

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20360

研究課題名(和文) 歯周病原性細菌による宿主自然免疫の回避機構の解析

研究課題名(英文) Mechanism analysis for evasion of periodontal pathogen from host innate immunity

研究代表者

竹内 洋輝 (Takeuchi, Hiroki)

大阪大学・歯学研究科・助教

研究者番号：40572186

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000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、Fast recycling に関わるとされるRab GTPaseの1つであるRab4A、およびその結合因子RUFY1と共局在を示した。また、歯肉上皮細胞のRab4A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Rab4A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 Rab4A, one of the Rab GTPases, has a key role in the fast recycling from early endosomes to plasma membrane. The objective of this study is to determine the involvement of Rab4A in intracellular localization of Pg. <Results> At 1-3 hour after infection, about one third of intracellular Pg was co-localized with Rab4A and RUFY1 in human immortalized gingival epithelial cells (HIGECs). Knockdown of Rab4A increased viable Pg in HIGECs, and caused accumulation of Pg in early endosomes even up to 5 h after infection. <Conclusion> Rab4A 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：口腔衛生学

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、歯周病患者から *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、菌の一部はライソゾームやオートファゴソームにより分解され、一部の菌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あて、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

ヒト不死化歯肉上皮細胞に *P. gingivalis* ATCC 33277 株を Multiplicity of infection 100 で感染した。

*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した。

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 を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) 歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* と Rab4A タンパク質との関連の解析

真核細胞の細胞内は多様な膜構造が存在し、これらの間を物質が適切に行きかうことで細胞は様々な生理機能を発揮している。このメンブレントラフィックと呼ばれる現象を制御する主要因子が Rab ファミリー G タンパク質である。ヒトでは60種類以上の Rab GTPase が同定されており、それぞれが特定のオルガネラに局在し、特異的な結合因子を膜状にリクルートすることで、そのオルガネラの機能に必要な分子群を誘導する。

そこで、どの Rab タンパク質が歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* に影響を及ぼすのが調べるため、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、初期エンドソームに存在することが報告されている Rab4A が *P. gingivalis* の生菌数に影響を及ぼすことを確認した。Rab4A 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* 生菌数の増加を認めた (Figure 1 and 2)。

Figure 1

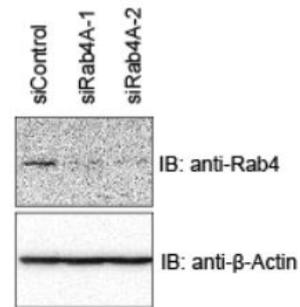
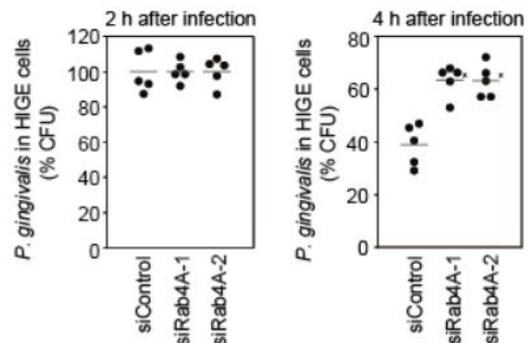
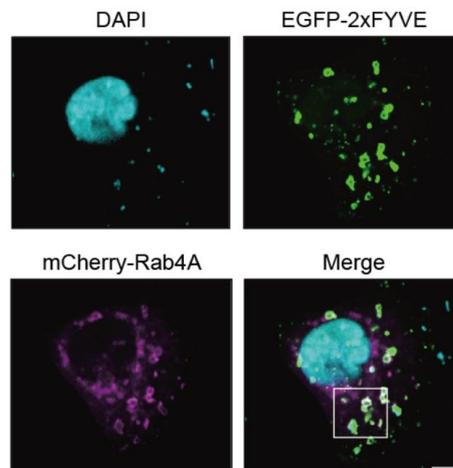


