

令和元年6月4日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K11094

研究課題名(和文) 歯周病関連細菌の有する「OmpA様蛋白質」の宿主に対する病原性の解明

研究課題名(英文) Pathogenicity of OmpA-like protein of periodontopathic bacteria to the host cells

研究代表者

猪俣 恵 (Megumi, Inomata)

朝日大学・歯学部・准教授

研究者番号：40553798

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)：代表的な歯周病関連細菌であるPorphyromonas gingivalis (Pg)およびTannerella forsythia (Tf)は外膜蛋白質としてOmpA様蛋白質(OmpALPs)を有するが、OmpALPsの病原性への関与は明らかにされていない。本研究計画の実施によって、Pg由来OmpALPが血清抵抗性と細胞刺激性に関与すること、さらにはTf由来OmpALPの糖修飾様式と宿主レクチンへの結合能を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の実施によって、今まで理解されてこなかった歯周病関連細菌の有する主要な外膜蛋白質の宿主に及ぼす影響、すなわち病原性を明らかにすることができたと考えられる。得られた研究成果は、腸内細菌のOmpA蛋白質にも反映すると考えられるため、歯科医学のみならず、基礎医科学・生物学においても有益な知見となると思われる。

研究成果の概要(英文)：Porphyromonas gingivalis (Pg) and Tannerella forsythia (Tf), which are representative periodontopathic bacteria, have OmpA-like proteins (OmpALPs) as outer-membrane proteins, but the involvement of OmpALPs in the pathogenicity has not been clarified. This research revealed that Pg-derived OmpALP is involved in serum resistance and host cell stimulation, and the sugar modification of Tf-derived OmpALP.

研究分野：口腔免疫学、口腔細菌学

キーワード：歯周病関連細菌 自然免疫 血清抵抗性 糖修飾 外膜タンパク質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Porphyromonas gingivalis (Pg) および *Tannerella forsythia* (Tf) は偏性嫌気性グラム陰性桿菌であり、慢性歯周炎の原因菌として知られている。両菌は *Escherichia coli* の外膜タンパク質 OmpA と相同性が高い OmpA 様タンパク質 (OmpALPs) を主要外膜タンパク質として有している。*E. coli* の OmpA は宿主細胞への付着、血清抵抗性や補体の殺傷からの回避など様々な病原性に関与することが報告されているが、Pg および Tf の OmpALPs にも同様の働きがあるのかどうかは分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、歯周病関連細菌 Pg および Tf の OmpALPs の病原性への関与を明らかにすることを目的とし、主に OmpALP 欠損株および精製した OmpALP を用いて種々の実験を試みた。

3. 研究の方法

(1) 菌株と培養

Pg は ATCC 33277 株、Tf は ATCC 43037 株を野生型株 (WT) とした。Pg に関しては OmpALP 欠損株として WT から OmpALP 遺伝子 (*pg0695*, *pg0694*) を欠失させた株 (695, 694) および両遺伝子を欠失させた株 (695-694) を用いた。これらの菌株は 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ヘミンおよび 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ メナジオンを添加したトリプチケースソイブロス (Becton Dickinson and Company, USA) を用いて 37 $^{\circ}\text{C}$ 、嫌気条件下 (N_2 : 80%; CO_2 : 10%; H_2 : 10%) にて 24 時間培養し、菌液の OD₆₀₀ を 1.0 に調製した。Tf の培養には、N-アセチルムラミン酸を添加した。

(2) 細胞培養

ヒト歯肉線維芽細胞 (HGF) および RAW264.7 細胞は DMEM (抗菌薬不含、10%非働化ウシ血清含有) を用いて 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下で培養した。

(3) 細胞刺激性の評価

HGF に WT あるいは OmpALP 欠損株を multiplicity of infection 100 または 10 にて 24 時間感染させた後、細胞から全 RNA を抽出して cDNA に逆転写した。リアルタイム PCR は SYBR Premix Ex Taq (Takara, 日本) および *IL6*、*IL8* あるいは *Cxcl2* を検出するためのデザイン済みプライマー (Takara) を使用し Dice Real Time System TP800 (Takara) にて行った。得られた結果はハウスキーピング遺伝子である Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase とターゲット遺伝子である *IL6*、*IL8* あるいは *Cxcl2* との発現量を相対比較し解析した (Ct 法)。

