

機関番号：14401
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390534
 研究課題名（和文） 細菌やヒト細胞に存在する多機能タンパク質GAPDHが歯周病細菌感染に果たす役割
 研究課題名（英文） Role of multifunctional protein, GAPDH, associated with bacteria and human cells in infection by periodontopathic bacteria
 研究代表者
 永田 英樹（NAGATA HIDEKI）
 大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
 研究者番号：50260641

研究成果の概要（和文）：*Streptococcus oralis* GAPDHにおける*P. gingivalis*線毛結合領域はGAPDHのアミノ酸残基166-183に存在することが示された。これを基に作製したペプチド（pep166-183）は、種々の口腔レンサ球菌と異なる線毛型の*P. gingivalis*とのバイオフィーム形成を阻害した。また、pep166-183は強い菌体表層GAPDH活性を示した口腔細菌と*P. gingivalis*とのバイオフィーム形成も阻害した。ヒト細胞GAPDHにおいても*S. oralis* GAPDHと同じ領域に*P. gingivalis*線毛結合領域が存在することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study showed that a binding domain for *P. gingivalis* fimbriae may exist within amino acid residues 166 to 183 of *S. oralis* ATCC 9811 GAPDH. The peptide corresponding to amino acid residues 166 to 183 of *S. oralis* ATCC 9811 GAPDH (pep166-183) inhibited the interbacterial biofilm formation by several oral streptococci and *P. gingivalis* strains with different types of FimA. pep166-183 strongly inhibited biofilm formation between *P. gingivalis* and several oral bacteria which showed relatively strong cell surface-associated GAPDH activity. Moreover, we found that the binding domain for *P. gingivalis* fimbriae in human cell GAPDH may exist within the same domain as in *S. oralis* GAPDH.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2008年度 | 6,400,000 | 1,920,000 | 8,320,000 |
| 2009年度 | 5,300,000 | 1,590,000 | 6,890,000 |
| 2010年度 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |
| 年度 | 0 | 0 | 0 |
| 年度 | 0 | 0 | 0 |
| 総計 | 14,700,000 | 4,410,000 | 19,110,000 |

研究分野：予防歯科学

科研費の分科・細目：社会系歯学

キーワード：GAPDH、歯周病細菌、ヒト細胞、感染、付着

1. 研究開始当初の背景

歯周病細菌がその病原性を発揮するためには、まず、口腔内に定着することが必要である。我々は、これまでに、有力な歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* が口腔内に定着する際に、初期デンタルバイオフィーム形成菌である種々の口腔レンサ球菌表層に存

在する glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) が重要な役割を果たすことを報告した。GAPDH はその塩基配列が非常によく保存されている生体に必須のタンパク質で、解糖系酵素作用以外に、膜輸送・膜融合、タンパク質リン酸化作用、遺伝子の翻訳制御作用、DNA 複製・修復、アポト

ーシスやウイルス感染における関与など多機能な働きが報告されている。さらに、真菌やグラム陽性菌においては、GAPDH がプラスミノーゲンやファイブロンネクチンなどの宿主タンパク質と結合することが報告されており、この相互作用が微生物の付着や病原性に関連することが示唆されている。一方、グラム陰性菌においては、これまで、菌体外 GAPDH の病原性に関する報告はなかったが、最近、病原性大腸菌の菌体外 GAPDH がヒトプラスミノーゲンやフィブリノゲンと結合し、病原因子として作用することが初めて報告された。しかし、口腔内における GAPDH の役割については不明な点が多い。

2. 研究の目的

本研究では、口腔細菌の GAPDH がデンタルバイオフィーム形成にどのような役割を果たしているのかを明らかにするとともに、ヒト細胞や口腔細菌表層に存在する GAPDH が歯周病細菌感染の際に果たす働きを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *S. oralis* リコンビナント GAPDH の作製

