

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 29 日現在

機関番号：83903

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670888

研究課題名(和文)酸化修飾タンパク質と歯周病病態との関連 - アダクトミクス応用による網羅的解析 -

研究課題名(英文)Correlation between oxidative modified protein and pathogenesis of periodontal disease

研究代表者

松下 健二 (Matsushita, Kenji)

独立行政法人国立長寿医療研究センター・口腔疾患研究部・部長

研究者番号：90253898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒト細胞内の酸化修飾タンパク質の網羅的解析を行うとともに、歯周病病態形成における酸化修飾タンパク質の役割を検討した。マクロファージ様細胞株RAW264を用い、同細胞においてs-ニトロシル化修飾を受けるタンパク質を網羅的に解析した。その結果、低分子量Gタンパク質の一種であるRab5が一酸化窒素(NO)によりニトロシル化され、細菌のファゴサイトーシスを亢進することが明らかになった。このようなタンパク質の酸化修飾は、歯周病原細菌に対する生体の防御機構の一つとして重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that oxidatively modified proteins are associated with the pathogenesis of chronic inflammatory diseases and infectious diseases. However, little is known about how the oxidative modification of proteins contributes to the pathogenesis of periodontal diseases. In this study, we explored oxidatively modified proteins in mammalian cells by an inclusive analyzing technique and examined the role of oxidatively modified proteins in the pathogenesis of periodontal diseases. We examined oxidatively modified proteins in the macrophage cell line RAW264 cyclopaedically and found that a small G-protein, Rab5, was s-nitrosylated in the cells. S-nitrosylated Rab5 enhanced bacterial pagocytosis in RAW264 cells. S-nitrosylation of proteins may be an important mechanism to protect periodontal tissues from infection with periodontopathic bacteria.

研究分野：歯周病学、口腔細菌学

キーワード：酸化修飾 活性酸素 Rab5 ファゴサイトーシス 歯周病 歯周病原細菌 マクロファージ 自然免疫

## 1. 研究開始当初の背景

生体分子の過酸化反応が虚血性心疾患、糖尿病、神経変性疾患等の慢性炎症性疾患の病態形成に深く関わっていること (Malhotra JD et al. *Antioxid Redox Signal* 9: 2277-2293, 2007.) が明らかにされつつあるが、活性酸素によるシグナル伝達経路修飾と病態との関連性といった視点から活性酸素の生理活性を捉える研究は十分ではない。活性酸素の一種である一酸化窒素 (NO) も cGMP の生成を介した生理活性以外に、タンパク質のチオール基を S-ニトロシル化 (SNO 化) し、タンパク質機能を可逆的に調整して細胞内シグナル伝達を制御するが、申請者はこれまで、NO が細胞内物質輸送の重要分子である N-エチルマレイミド感受性因子 (NSF) を SNO 化あるいは酸化して同分子の活性を制御することで細胞の分泌現象を調節することを明らかにしてきた (Matsushita K et al. *Cell* 115:139-150, 2003.; Matsushita K et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:11483-11487, 2004.; Matsushita K et al. *J Cell Biol* 170:73-79, 2005.; Matsushita K et al. *Blood* 105:207-214, 2005.; Jeong Y, Matsushita K et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:3782-3787, 2009.)。さらに、TLR シグナルの鍵分子 MyD88 の SNO 化により、自然免疫応答が調節されることも明らかにした (Into T..., Matsushita K *J Biol Chem* 282:8134-8141, 2007.; Into T..., Matsushita K *Mol Cell Biol* 28:1338-1347, 2008.)。このように、タンパク質の酸化的翻訳後修飾は細胞機能の調節に重要であり、その異常は様々な疾患の病態形成に繋がる可能性がある。歯周病の病態形成にも酸化的翻訳後修飾が関与している可能性があるが、両者の関連性については不明である。

## 2. 研究の目的

酸化により転写後修飾されたタンパク質が、生活習慣病、慢性炎症性疾患、感染症等の病態形成に関与することが示唆されているが、

歯周病の病態形成におけるそれらの分子の動態や細胞生物学的役割については不明である。加えて、タンパク質の酸化修飾変化を定量的に解析する方法も十分確立されていない。本研究では、アダクトミクスを応用した網羅的酸化修飾タンパク質の解析法を開発するとともに、その方法を用いて歯周病病態形成における酸化的翻訳後修飾タンパク質、特に S-ニトロシル化タンパク質の役割を検討する。

## 3. 研究の方法

1. 細胞：マウスマクロファージ様 RAW264 細胞株 (RIKEN BANK) を実験に供試した。同細胞を 10% FCS 添加 DMEM 培地を CO<sub>2</sub> インキュベーター内で継代維持し、実験に用いた。
2. S-ニトロシル化検出：上記細胞培養系に各種濃度の GSNO を添加した。同細胞におけるニトロシ化のタンパクを、LC/MS マススペクトロメトリーで解析した。また、合わせて、ビオチンスイッチ法 (Jaffrey, S.R. and Snyder, S.H. *Sci STKE* 2001) によってニトロシル化を評価した。

