

## *Porphyromonas gingivalis* LPS によるマウス B 細胞の増殖反応にかかわる 25 kDa チロシンリン酸化タンパク質の解析

下山 佑

岩手医科大学歯学部口腔微生物学講座

(主任：木村 重信 教授)

(受付：2006年12月22日)

(受理：2007年1月5日)

**Abstract** : To elucidate B cell activation induced by *Porphyromonas gingivalis*, the lipopolysaccharide (LPS)-induced B cell proliferation and tyrosine phosphorylation in B cells from C3H/HeN and LPS-hyporesponsive C3H/HeJ mice were examined. *P. gingivalis* LPS induced cell proliferation of both C3H/HeN and C3H/HeJ B cells, accompanied by the induction of tyrosine phosphorylation of selected proteins that included 25 kDa protein (p25). In contrast, *Escherichia coli* LPS activated only C3H/HeN B cells to proliferate and to induce tyrosine phosphorylation of p25. In order to characterize p25, *P. gingivalis* LPS-activated B cell lysates were separated by two-dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE). Two out of 8 spots of the candidates of p25 separated by 2D-PAGE were identified as Ran (Ras-like nuclear protein) by peptide mass fingerprinting with matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Western blotting analysis revealed that Ran existed as at least 4 spots in B cells with and without LPS stimulation. However, total amounts and the amount of the most acidic spot of Ran apparently increased by *P. gingivalis* LPS stimulation. These results suggested that quantitative alteration and tyrosine phosphorylation of Ran are involved in *P. gingivalis* LPS-induced B cell proliferation.

**Key words** : *Porphyromonas gingivalis*, LPS, B cell proliferation, tyrosine phosphorylation

### 緒 言

ヒトの歯周炎は *Porphyromonas gingivalis* をはじめとする歯周病原性細菌により惹起される疾患であることが明らかにされている。しかし、歯周病原性細菌の直接的な作用というよりは、歯周病原性細菌のビルレンス因子と宿主側の防御機構／細胞との相互作用の結果、歯周炎

が発症、進行するものと考えられている<sup>1)</sup>。実際、ヒトの歯周炎の病巣歯肉組織の病理組織学的観察結果によれば、歯周病原性細菌の直接的な侵入はまれ<sup>2)</sup>で、B細胞優勢の炎症性細胞浸潤像が観察されることが示されている<sup>3,4)</sup>。成人性(慢性)歯周炎の原因菌とされる *P. gingivalis*<sup>5,6)</sup>、*Prevotella intermedia*<sup>7,8)</sup> および *Tannerella forsythensis*<sup>9)</sup>、若年性(侵襲性)

Analysis of 25 kDa tyrosine phosphorylated proteins in *Porphyromonas gingivalis* LPS-induced mouse B cell proliferation

Yu SHIMOYAMA

Department of Oral Microbiology, School of Dentistry, Iwate Medical University

1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

歯周炎の原因菌とされる *Actinobacillus actinomycetemcomitans*<sup>10,11)</sup> といった歯周病原性細菌がいずれもグラム陰性嫌気性菌であることを考え合わせれば、歯周炎病巣局所では、グラム陰性菌の外膜に存在するリポ多糖 (LPS) がビルレンス因子として作用している可能性が高いと考えられる。それゆえ、歯周炎の発症・病状の進行には、*P. gingivalis* をはじめとする歯周病原性細菌の LPS による宿主防御機構を担う免疫担当細胞、特に B 細胞の活性化反応が深く関与することが強く示唆される。

LPS は、B 細胞およびマクロファージに対して、*in vitro* で増殖、分化を誘導し、それともなう炎症性サイトカインの産生を誘導するなど、多彩な免疫生物学的活性を示すことが知られている<sup>12,13)</sup>。しかし、その活性化機構については、マクロファージに関するものがほとんどで、LPS による B 細胞の活性化機構の詳細は依然不明な点が数多く残されている。

LPS によるマクロファージの活性化は、LPS が血清中の LPS binding protein (LBP) と複合体をつくり、細胞膜上の CD14, Toll-like receptor 4 (TLR 4) /myeloid differentiation protein-2 (MD-2) 複合体に結合し、細胞内へシグナルが伝達され惹起されることが示されている<sup>14,15)</sup>。マクロファージ内のシグナル伝達系は、異論もあるものの、最近の報告を総合すれば、myeloid differentiation factor 88 (MyD88), TNF receptor-associated factor 6 (TRAF6) から MAP キナーゼ, NF- $\kappa$ B を活性化して IL-1  $\beta$  や TNF- $\alpha$  産生を誘導する経路と、TRIF-related adaptor molecule (TRAM), Toll/IL-1 receptor containing adaptor including interferon- $\beta$  (TRIF) から interferon regulation factor 3 (IRF3) 活性化を通じて IFN- $\gamma$  の産生を誘導する経路の存在が示唆されている<sup>16,17)</sup>。