(4) LPS の測定

上清中の LPS の濃度はリムルスカラー試薬 (和光純薬、日本) を用いて Infinite M200 PRO プレートリーダー (Tecan, Switzerland) にて比色定量して解析した。

(5) 生菌の増殖レベルの評価

生菌の増殖レベルは BacTiter Glo Microbial Cell Viability Assay Kit (Promega, USA) を用い、細菌由来の ATP の産生レベルをルシフェリンの発光を測定することで評価した。

(6) siRNA によるサイレンシング

RAW264.7 細胞に *Tlr2* siRNA、*Tlr4* siRNA またはコントロール siRNA (Thermo Fisher Scientific, USA) を Lipofectamine RNAi MAX (Thermo Fisher Scientific) を用いて導入した。

(7) 液体クロマトグラフィー質量分析

Tf 由来 OmpALP の糖鎖の解析は精製した OmpALP を利用し液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) によって行った。

(8) 精製 OmpALP の宿主細胞レクチンへの結合能

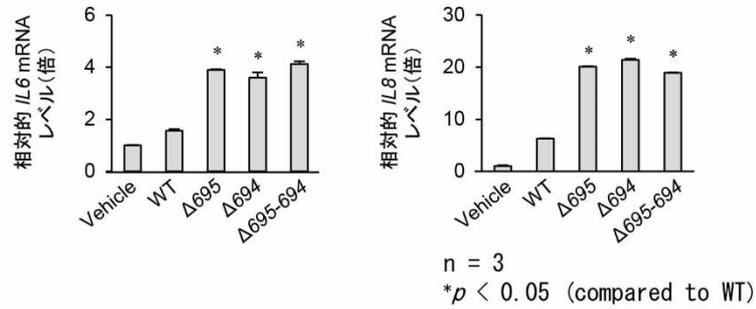
精製した OmpALP の宿主細胞レクチンへの結合能は、ELISA にて調べた。

4. 研究成果

(1) WT と OmpALP 欠損株の HGF 刺激性について

Pg の OmpALPs の病原性への関与を調べるため、まず HGF における WT と OmpALP 欠損株の細胞刺激性を *IL6* あるいは *IL8* を検出するためのデザイン済みプライマーを用いたリアルタイム PCR にて調べた。その結果、OmpALP 欠損株の *IL6* および *IL8* 遺伝子誘導能は WT に比べて有意に高かった (図 1)。この結果から、OmpALPs が欠損することで Pg の細胞刺激性が亢進することが考えられた。

図 1



(2) WT と OmpALP 欠損株の細胞刺激性への TLR2 と TLR4 の関与について

Pg の有する線毛および LPS はそれぞれ TLR2 および TLR4 を介して認識されることが知られている。WT と OmpALP 欠損株の細胞刺激性への TLR2 と TLR4 の関与を調べるため RAW264.7 細胞において TLR2 または TLR4 の発現を siRNA でノックダウンし、*Cxcl2* の発現量をリアルタイム PCR で調べた。WT の *Cxcl2* 遺伝子誘導能は *Tlr2* のノックダウンによってのみ抑制されたが、OmpALP 欠損株の細胞刺激性は *Tlr2* および *Tlr4* のいずれのノックダウンによっても抑制された (図 2)。この結果から、OmpALP 欠損株の細胞刺激性には TLR4 が主に関与していると考えられた。

(3) 非働化ウシ血清の WT と OmpALP 欠損株への影響について

線毛は菌体外に露出しているため TLR2 によって認識されるが、LPS、特に活性中心であるリピド A は外膜内に隠れているため、無傷の菌体では TLR4 に認識されない。従って、OmpALP 欠損株は培地中に含まれる何らかの成分により溶菌されている可能性が考えられた。培地中には 10% 非働化ウシ血清が含まれていることから、WT と OmpALP 欠損株を 10% 血清を含む PBS において嫌気条件下で培養し、培養後、上清中の LPS 量に違いが認められるどうかを調べた。その結果、OmpALP 欠損株の上清中の LPS 量は WT に比べ有意に多かった (図 3)。この結果から OmpALP 欠損株は培地中に含まれるウシ血清によって溶菌された結果、上清中に LPS を放出した可能性が考えられた。

