP-1 細胞の貪食機能に影響を及ぼしている可能性がある。そこで我々は、PpiA リコンビナントタンパク質を用いて、far-western blot を行い、PpiA

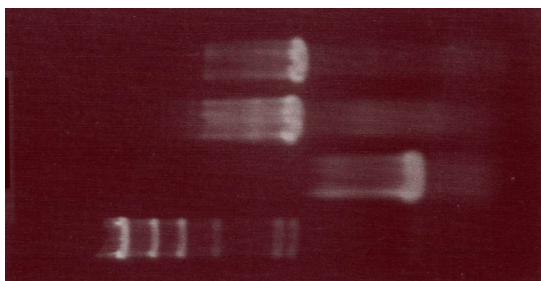
と結合するタンパク質を検索した。方法は以下のとおりである。THP-1 細胞を回収した後、界面活性剤である Triton-X114 を用いて細胞膜成分を分離回収す。回収した細胞膜画分をサンプルとして SDS-PAGE を行い、セルロース膜に転写する。リコンビナント PpiA を bait タンパクとして作用させ、一次抗体として抗 PpiA 抗体を使用し、PpiA と結合した膜たんぱく質を検出した。

#### 4. 研究成果

##### ***P.gingivalis***

##### (1) *P.gingivalis* ppiA 遺伝子欠損株作成

*P.gingivalis* ppiA 遺伝子 (PGN1364) を欠損させる方法として、本遺伝子をエリスロマイシン耐性遺伝子と相同組み換えさせる手法にて行った。簡潔に説明すると、目的の PG1364 遺伝子の上流+エリスロマイシン耐性遺伝子+下流遺伝子を 3 つつなげた遺伝子断片を *P.gingivalis* のゲノム遺伝子を用いて PCR にて作成し、この遺伝子をエレクトロポレーション法にて、*P.gingivalis* に入れることで相同組み換えが起きるように実験を行った。しかし、現在に至るまで *P.gingivalis* の ppiA 遺伝子欠損株を作成することができず、*P.gingivalis* の生存にとって本分子が極めて重要な場合、欠損させることで菌自体が生きていけなくなる可能性が示唆された。



上から上流配列・エリスロマイシン耐性遺伝子・下流配列の PCR 産物・マーカー



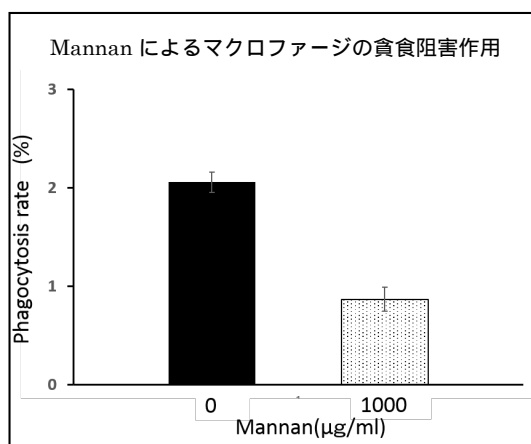
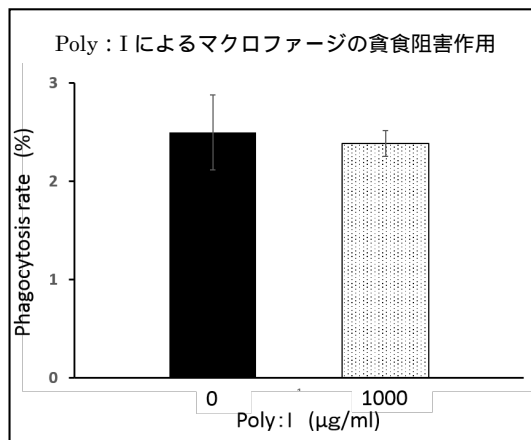
上記 3 分子の結合後 PCR 産物