一方、LPS による B 細胞の活性化機構については、Kimura ら<sup>18)</sup> および及川<sup>19)</sup> が、CD14 依存性および CD14 非依存性の活性化経路が存在することを報告している。それらの報告によれ

ば、CD14 依存性の TLR 4 /MD-2 を介する活性化経路では NF- $\kappa$ B の活性化を通じて、TGF- $\beta$ , IgA の産生が誘導され、CD14 非依存性の活性化経路では細胞増殖、IL-6 産生および IgM 産生が誘導される。CD14 非依存性の細胞内シグナル伝達経路の詳細については明らかにされていないが、Dearden-Badet と Revillard<sup>20)</sup> および Kimura ら<sup>21)</sup> は、LPS による B 細胞の増殖反応には細胞内チロシンリン酸化が重要な役割を演じていることを報告している。さらに Kimura らは、24.8 kDa および 26 kDa の細胞内基質タンパク質のチロシンリン酸化が LPS 刺激による B 細胞の増殖活性に関連することを報告しているが、その本体については明らかにされていない。

細胞付着性の線毛<sup>22,23)</sup> やジンジパイン<sup>24,25)</sup> などのプロテアーゼとともに *P. gingivalis* の主要なビルレンス因子である LPS は、構造的に腸内細菌の LPS と異なり、その免疫生物学的な内毒素活性は、*Escherichia coli* の LPS と比較して弱いことが示されている<sup>26)</sup>。しかし、*P. gingivalis* LPS は、一方で、*E. coli* LPS に低応答性の C3H/HeJ マウス B 細胞に対しても増殖活性を示すという免疫生物学的な特異性を有することも示されている<sup>27)</sup>。そこで本研究では、歯周炎の病理発症機序にかかわる *P. gingivalis* LPS の B 細胞活性化機構の解明を目的として、*P. gingivalis* LPS 刺激により惹起される細胞増殖にともなう細胞内基質タンパク質のチロシンリン酸化、ならびにチロシンリン酸化細胞内基質タンパク質についての解析を行った。

## 材料および方法

### 1. LPS の調製

*P. gingivalis* 381 株を、Brain Heart Infusion 培地 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) に 5  $\mu$ g/ml hemin (SIGMA-ALDRICH Co., Irvine, UK) と 1  $\mu$ g / ml menadione (SIGMA-ALDRICH) を添加し、嫌気条件下で培養した。既報<sup>18,21)</sup> に従い、*P. gingivalis* 381 株の凍結乾燥菌体より、hot phenol-water 抽出

法を二度繰り返し、精製 LPS を調製した。*E. coli* LPS は、市販の *E. coli* K235 株由来 LPS (SIGMA-ALDRICH) を hot phenol-water 抽出法でさらに精製し、対照として使用した。

## 2. B 細胞の調製と増殖反応の測定

6-8 週齢の C3H/HeN および C3H/HeJ マウス (日本クレア, 東京) より採取した脾細胞を、10% ウシ胎児血清 (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) を含む RPMI1640 培地 (100 U/ml penicillin および 100  $\mu$ g/ml streptomycin 含有) (日研生物医学研究所 Co., 京都) に浮遊した。細胞浮遊液を滅菌 Sephadex G-10 (GE Healthcare Bio-Science Co., Piscataway, NJ, USA) カラム (0.8 x 6 cm) に添加し、吸着性の単球・マクロファージを除去し、カラムを通過した細胞を B 細胞とした<sup>28)</sup>。得られた B 細胞は、10% ウシ胎児血清を含む RPMI1640 培地で、37°C, 5% CO<sub>2</sub>-95% Air の条件下で培養した。*P. gingivalis* LPS および *E. coli* LPS (10  $\mu$ g/ml) を B 細胞 (2 x 10<sup>7</sup> cells/2 ml/well) に添加し、48 時間培養後の細胞数を計測した。また、実験によっては、チロシンキナーゼの阻害剤である herbimycin A (0.5  $\mu$ M; ALEXIS BIOCHEMICALS, Carlsbad, CA, USA) で 16 時間前処理した B 細胞を用いた。

