



Title	Porphyromonas gingivalis によるリサイクリング経路を利用した歯肉上皮細胞からの脱出に係る分子基盤の解析
Author(s)	高田, 明比古
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56152
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏名(高田明比古)	
論文題名	<i>Porphyromonas gingivalis</i> によるリサイクリング経路を利用した歯肉上皮細胞からの脱出に係る分子基盤の解析
論文内容の要旨	
<p>歯肉上皮細胞は、バイオフィルム構成細菌の侵入から歯周組織を守る障壁であると考えられている。しかし、歯周病菌の一つである<i>Porphyromonas gingivalis</i> は、歯肉上皮細胞に侵入し組織深部へ感染を拡大することが可能である。これまでに、歯肉上皮細胞に侵入した <i>P. gingivalis</i> は、リサイクリング経路を利用し細胞外へ脱出することが報告されている。しかし、その詳細な分子基盤は不明である。そこで、本論文では <i>P. gingivalis</i> がどのような分子基盤により宿主細胞から脱出するのかについて検討を加えた。</p> <p><i>P. gingivalis</i> ATCC 33277 株を不死化歯肉上皮細胞へ感染させ、その細胞内動態を共焦点顕微鏡で観察すると、本菌は感染後1 時間で初期エンドソームに存在し、細胞内輸送小胞の融合を担う soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (SNARE) タンパク質の一つである、vesicle-associated membrane protein 2 (VAMP2) と共局在を示した。VAMP2 を RNA Interference (RNAi) でノックダウンした細胞において、感染後5 時間で初期エンドソームマーカーであるEGFP-2xFYVE (enhanced green fluorescent protein – 2x FYVE domain of early endosome antigen 1) と <i>P. gingivalis</i> は、対象群と比べ高い共局在率を示した。さらに、VAMP2 ノックダウン細胞において colony-formation units (CFU) アッセイを行ったところ、感染後4 時間で細胞内の生菌数は増加し、感染後6 時間で細胞培養液中の生菌数は減少した。このことより、VAMP2 は感染細胞からの <i>P. gingivalis</i> の脱出に関与する可能性が示された。</p> <p><i>P. gingivalis</i> が存在する初期エンドソームへ、VAMP2 がどのようにリクルートされるか検討した。VAMP2 は transmembrane domain (TMD) と coiled-coil domain (CCD) をもつ。歯肉上皮細胞に EGFP-2xFYVE と同時に TMD を欠失したmCherry-VAMP2 Δ(93-115), またはCCD を欠失したmCherry-VAMP2 Δ(31-91) やCherry-VAMP2 Δ(3-91) を一過性に形質転換し <i>P. gingivalis</i> を感染させた。初期エンドソームにおいて mCherry-VAMP2 Δ(93-115) は <i>P. gingivalis</i> と共に局在を示さなかった。しかし、mCherry-VAMP2 Δ(31-91) やmCherry-VAMP2 Δ(3-91) は野生型のVAMP2 と同様に、<i>P. gingivalis</i> と共に局在を示した。このことより、<i>P. gingivalis</i> を含む初期エンドソームへのリクルートに、VAMP2 の TMD が必要であることが示された。</p> <p>歯肉上皮細胞において VAMP2 はリサイクリング小胞の細胞膜への繫留を制御する、エキソシストの構成因子であるexocyst complex component 2 (EXOC2/Sec5) やEXOC3/Sec6 と複合体を形成する可能性を調べた。Myc-VAMP2 プラスミドを一過性に形質転換し免疫沈降法を行ったところ、VAMP2 が EXOC2 およびEXOC3 と TMD 依存的に複合体を形成した。さらに、EXOC3 ノックダウン細胞では対照群と比べ、感染後5 時間にわたり初期エンドソームに存在する <i>P. gingivalis</i> の局在率が増加した。このことより、エキソシストが初期エンドソームからの <i>P. gingivalis</i> の移送に関与することが示唆された。</p> <p>リサイクリング経路には、初期エンドソームから直接細胞膜へ戻る経路（ファストリサイクリング）と、リサイクリングエンドソームを通過し細胞膜へ戻る経路（スローリサイクリング）がある。ファストリサイクリングの制御因子で Rab ファミリー GTPase の一つである Rab4A と <i>P. gingivalis</i> の局在を調べた。Rab4A と <i>P. gingivalis</i> の共局在率は感染後3 時間でピークに達し、感染後5 時間まで共局在を示した。Rab4A ノックダウン細胞に <i>P. gingivalis</i> を感染させたところ、対照群と比べ、感染後5 時間で初期エンドソームに存在する <i>P. gingivalis</i> の局在率はほとんど減少しなかった。さらに、Rab4A ノックダウン細胞に CFU アッセイを行ったところ、感染後4 時間で細胞内の生菌数は増加し、感染後6 時間で細胞培養液中の生菌数は減少した。以上の結果より、<i>P. gingivalis</i> の脱出は Rab4A が関与するファストリサイクリングを利用する可能性が示された。また、Rab4A ノックダウン細胞では、対照群の細胞と比べ、<i>P. gingivalis</i> と後期エンドソーム/リソソーム、およびオートリソソームのマーカーである Rab7A との共局在率は減少しなかった。このことより、Rab4A は細胞内分解の場への <i>P. gingivalis</i> の移送に関与しないことが示唆された。</p> <p><i>P. gingivalis</i> 感染後3 時間で初期エンドソームに存在する <i>P. gingivalis</i> は、Rab4A や VAMP2 と共に局在を示した。このことより、Rab4A は VAMP2 とともにリサイクリング経路への関与が示唆された。VAMP2 とエキソシストとの複合体の形成を、Rab4A が制御する可能性があったため解析を加えた。免疫沈降法により、Rab4A をノックダウンした</p>	

