

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究(B)
 研究期間：2008～2009
 課題番号：20791638
 研究課題名（和文）バイオフィーム形成における歯周病細菌の新たな情報伝達系因子の役割
 研究課題名（英文）A *Porphyromonas gingivalis* tyrosine phosphatase is a multifunctional regulator of virulence attributes.
 研究代表者
 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：00346165

研究成果の概要（和文）：歯周病細菌である *Porphyromonas gingivalis* は Ltp1 酵素を発現する。本研究は Ltp1 の酵素活性を測定し、遺伝子をノックアウトしたミューテーション株を作製、利用して、初期デンタルバイオフィーム形成菌と結合するバイオフィーム形成能の違いを調べ、Ltp1 がバイオフィーム形成の情報伝達因子として重要な役割を果たしている可能性が高く、バイオフィーム形成における Ltp1 の役割を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：*Porphyromonas gingivalis*, an opportunistic oral pathogen, expresses a Ltp1. We characterized the enzymatic activity of Ltp1 and, through the use of the mutant that lack Ltp1, showed that the activity constrains biofilm development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：社会歯科学

科研費の分科・細目：社会歯科学

キーワード：歯周病、Phosphotyrosine phosphatase、バイオフィーム、*Porphyromonas gingivalis*
 口腔レンサ球菌、LuxS、共焦点顕微鏡、エキソポリサッカライド

1. 研究開始当初の背景

P. gingivalis が口腔内に定着するためには、複雑な菌叢によって構成されるバイオフィームの中で、*Actinomyces* や口腔レンサ球菌など、初期デンタルバイオフィーム形成菌への結合が重要であると考えられている。米国の研究グループが口腔レンサ球菌とバイオフィームを形成する *P.*

gingivalis 株と形成しない *P. gingivalis* 株との遺伝子発現の差を DNA マイクロアレイとリアルタイム PCR を使って調べた結果、*P. gingivalis* の RNA において 33 個の遺伝子に変化があることが報告されている (Simionato MR *et al.*, Infect Immun 74, 6419-6428, 2006.)。それらの遺伝子のうちの一つである *ltp1* 遺伝子の発現は、DNA マイ

クオレイで1.69倍、リアルタイムPCRで2.06倍の増加が認められ、Ltp1は菌体内に存在する分子量20kDaの低分子タンパク質で、サルモネラ菌においては、情報伝達因子としてクオラムセンシングに参与することやエキソポリサッカライドの発現増加に参与していることが報告されている(De Keersmaecker SC, Sonck K, Vanderleyden J, Trends Microbiol 14, 114-119, 2006.)。

*P. gingivalis*のLtp1はバイオフィーム形成の情報伝達因子として重要な役割を果たしている可能性が高く、バイオフィーム形成におけるLtp1の役割を明らかにすることにより、*P. gingivalis*のバイオフィームへの定着メカニズムの一端を解明できるのではないかという着想に至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、*P. gingivalis*におけるLtp1の役割を明らかにすることである。そのため、まず、Ltp1のリコンビナントタンパク質を作成し、酵素活性を測定し、他菌と比較する。さらに*ltp1*遺伝子をノックアウトしたミュレーション株や*ltp1*遺伝子を再挿入したコンプリメント株を作製、利用して、共焦点顕微鏡、リアルタイムPCRや二次元電気泳動などの最新の技術を用いて、バイオフィーム形成能やエキソポリサッカライドの発現量における野生株との違いを調べ、また*Vibrio Harvey*菌株におけるルシフェラーゼアッセイによるクオラムセンシングの違いを調べる。また、Ltp1によるチロシン脱リン酸化した*P. gingivalis*内在性のタンパク質についても同定する。これにより、*P. gingivalis*におけるLtp1の役割を明らかにし、バイオフィーム形成を制御する情報伝達系の一端を解明することができる。さらに、口腔レンサ球菌の表層タンパク質GAPDHを*P. gingivalis*にあらかじめ結合させることにより、*P. gingivalis*内在性タンパク質のLtp1によるチロシン脱リン酸化の状態がどのように変化するかを検討し、脱リン酸化されたタンパク質を同定することで、口腔レンサ球菌とのバイオフィームにおける情報伝達メカニズムの一端を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) リコンビナントLtp1の精製

