

Aggregatibacter actinomycetemcomitans Y4株の細胞外マトリックスタンパクへの付着能に関する研究

Adherence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 to extracellular matrix proteins

佐藤節子

キーワード：*A. actinomycetemcomitans*,
フィブロネクチン, IV型コ
ラーゲン, 付着能



(さとう・せつこ)
ICDフェロー
歯科医師
歯学博士
日本大学歯学部
衛生学講座兼任講師

I. 緒言

*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*はグラム陰性桿菌であり、限局性の侵襲性歯周炎や慢性歯周炎の発症および進展に深く関与している¹⁻³⁾。口腔内細菌の多くは歯面に付着した後、バイオフィルムを形成して口腔内に定着する。*A. actinomycetemcomitans*も他の口腔内細菌とともにバイオフィルムを形成し、歯肉辺縁または歯肉縁下の歯面に定着する^{4, 5)}。また、同菌は歯肉上皮に付着するだけでなく⁶⁻⁸⁾、上皮を通過して歯周組織の深層にまで侵入することが知られている^{6, 9, 10)}。同菌の歯肉上皮への付着には、上皮組織やその直下の結合組織を構成する細胞外マトリックス (ECM) タンパクが深く関与している^{9, 10, 11)}。口腔内細菌とECMタンパクとの付着については、細菌性心内膜炎組織から検出されるグラム陽性レンサ球菌について詳細に検討され、フィブロネクチン、ラミニニンおよびコラーゲンに対する付着能が報告されている¹²⁻¹⁴⁾。*A. actinomycetemcomitans*についても感染性心疾患への関与が示唆されており^{15, 16)}、フィブロネクチンおよびコラーゲンに対する付着能が調べられている¹⁷⁾。しかし、歯周疾患を想定し、同菌の歯周組織への付着能を調べた報告は少なく、また、その分子機構を詳細に検討した報告はみあたらない。

そこで本研究では、歯周組織を想定して、*A. actinomycetemcomitans*の歯肉上皮下の結合組織を構成するECMタンパクへの付着の分子機構を調べることを目的として、4種類のECMタンパク (I型コラーゲン、IV型コラーゲン、フィブロネクチンおよびラミニニン) と*A. actinomycetemcomitans*菌体との付着能を検討し、さらに、ECMタンパクと付着親和性を示す同菌の菌体成分を検索した。

II. 実験方法

使用菌株および菌懸濁液の調整

本研究には、日本大学歯学部衛生学教室に -80°C で保存されている*A. actinomycetemcomitans* Y4株を、また同菌の培養には、Todd-Hewitt broth (Becton Dickinson) に1%Yeast Extract (Becton Dickinson) を添加した培地を用いた。培養後の細菌は、リン酸

塩緩衝液で2回洗浄後、0.02% (wt/vol) のbovine serum albumin (BSA;Sigma) を添加したPBSで 1×10^8 cells/mlの細菌数になるように調整した。

細菌細胞のECMタンパクへの付着実験

I型コラーゲン (ラット由来)、IV型コラーゲン (マウス由来)、フィブロネクチン (ヒト由来) およびラミニン (マウス由来) でコートされたBD BioCoat Cellware 96-well plates (BD Biosciences) の各wellに菌液を添加し、室温で1時間静置した。

フィブロネクチンおよびIV型コラーゲンに対する付着実験では、フィブロネクチン (ヒト由来、Gibco) およびIV型コラーゲン (ヒト由来、コラーゲンリサーチセンター) の同時添加が菌付着に与える影響についても調べた。これらのタンパクおよびBSAを $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 含む菌懸濁液を調製して室温で30分間静置後、前述のフィブロネクチンあるいはIV型コラーゲンがコートされたwellに加えた。なお、コントロールでは、菌懸濁液のみをwellに加えた。

付着反応後のwell内から非付着菌体を取り除いた後、クリスタルバイオレット液 (Sigma) を加えて付着菌体を5分間染色した。その後、エタノール (和光純薬) で色素を溶出し、マイクロプレートリーダー (Molecular Devices) を用いて波長595nmで測定した。

