

平成 22年 5月 5日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20791334

研究課題名 (和文) 歯周病菌の細胞内侵入機構の解明

研究課題名 (英文) The research of mechanism of *P. gingivalis* invasion

研究代表者

古田 信道 (FURUTA NOBUMICHI)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：50452446

研究成果の概要 (和文)：歯周病原因菌の一つであるグラム陰性菌 *Porphyromonas gingivalis* は細胞傷害性を有する小胞を分泌する。我々は *P. g.* - 小胞の細胞内侵入機構について検討したところ、小胞の細胞内侵入には Rac1、アクチン、PI3P、脂質、及び膜脂質ドメインであるラフトを利用したエンドサイトーシス機構が関与していることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)： *Porphyromonas gingivalis*, a periodontal pathogen, secretes outer membrane vesicles (OMVs) that contain major virulence factors, including major fimbriae and proteases termed gingipains, although it is not confirmed whether OMVs enter host cells. We analyzed the mechanisms involved in the interactions of *P. gingivalis* OMVs with human epithelial cells. OMVs adhered to cells in a fimbria-dependent manner and then entered via a lipid raft-dependent endocytic pathway. In addition, OMV-associated gingipains degraded cellular functional molecules such as Tfr and paxillin/FAK, resulting in cellular impairment. These results suggest that *P. gingivalis* OMVs are potent vehicles for transmission of virulence factors into host cells and are involved in the etiology of periodontitis.

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔細菌学

1. 研究開始当初の背景

グラム陰性菌においては宿主細胞に対し

それぞれ特定の病原性因子小胞 (Outer membrane vesicle; OMV) を放出し、様々な

毒性を発揮することが報告されている。歯周病の原因菌とされる *P. gingivalis* においても他のグラム陰性菌と同様に自身の膜がちぎれてできた *P. g.*-OMV を分泌することが知られており、放出される *P. g.*-OMV と菌とが複合的に機能することで細胞に対して障害を及ぼすと考えられている。しかし、*P. gingivalis* から放出される *P. g.*-OMV が及ぼす細胞毒性や細胞侵入機構についての詳細は全く未解明のままである。

2. 研究の目的

P. gingivalis が歯周病を引き起こす過程において、歯周組織を構成する細胞に付着・侵入することが、本菌の歯周病原性発揮に大いに寄与するといわれているが、その侵入経路の詳細については未解明な部分が多く残されている。我々は、*P. gingivalis* が宿主細胞のどのような機構を利用して細胞内に侵入し病原性を発揮しているのかを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *P. g.*-OMV が *P. gingivalis* の細胞内侵入に及ぼす役割

P. g.-OMV と各細胞内オルガネラマーカーである既知のタンパク質（例えば EEA1 や LAMP1 等）との共局在を共焦点レーザー顕微鏡により確認する。また、細胞内小胞輸送経路のマーカーとして広く用いられているトランスフェリンレセプターやデキストラン等と共局在を示すかどうかについても観察し、*P. g.*-OMV が通常のエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれるか否かについて検討する。

(2) *P. gingivalis* の侵入に関与する菌側の因子の探索

様々な細胞傷害性因子を欠失させた *P. gingivalis* ミュータント株 OMV が細胞内に侵入できるか否かについて共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察する。さらに線毛を菌体外に露出できないミュータント株 OMV や、その他の *P. gingivalis* ミュータント株 OMV の細胞内侵入能についても検討を加える。

(3) *P. g.*-OMV が破壊のターゲットとする因子の探索

P. gingivalis が破壊ターゲットとする因子を探索するために、*P. gingivalis* を感染させた細胞と、させていない細胞から様々な蛋白質を抽出し、それら細胞内蛋白量の増減をウエスタンブロットにより検出する。

4. 研究成果

(1) *P. g.*-OMV の細胞内侵入機構

P. g.-OMV の細胞内侵入には Rac1、アクチン、PI3P、脂質、及び膜脂質ドメインであるラフトを利用したエンドサイトーシス機構、つまり初期エンドソーム、後期エンドソームを経由して最終的にライソソームに到達することを明らかにした。加えて *P. g.*-OMV はエンドソームの著しい酸性化を引き起こすことも明らかにした。