S. oralis GAPDH 遺伝子は、制限酵素 *Bam*HI 認識配列 (下線部) とリジン配列 (AAA) を付加したフォワードプライマー (5' - CGCCGCGGATCCAAAGTAGTTAAAGTTGGTATTAACGGT -3') と、制限酵素 *Sa*II 認識配列 (下線部) と終止コドン付加したリバースプライマー (5' - GGCGCCGAATTCGTCGACATTATTTAGCGATTTTGGCG -3') を用いて PCR 法により増幅させた。PCR 産物はプラスミド pQE-30 にライゲーションし、*E. coli* M 15 (pREP4) 株に形質転換した。His-tag リコンビナント *S. oralis* GAPDH (rGAPDH) は HisTrap HP Kit を用いて精製した。

(2) *S. oralis* rGAPDH 断片の作製

rGAPDH 溶液にリシルエンドペプチダーゼを加え、暗所で 37°C、12 時間消化させた。rGAPDH 断片の分画は、HPLC にて行った。*P. gingivalis* FimA 線毛と最も強い結合活性を示した画分を収集後、凍結乾燥し、次のような酵素処理を行った。アスパラギン酸の N 末端を切断するために、エンドプロテアーゼ Asp-N を加え、37°C で 4 時間消化させた。アルギニンの C 末端を切断するために、トリプシンを加え、37°C で 4 時間消化させた。トリプシン処理により得られた画分を、さらに、グルタミン酸の C 末端で切断するために、エンドプロテアーゼ Glu-C を加え、25°C で 4 時間消化させた。酵素処理により得られた断片は前述と同様の方法で HPLC に展開し、BIAcore 2000 により各画分の *P. gingivalis* FimA 線毛結合活性を測定した。

(3) *S. oralis* rGAPDH 断片の *P. gingivalis* リコンビナント FimA への結合

P. gingivalis リコンビナント線毛 (I 型線毛、rFimA) と rGAPDH フラグメントとの結合活性の測定は、BIAcore 2000 を用いて行った。反応解析には BIAevaluation 3.1 を用いた。

(4) *S. oralis* rGAPDH 断片のアミノ酸配列の決定

S. oralis rGAPDH 断片のアミノ酸配列は、アミノ酸シーケンス、アミノ酸分析および質量分析法により決定した。

(5) 合成ペプチドの作製

S. oralis ATCC 9811 株 GAPDH アミノ酸残基 166-183 に相当するペプチド (pep 166-183; DNFGVVEGLMTTIHAYTG) と Pep 166-183 の疎水性アミノ酸残基をアラニンに置換したコントロールペプチド (DNAGAAEGAATTAHAYTG) の作製は Invitrogen Corp. に依頼した。

(6) *P. gingivalis* と口腔細菌とのバイオフィーム形成

口腔細菌はヘキシジウムイオダイド (HI) で染色し、 5×10^7 cfu を唾液で被覆した Culture Well™ Chambered Coverglass System に播種し、37°C で 16 時間、嫌気条件下で培養した。次に、*P. gingivalis* をフルオレセインイソチオシアネート (FITC) で染色し、 5×10^6 cfu を口腔細菌のバイオフィームを形成させたウェルに加え、さらに 37°C で 24 時間、嫌気条件下で培養した。阻害実験では、*P. gingivalis* を pep 166-183 またはコントロールペプチドとあらかじめ 30 分間反応させたものを用いた。

(7) バイオフィームの共焦点レーザー顕微鏡による観察

P. gingivalis と口腔細菌とのバイオフィーム形成の分析には共焦点レーザー顕微鏡

(CLSM) を用いた。無作為に 6 視野を撮影し、Imaris Software Ver. 5.0.1 を用いて口腔細菌と *P. gingivalis* の体積を算出した。バイオフィーム形成阻害率は以下の計算式に基づき算出した。阻害率 (%) = $(1 - A/B) \times 100$

(A: pep 166-183 またはコントロールペプチドを添加したときの口腔細菌に対する *P. gingivalis* の体積の比率、B: ペプチド無添加のときの口腔細菌に対する *P. gingivalis* の体積の比率の平均)

(8) 口腔細菌の菌体表層関連 GAPDH 活性の測定

GAPDH 活性の測定は、前田らの方法 (Maeda K, Nagata H, et al. *Microbes Infect.*, 6(13), 1163-1170, 2004.) に準じて行った。

(9) ヒト細胞 GAPDH と *P. gingivalis* 線毛との結合

ヒト細胞 GAPDH は市販の赤血球由来 GAPDH を使用した。*P. gingivalis* rFimA との結合

は Western blot および BIAcore により行った。ヒト赤血球 GAPDH 画分は、*S. oralis* GAPDH 画分と同様の方法で作製した。