Ligand blottingによる菌体タンパクの検索

菌体タンパクをSDS-ポリアクリルアミドゲル (SDS-PAGE) 電気泳動したのち、PVDF膜 (Millipore) へ転写した。転写膜を4% (wt/vol) ブロックエース (大日本製薬) でブロッキング処理を施した後、 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ のフィブロネクチンまたはIV型コラーゲンを含む溶液に浸漬し、 4°C で一昼夜反応させた。その後、転写膜上の菌体タンパクに結合したフィブロネクチンあるいはIV型コラーゲンをマウス抗ヒトフィブロネクチン抗体 (Sigma) またはウサギ抗ヒトIV型コラーゲン抗体 (Chemicon) を用いて検出した。

統計分析

実験は3回繰り返し、結果は平均値と標準偏差で表した。また、有意差検定は、Bonferroni's modification of Student's *t*-testを用いて行い、危険率5%未満を有意とした。

Ⅲ. 実験結果

1. ECMタンパクコートwellへの菌体の付着

フィブロネクチンおよびIV型コラーゲンへの付着菌量は、I型コラーゲンおよびラミニンへの付着菌量に比べて有意に高い値を示した。なお、フィブロネクチンとIV型コラーゲンへの付着菌量との間には有意差は認められなかった (図1)。

2. フィブロネクチンコートwellへの菌体付着に及ぼすフィブロネクチンあるいはIV型コラーゲン添加の影響

フィブロネクチンコートwellへの菌体付着は、フィブロネクチンの同時添加によって有意に抑制された。また、IV型コラーゲン添加によって、フィブロネクチンコートwellへの菌体付着はフィブロネクチン添加と同レベル程度まで有意に抑制された (図2)。

3. IV型コラーゲンコートwellへの菌体付着に及ぼすIV型コラーゲンあるいはフィブロネクチン添加の影響

IV型コラーゲンコートwellへの菌体付着は、IV型コラーゲンの同時添加によって有意に抑制された。ま

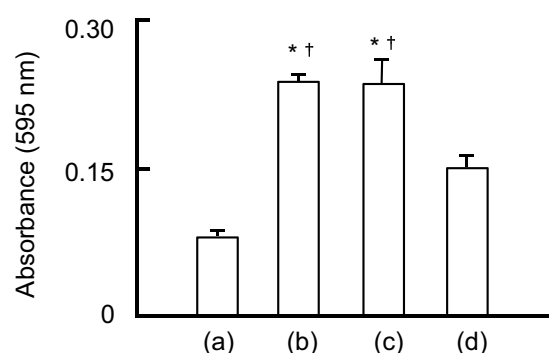


図1 *A. actinomycetemcomitans* Y4株のECMタンパクコートwellへの付着

(a)I型コラーゲン、(b)IV型コラーゲン、(c)フィブロネクチン、(d)ラミニン

* : I型コラーゲンに対して有意差あり ($p < 0.05$)

† : ラミニンに対して有意差あり ($p < 0.05$)

Fig. 1 Adhesions of *A. actinomycetemcomitans* Y4 cells to ECM protein-coated wells

(a)type I collagen, (b)type IV collagen, (c)fibronectin, (d)laminin

* : versus type I collagen ($p < 0.05$)

† : versus laminin ($p < 0.05$)

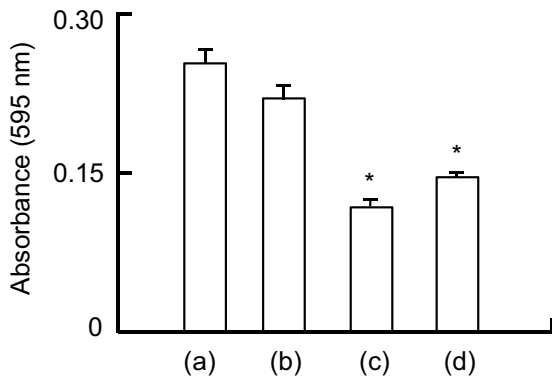


図2 *A. actinomycetemcomitans* Y4株のフィブロネクチンコートwellへの付着に及ぼすフィブロネクチンおよびIV型コラーゲン添加の影響

(a)コントロール、(b)BSA添加、(c)フィブロネクチン添加、(d)IVコラーゲン添加

*: controlに対して有意差あり ($p < 0.05$)

Fig. 2 Effect of addition of soluble fibronectin and type IV collagen on adhesions of *A. actinomycetemcomitans* Y4 cells to fibronectin-coated wells