## 3. 二次元電気泳動および細胞内チロシンリン酸化基質タンパク質の検出

細胞内リン酸化基質タンパク質の解析は、増殖反応と同条件で培養した細胞を用いて行った。*P. gingivalis* LPS で刺激後、回収した B 細胞に、Phosphatase Inhibitor Cocktail (SIGMA-ALDRICH) を含む lysis buffer (7.8 M urea, 2 M thiourea, 1.89% NP-40, 1 mM E-64, 0.05 mM PMSF, 0.1 mM TLCK, 10  $\mu$ g/ml aprotinin, 10 mM chymostatin および 0.5 mM EDTA) を加えて溶解し、B 細胞ライセートを調製した。B 細胞ライセートのタンパク質濃度はブラッドフォード法タンパク質定量試薬により測定した。B 細胞ライセート (150  $\mu$ g タンパク質) を、Immobilone IPG Dry-strip pH 3-10

NL (7 cm; GE Healthcare Bio-Science) を用いた等電点電気泳動および SDS-PAGE (12% ポリアクリルアミドゲル) による二次元電気泳動で分離した。二次元電気泳動後、ゲル内のタンパク質を PVDF 膜 (Millipore Co., Billerica, MA, USA) に転写し、抗ホスホチロシン抗体 (1G2; フナコシ, 東京) および ECL Western blotting 検出システム (GE Healthcare Bio-Science) を用いてチロシンリン酸化基質タンパク質の検出を行った。

## 4. 飛行時間型質量分析 (MALDI-TOF MS 分析) および peptide mass fingerprinting 解析

二次元電気泳動後のゲルを Coomassie Brilliant Blue R-250 (CBB; ナカライテスク, 京都) で染色した。*P. gingivalis* LPS 刺激によりチロシンリン酸化の亢進が見られたスポットに対応するタンパク質スポットの検出と位置の対応は二次元電気泳動ゲルイメージ解析ソフト (PDQuest<sup>TM</sup>, Ver. 8.0, BIO-RAD Co., Hercules, CA, USA) を用いて行った。その際、4 種の内部標準スポットを使用してスポット位置を確認した。目的とするタンパク質スポットをゲルより切り出し、30% acetonitrile, 25 mM 重炭酸アンモニウム溶液で脱色後、acetonitrile を用いて脱水した。脱水後の試料を還元・アルキル化し、trypsin (Promega Co., Madison, WI, USA) あるいは V8 protease (Boehringer Ingelheim Co., Ingelheim, Germany) を用いてゲル内消化した<sup>29)</sup>。消化後、試料を濃縮し、5 mg/ml の  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid (Applied Biosystems Co., Foster City, CA, USA) / 50% acetonitrile と混合した後、Voyager DE-PRO (Applied Biosystems) を用いた MALDI-TOF MS 分析を行った。得られたデータについて ProteinProspector MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu/prospector/4.0.7/html/msfit.htm>) による peptide mass fingerprinting 解析を行った。リン酸化アミノ酸残基の推定には NetPhos 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/service/NetPhos>) を使用した。

### 5. Ras-like nuclear protein (Ran) スポットの解析

チロシンリン酸化基質タンパク質の検出を行った PVDF 膜を 0.1 M グリシン塩酸バッファ pH2.5 によりデストリップ処理後、抗 Ran 抗体 (ARAN1; SIGMA-ALDRICH) を用いたウエスタンブロッティングを行い、Ran を検出した。Ran のスポットの検出と位置の確認、および定量化は PDQuest™ を用いて行った。

## 結 果

### 1. *P. gingivalis* LPS による B 細胞増殖反応と細胞内チロシンリン酸化反応の誘導

C3H/HeN マウス B 細胞および TLR 4<sup>+</sup> で腸内細菌の LPS に低応答性の C3H/HeJ マウス B 細胞に対する *P. gingivalis* LPS の増殖活性を測定した (Fig. 1)。その結果、*P. gingivalis* LPS は C3H/HeN および C3H/HeJ B 細胞に対して、*E. coli* LPS は C3H/HeN B 細胞に対してのみ増殖活性を示し、これまでの報告<sup>21)</sup>を支持する成績が得られた。さらに、チロシンキナーゼ阻害剤である herbimycin A で B 細胞を前処理することにより、*P. gingivalis* LPS および *E. coli* LPS による B 細胞の増殖反応は有意に抑制された (Fig. 1)。