P. gingivalis ATCC 33277の*ltp1*遺

伝子をベクターpET30bに挿入し、構築したプラスミドを形質転換した大腸菌*E. coli* BL21 (DE3)株から、超音波菌体破碎とニッケルカラム操作によりリコンビナントLtp1(rLtp1)を精製する。SDS電気泳動によってrLtp1の分子量と精製度を確認する。

(2) rLtp1の酵素活性の測定

ペプチド基質(DADE(pY)LIPQQG)を用いて、rLtp1が基質を脱リン酸化する際に生じるリンイオンにマラカイトグリーンが反応するホスホチロシンアッセイにより、酵素活性を測定する。阻害剤として、NaFやOrthovanadateを使用することにより、チロシンに特異的な酵素反応があることを確認する。

(3) コンプリメント菌株の作成

*P. gingivalis*の*ltp1*遺伝子のノックアウト株をコンピテント細胞にして、*ltp1*遺伝子を挿入したシャトルベクターpT-COWをトランスフォーメーションすることにより、コンプリメント株を作製する。

(4) 共焦点顕微鏡による口腔レンサ球菌とのバイオフィームアッセイ

スライドチャンバーに口腔レンサ球菌を一晩培養し、*P. gingivalis*の野生株、ノックアウト株およびコンプリメント株をそれぞれ共培養し、共焦点顕微鏡にてバイオフィーム形成状態を比較する。

(5) エキソポリサッカライドの測定

*P. gingivalis*の野生株、ノックアウト株およびコンプリメント株をそれぞれ培養し、各菌株からRNAを抽出し、逆転写酵素によってDNAに変換し、エキソポリサッカライドに関連した遺伝子群をリアルタイムPCRによって定量比較する。また、エキソポリサッカライド蛍光抗体を用いて、共焦点顕微鏡により発現量を比較する。

(6) クオラムセンシングへの影響

*Vibrio harvey*菌株を用いて、*P. gingivalis*のLuxSの影響によるオートインデューサーAI-2の変化をルシフェラーゼアッセイにより蛍光度測定器で測定する。

(7) 二次元電気泳動による*P. gingivalis*の内在性タンパクの脱リン酸化

*P. gingivalis*の野生株とノックアウト株のタンパク質をリン酸化チロシン抗体の結合したアガロースビーズで免疫沈降し、得られたサンプルを二次元電気泳動、ウエスタンブロットを行った後、リン酸化チロシン抗体を用いてスポッ

との違いを比較する。スポットのアミノ酸シーケンシングを行い、タンパク質を同定する。

(8) 二次元電気泳動による口腔レンサ球菌の GAPDH の影響による *P. gingivalis* の内在性タンパクの脱リン酸化の測定

口腔レンサ球菌のリコンビナント GAPDH を *P. gingivalis* の野生株と一晚培養し、全菌体タンパク質を二次元電気泳動し、ウェスタンブロットを行った後、リン酸化チロシン抗体を用いてスポットの違いを比較し、異なる位置に発現したスポットのアミノ酸シーケンシングを行い、タンパク質の同定を行う。さらに同定したタンパク質の遺伝子をノックアウトした菌株を作製し、共焦点顕微鏡によるバイオフィームアッセイを行い、野生株と比較する。これにより、*P. gingivalis* と口腔レンサ球菌とのバイオフィーム形成における情報伝達メカニズムの一端が明らかになる。

4. 研究成果

(1) rLtp1 の酵素活性の測定

E. coli BL21 (DE3) 株から発現させ、精製した rLtp1 を用いて、ホスホチロシンアッセイによる酵素活性を測定した。阻害剤として、NaF や Orthovanadate を使用することにより、チロシンに特異的な酵素反応があることを確認した。(図 1 A 参照)