(a)control, (b)addition of BSA, (c)addition of fibronectin, (d)addition of type IV collagen

*: versus control ($p < 0.05$)

た、フィブロネクチン添加によって、IV型コラーゲンコートwellへの菌体付着はIV型コラーゲン添加と同レベル程度まで有意に抑制された(図3)。

4. Ligand blottingによるフィブロネクチンおよびIV型コラーゲンに付着能を有する菌体タンパクの検索

フィブロネクチンを用いたligand blottingでは、フィブロネクチンとの結合を示す30～80kDaの菌体タンパクが複数検出され、特に約40kDaの移動度を示すバンドが顕著であった。また、IV型コラーゲンを用いたligand blottingにおいても、約40kDaのIV型コラーゲン結合性の分子が検出された(図4)。

IV. 考察

本研究は、歯周疾患進行の分子機構を解明するために、*A. actinomycetemcomitans* Y4株のECMタンパクへの付着能を調べた。その結果、同菌のECMタンパクへの付着能は、I型コラーゲンおよびラミニンに比べて、フィブロネクチンおよびIV型コラーゲンで有意に高かった。I型コラーゲンは歯肉結合組

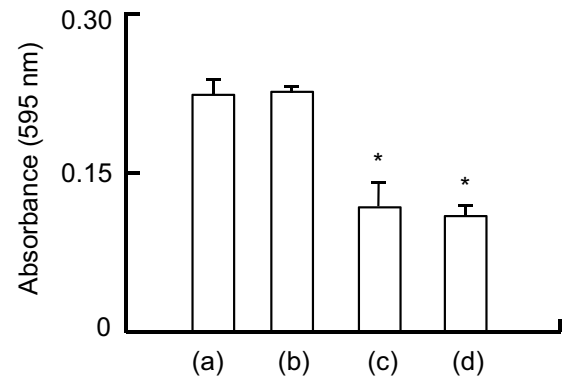


図3 *A. actinomycetemcomitans* Y4株のIV型コラーゲンコートwellへの付着に及ぼすIV型コラーゲンおよびフィブロネクチン添加の影響

(a)コントロール、(b)BSA添加、(c)IVコラーゲン添加、(d)フィブロネクチン添加

*: Controlに対して有意差あり ($p < 0.05$)

Fig. 3 Effect of addition of soluble type IV collagen and fibronectin on adhesions of *A. actinomycetemcomitans* Y4 cells to type IV collagen-coated wells

(a)control, (b)addition of BSA, (c)addition of type IV collagen, (d)addition of fibronectin

*: versus control ($p < 0.05$)

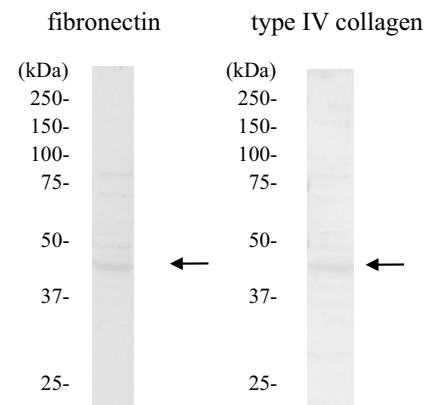


図4 *A. actinomycetemcomitans* Y4株由来の菌体タンパクとフィブロネクチンおよびIV型コラーゲンのligand blotting

Fig. 4 Ligand blotting of cellular proteins extracted from *A. actinomycetemcomitans* Y4, soluble fibronectin and type IV collagen

織、歯根膜、セメント質および歯槽骨に存在し、歯周組織を構成する主要なECMタンパクである¹⁸⁾。一方、IV型コラーゲンは、歯肉上皮細胞下の基底膜を構成するタンパクの一つである¹⁸⁾。コラーゲンと*A.*