つぎに、*P. gingivalis* LPS による B 細胞の増殖反応にともなう細胞内チロシンリン酸化について検討した (Fig. 2)。C3H/HeN および C3H/HeJ B 細胞のいずれにおいても、無刺激 (Fig. 2 A, lane 1 および 4) で多数のチロシンリン酸化基質タンパク質のバンド (ハウスキープバンド) が認められた。しかし、*P. gingivalis* LPS で刺激した C3H/HeN (Fig. 2 A, lane 3) および C3H/HeJ B 細胞 (Fig. 2 A, lane 6) では、無刺激の B 細胞では認められなかったバンド、特に 25 kDa 付近の基質タンパク質 (p25) のバンドが観察された。p25 のバンドは、*E. coli* LPS で刺激した C3H/HeN B 細胞 (Fig. 2 A, lane 2) においても認

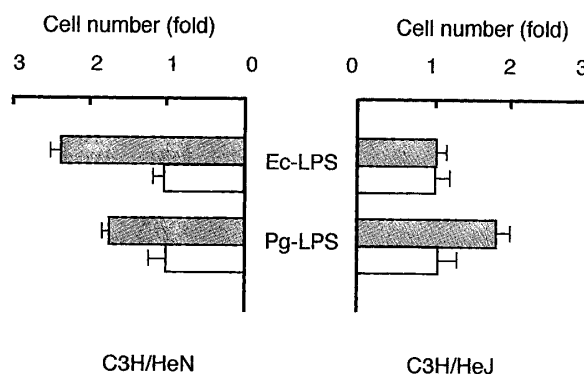


Fig. 1. *P. gingivalis* LPS-induced B cell proliferation and the effect of herbimycin A.

Splenic B cells prepared from C3H/HeN and C3H/HeJ mice were preincubated with (open bars) or without 0.5  $\mu$ M herbimycin A (shaded bars), and then stimulated with 10  $\mu$ g/ml of *P. gingivalis* LPS and/or *E. coli* LPS. After 48 h incubation, viable cell numbers were counted. Values are the arithmetic mean  $\pm$  SD of the cell number ratio (cell numbers in the experiment culture/cell number in the unstimulated control culture).

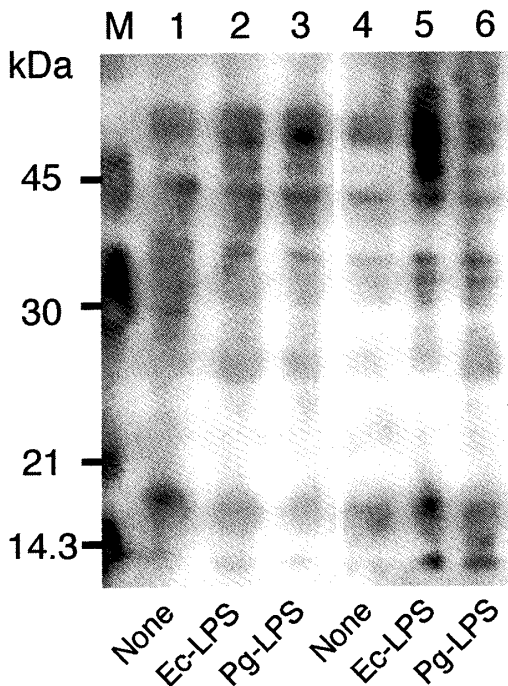
められた。しかし、herbimycin A 処理 (Fig. 2 B) した B 細胞ではいずれの LPS の刺激によっても認められなかったことから、p25 は *P. gingivalis* LPS および *E. coli* LPS による B 細胞の増殖反応にともなってチロシン残基がリン酸化される基質タンパク質の一つであることが強く示唆された。

### 2. 二次元電気泳動による細胞内チロシンリン酸化基質タンパク質の検出

p25 についてさらに検討するために、二次元電気泳動により分離後、ウエスタンブロッティングを行った。その結果、Fig. 2 で示した一次元での p25 のバンドに相当すると考えられるチロシンリン酸化基質タンパク質のスポットが、25-27 kDa, pI 6-7 に複数存在することが明らかとなった (Fig. 3)。なお、いずれの B 細胞においても無刺激では、チロシンリン酸化タンパク質の明確なスポットは分子量 22-28 kDa, pI 約 5-8 の領域では観察されなかった (Fig. 3)。