図 2

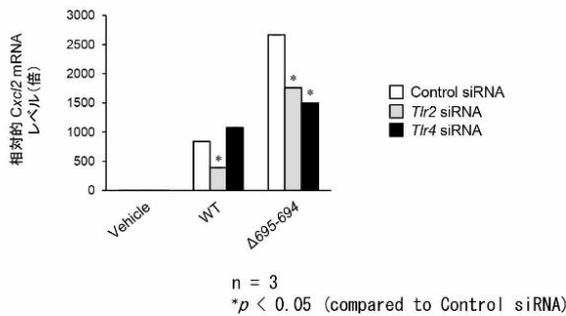
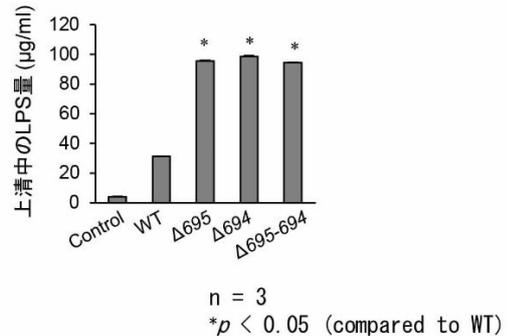


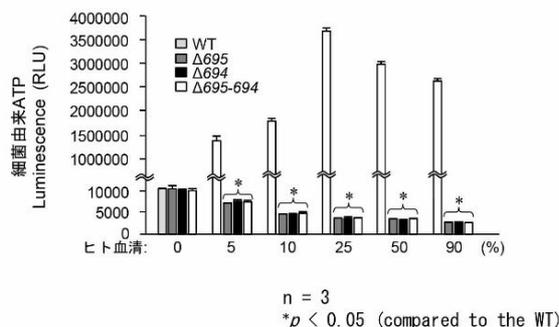
図 3



(4) ヒト血清の WT と OmpALP 欠損株への影響について

次にヒト血清の WT と OmpALP 欠損株への影響を調べるため、両菌株をヒト血清を含む PBS 中で嫌気培養した。WT は種々の濃度のヒト血清を含む PBS 中において増殖したが、OmpALP 欠損株は 5% 血清を含む PBS でも全く増殖しなかった (図 4)。この結果から、OmpALP 欠損株は血清を含む細胞培養培地中では生存できずに溶菌し、LPS を放出することで TLR4 を刺激すると考えられた。

図 4



(5) Tf 由来 OmpALP の質量分析

Tf 由来 OmpALP に関して、LC-MS によって O 結合型の糖鎖解析では、Hexose と HexNAc が検出された (図 5)。一方で N 結合型の糖鎖解析では、糖鎖が検出されなかった。

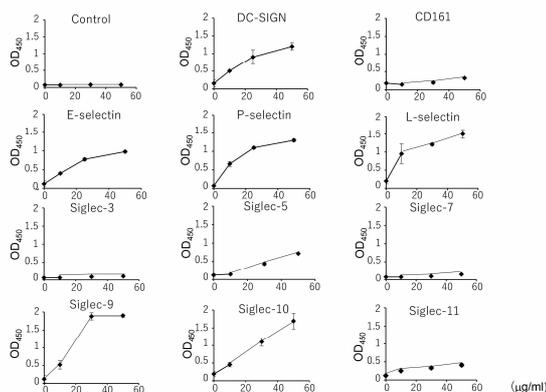
(6) Tf 由来 OmpALP の宿主細胞レクチンへの結合能

OmpA 様蛋白質は E-セレクトリン、P-セレクトリン、L-セレクトリン、Siglec-5、Siglec-9、Siglec-10、DC-SIGN および CLEC9a に強く結合した (図 6)。

図 5

Peak No.	Observed m/z	Calculated m/z	Ion species	Estimated glycan composition (GlycoMod database)
1	405.01	-	[M-H] ⁻	N/A
4	461.18	461.18	[M-H] ⁻	(Hexose) ₂
14	555.09	-	[M-H] ⁻	N/A
15	541.07	541.14	[M-H] ⁻	(Hexose) ₂ (Phosphate) ₁
16	418.99	-	[M-H] ⁻	N/A
17	577.10	-	[M-H] ⁻	N/A
21	557.07	-	[M-H] ⁻	N/A
34	272.49	-	[M-2H] ²⁻	N/A
35	280.49	-	[M-2H] ²⁻	N/A
41	296.99	-	[M-2H] ²⁻	N/A