*actinomycetemcomitans*の結合性については、Mintzら¹⁷⁾がSUNY 465株を用いて、I型からV型までの5種類のコラーゲンと菌体との結合性について調べ、SUNY 465菌体はI型およびV型コラーゲンへの付着結合能が高く、IV型コラーゲンへの付着能は最も低いと報告している。また、本研究で検討したY4株を含むSUNY 465以外の7種類の菌株についても検索を試み、Y4株のI型コラーゲンへの付着親和性が高いこと、さらに、その付着親和性は菌株間で大きく異なることを報告している¹⁷⁾。本研究結果とMintzら¹⁷⁾の報告とでは、Y4株が示すI型コラーゲンへの付着能が異なった。この理由の一つとして、培地に添加するYeast Extractの濃度および培養後の菌体の処理方法など、実験条件の相違が考えられるが、その相違を明らかにするためには、今後より詳細な検討が必要である。一方、IV型コラーゲンについては、Mintzら¹⁷⁾のSUNY 465株とは異なる結果であったが、彼らはY4株とIV型コラーゲンの付着親和性を検討していない。したがって、この相違は、菌株の違いと関連している可能性がある。

ラミニンは、基底膜に存在する巨大な糖タンパクであり、IV型コラーゲンやヘパリンとの結合能も有している^{19, 20)}。本研究では、基底膜成分としてIV型コラーゲンの他にラミニンへの付着能についても検討したが、ラミニンへの付着菌量は、IV型コラーゲンよりも低い値であった。本結果から、歯肉上皮下の基底膜への*A. actinomycetemcomitans* Y4株の付着、定着には、IV型コラーゲンの関与がより大きいと考えられた。現在、ラミニンには、少なくとも15種のアイソフォームの存在が知られている^{21, 22)}。しかし、本研究で用いた96 well コートのプレートには、ラミニンのアイソフォームに関する情報が記載されていない。したがって、*A. actinomycetemcomitans*のラミニンへの付着能については、アイソフォーム別に今後、詳細に検討して確認する必要がある。

フィブロネクチンは、分子内にコラーゲンやヘパリンに結合する部位をもち、ECMの不溶性高分子会合体を構成する接着性タンパクである。これまでに、*A. actinomycetemcomitans*がフィブロネクチンに対して高付着能を有することが報告されてお

り¹⁷⁾、本研究においても、*A. actinomycetemcomitans* Y4株のフィブロネクチンに対する付着能は、IV型コラーゲンと同様に高かった。この結果から、*A. actinomycetemcomitans* Y4株が歯肉結合組織に付着、定着する過程では、歯肉上皮下の基底膜に存在するIV型コラーゲンと、歯肉結合組織中のフィブロネクチンが重要な役割を果たしていることが示唆された。

本研究では、*A. actinomycetemcomitans* Y4菌体のフィブロネクチンコートwellへの付着は、フィブロネクチンの同時添加で有意に抑制された。また、IV型コラーゲンコートwellへの付着についても同様に、IV型コラーゲンの同時添加で有意に抑制された。これらの付着抑制は、フィブロネクチンおよびIV型コラーゲンと結合性を示す菌体表層分子に対するwell上の接着分子と、同時添加した接着分子との競合によって、菌体の付着が阻害されたことによるものと考えられた。また、本研究では、IV型コラーゲンの同時添加による菌体のフィブロネクチンコートwellへの付着抑制と、フィブロネクチンの同時添加による菌体のIV型コラーゲンコートwellへの付着抑制も認められた。このことから、*A. actinomycetemcomitans* Y4株にはフィブロネクチンおよびIV型コラーゲンへの付着に関与する共通の結合分子が存在している可能性が考えられた。そこで、SDS-PAGE電気泳動で菌体タンパクを分子量別に分離してPVDF膜に転写後、フィブロネクチンあるいはIV型コラーゲンを用いたligand blottingを行い、付着能を示す菌体タンパクの検索を試みた。その結果、フィブロネクチンおよびIV型コラーゲンに結合性を有し、約40kDaの移動度を示す菌体タンパクのバンドが確認された。この結果から、*A. actinomycetemcomitans* Y4株の分子量約40kDaの菌体タンパクが、フィブロネクチンとIV型コラーゲンの共通の付着因子である可能性が示唆された。

ECMタンパクの付着に関与する*A. actinomycetemcomitans*が有する付着因子としては、菌体タンパクで分子量約200kDaのEmaAがコラーゲンとの付着に関与することが報告されている²³⁾。すなわち、EmaAを欠損した*A. actinomycetemcomitans*はI、II、IIIおよびV型コラーゲンへの結合能が著しく低下する一方で、フィブロネクチンとの結合能には影響しないと報告されている