(10) 統計解析

ペプチドのバイオフィルム形成阻害率の有意差検定は一元配置分散分析および Dunnett の検定にて行い、濃度依存性を検討するための傾向検定は Jonckheere-Terpstra 検定にて行った。統計ソフトは Excel 統計 2006 を用いた。

4. 研究成果

(1) *S. oralis* GAPDH の *P. gingivalis* FimA 線毛との結合部位の同定

種々の *S. oralis* GAPDH 画分と rFimA との結合活性を BIAcore により測定したところ、*S. oralis* ATCC 9811 株 GAPDH の *P. gingivalis* 線毛との結合部位はアミノ酸残基 166-183 に存在すると推定された。

(2) GAPDH の線毛結合領域に相当する合成ペプチドの結合特性

S. oralis ATCC 9811 株 GAPDH アミノ酸残基 166-183 に相当する合成ペプチド (pep 166-183) を作製し、*P. gingivalis* rFimA との結合特性を BIAcore により解析した結果、結合定数 (K_a) は $3.84 \times 10^8 / M$ と高親和性の結合であることが示された。

(3) pep 166-183 による *P. gingivalis* ATCC 33277 株と種々の口腔レンサ球菌のバイオフィルム形成の阻害効果

pep 166-183 により *P. gingivalis* ATCC 33277 株と *S. oralis* ATCC 9811 株のバイオフィルム形成は濃度依存的に阻害された (P for trend < 0.001)。一方、コントロールとして作製した pep 166-183 の疎水性アミノ酸残基を Ala に置換した合成ペプチドは、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度では、*P. gingivalis* ATCC 33277 株 - *S. oralis* ATCC 9811 株混合バイオフィルムの形成にほとんど影響を及ぼさなかった。

次に、pep 166-183 が種々の口腔レンサ球菌と *P. gingivalis* ATCC 33277 株とのバイオフィルム形成に及ぼす影響を検討した。pep 166-183 は、*P. gingivalis* ATCC 33277 株と *S. oralis* ATCC 10557 株、*S. gordonii* G9B 株、*S. sanguinis* ATCC 10556 株および *S. parasanguinis* ATCC 15909 株との混合バイオフィルム形成も濃度依存的に阻害した (P for trend < 0.001)。また、pep 166-183 に対するコントロールペプチドは、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度では、上記の口腔レンサ球菌と *P. gingivalis* ATCC 33277 株との混合バイオフィルム形成にはほとんど影響を及ぼさなかった。

(4) pep 166-183 による *S. oralis* ATCC 9811 株と FimA 線毛型別 *P. gingivalis* とのバイオフィルム形成の阻害効果

P. gingivalis ATCC 33277 株 (I 型線毛) とは異なる FimA 線毛型別に、OMZ 314 株 (II 型線毛)、6/26 株 (III 型線毛)、W 50 株 (IV 型線毛) および HNA 99 株 (V 型線毛) を選び、pep 166-183 による *S. oralis* ATCC 9811 株とのバイオフィルム形成への阻害効果について検討を行った。その結果、pep 166-183 は、*P. gingivalis* OMZ 314 株と *S. oralis* ATCC 9811 株との混合バイオフィルム形成を濃度依存的に阻害し (P for trend < 0.001)、その阻害効果は *P. gingivalis* ATCC 33277 株と *S. oralis* ATCC 9811 株の混合バイオフィルム形成阻害効果とほぼ同程度であった。*P. gingivalis* 6/26 株と *S. oralis* ATCC 9811 株との混合バイオフィルム形成量は、*P. gingivalis* ATCC 33277 株と *S. oralis* ATCC 9811 株とのバイオフィルム形成量より少ないものの、pep 166-183 は濃度依存的に混合バイオフィルム形成を阻害した (P for trend < 0.001)。 *S. oralis* ATCC 9811 株は *P. gingivalis* W 50 株や HNA 99 株と混合バイオフィルムは形成したものの、*P. gingivalis* ATCC 33277 株と比べてバイオフィルム形成量は非常に少なかったため、pep 166-183 がバイオフィルム形成に及ぼす阻害効果は検討できなかった。

