

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462866

研究課題名(和文) 歯周病細菌外膜ヴェシクルの免疫病理と異菌種外膜ヴェシクル間相互作用に関する研究

研究課題名(英文) Immunopathology of outer membrane vesicles of periodontopathic bacteria

研究代表者

中尾 龍馬 (NAKAO, Ryoma)

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官

研究者番号：10370959

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg) は、外膜ヴェシクル(OMV)を菌体外に放出し、生体と相互作用する。本研究では、PgのOMVの二次元電気泳動とウエスタンブロットを併用したイムノプロテオーム解析を行い、OMVで免疫したマウス血清抗体におけるイムノドミナント抗原を同定した。また、ある表面活性化磁性ビーズとPgOMVの特有的な結合を見出し、新たなPgOMVの精製方法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Gram-negative bacteria produce and release spherical, microstructural bodies called outer membrane vesicles (OMVs) during growth. As with other Gram-negative bacteria, OMVs are naturally produced by *Porphyromonas gingivalis* (Pg). In the present study, we identified immunodominant antigens recognized in serum samples from mice intranasally immunized with PgOMV by a sub-immunoproteome approach with the combination of two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry analysis. In addition, we discovered a novel approach for purification and selective capture of PgOMV. PgOMV was found to bind to magnetic beads coated with epoxy groups in a noncovalent, species-specific manner.

研究分野：細菌学、分子生物学

キーワード：歯周病 免疫 外膜ヴェシクル

1. 研究開始当初の背景

歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis*(Pg) は、外膜ヴェシクル(Outer membrane vesicle; OMV)を菌体外に放出し、生体と相互作用する。

2. 研究の目的

(1) Pg の OMV のイムノプロテオーム解析を行うこと。

(2) PgOMV と様々な表面活性化磁性ビーズと結合力を調べ、この結合を応用した新たな PgOMV の精製方法を確立すること。

3. 研究の方法

(1) PgOMV を二次元電気泳動で展開した後、これに OMV 経鼻投与して得られたマウス血清を反応させ、OMV 中のイムドミナント抗原を同定した。

(2) PgOMV が各種表面活性化磁性ビーズに結合する性質を調べ、PgOMV を精製することを試みた。

4. 研究成果

(1) PgOMV を二次元電気泳動により展開したところ、スポットの多くは低 pH 領域に分布していた。2D マップ上の合計 53 のスポットを MS 解析により同定した。さらに、作成した PgOMV の 2D マップに PgOMV で免疫したマウス血清を当ててウエスタンブロットを行ったところ A-LPS やジンジパイン、Mfa1 線毛といった複数の病原因子に強力なシグナルが見られた。

(2) 異なる Pg 菌 5 株に由来する OMV を用いて、各種表面活性化磁性ビーズと結合するかどうか調べたところ、5 株の PgOMV はいずれもエポキシ基活性化磁性ビーズ(SB-Epoxy)と結合することが明らかとなった。一方で、Pg 由来の線毛は SB-Epoxy には付着しなかった。SB-Epoxy に結合した PgOMV は、2M の Urea などの変性条件下で SB-Epoxy から解離したこと、また他に調べた 6 菌種 11 菌株は SB-Epoxy とは結合しなかったことから、その結合様式は、菌特異的な非共有結合であることが明らかとなった。この精製方法で溶出、単離した PgOMV は、上皮細胞に対する強力な脱離活性(ジンジパインによるトリプシン様タンパク分解酵素活性)を保持していた。磁性ビーズを用いた簡便な PgOMV の新たな精製方法が確立された。

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 6 件)

Obana N, Nakao R, Nagayama K, Nakamura K, Senpuku H, Nomura N. Immunoactive clostridial membrane vesicle production is regulated by a sporulation

factor., Infection and Immunity, 2017, pii:IAI.00096-17.doi:10.1128/IAI.00096-17.

Ryoma Nakao, Hideki Hasegawa, Bai Dongying Makoto Ohnishi, Hidenobu Senpuku. Assessment of outer membrane vesicles of periodontopathic bacterium *Porphyromonas gingivalis* as possible mucosal immunogen, Vaccine, 2016 Aug, 34(38):4626-34

Toru Kariu, Ryoma Nakao, Tsuyoshi Ikeda, Keisuke Nakashima, Jan Potempa, and Takahisa Imamura

Inhibition of gingipains and *Porphyromonas gingivalis* growth and biofilm formation by prenylated flavonoids, Journal of Periodontal Research, 2016 Feb, doi:10.1111/jre.12372

Bai D, Nakao R, Ito A, Uematsu H, Senpuku H. Immunoreactive antigens recognized in serum samples from mice intranasally immunized with *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles, Pathogens and Disease, 2015 April, 73(3). pii: ftu006

Nakao R, Kikushima K, Higuchi H, Obana N, Nomura N, Bai D, Ohnishi M, Senpuku H. A Novel Approach for Purification and Selective Capture of Membrane Vesicles of the Periodontopathic Bacterium, *Porphyromonas gingivalis*: Membrane Vesicles Bind to Magnetic Beads Coated with Epoxy Groups in a Noncovalent, Species-Specific Manner., PLoS ONE, 2014 May, 9(5):e95137

Nakao R, Takashiba S, Kosono S, Yoshida M, Watanabe H, Ohnishi M, Senpuku H. Effect of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles on gingipain-mediated detachment of cultured oral epithelial cells and immune responses, Microbes and Infection, 2014 Jan, 16(1):6-16.