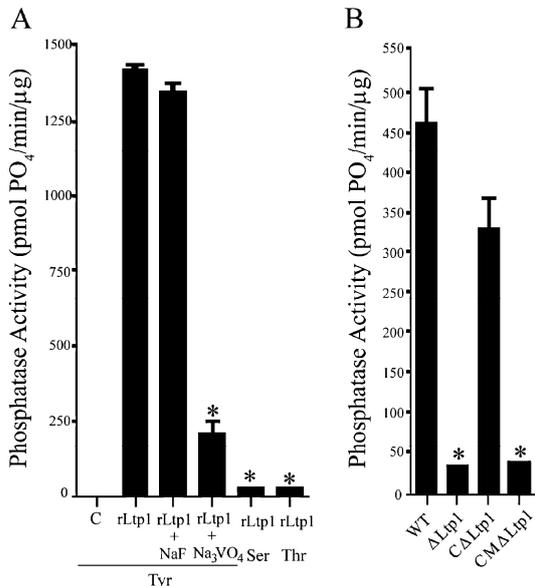


図 1 rLtp1 と *P. gingivalis* 株の酵素活性

(2) コンプリメント菌株の作成と酵素活性

P. gingivalis の *Ltp1* 遺伝子のノ

ックアウト株をコンピレーン細胞にして、*Ltp1* 遺伝子を挿入したシャトルベクター pT-COW をトランスフォーメーションすることにより、コンプリメント株を作製した。*P. gingivalis* 菌株表面のホスホチロシン酵素活性は *Ltp1* 遺伝子をノックアウトすることで特異的であることを確認した。また、*Ltp1* 遺伝子のキャタリティックドメインである ₈VCLGNICRS₁₈ のうち C¹⁰ を S に置換した相補株において酵素活性が減少したことを確認した。(図 1 B 参照)

(3) 共焦点顕微鏡による口腔レンサ球菌とのバイオフィームアッセイ

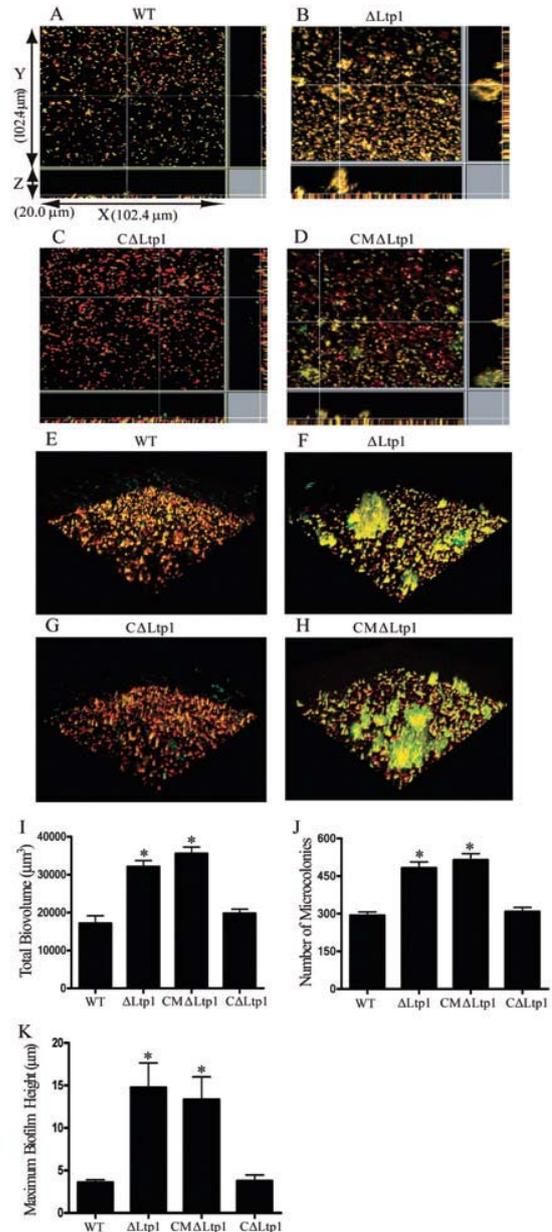


図 2 *Ltp1* の酵素活性による *P. gingivalis* 株と口腔レンサ球菌とのバイオフィームの影響

スライドチャンバーに口腔レンサ球菌を一晩培養し、*P. gingivalis* の野生株、ノックアウト株およびコンプリメント株をそれぞれ共培養し、共焦点顕微鏡にてバイオフィーム形成状態を比較したところ、*Itp1* 遺伝子を欠損させるとバイオフィームをより発達させることを確認した。(図2参照)