### 3. チロシンリン酸化基質タンパク質の同定

## A Herbimycin A (-)



## B Herbimycin A (+)

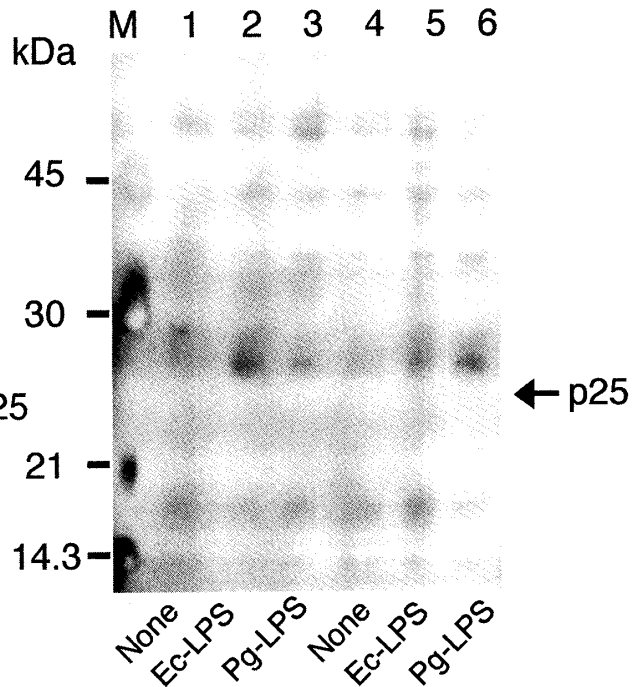


Fig. 2. *P. gingivalis* LPS-induced tyrosine phosphorylation in C3H/HeN and C3H/HeJ B cells. Splenic B cells prepared from C3H/HeN (lanes 1-3) and C3H/HeJ (lanes 4-6) mice were preincubated without (A) or with (B) 0.5  $\mu$ M herbimycin A, and then stimulated with 10  $\mu$ g/ml of *P. gingivalis* LPS and/or *E. coli* LPS. After 48 h incubation, whole cell lysates were separated with SDS-PAGE, and phosphotyrosine proteins were detected by ECL immunoblotting using a monoclonal anti-phosphotyrosine antibody (1G2). M: molecular weight standards.

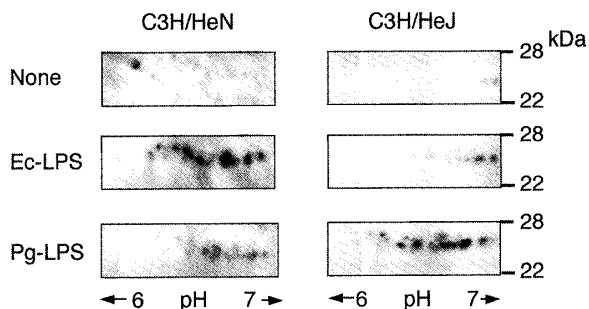


Fig. 3. 2D-PAGE analysis of *P. gingivalis* LPS-induced tyrosine phosphorylation in B cells.

Whole cell lysates were prepared from B cells from C3H/HeN and C3H/HeJ mice stimulated with *P. gingivalis* LPS and/or *E. coli* LPS for 48 h, and aliquots (150  $\mu$ g proteins) were separated with 2D-PAGE. Phosphotyrosine proteins were detected by ECL immunoblotting using a monoclonal anti-phosphotyrosine antibody (1G2).

CBB染色したポリアクリルアミドゲル上のタンパク質スポットと、Fig. 3で観察された25-27 kDa, pI 6-7のチロシンリン酸化基質タンパク質のスポットとの位置の対応は、4つのスポット (Fig. 4 A, スポット IC 1-4) を内部標準としてPDQuest™を用いて確認した。候補となる8個のタンパク質スポット (Fig. 4 A, スポット a-h) を選択した。Fig. 4には *P. gingivalis* LPS刺激のC3H/HeJ B細胞での結果を示した。目的とするタンパク質スポットを切り出し、MALDI-TOF MS分析, peptide mass fingerprinting解析を行った。その結果、最も再現性良くチロシンリン酸化基質タンパク質のスポットとのマッチングが認められたスポット d (25 kDa, pI 6.8) およびスポット g (25 kDa, pI 7.0) は、いずれも Ras-like nuclear protein である Ran であると同定された。また、内部標準としたスポット IC 1-IC 4は、そ