(2) *P. gingivalis* の侵入に関与する菌側の因子、及び *P. g.*-OMV が破壊のターゲットとする因子の探索

Kgp や Rgp をそれぞれ欠失させた *P. g.* 変異株 OMV において、Rgp 欠損株 OMV は細胞内に侵入できず、また Rgp 阻害剤処理した野生株 OMV の細胞内侵入が阻害されたことから、OMV の細胞内侵入には Rgp が関与している可能性が示唆された。さらに Rgp 依存的にトランスフェリンレセプターを分解しトランスフェ

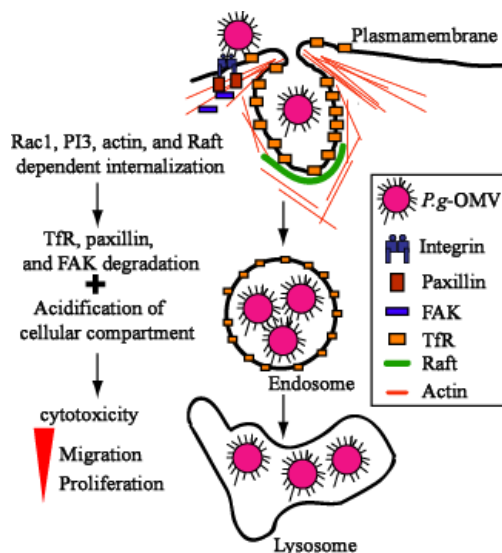
リンの細胞内取り込みを阻害し細胞傷害性を引き起こしていると考えられた。一方 Kgp はパキシリンや FAK を分解するが、Kgp 活性は細胞内侵入には関与していなかった。

(3) *P. g.* -OMV と細胞傷害性の関係

野生株 OMV を処理した細胞では増殖能、及び運動能低下が認められたが、Rgp 欠損株 OMV 処理の細胞はこれらがほぼ正常であったことから、*P. g.* -OMV は Rgp 依存的に効率的に細胞内に侵入し細胞傷害性機能を発揮していることが示唆された。

以上のことをふまえて、今後は *P. gingivais* と *P. g.* -OMV とが複合的に細胞に及ぼす影響について検討する必要があると思われる。

(4) *P. g.* -OMV の細胞内侵入と細胞傷害性機構についてのモデル図



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)

- ① Furuta N, Takeuchi H, and Amano A. Entry of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles into epithelial cells causes cellular functional impairment. *Infect Immun*, 77: 4761-70, 2009. (査読有り)
- ② Furuta N, Tsuda K, Omori H, Yoshimori T, Yoshimura F, and Amano A. Entry of *Porphyromonas gingivalis* outer membrane vesicles into human epithelial cells via endocytic pathway sorted to lysosomal compartments. *Infect Immun*, 77:4187-96, 2009. (査読有り)
- ③ Tsuda K, Furuta N, Inaba H, Kawai S, Hanada K, Yoshimori T, and Amano A. Functional analysis of $\alpha 5 \beta 1$ integrin and lipid rafts in invasion of epithelial cells by *Porphyromonas gingivalis* using fluorescent beads coated with bacterial membrane vesicle. *Cell Struct Funct*, 33:123-32, 2008. (査読有り)

[学会発表] (計 2 件)

- ① Furuta N, Amano, A. Invasion of host cells by membrane vesicles of *Porphyromonas gingivalis*. 第 87 回国際歯科研究学会、2009 年 4 月 3 日、Miami, Florida, Miami Beach Convention Center
- ② 古田 信道、天野敦雄 *Porphyromonas gingivalis* 病原性膜小胞の細胞侵入と細胞傷害性の解析 第 50 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2008 年 9 月 23 日、東京、TOC 有明
[その他]
<http://www.dent.osaka-u.ac.jp/~methodol/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

古田 信道 (FURUTA NOBUMICHI)

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：50452446