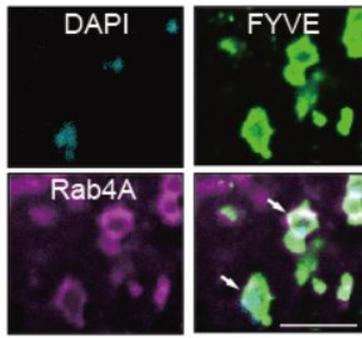
Figure 2



次に Rab4A 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、Rab4A と蛍光タンパク質との融合タンパク質を歯肉上皮細胞に発現させ *P. gingivalis* を感染し、その局在を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、感染後1-3時間において、Rab4A は *P. gingivalis* を含む初期エンドソームとよく共局在を示した (Figure 3)。

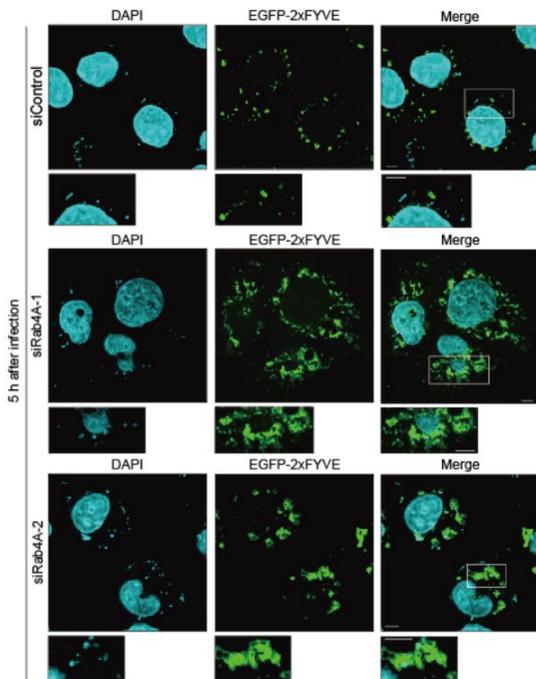
Figure 3



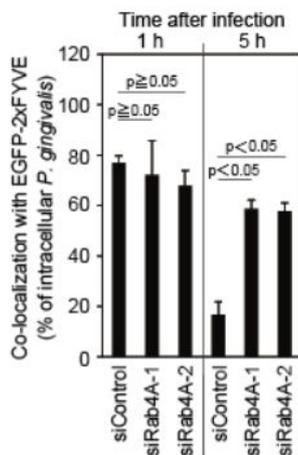


さらに、Rab4A をノックダウンした細胞では、感染後 5 時間において *P. gingivalis* と初期エンドソームとの共局在が多く認められた (Figure 4 and 5)。

**Figure 4**



**Figure 5**



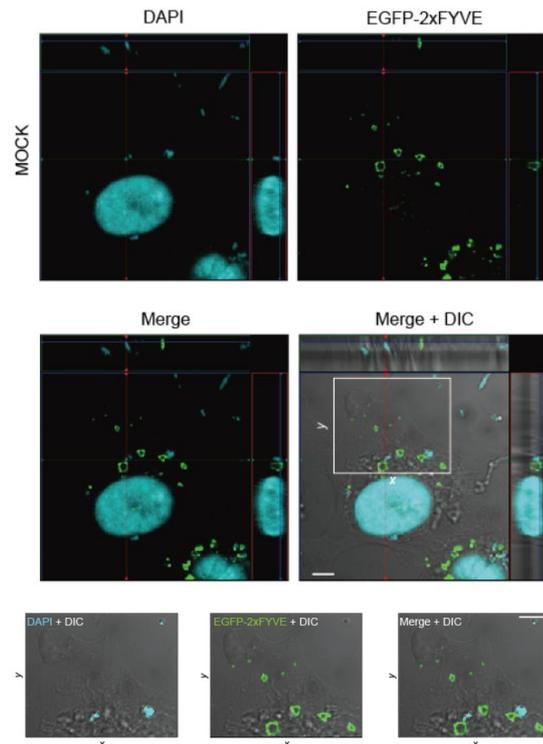
## (2) 歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* と CDC42 タンパク質との関連の解析