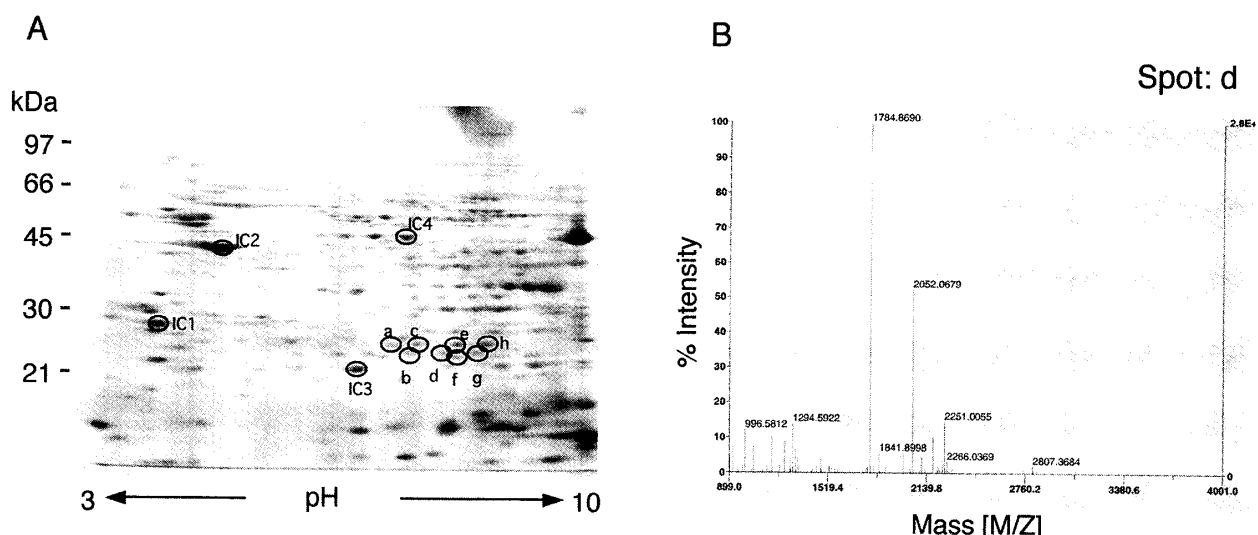


Fig. 4. Proteome analysis of phosphotyrosine proteins in C 3 H/HeJ B cells stimulated with *P. gingivalis* LPS. Whole cell lysates were prepared from C 3 H/HeJ B cells stimulated with *P. gingivalis* LPS for 48 h, and (A) aliquots (150  $\mu$ g proteins) were separated with 2 D-PAGE. Proteins were stained with CBB. Spots a-h as well as internal controls (IC 1-4) were analyzed by peptide mass fingerprinting with MALDI-TOF MS. (B) A representative mass spectrum of spot d is presented.

Table 1. PMF analyses of spots d and g

Peak	MH+ Matched	Delta ppm	Modification	Start	End
1	922.5	-12		100	106
2	1244.6	-21	AcetN	1	12
3	1294.6	16	1 PO <sub>4</sub>	143	152
4	1294.6	-11		61	71
5	1784.9	-24		153	166
6	2052.1	-17		39	56
7	2180.2	2.2		38	56

The matched peptides cover 33% of Ran.

それぞれ14-3-3 Zeta (27,725 Da, pI 4.7),  $\gamma$ -actin (41,019 Da, pI 5.6), endonuclease III-like protein である tuberin (22,502 Da, pI 5.9) および enolase-1 (47,141 Da, pI 6.4) と同定された。

スポット d (Fig. 4 B, Table 1) および g のトリプシン分解ペプチドでは全アミノ酸配列の 33%にあたるペプチドがカバーされた。さらに、V 8 protease による加水分解も行ったが、トリプシンで得られた結果を支持し、Ran の 31%のペプチドがカバーされた。また、M/S 1294.6のペプチドは Asn143から Lys152に相当し、1リン酸基の修飾をうけていることが明らかとなった (Table 1)。Ran のアミノ酸配列を

```

1 (-)AAQGEPQVQFKLVLVGDDGKTFVVKRHLTGEFEKLYV
41 ATLGVEVHPLVFHTNRGPIKFNVDWDTAGQEKFGLRDGYV
81 IQAQCAIIMFDVTSRVTYKKNVWNWHRDLVRVCENIPIVLC
121 GNKVDIKDRKVKAKSIVFHRKK NLQYYDISAKSNYNFEKP
161 FLWLARKLIGDPNLEFVAMPALAPPEVMDPALAAQYEH
201 LEVAQTALPDEDDDL
    
```

Fig. 5. Amino acid sequence of Ran.

Amino acid sequences underlined are the matched trypsin digested peptides, and asterisks indicate phosphoamino acid predicted by NetPhos 2.0.