(4) *Itp1* による *P. gingivalis* の自己凝集の影響

スライドチャンバーに、*P. gingivalis* の野生株、ノックアウト株およびコンプリメント株をそれぞれ培養し、共焦点顕微鏡にて自己凝集状態を比較したところ、*Itp1* 遺伝子を欠損させると強い自己凝集を確認し、自己凝集において、mRNA 比較で *Itp1* 遺伝子が関与することを確認した。(図3参照)

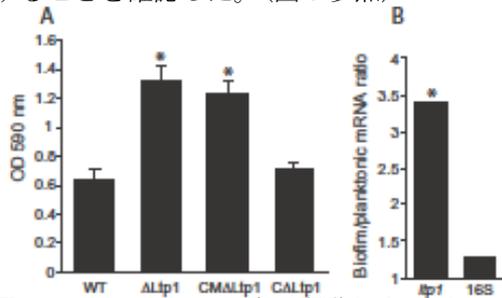


図3 *P. gingivalis* 自己凝集における *Itp1* の影響

(5) エキソポリサッカライドの測定

P. gingivalis の野生株、ノックアウト株およびコンプリメント株をそれぞれ培養し、各菌株から RNA を抽出し、逆転写酵素によって DNA に変換し、エキソポリサッカライドに関連した遺伝子群をリアルタイム PCR によって定量比較したところ、*Itp1* 遺伝子が欠損すると、*orf24*、*436*、*rfbD*、*porS*、*porR*、*wbbL* 遺伝子が増加し、*PG0106*、*PG0116* は減少した。また、共焦点顕微鏡を用いて、エキソポリサッカライド発現量を比較すると、*Itp1* 遺伝子が欠損することにより増加した。(図4参照)

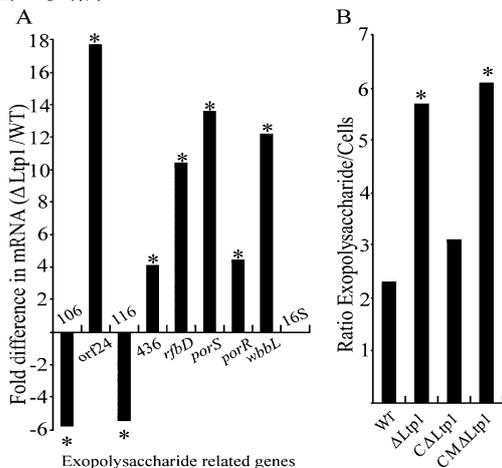


図4 *Itp1* 酵素活性によるバイオフィーム内のエキソポリサッカライドの調整

(6) クオラムセンシングへの影響

Vibrio harvey 菌株を用いて、*P. gingivalis* の *LuxS* の影響によるオートインデューサー AI-2 の変化をルシフェラーゼアッセイにより蛍光度測定器で測定したところ、*Itp1* との相関を確認した。(図5AとB参照) *P. gingivalis* の *Itp1* 遺伝子が欠損すると、*LuxS* に関係することでヘミンの摂取が減少し、ヘミン摂取関連遺伝子も減少する可能性を示唆した。(図5CとD)