[学会発表](計 34 件)

1) Yuri Yoshimasu, Tsuyoshi Ikeda, Akira Yagi, Yasushi Morinaga, Souichi Furukawa, Ryoma Nakao, Propolis immediately triggers bactericidal action through the aberrant bleb formation and membrane perturbation at the bacterial surface, 第 89 回日本細菌学会総会, 2017 年 3 月 19 日 ~ 21 日, 宮城県・仙台市

2) Satoru Hirayama, Hidenobu Senpuku, Makoto Ohnishi, Ryoma Nakao, Mucosal adjuvant activity of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* outer membrane

vesicles、第 89 回日本細菌学会総会、2017 年 3 月 19 日～21 日、宮城県・仙台市

3) Ryoma Nakao

Vaccine Efficacy and Safety of Outer Membrane Vesicles Derived from a Major Periodontopathic Bacterium, *Porphyromonas gingivalis*, Joint Meeting of Umea Univ and Karolinska Institutet, 2017 年 3 月 3 日、Umeå, Sweden

4) Ryoma Nakao, Hideki Hasegawa, Yuri Yoshimasu, Makoto Ohnishi, Hidenobu Senpuku, Assessment of outer membrane vesicle of *Porphyromonas gingivalis* as a mucosal immunogen candidate for development of a periodontal disease vaccine, ASM Conference on antibacterial development, 2016 年 12 月 11 日～14 日、Washington DC USA

5) Ryoma Nakao, Hideki Hasegawa, Makoto Ohnishi, Hidenobu Senpuku, A feasible intranasal vaccine strategy using bacterial outer membrane vesicles: —the safety and cross-protective immunity—, Keystone Symposia, Translational vaccinology for global health, 2016 年 10 月 25 日～29 日、London UK

6) Ryoma Nakao, Hideki Hasegawa, Makoto Ohnishi, Hidenobu Senpuku, Assessment of outer membrane vesicle of *Porphyromonas gingivalis* as a mucosal immunogen candidate for development of a periodontal disease vaccine, 10th Vaccine Congress, 2016 年 9 月 4 日～7 日、Amsterdam オランダ

7) Kyoko Nagayama¹, Nozomu Obana¹, Ryoma Nakao², Hidenobu Senpuku², Kouji Nakamura¹, Nobuhiko Nomura¹, Functional analysis of membrane vesicles released by intestinal bacteria, Interdisciplinary Workshop on Science and Patents (IWP)2016, 2016 年 9 月 2 日、筑波茨城県

8) 中尾龍馬、殺菌性を有する食品を利用した歯周病原細菌の制御に関する研究、第 58 回歯科基礎医学会、2016 年 8 月 24 日～28 日、札幌 北海道

9) Ryoma Nakao, A feasible intranasal vaccine strategy using bacterial outer membrane vesicles (OMVs) —the safety and cross-protective immunity—, Seminar at Karolinska Institutet, 2016 年 8 月 22 日、Stockholm Sweden

10) 永山恭子、尾花 望、中尾龍馬、泉福英信、中村幸治、野村暢彦、*Clostridium perfringens* のメンブランベシクルを介した宿主免疫誘導、グラム陽性菌ゲノム機能会議、2016 年 8 月 29 日～30 日、熱海 静岡県

11) 中尾龍馬、歯周病細菌由来ヴェシクルの経鼻粘膜ワクチンへの応用、第 30 回日本バイオフィルム学会学術集会、2016 年 7 月 2 日、東京

12) Nakao R. Y. Ogata, T Shimizu, H. Senpuku. Therapeutic implications of propolis and curry leaf against periodontitis, 94th General Session of International association for Dental Research, 2016 年 6 月 22 日～25 日、ソウル 韓国

13) 永山恭子、尾花 望、中尾龍馬、泉福英信、中村幸治、野村暢彦、Membrane vesicles of *Clostridium perfringens* induce host immune response, 日本農芸化学会 2016、2016 年 3 月、札幌 北海道

14) 吉益由莉、中尾龍馬、プロポリスによる *Porphyromonas gingivalis* の殺菌機序、第 89 回日本細菌学会総会、2016 年 5 月、大阪

15) 尾花 望、中尾龍馬、永山恭子、泉福英信、野村暢彦、Immunoactive membrane vesicles are actively produced by the Gram-positive clostridial pathogen, 第 89 回日本細菌学会総会、2016 年 5 月、大阪

16) 中尾龍馬、大西真、泉福英信、*Porphyromonas gingivalis* の外膜ヴェシクル・歯周病粘膜ワクチンの候補抗原としての評価、第 89 回日本細菌学会総会、2016 年 5 月、大阪