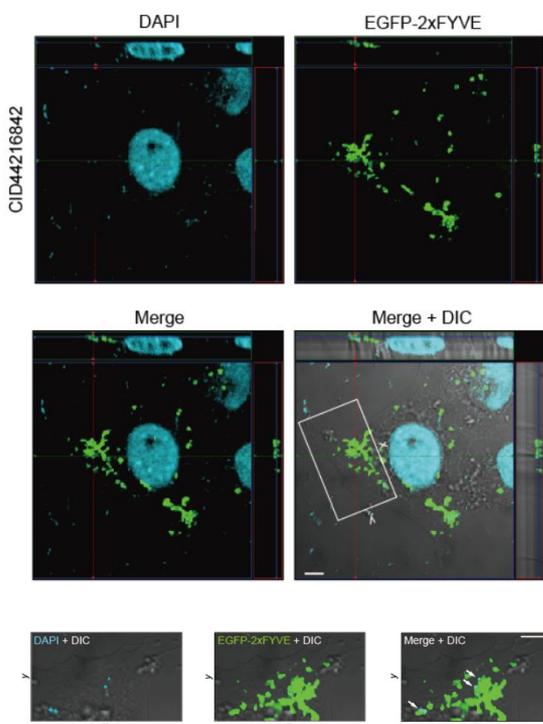
これまでに研究代表者は、歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* の細胞外脱出にアクチンが関与することを報告した。細胞骨格を制御する Rho ファミリー G タンパク質はヒトに約 20 種類存在するが、どのタンパク質が本菌の宿主細胞内動態に影響を与えるか、不明な点が多い。本研究では、特に CDC42 に焦点をあて、歯肉上皮細胞に侵入した *P. gingivalis* との関係を調べた。

まず、蛍光蛋白質 mCherry と CDC42 の融合蛋白質をコードするプラスミドを作製し歯肉上皮細胞へ発現させ、細胞内に侵入した *P. gingivalis* との共局在率を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、感染後 1 時間で本菌と mCherry-CDC42 は共局在を示した。

さらに、歯肉上皮細胞に侵入した *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 CDC42 が関与する可能性を解析するため、歯肉上皮細胞に *P. gingivalis* を感染後 CDC42 選択阻害剤である ML 141 または CID44216842 で処理し、菌の局在を共焦点顕微鏡で観察した。その結果、感染後 4 時間において対照群と比較し、初期エンドソームに局在する *P. gingivalis* が増加し、本菌を含む初期エンドソームが歯肉上皮細胞の辺縁部に蓄積するようになった (Figure 6)。

**Figure 6**





これらの結果より、CDC42 は歯肉上皮細胞に侵入した *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参与している可能性が示された。

## 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3件)

**Takeuchi H**, Takada A, Kuboniwa M, Amano A. Intracellular periodontal pathogen exploits recycling pathway to exit from infected cells, *Cellular Microbiology*, 18: 928-948, 2016.  
doi: 10.1111/cmi.12551.

Sakanaka A, **Takeuchi H**, Kuboniwa M, Amano A. Dual lifestyle of *Porphyromonas gingivalis* in biofilm and gingival cells, *Microbial Pathogenesis*, 94: 42-47, 2016.  
doi: 10.1016/j.micpath.2015.10.003.

Sakanaka A, Kuboniwa M, **Takeuchi H**, Hashino E, Amano A. Arginine-ornithine antiporter ArcD controls arginine metabolism and interspecies biofilm development of *Streptococcus gordonii*, *Journal of Biology and Chemistry*, 290: 21185-21198, 2015.  
doi: 10.1074/jbc.M115.644401.

[学会発表](計2件)

**竹内 洋輝**, 目 絵理子, 天野 敦雄. 歯肉上皮細胞に侵入した *Porphyromonas gingivalis* の細胞内動態の解析, 第27回近畿・中国・四国口腔衛生学会, 大阪, 大阪大学大学院歯学研究科, 2016年10月2日.

**竹内 洋輝**, 天野 敦雄. 歯肉上皮細胞に侵入した *Porphyromonas gingivalis* の細胞内動態の解析, 第26回近畿・中国・四国口腔衛生学会, 山口, 山口県歯科医師会館, 2015年9月27日.

[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・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：40572186