が、IV型コラーゲンとEmaAとの関連性は検討していない²³⁾。本実験でフィブロネクチンとIV型コラーゲンとの両方に結合能を示した約40kDaの菌体タンパクは、その分子量およびフィブロネクチンとの結合性から、EmaAとは異なる菌体タンパクであると考えられた。今後は、*A. actinomycetemcomitans*のフィブロネクチンおよびIV型コラーゲンへの付着における40kDaの菌体外膜タンパクの機能解析を行う必要がある。

V. 結 論

A. actinomycetemcomitans Y株のI型コラーゲン、IV型コラーゲン、フィブロネクチンおよびラミニンへの付着能を検討し、以下の結果および結論を得た。

1. フィブロネクチンおよびIV型コラーゲンへの付着菌量は、ラミニンおよびI型コラーゲンへの付着菌量よりも有意に高い値を示した。
2. フィブロネクチンへの付着は、フィブロネクチンおよびIV型コラーゲンの同時添加によって抑制された。
3. IV型コラーゲンへの付着は、フィブロネクチンおよびIV型コラーゲンの同時添加によって抑制された。
4. フィブロネクチンとIV型コラーゲンに高い付着能を有した菌体タンパクは、いずれも分子量約40kDaの移動度を示した。

以上のことから、*A. actinomycetemcomitans* Y4株は、フィブロネクチンおよびIV型コラーゲンに対して高い付着能を示し、分子量約40kDaの菌体タンパクが、それらへの共通の付着因子であることが示唆された。

参 考 文 献

- 1) Slots J, Listgarten MA : *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases, J Clin Periodontol ; 15 : 85-93, 1988.
- 2) Slots J, Reynolds HS : Genco RJ *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease: a cross-sectional microbiological investigation, Infect Immun ; 29 : 1013-1020, 1980.
- 3) Zambon JJ : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease, J Clin Periodontol ; 12 : 1-20, 1985.
- 4) Haase EM, Bonstein T, Palmer Scannapieco FA : Environmental influences on *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm formation, Arch Oral Biol ; 51 : 299-314, 2006.
- 5) Inoue T, Shingaki R, Sogawa N, et al. : Biofilm formation by a fimbriae-deficient mutant of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, Microbiol Immunol ; 47 : 877-881, 2003.
- 6) Meyer DH, Sreenivasan PK, Fives-Taylor PM : Evidence for invasion of a human oral cell line by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, Infect Immun ; 59 : 2719-2726, 1991.
- 7) Gasparetto A, Arana-Chavez VE, Lorenzetti Simionato MR, et al. : Adherence of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* on oral epithelial cells, New Microbiol ; 24 : 389-396, 2001.
- 8) Wu H, Fives-Taylor PM : Molecular strategies for fimbrial expression and assembly, Crit Rev Oral Biol Med ; 12 : 101-105, 2001.
- 9) Christersson LA, Albin B, Zambon JJ, Wikesjö UM, Genco RJ : Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. I. Light, immunofluorescence and electron microscopic studies, J Periodontol ; 58 : 529-539, 1987.
- 10) Christersson LA, Wikesjö UM, Albin B, et al. : Tissue localization of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontitis. II. Correlation between immunofluorescence and culture techniques, J Periodontol ; 58 : 540-545, 1987.
- 11) Meyer DH, Fives-Taylor PM : Adhesion of oral bacteria to soft tissue, Methods Enzymol ; 253 : 373-385, 1995.
- 12) Beg AM, Jones MN, Miller-Torbert T, et al. : Binding of *Streptococcus mutans* to extracellular matrix molecules and fibrinogen, Biochem Biophys Res Commun ; 298 : 75-79, 2002.
- 13) Lowrance JH, Hasty DL, Simpson WA : Adherence of *Streptococcus sanguis* to conformationally specific determinants in fibronectin, Infect Immun ; 56 : 2279-2285, 1988.
- 14) Switalski LM, Murchison H, Timpl R, et al. : Binding of laminin to oral and endocarditis strains of viridans streptococci, J Bacteriol ; 169 : 1095-1101, 1987.
- 15) Genco R, Offenbacher S, Beck J : Periodontal disease and cardiovascular disease: epidemiology and possible mechanisms, J Am Dent Assoc ; 133 Suppl : 14-22, 2002.
- 16) Paturel L, Casalta JP, Habib G, et al. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* endocarditis, Clin Microbiol Infect ; 10 : 98-118, 2004.
- 17) Mintz KP, Fives-Taylor PM : Binding of the periodontal pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to extracellular matrix proteins, Oral Microbiol Immunol ; 14 : 109-116, 1999.
- 18) Bartold PM, Narayanan AS : Molecular and cell biology of healthy and diseased periodontal tissues, Periodontol 2000 ; 40 : 29-49, 2006.
- 19) Romanos G, Schröter-Kermani C, Hinz N, et al. : Immunohistochemical distribution of the collagen types