17) 中尾龍馬、ミツバチ産品による歯周病バイオフィルム制御方法の開発、山田養蜂場みつばち研究助成基金第 7 回成果発表会、2016 年 5 月、津山市 岡山県

18) Kyoko Nagayama, Nozomu Obana, Ryoma Nakao, Hidenobu Senpuku, Kouji Nakamura, Nobuhiko Nomura, Functional analysis of membrane vesicles produced by gram-positive intestinal bacteria, Interdisciplinary Workshop on Science and Patents (IWP) 2015, 2015 年 9 月、筑波茨城県

19) 永山 恭子, 尾花 望, 中尾 龍馬, 泉福英信, 中村 幸治, 野村 暢彦, ウェルシュ菌のメンブランベシクルを介した宿主免疫誘導、第 30 回日本微生物生態学会 2015、2015 年 10 月 土浦市 茨城県

20) 中尾龍馬、泉福英信、Porphyromonas gingivalis 外膜ヴェシクルは2型免疫応答を誘導する、第57回歯科基礎医学会、2015年9月、新潟市

21) Ryoma Nakao, Nozomu Obana, Kyoko Nagayama, Nobuhiko Nomura, Makoto Ohnishi, Hidenobu Senpuku, Assessment of immune responses in mice after intranasal immunization using outer membrane vesicles derive from 3 different Gram-negative pathogens、International Congress of Mucosal Immunology 2015、2015年7月、Berlin, Germany

22) 泉福英信、中尾龍馬、歯周病関連菌のLPSとその特徴、第58回春季日本歯周病学会学術大会、2015年5月、東京

23) Ryoma Nakao, Yuri Yoshimasu, Souichi Furukawa, Yasushi Morinaga, Hidenobu Senpuku, The mode of antimicrobial action of propolis on periodontopathic Gram-negative bacteria、Keystone Symposia, Gram-negative resistance、2015年3-4月、Tahoe, CA, USA

24) 尾花 望、中尾龍馬、中村幸治、泉福英信、野村暢彦、グラム陽性細菌のメンブランベシクルと動物細胞への作用、日本農芸化学会2015、2015年3月、岡山

25) 吉益由莉 泉福英信 中尾龍馬、プロポリスの歯周病原細菌に対する抗菌作用の検討、第88回日本細菌学会総会、2015年3月、岐阜市

26) 菊島健児、中尾龍馬、高速原子間力顕微鏡を用いた大腸菌からの外膜ヴェシクルの放出、第88回日本細菌学会総会、2015年3月、岐阜市

27) 永山恭子、尾花 望、中尾龍馬、泉福英信、中村幸治、野村暢彦、ウェルシュ菌が産生するメンブランベシクルは宿主の免疫応答を誘導する、第88回日本細菌学会総会、2015年3月、岐阜市

28) 吉益由莉 森永康 古川壮一 泉福英信 中尾龍馬、プロポリスの歯周病原性細菌に対する殺菌作用の検討、日本食品工学会関東支部会、2015年3月、東京

29) 菊島健児、中尾龍馬、樋口秀男、Imaging of Porphyromonas gingivalis infection using quantum dots、第43回日本免疫学会、2014年12月、京都市

30) 永山恭子、尾花 望、中尾龍馬、泉福英信、

中村幸治、野村暢彦、クロストリジウム属細菌が産生するメンブランベシクルは宿主細胞と相互作用する、環境微生物系学会合同大会2014、2014年10月、浜松市 静岡県

31) 永山恭子、尾花 望、中尾龍馬、泉福英信、中村幸治、野村暢彦、クロストリジウム属細菌が産生するメンブランベシクルは宿主細胞と相互作用する、グラム陽性菌ゲノム機能会議、2014年9月、山形県鶴岡市

32) 中尾龍馬、泉福英信、歯周病原細菌 Porphyromonas gingivalis に対するプロポリスの抗菌効果の検討、第56回歯科基礎医学会、2014年9月、福岡

33) Ryoma Nakao, Hidenobu Senpuku, Outer membrane vesicles of Porphyromonas gingivalis Bind to Magnetic Beads Coated with Epoxy Groups in a Noncovalent, Species-Specific manner、第56回歯科基礎医学会、2014年9月、福岡

34) Ryoma Nakao, Nozomu Obana, Nobuhiko Nomura, Makoto Ohnishi, Hidenobu Senpuku、P. gingivalis Membrane Vesicles Bind to Epoxy Groups on Magnetic Beads in a Species-Specific Manner、第87回日本細菌学会総会、2014年3月、東京都

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

中尾龍馬 (NAKAO, Ryoma)
国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官
研究者番号：10370959

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

泉福英信 (SENPUKU, Hidenobu)
国立感染症研究所・細菌第一部・室長
研究者番号：20250186

大西真 (OHNISHI, Makoto)
国立感染症研究所・細菌第一部・部長
研究者番号：10233214

高橋英之 (TAKAHASHI, Hideyuki)
国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官
研究者番号：60321866

小方頼昌 (OGATA, Yorimasa)
日本大学松戸・歯学部・教授
研究者番号：90204065

樋口秀男 (HIGUCHI, Hideo)
東京大学・理学部・教授
研究者番号：9016503

(4)研究協力者

該当なし