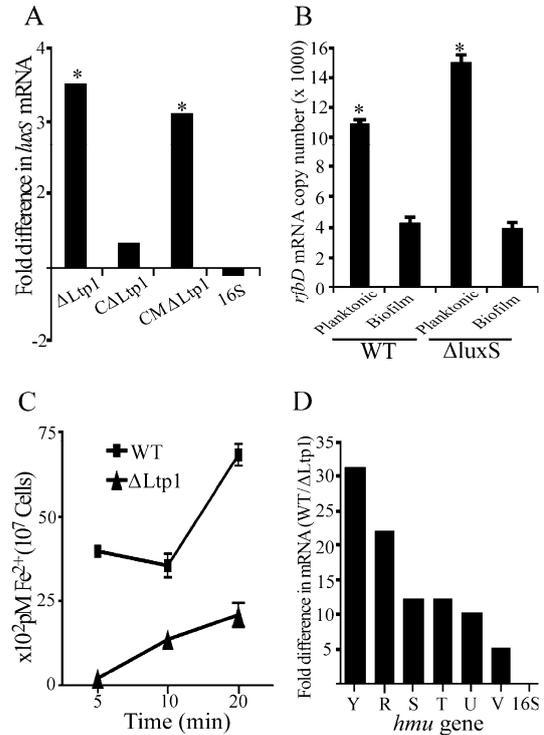


図5 *Itp1* による *P. gingivalis* 株の *LuxS* の影響

(7) 二次元電気泳動による *P. gingivalis* の内在性タンパクの脱リン酸化

P. gingivalis の野生株とノックアウト株のタンパク質をリン酸化チロシン抗体の結合したアガロースビーズで免疫沈降し、得られたサンプルを二次元電気泳動、ウエスタンブロットを行った後、リン酸化チロシン抗体を用いてスポットの違いを比較したところ、43-55 kDaのあたりにスポットが確認された。スポットのアミノ酸シーケンシングを行い、タンパク質を同定したところ、43 kDaのスポットからリシン特異的ジンジパイン (Kgp) とアルギニン特異的ジンジパイン (RgpB) が同定され、55kDaのスポットからアルギニン特異的ジンジパイン (RgpA) が同定された。(図6AとB参照) この結果から、*Itp1* が欠損すると Kgp と Rgp に影響があるということから、Rgp は上清に多く分泌され、Kgp は *P. gingivalis* 表層に多くあることが確認された。(図6C-F参照)

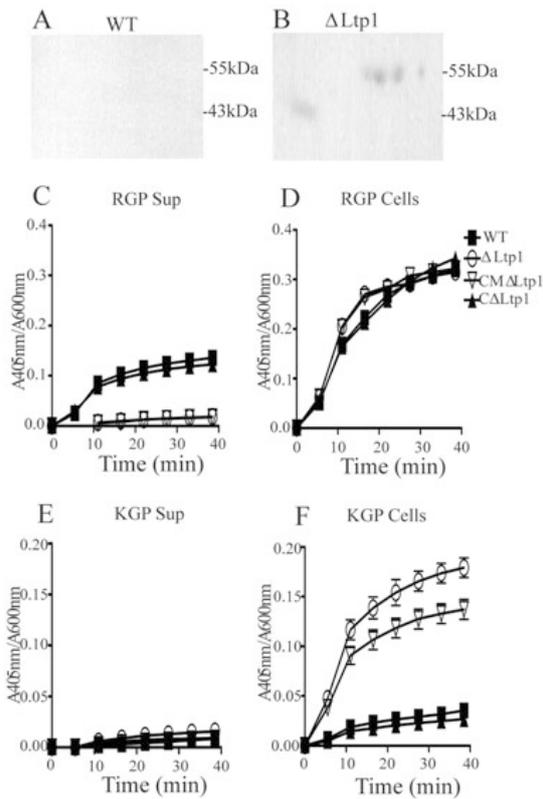


図6 Ltp1によるKgpとRgpの影響
 以上の結果より、バイオフィルムにおいてLtp1は新たな情報伝達系因子として多機能性を示すことを明らかとした。

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1件)

① Kazuhiko Maeda, Gena D. Tribble, Chelsea M. Tucker, Cecilia Anaya, Satoshi Shizukuishi, Janina P. Lewis, Donald R. Demuth and Richard J. Lamont
 A *Porphyromonas gingivalis* tyrosine phosphatase is a multifunctional regulator of virulence attributes, 69巻、Molecular Microbiology、査読有、2008、1153-1164

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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：00346165