もとに NetPhos 2.0によるリン酸化アミノ酸の予測を行った結果、Ran 分子全体では Tyr39, Tyr80, Tyr98, Tyr146, Ser135, Ser153, Thr

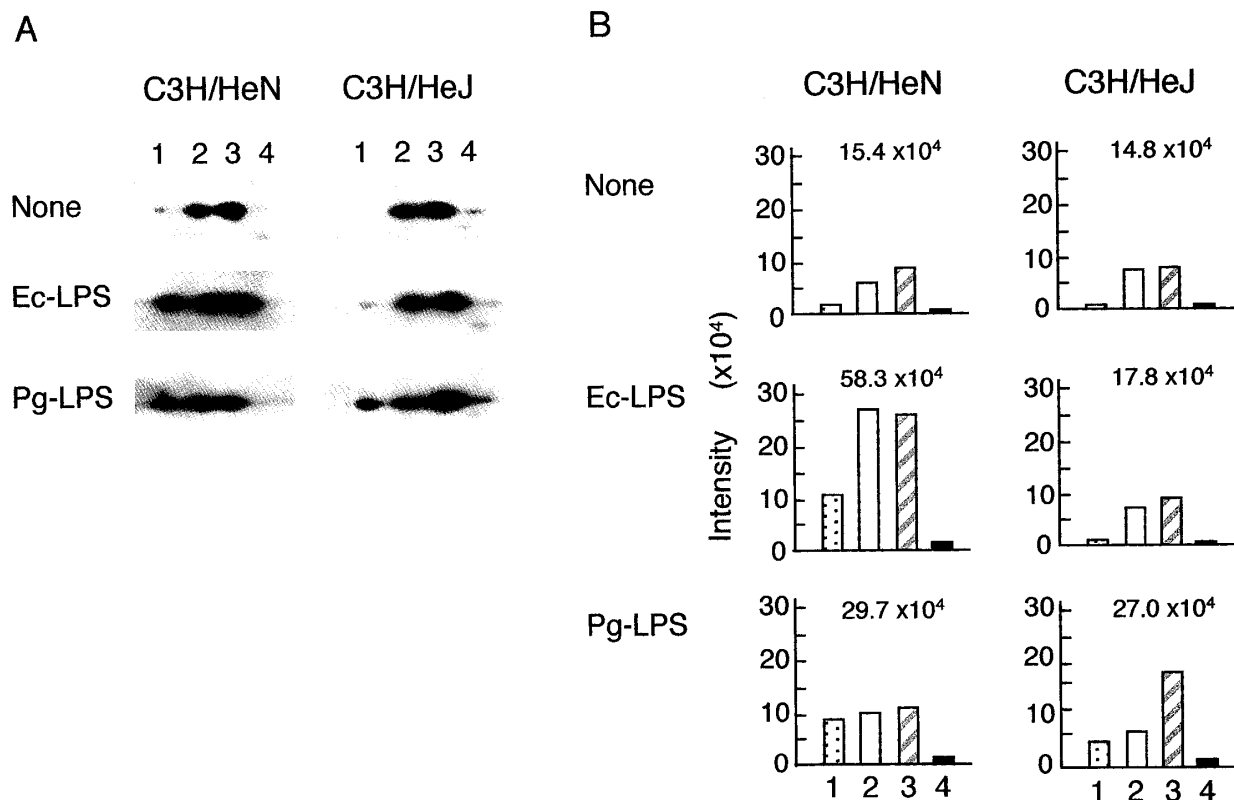


Fig. 6. Alteration of quantity of Ran spots in *P. gingivalis* LPS-stimulated B cells. Whole cell lysates were prepared from C3H/HeN and C3H/HeJ B cells stimulated with *P. gingivalis* LPS and/or *E. coli* LPS for 48 h, and aliquots (150  $\mu$ g proteins) were separated with 2 D-PAGE. Ran was detected by ECL immunoblotting using a monoclonal anti-Ran antibody (ARAN1)(A), and the intensities of Ran spots 1-4 measured by PDQuest™, and the total intensities of Ran spots were presented (B).

32, Thr93および Thr97がリン酸化可能なアミノ酸として予測された (Fig. 5)。143-152ペプチド内では Tyr146のリン酸化が予測されたことから, チロシンリン酸化基質タンパク質のスポット d および g は, Tyr146がリン酸化された Ran であることが強く示唆された。

#### 4. *P. gingivalis* LPS 刺激による Ran スポットの変動

*P. gingivalis* LPS 刺激によりチロシンリン酸化が誘導される B 細胞内基質タンパク質の候補の 1 つとして Ran が同定されたことから, 抗 Ran 抗体を用いたウエスタンブロッティングを用いて, *P. gingivalis* LPS 刺激前後の二次元電気泳動上の Ran スポットの変動について検討した。その結果, 無刺激の場合にも, C3H/HeN および C3N/HeJ B 細胞のいずれにおいても, 4 つの Ran のスポットが検出される