- IV, V, VI and glycoprotein laminin in the healthy rat, marmoset (*Callithrix jacchus*) and human gingivae, Matrix, ; 11 : 125-132, 1991.
- 20) Tanzer ML : Current concepts of extracellular matrix, J Orthop Sci ; 11 : 326-331, 2006.
- 21) 鈴木喜晴, 野水基義 : ラミニンアイソフォームの活性部位の多様性と相同性, 生化学 ; 73 : 1215-1220, 2001.
- 22) 門谷裕一 : 上皮器官形成に関わるラミニンのドメイン, 生化学 ; 73 : 1221-1226, 2001.
- 23) Mintz KP (2004) Identification of an extracellular matrix protein adhesin, EmaA, which mediates the adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to collagen. Microbiology ; 150, 2677-2688.

●抄録● *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4株の細胞外マトリックスタンパクへの付着能に関する研究
／佐藤節子

口腔内細菌の歯周組織への付着は、歯周疾患の発症や進行の重要な病原因子と考えられている。歯周病原菌の一つである*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*は歯肉上皮に付着するだけでなく、歯周組織深層に侵入することが報告されている。本研究では、歯周組織を構成する細胞外マトリックスタンパクのうちI型およびIV型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンに対する*A. actinomycetemcomitans* Y4株の付着能について検討した。すなわち、細胞外マトリックスタンパクでコートされた96 wellプレートを用いて、同菌の付着菌量を比較検討した。その結果、同菌のフィブロネクチンおよびIV型コラーゲンへの付着菌量は、I型コラーゲンおよびラミニンへの付着菌量に比べて有意に高い値を示した。また、フィブロネクチンおよびIV型コラーゲンコートwellへの菌体の付着は、フィブロネクチンおよびIV型コラーゲンの同時添加によって有意に抑制された。フィブロネクチンおよびIV型コラーゲンと結合する菌体タンパクをligand blottingによって検索したところ、分子量約40 kDaの菌体タンパクが、両分子に対する高い結合能を示した。以上の結果から、*A. actinomycetemcomitans* Y4株はフィブロネクチンおよびIV型コラーゲンに高い付着能を示し、約40kDaの菌体タンパクが両分子に対する共通の付着因子であることが示唆された。

キーワード : *A. actinomycetemcomitans*, フィブロネクチン, IV型コラーゲン, 付着能

Adherence of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Y4 to extracellular matrix proteins

Setsuko SATO D.D.S., PhD.

Adherence of oral bacteria to periodontal tissue is the important virulence factor in the induction of periodontitis. Several investigators previously reported that *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, which is important pathogen in adult periodontitis, could adhere to epithelial cells and invade into periodontal tissue. In this study, the adherence of *A. actinomycetemcomitans* Y4 strain to extracellular matrix proteins that are parts of components of periodontal tissue was investigated using 96-well plates coated with type I collagen, type IV collagen, fibronectin and laminin. Large amounts of Y4 cells adhered to type IV collagen and fibronectin significantly compared with type I collagen and laminin. Adhesions of Y4 cells to the wells coated with fibronectin and type IV collagen were reduced significantly by the addition of the soluble fibronectin and type IV collagen, respectively. The bacterial proteins that bind to fibronectin and type IV collagen were identified by ligand blot analysis. The both of fibronectin and type IV collagen bound to the 40-kDa protein extracted from Y4 cells. These results suggested that *A. actinomycetemcomitans* Y4 cells displayed high affinity to fibronectin and type IV collagen, and that the 40-kDa protein in Y4 cells may act as an adhesion factor for both of fibronectin and type IV collagen.

Key words : *A. actinomycetemcomitans*, Fibronectin, TypeIV collagen, Adherence