細胞では、VAMP2 とEXOC2 またはEXOC3 との複合体の形成が増加した。このことより、Rab4A がVAMP2 とエキソシストが形成する複合体の解離を制御することが示唆された。

エキソシストはRat sarcoma like (Ral) に結合する複合体であることが知られている。RalA の細胞内局在について分析を加えた。その結果、RalA と共に局在する*P. gingivalis* が、VAMP2, Rab4A および初期エンドソームとも共局在を示した。このことより、RalA がVAMP2, Rab4A とともに細胞からの*P. gingivalis* の脱出に関与することが示唆された。

歯肉上皮細胞内の*P. gingivalis* とRab4A の関係を調べた。歯肉上皮細胞にmCherry-Rab4A, mCherry-Rab4A S22N (非活性型)、またはmCherry-Rab4A Q67L (活性型)を一過性に形質転換し*P. gingivalis* を感染させた。感染後3 時間で*P. gingivalis* はmCherry-Rab4A やmCherry-Rab4A Q67L と共に局在を示した。しかし、mCherry-Rab4A やmCherry-Rab4A Q67L と比較し、mCherry-Rab4A S22N と共に局在を示した*P. gingivalis* の割合は有意に減少していた。このことより、Rab4A は*P. gingivalis* を含むエンドソームへGTP 依存的にリクルートされる可能性が示された。

Rab4A の結合因子である RUN and FYVE domain-containing protein 1 (RUFY1/Rabip4) について、*P. gingivalis* を含むエンドソームにリクルートされるか検討を加えた。RUFY1 は感染後3 時間ににおいて、初期エンドソームに局在する*P. gingivalis* と共に局在を示し、Rab4A とも共局在した。しかし、Rab7A に局在する*P. gingivalis* とは共局在を示さなかった。この結果より、RUFY1 は*P. gingivalis* を含む後期エンドソーム/リソソームやオートリソソームではなく、*P. gingivalis* を含む初期エンドソームへリクルートされることが示唆された。

Rab14 はGTP 依存的にRUFY1 と結合し、エンドソーム膜上へのRUFY1 のリクルートに関与する。Rab14 と*P. gingivalis* の共局在を調べたところ、初期エンドソームに存在する*P. gingivalis* はRab14, Rab4A, RUFY1、およびVAMP2 と共に局在を示した。mCherry-Rab14, mCherry-Rab14 S25N (非活性型) またはmCherry-Rab14 Q70L (活性型) を歯肉上皮細胞に形質転換し *P. gingivalis* を感染させると、感染後1 時間ににおいて*P. gingivalis* はmCherry-Rab14 やmCherry-Rab14 Q70L と共に局在を示した。しかし、*P. gingivalis* とmCherry-Rab14 S25N はほとんど共局在を示さなかった。以上の結果より、Rab14 は*P. gingivalis* を含む初期エンドソームへGTP 依存的にリクルートされ、Rab4A やRUFY1 とともにファストリサイクリングにおいて機能することが示唆された。