(5) pep 166-183 による種々の口腔細菌と *P. gingivalis* とのバイオフィルム形成の阻害効果

種々の口腔細菌の菌体表層関連 GAPDH 活性を測定したところ、*Actinomyces israelii* DK2-3 株、*Actinomyces viscosus* ATCC 27044 株および *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* ATCC 43719 株に比較的高い活性がみられた。これらの口腔細菌と *P. gingivalis* ATCC 33277 株とのバイオフィルム形成は 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の pep166-183 により阻害された。

(6) ヒト赤血球由来 GAPDH における *P. gingivalis* 線毛結合部位の同定

Western blot および BIAcore によりヒト赤血球由来 GAPDH は *P. gingivalis* rFimA と特異的に結合することが示された。そこで、*S. oralis* ATCC 9811 株 GAPDH と同様の方法で線毛結合部位を同定したところ、ヒト GAPDH のアミノ酸残基 162-185 に存在し、*S. oralis* ATCC 9811 株 GAPDH とほぼ同じ領域が *P. gingivalis* 線毛との結合に関与していることがわかった。

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 8 件)

- ① M Kuboniwa, H Inaba, A Amano, Genotyping to distinguish microbial pathogenicity in periodontitis,

- Periodontology 2000, 査読有, 54, 2010, 136-159
- ② M Kuboniwa, RJ Lamont, Subgingival biofilm formation, Periodontology 2000, 査読有, 52, 2010, 38-52
- ③ M Kuboniwa, A Amano, H Inaba, E Hashino, S Shizukuishi, Homotypic biofilm structure of *Porphyromonas gingivalis* is affected by FimA type variations, Oral Microbiology and Immunology, 査読有, 24, 2009, 260-263
- ④ H Nagata, M Iwasaki, K Maeda, M Kuboniwa, E Hashino, M Toe, M Minamino, H Kuwahara, S Shizukuishi, Identification of binding domain of *Streptococcus oralis* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase for *Porphyromonas gingivalis* major fimbriae, Infection and Immunity, 査読有, 77, 2009, 5130-5138
- ⑤ M Kuboniwa, A Amano, E Hashino, Y Yamamoto, H Inaba, N Hamada, K Nakayama, GD Tribble, RJ Lamont, S Shizukuishi, Distinct role of long/short fimbriae and gingipains in homotypic biofilm development by *Porphyromonas gingivalis*, BMC Microbiology, 査読有, 9, 2009, 105
- ⑥ M Kuboniwa, EL Hendrickson, Q Xia, T Wang, H Xie, M Hackett, RJ Lamont, Proteomics of *Porphyromonas gingivalis* within a model oral microbial community, BMC Microbiology, 査読有, 9, 2009, 98
- ⑦ K Maeda, GD Tribble, CM Tucker, C Anaya, S Shizukuishi, JP Lewis, DR Demuth, RJ Lamont, A *Porphyromonas gingivalis* tyrosine phosphate is a multifunctional regulator of virulence attributes, Molecular Microbiology, 査読有, 69, 2008, 1153-1164
- ⑧ M Kuboniwa, Y Hasegawa, S Mao, A Amano, S Shizukuishi, RJ Lamont, O Yilmaz, *P. gingivalis* accelerates gingival epithelial cell progression through the cell cycle, Microbes and Infection, 査読有, 10, 2008, 122-128
- [学会発表] (計 15 件)
- ① K Maeda, M Kuboniwa, M Iwasaki, M Toe, E Hashino, H Nagata, Identification of *Porphyromonas gingivalis* client proteins with *Streptococcus oralis* GAPDH, 第 58 回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会, 21 November 2010, Kitakyushu
- ② 永田英樹, *Streptococcus oralis* GAPDH から同定された *Porphyromonas gingivalis* 線毛に結合するペプチドによるバイオフィーム形成の阻害, 第 59 回日本口腔衛生学会総会学術賞受賞講演, 2010 年 10 月 7 日, 新潟
- ③ M Kuboniwa, A Chawla, E Hashino, H Nagata, A Amano, M Hackett, RJ Lamont, S Shizukuishi, Role of 4-aminobenzoate in interspecies communication, 88th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research, 15 July 2010, Barcelona
- ④ E Hashino, M Kuboniwa, M Iwasaki, Y Yamamoto, K Suematsu, H Cho, S Shizukuishi, Effect of erythritol on periodontopathic biofilm development, 88th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research, 15 July 2010, Barcelona
- ⑤ H Nagata, M Iwasaki, E Hashino, M Toe, S Shizukuishi, GAPDH peptide inhibits *P. gingivalis* biofilm formation with oral bacteria, 88th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research, 15 July 2010, Barcelona
- ⑥ 橋野恵衣、東江正裕、田中宗雄、久保庭雅恵、エリスリトールが歯周病原性バイオフィーム構成細菌の代謝に及ぼす影響、大阪大学歯学会第 110 回例会、2010 年 7 月 8 日、吹田
- ⑦ 山本裕美子、久保庭雅恵、橋野恵衣、オクラポリサッカライドが歯周病原性バイオフィーム形成に及ぼす影響、第 21 回近畿・中国・四国口腔衛生学会総会、2010 年 6 月 20 日、松江
- ⑧ M Kuboniwa, E Hashino, M Toe, M Iwasaki, Y Yamamoto, S Shizukuishi, Role of 4-aminobenzoate in periodontopathic biofilm development, 第 83 回日本細菌学会総会, 27-29 March 2010, Yokohama
- ⑨ M Kuboniwa, EL Hendrickson, H Xia, E Hashino, S Shizukuishi, M Hackett, RJ Lamont, Proteomics of *Porphyromonas gingivalis* within a model oral microbial community, The 2009 Gordon research Conference on Periodontal Disease, 2-7 August 2009, Colby-Sawyer College
- ⑩ 岩崎未央、橋野恵衣、東江正裕、永田英樹、久保庭雅恵、雫石聡、デンタルバイオフィーム形成に及ぼす *Streptococcus*