図 6



本研究では Pg の所有する OmpALPs の病原性への関与を明らかにすることを目的とし、まず WT と OmpALP 欠損株の細胞刺激性を比較した。その結果、OmpALP 欠損株は WT と比較して IL6 の発現を有意に誘導し細胞刺激性を亢進した (図 1)。本研究で OmpALP 欠損株の細胞刺激性のメカニズムについても調べたところ、その細胞刺激性には TLR4 が関与していることが明らかになった (図 3)。さらなるメカニズムとして OmpALP 欠損株は細胞培養培地中に含まれる血清により溶菌され (図 4) LPS を上清中に放出する結果 (図 2) TLR4 を刺激していることが分かった。これらの結果から、OmpALPs は血清抵抗性に関与しており OmpALPs が血清による Pg の殺菌を抑制することで二次的に TLR4 を介した宿主細胞の活性化を抑制していることが考えられた。歯肉溝滲出液中には約 70% の血清が含まれており、種々の血清中殺菌成分が歯肉縁下の常在細菌の増殖を抑制している。無傷の Pg では LPS が外膜内に存在するため細胞刺激性は弱い、溶菌された場合には細胞刺激性を亢進することが明らかにされている。このことから Pg は OmpALPs の血清抵抗性に依存的に宿主の自然免疫系から回避し、歯肉溝滲出液中で生存していると考えられた。さらに Tf の所有する OmpALP に関しては、その糖鎖様式と特定の宿主細胞レクチンへの結合能を明らかにすることができた。

これらのデータは以下の論文中ですでに公表している。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

猪俣 恵、堀江 俊、引頭 毅 *Porphyromonas gingivalis* は OmpA 様蛋白質依存的に血清抵抗性を示す. 嫌気性菌感染症学会雑誌 48 巻・2 号、65-71 2018/12

Inomata M., Horie T., Into T. OmpA-like proteins of *Porphyromonas gingivalis* contribute to serum resistance and prevent Toll-like receptor 4-mediated host cell activation. PLoS One 13 巻・8 号、e0202791 2018/8 doi: 10.1371/journal.pone.0202791. eCollection 2018.

Horie T., Inomata M., Into T., Hasegawa Y., Kitai N., Yoshimura F., and Murakami Y. Identification of OmpA-like protein of *Tannerella forsythia* as an O-linked glycoprotein and its binding capability to lectins. PLoS One 11 巻・10 号、e0163974 2016/10 doi: 10.1371/journal.pone.0163974. eCollection 2016.

猪俣 恵、引頭 毅、堀江 俊、出水川 雅司、稲葉 裕明、長谷川 義明、北井 則行、村上 幸孝 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* の OmpA 様蛋白質を介した血管内皮細胞に及ぼす影響の解析 Bacterial Adherence and Biofilm 29: 87-91 2015/12
堀江 俊、猪俣 恵、出水川 雅司、長谷川 義明、稲葉 裕明、引頭 毅、北井 則行、村上 幸孝 歯周病関連細菌 *Tannerella forsythia* に存在する糖鎖修飾を有する OmpA 様蛋白質の分離とその性質の解析 Bacterial Adherence and Biofilm 29: 71-75 2015/12

[学会発表] (計 4 件)

猪俣 恵、引頭 毅、堀江 俊、村上 幸孝 *Porphyromonas gingivalis* は OmpA 様蛋白質依存的にヒト血清に抵抗性を示す 第 48 回日本嫌気性菌感染症学会総会・学術集会 2018/3

猪俣 恵、引頭 毅、堀江 俊、村上 幸孝 *Porphyromonas gingivalis* の OmpA 様蛋白質

質のヒト血清抵抗性への関与 第 59 回歯科基礎医学会学術大会 2017/9
猪俣 恵、引頭 毅、堀江 俊、村上 幸孝 *Porphyromonas gingivalis* の OmpA 様蛋白質の血清抵抗性への関与について 第 89 回日本細菌学会総会 2016/3
猪俣 恵、引頭 毅、稲葉 裕明、堀江 俊、長谷川 義明、北井 則行、村上 幸孝 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* の OmpA 様蛋白質を介した血管内皮細胞に及ぼす影響の解析 第 88 回日本細菌学会総会 2015/7

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：村上 幸孝
ローマ字氏名：
所属研究機関名：朝日大学
部局名：歯学部
職名：教授
研究者番号(8桁)：60239506

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。