non-receptor tyrosine kinase の一つであるbone marrow X kinase (BMX) がRUFY1 のチロシン残基のリン酸化を誘導する。Myc-RUFY1 とhemagglutinin (HA)-BMX のキメラタンパクを作製し、免疫沈降法によりRUFY1 のリン酸化を観察した。その結果、*P. gingivalis* 感染後5 分でRUFY1 のリン酸化を確認した。しかし、CCD 結合領域の変異体であるRUFY1 Y281/292F を形質転換したRUFY1 では、リン酸化は認められなかった。このことより、*P. gingivalis* 感染によりRUFY1 のY281/292 にリン酸化が誘導される可能性が示された。RUFY1 は感染後1 時間で*P. gingivalis* と共に局在を示したが、RUFY1 Y281/292F と*P. gingivalis* は明確な共局在を示さなかった。また、不活性変異体キナーゼであるBMX K445Q を歯肉上皮細胞に一過性に形質転換し*P. gingivalis* を感染させたところ、RUFY1 のリン酸化は認められなかった。以上の結果より、BMX のキナーゼ活性が*P. gingivalis* 感染によるRUFY1 のチロシン残基のリン酸化に必要であることが示唆された。

VAMP2 に結合するRho ファミリーG タンパク質の一つとして、cell division cycle 42 (CDC42) が報告されている。エンドソームに存在する活性型CDC42 の、細菌に対する役割は不明である。免疫沈降法により、細胞内のCDC42 とVAMP2 の複合体の形成を確認した。*P. gingivalis*と共に局在を示すVAMP2 はCDC42 とも共局在を示した。また、歯肉上皮細胞に*P. gingivalis* を感染させ、活性型CDC42 に対する非競合阻害剤であるCID44216842 およびML141 で歯肉上皮細胞を処理した。その結果、対照群と比べ、感染後4 時間ににおいても初期エンドソームに存在する*P. gingivalis* の局在率が増加した。以上の結果より、CDC42 の活性が歯肉上皮細胞における*P. gingivalis* の初期エンドソームからの移送に関与することが示唆された。

P. gingivalis の細胞侵入に伴いVAMP2 やRab4A は*P. gingivalis* を含む初期エンドソームへリクルートされる。VAMP2 はEXOC2/EXOC3 やCDC42 と複合体を形成し、初期エンドソームからの*P. gingivalis* の移送に関与する。*P. gingivalis* は細胞質に存在するRUFY1 のリン酸化を誘導し、RUFY1 を初期エンドソームへリクルートする。初期エンドソームへリクルートされたRUFY1 はRab4A やRab14 とともに、ファストリサイクリング経路において積荷物質の移送に関与する。そしてRab4A は VAMP2 とEXOC2/EXOC3との複合体の解離を制御する。

以上の結果より、*P. gingivalis* がファストリサイクリングを利用して細胞外へ脱出し、歯周組織での感染の拡大を果たすことが示唆された。

論文審査の結果の要旨及び担当者

	氏名 (高田 明比古)	
	(職)	氏名
論文審査担当者	主査 大阪大学 教授	天野 敦雄
	副査 大阪大学 教授	村上伸也
	副査 大阪大学 准教授	中田匡宣
	副査 大阪大学 講師	村上智彦

論文審査の結果の要旨

本研究では、歯肉上皮細胞に侵入した歯周病菌 *Porphyromonas gingivalis* が侵入細胞から脱出するために利用する宿主細胞の分子基盤について検討を加えた。

細胞内に侵入した *P. gingivalis* は初期エンドソームに捕獲される。しかし、SNARE タンパク質の VAMP2 や、Rab ファミリー GTPase の Rab4A、エキソシストの構成因子である EXOC2/Sec5、EXOC3/Sec6 や Rho ファミリーG タンパク質の CDC42、さらに RUFY1/Rabip4 などの機能分子が関与するファストリサイクリングを利用して、細胞外に脱出することが示された。

この研究は、*P. gingivalis* が歯周組織内で感染を拡大するために利用する宿主細胞分子基盤の解明に新たな知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位に十分値するものと認める。