oralis GAPDH ペプチドの影響、第 20 回
日本口腔衛生学会近畿・中国・四国地方
会総会、2009 年 6 月 20 日、広島

- ⑪ H Nagata, M Iwasaki, M Kuboniwa, K Maeda, S Sekine, S Shizukuishi, *Streptococcus oralis* GAPDH peptide inhibits *Porphyromonas gingivalis* biofilm formation, 87th General session & exhibition of the International Association for Dental Research, 1-4 April, 2009, Miami
- ⑫ M Kuboniwa, A Amano, E Hashino, S Shizukuishi, Distinct roles of major/minor fimbriae and gingipains in homotypic biofilm development by *Porphyromonas gingivalis*, Biofilms III: 3rd International Conference, 6-8 October 2008, Munich
- ⑬ 岩崎未央、永田英樹、久保庭雅恵、前田和彦、橋野恵衣、雫石聰、*Porphyromonas gingivalis* のバイオフィルム形成に及ぼす GAPDH ペプチドの阻害効果、第 57 回日本口腔衛生学会・総会、2008 年 10 月 2-4 日、さいたま
- ⑭ 岩崎未央、永田英樹、前田和彦、久保庭雅恵、橋野恵衣、雫石聰、*Porphyromonas gingivalis* 線毛への口腔レンサ球菌菌体表層 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase の結合部位の解析、大阪大学歯学会第 106 回例会、2008 年 7 月 17 日、吹田
- ⑮ M Kuboniwa, E Hashino, Y Yamamoto, RJ Lamont, S Shizukuishi, Role of *Streptococcus gordonii* Cbe protein in periodontopathic biofilm development, 86th General session & exhibition of the International Association for Dental Research, 2-5 July 2008, Toronto

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永田 英樹 (NAGATA HIDEKI)
大阪大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：5 0 2 6 0 6 4 1

(2) 研究分担者

久保庭 雅恵 (KUBONIWA MASAE)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：0 0 3 0 3 9 8 3
前田 和彦 (MAEDA KAZUHIKO)
大阪大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号：0 0 3 4 6 1 6 5

(3) 連携研究者

片岡 宏介 (KATAOKA KOSUKE)
徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス
研究部・准教授
研究者番号：5 0 2 8 3 7 9 2