## 4. 研究成果

まず、我々は RAW264 細胞におけるニトロシル化タンパクについて、LC/MS マススペクトロメトリーによって網羅的に解析した。その結果、高頻度にニトロシル化される細胞内タンパク質が 13 種類存在することが明らかになった。また、その中に低分子 G タンパク質の一種である Rab5 が含まれていた。同タンパク質は、細胞のエンドサイトーシスに関与し、マクロファージ等の貪食細胞においては、最近などのファゴサイトーシスに重要な分子であることが知られている。そこで、NO とファゴサイトーシスとの関連性を明らかにするために、NO ドナーの一種である GSNO を RAW264 細胞に添加した後、*S. aureus* pHrode のファゴサイトーシスを調べた。その結果、GSNO を添加した RAW264 細胞において同プローブのファゴサイトーシスが上昇し

た。次に、NO 阻害剤である L-NAME を RAW264 細胞に添加し、*S. aureus* pHrode を用いたファゴサイトーシスアッセイを行った。その結果、L-NAME を添加した細胞では、ファゴサイトーシスは低下した。次に、Rab5 がニトロシル化されるか否かを組換え Rab5 タンパクに NO ドナーとして DEA-NONOate を添加し、ピオチンスイッチ法で検討した。その結果、不活性型 Rab5 と比較して活性型 Rab5 がニトロシル化されやすいことが明らかとなった。さらに、ファゴゾーム、Rab5 と iNOS との局在について解析を行った。その結果、LPS 刺激によって iNOS を発現した RAW264 細胞において、Rab5 と iNOS が、*S. aureus*-alexa fluor555 が存在する小胞で共局在していた。現在、in vivo における解析を行っているところである。

以上の結果より、NO がファゴサイトーシスを調節すること、NO が Rab5 をニトロシル化することが明らかとなった。

#### 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6件)

1. Kato Y, Hagiwara M, Ishihara Y, Isoda R, Sugiura S, Komatsu T, Ishida N, Noguchi T and Matsushita K: TNF-augmented *Porphyromonas gingivalis* invasion in human gingival epithelial cells through Rab5 and ICAM-1. BMC Microbiology, 14:229, 2014. (査読有) DOI:10.1186/s12866-014-0229-z.
2. Hagiwara M and Matsushita K: Epigallocatechin gallate suppresses LPS endocytosis and nitric oxide production by reducing Rab5-caveolin-1 interaction. Biomed Res. 35:145-151, 2014. (査読有)
3. Hagiwara M, Kokubu E, Sugiura S, Komatsu T, Tada H, Isoda R, Tanigawa N, Kato Y, Ishida N, Kobayashi K, Nakashima M, Ishihara K, Matsushita K: Vinculin and Rab5 Complex is Required for Uptake of Staphyrococcus aureus and Interleukin-6 Expression. PLOS ONE 9(1): e87373 (査読有) DOI:10.1371/journal.pone.0087373
4. Hagiwara M, Komatsu T, Sugiura S, Isoda R, Tada H, Tanigawa N, Kato Y, Ishida N, Kobayashi K, and Matsushita K: POT1b regulates phagocytosis and NO production by modulating activity of the small GTPase Rab5. Biochem Biophys Res Commun 439:413-417, 2013. (査読有) DOI:10.1016/j.bbrc.2013.08.018
5. Iohara K, Murakami M, Takeuchi N, Osako Y, Ito M, Ishizaka R, Utunomiya S, Nakamura H, Matsushita K, Nakashima M: A novel combinatorial therapy with pulp stem cells and granulocyte colony-stimulating factor for total pulp regeneration. Stem Cells Transl Med.2(7) 521-533 2013. (査読有) DOI:10.5966/sctm.2012-0132
6. Tanigawa N, Hagiwara M, Tada H, Komatsu T, Sugiura S, Kobayashi K, Kato Y, Ishida N, Nishida K, Ninomiya M, Koketsu M and Matsushita K: Acacetin inhibits expression of E-selectin on endothelial cells through regulation of the MAP kinase

signaling pathway and activation of NF- $\kappa$ B. Immunopharm Immunot 35:471-477,2013. (査読有)  
DOI:10.3109/08923973.2013.811596.