##### ***S.gordonii***

##### (1) *S.gordonii* の貪食抵抗に關与する貪食受容体の検索

過去に我々は MARCO SR-A に対する阻害剤を用いることで、*S.gordonii* をマクロファージが貪食する際、上記の 2 分子が關与していることを示した。今回、我々は PolyI : C (LOX-1 の阻害剤) マンナン(マンノース受容体の阻害剤)を用いて、THP-1 細胞における *S.gordonii* の貪食実験を行った。結果を以

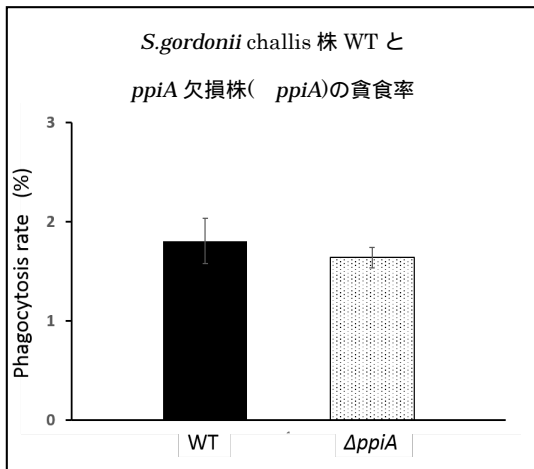
下に示す。



結果、Poly:I による Lox-1 受容体の阻害では有意差が認められなかった。一方、Mannan によるマンノース受容体の阻害では貪食作用が減弱した。以上から、マンノース受容体は *S.gordonii* の貪食に關与している事が分かった。

##### (2) *S.gordonii* の他の株における PpiA の貪食抵抗性

*S.gordonii* には本研究で使用している 10558 株の他に、12396 株と challis 株がよく知られており、この 2 菌株に対しても ppiA 遺伝子の欠損がどのような影響を及ぼす検討するため、ppiA 遺伝子欠損株作成を試みた。しかし 12396 株の ppiA 遺伝子欠損株は何度試みても作成できず、challis 株において ppiA 遺伝子欠損株のみ得ることが出来た。そこで challis 株において野生株と ppiA 遺伝子欠損株で貪食実験を行ったところ、各菌株間において貪食率に有意差は認められなかった。わわ我は、*S.mutans* の 3 菌株でも同様の実験を行っており、その時はいずれの ppiA 遺伝子欠損株でも貪食率が上昇したことから、菌株間での機能の違いはあまりないと想定していたが、*S.gordonii* においては菌株間において、PpiA の貪食抵抗性に大きな違いがあることが分かった。



### (3) マクロファージ様細胞 THP-1 の貪食に関する遺伝子の変化

我々は、THP-1 細胞に対して、*S.gordonii* の野生株、*ppiA* 遺伝子欠損株を刺激として加え、その後 RNA を回収し、マイクロアレイによる網羅的遺伝子検索を行った。結果、2.5 倍以上の有意差がある遺伝子において遺伝子を検出した。貪食に関わる分子の遺伝子発現は検出されたものの著しく大きな変化を認めたものはなかった。よって PpiA は細胞の遺伝子発現に影響を及ぼしているものの、今回の結果では、PpiA の貪食抵抗性に強く関連している遺伝子を推定することは出来なかった。

### (4) PpiA タンパクに結合する分子の検索

far-western blot の結果、22kDa と 27kDa の付近に、PpiA と強く結合するバンドを検出した。今回は、細胞膜全体の Lycete を使用しており、タンパクの特定はできなかったが、今後 2 次元電気泳動などを使用し、タンパクを特定し、PpiA の貪食抵抗性に関与するかを検討していく予定である。

本研究の結果から、*S.gordonii* に対するマクロファージの貪食受容体として、マンノース受容体が関与している可能性が示唆された。また、PpiA と相互作用するマクロファージ細胞の膜タンパク質の存在も示唆されており、今後は、上記結果を踏まえ、PpiA の貪食抵抗性について関与する分子の検索、及びその機序をさらに深く検討していく。

## 5. 主な発表論文等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

張 家誠 (CHOU, Kasei)

昭和大学・歯学部歯周病学講座・助教

研究者番号：80710681