〔学会発表〕(計 2 1 件)

1. Wang J, Kobayashi K, Hagiwara M, Ishida N, Matsushita K: Analysis of the Regulatory Mechanism by which Shear Stress and Stretch Force Induce Nitric Oxide Production in Endothelial Cells. ASCB/IFCB meeting. Dec 9, 2014, Philadelphia, USA
2. Hagiwara M, Ishida N, Wang J, Matsushita K: Nitric oxide regulates phagocytosis by S-nitrosylation of Rab5. ASCB/IFCB meeting. Dec 8, 2014, Philadelphia, USA
3. 萩原真、石田直之、王静舒、松下健二: NO 修飾のファゴサイトーシスへの関与 第 37 回日本分子生物学会年会 2014/11/27 横浜
4. Hagiwara M, Ishida N, Wang J, Matsushita K: Nitric oxide regulates phagocytosis. 15th IUBMB-24th FAOBMB-TSBMB. Ooc 21-22, 2014, Taipei, Taiwan.
5. Ishida N, Ishihara Y, Ishida K, Tada H, Kato Y, Hagiwara M, Michikawa M, Noguchi T, Matsushita K: Periodontitis Induced by Porphyromonas Gingivalis Infection Exacerbates Features of Alzheimer's Disease in Transgenic Mice. 100th Annual Meeting of American Academy of Periodontology. Sep 20, 2014, San Francisco, USA.
6. 萩原真、石田直之、王静舒、松下健二: NO は化学修飾を介してファゴサイトーシスを調節する 光イメージングに興味のある若手研究者の会 2014/9/6-7 明石
7. 萩原真、石田直之、王静舒、松下健二: 細菌感染防御機構における一酸化窒素の新規な作用機構 第 9 回トランスポーター研究会 2014/6/14-15 名古屋
8. Makoto Hagiwara, Ryutaro Isoda, Yoshiko Kato, Naoyuki Ishida, Jingshu Wang and Kenji Matsushita: How is phagocytosis regulated by NO? The 66th Annual Meeting of Japan Society for Cell biology. June 11, 2014. Nara
9. Hagiwara M, Isoda R, Kato Y, Ishida N, Wang J, Matsushita K: Effect of Nitric Oxide on phagocytosis 名古屋グローバルリトリート、2014/2/14 大府
10. Hagiwara M, Kokubu E, Sugiura S, Komatsu T, Tada H, Isoda R, Tanigawa N, Kato Y, Ishida N, Kobayashi K, Jingshu W, Nakashima M, Ishihara K, and Matsushita K: Vinculin: a Novel Rab5-binding Protein Required for Internalization of Staphyrococcus aureus to Nonphagocytic Cells. The 5th International Symposium for Interface Oral Health Science. January 21, 2014. Sendai.
11. Ishida N, Ishihara Y, Ishida K, Tada H, Kato Y, Isoda R, Hagiwara M, Michikawa M, Noguchi T, Matsushita K: Periodontitis Induced by Bacterial Infection Exacerbates Features of Alzheimer's disease in Transgenic Mice. The 5th International Symposium for

- Interface Oral Health Science.  
January 21, 2014. Sendai.
12. 萩原真、磯田竜太郎、加藤佳子、石田直之、小林かおる、松下健二：ファゴサイトーシスにおける一酸化窒素の役割 第36回日本分生生物学会大会、2013/12/3 神戸
  13. Noguchi T, Ishida N, Ishihara Y, Ishida K, Kato Y, Michikawa M, and Matsushita K : Effects of periodontitis on Alzheimer's disease development in transgenic mice. IADR's 10th World Congress on Preventive Dentistry (WCPD). October 9, 2013, Budapest, Hungary
  14. 萩原真、磯田竜太郎、加藤佳子、石田直之、小林かおる、松下健二：一酸化窒素による Rab5 依存性エンドサイトーシス制御機構の解明 第86回日本生化学会大会 2013/9/11 横浜
  15. Ishihara Y, Ishida N, Ishida K, Kato Y, Noguchi T, Michikawa M, Matsushita K : Alzheimer's disease progress is induced by experimental periodontitis in transgenic mice. 10th Asian Pacific Society of Periodontology Meeting, September 3, Nara
  16. Kato Y, Hagiwara M, Ishihara Y, Isoda R, Sugiura S, Ishida N, Noguchi T and Matsushita K : Rab5 and ICAM-1 mediate TNF- augmented Porphyromonas gingivalis invasion in cells. The 2nd Meeting of the International Association for Dental Research-Asia Pacific Region. August 21, Bangkok, Thailand.
  17. Ishida N, Ishihara Y, Ishida K, Tada H, Kato Y, Isoda R, Hagiwara M, Michikawa M, Noguchi N, Matsushita K : Periodontitis Induced by Bacterial Infection Exacerbates Features of Alzheimer's disease in Transgenic Mice. Alzheimer's Association International Conference 2013. July 17, Boston, USA.
  18. Makoto Hagiwara, Eitoyo Kokubu, Shinsuke Sugiura, Toshinori Komatsu, Hiroyuki Tada, Ryutaro Isoda, Naomi Tanigawa, Yoshiko Kato, Naoyuki Ishida, Kaoru Kobayashi, Kazuyuki Ishihara and Kenji Matsushita : Interaction of vinculin and Rab5 in uptake of Staphylococcus aureus. 第65回日本細胞生物学会 June 2013. Nagoya
  19. 萩原真、国分栄仁、杉浦進介、小松寿明、多田浩之、磯田竜太郎、谷川順美、加藤佳子、石田直之、小林かおる、石原和幸、松下健二 : vinculin と Rab5 による Staphylococcus aureus の細胞内移行メカニズムの解析 第8回トランスポーター研究会年会、2013/6 熊本
  20. 石田直之、加藤佳子、磯田竜太郎、多田浩之、石田和人、石原裕一、道川 誠、野口俊英、松下健二 : アルツハイマー病と歯周病との関連性に関する研究 第55回春季日本歯周病学会学術大会 2013/5/31, 東京
  21. 萩原真、磯田竜太郎、加藤佳子、石田直之、小林かおる、松下健二 : 細菌が細胞内へ侵入する時の一酸化窒素の役割とそれを制御する食品由来因子の探索 第67回日本栄養食糧学会大会 2013/5 名古屋
- 〔図書〕(計9件)
1. Hagiwara M and Matsushita K :

- BIOMEDICAL RESEARCH-TOKYO, Epigallocatechin gallate suppresses LPS endocytosis and nitric oxide production by reducing Rab5-caveolin-1 interaction, 2014, 35:2
2. Isoda R and Matsushita K: Springer New York, The role of Protein Oxidative Modification in Periodontal Diseases, in Studies on Periodontal Disease. (Ekuni D, Battio M, Tomofuji T, and Putnins EE eds), 2014, Vol.1, pp.15-32
  3. 松下健二:医歯薬出版, 第2章慢性疾患の構図からみた歯周病の再発見慢性炎症 - 慢性疾患の分子的共通基  
1) 生活習慣病における慢性疾患. 慢性疾患としての歯周病へのアプローチ - 患者さんの生涯にわたる QOL に貢献するために. 野口俊英・林潤一郎編, 57-58, 2014.
  4. 松下健二:医歯薬出版, 第2章慢性疾患の構図からみた歯周病の再発見慢性炎症 - 慢性疾患の分子的共通基  
2) 慢性炎症における組織リモデリング. 慢性疾患としての歯周病へのアプローチ - 患者さんの生涯にわたる QOL に貢献するために. 野口俊英・林潤一郎編, 59-61, 2014.
  5. 松下健二:医歯薬出版, 第2章慢性疾患の構図からみた歯周病の再発見自然炎症としての歯周病1) - 自然炎症と内因性リガンド. 慢性疾患としての歯周病へのアプローチ - 患者さんの生涯にわたる QOL に貢献するために. 野口俊英・林潤一郎編, 62-64, 2014.
  6. 松下健二:医歯薬出版, 第2章慢性疾患の構図からみた歯周病の再発見自然炎症としての歯周病2) - 内因性リガンドが歯周炎に及ぼす影響. 慢性疾患としての歯周病へのアプローチ - 患者さんの生涯にわたる QOL に貢献するために. 野口俊英・林潤一郎編, 65, 2014.
  7. 松下健二:医歯薬出版, 第2章慢性疾患の構図からみた歯周病の再発見血管の炎症からみる歯周病1) - 歯周病における血管の炎症. 慢性疾患としての歯周病へのアプローチ - 患者さんの生涯にわたる QOL に貢献するために. 野口俊英・林潤一郎編, 66-67, 2014.
  8. 松下健二:医歯薬出版, 第2章慢性疾患の構図からみた歯周病の再発見血管の炎症からみる歯周病2) - 歯周病関連細菌が血管内皮細胞に及ぼす影響. 慢性疾患としての歯周病へのアプローチ - 患者さんの生涯にわたる QOL に貢献するために. 野口俊英・林潤一郎編, 68-69, 2014.
  9. 松下健二:財団法人東京顕微院, 働き世代から始める、健康寿命を延ばす口腔ケア～全身の健康と口腔の密接な関係とは. 2014.
- 〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)  
取得状況(計0件)
- 〔その他〕  
ホームページ等  
<http://www.ncgg.go.jp/department/odr/index.html>
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
松下 健二 (MATSUSHITA, Kenji)  
国立長寿医療研究センター・  
口腔疾患研究部・部長  
研究者番号: 9 0 2 5 3 8 9 8
- (2)研究分担者  
萩原 真 (HAGIWARA, Makoto)  
国立長寿医療研究センター・  
口腔疾患研究部・流動研究員  
研究者番号: 3 0 5 4 6 0 9 9
- (3)研究分担者  
多田 浩之 (TADA, Hiroyuki)  
東北大学・大学院歯学研究科・講師  
研究者番号: 7 0 4 3 1 6 3 2