ことが明らかとなった (Fig. 6 A)。これら 4 つの Ran の分子種は, 12% ポリアクリルアミドゲル上で分子量は等しい (25 kDa) もの, 等電点が異なっており, 無刺激の場合, スポット 2 および 3 (スポット d および g に相当する) の発現量がスポット 1 および 4 に比較して高いことが観察された。LPS 刺激後では, 増殖反応の有無に一致して Ran の総発現量が変動した。すなわち, 増殖反応のみられない *E. coli* LPS 刺激の C3H/HeJ B 細胞での 4 つの分子種の総発現量 (17.8 x 10<sup>4</sup>) は無刺激群同様 (14.8 x 10<sup>4</sup>) であったが, 増殖反応の認められた *P. gingivalis* LPS 刺激の C3H/HeN および C3H/HeJ B 細胞, ならびに *E. coli* LPS 刺激の C3H/HeN B 細胞での 4 つの Ran の総発現量は, 無刺激群と比較して高かった。さらに, B 細胞の増殖反応にともない Ran の総発現量の

上昇を認めた群では、4つの Ran の分子種のスポットのうち、最も酸性側のスポット1の発現量の上昇が観察された (Fig. 6 B)。

## 考 察

本研究では、*P. gingivalis* LPS による B 細胞活性化機構の解明を目的に、*P. gingivalis* LPS 刺激により誘導される B 細胞の増殖反応にかかわる細胞内チロシンリン酸化の検討およびチロシンリン酸化基質タンパク質の同定を試みた。

これまでの報告<sup>26,27)</sup>では、マイトジェン活性を用いた測定法により *P. gingivalis* LPS の C3H/HeJ B 細胞に対する増殖活性が示されていたが、本研究で用いた細胞数計測法からも、*P. gingivalis* LPS が、C3H/HeN B 細胞のみならず、TLR4<sup>-/-</sup>の C3H/HeJ B 細胞に対しても増殖活性を示すことが確認された (Fig. 1)。単球/マクロファージ系の細胞における腸内細菌の LPS 刺激のシグナル伝達系には、TLR4<sup>30)</sup>、MD-2<sup>31,32)</sup>、LBP ならびに LBP を認識する CD14<sup>33,34)</sup> などの複数のタンパク質が関与することが示されている。しかし、C3H/HeJ マウスでは TLR4 遺伝子 (*Tlr4*) の第3エクソンにミスセンス変異があり、TLR4 の Pro712 が His に置換しており<sup>35)</sup>、この1アミノ酸置換により C3H/HeJ 細胞は LPS 低応答性であると理解されている。B 細胞においても、LPS 刺激のシグナル伝達系には TLR4/MD-2 が関与するとの報告がある<sup>36,37)</sup>が、本研究結果からも明らかなように、*P. gingivalis* LPS は TLR4<sup>+/+</sup>である C3H/HeN B 細胞のみならず、TLR4<sup>-/-</sup>の C3H/HeJ B 細胞に対しても増殖活性を示す。それゆえ、*P. gingivalis* LPS を認識する B 細胞膜レセプターは TLR4/MD-2 系だけではなく、それ以外の分子がレセプターとして機能していることが強く示唆される。TLR4 以外で LPS と相互作用する B 細胞膜レセプターとしては、radioprotective 105 (RP105)/MD-1 複合体が報告されている<sup>38)</sup>。しかし、最近の報告では単球/マクロファージおよ

び B 細胞に発現しているこの分子複合体には LPS 認識領域がないとの報告<sup>39,40)</sup>がなされたことから、LPS 刺激後の B 細胞のシグナル伝達系は、未知の LPS 認識分子を含め、依然として、不明な点が数多く残されている。

*P. gingivalis* LPS 刺激後、C3H/HeN および C3H/HeJ B 細胞の増殖反応にともなって細胞内チロシンリン酸化が誘導され、また、チロシンキナーゼ阻害剤処理により増殖反応も抑制された (Fig. 1) ことから、B 細胞の増殖反応には細胞内チロシンリン酸化が必須であることが強く示唆された。また、一次元でのチロシンリン酸化タンパク質バンドのうち、p25 は B 細胞の増殖反応にともなってチロシン残基がリン酸化される基質タンパク質であることが示唆された (Fig. 2)。Kimura ら<sup>21)</sup>は同様なチロシンリン酸化基質タンパク質 (24.8 kDa および 26 kDa) について報告しているが、その本体については明らかにされておらず、p25 との異同については明らかではない。そこで本研究では、二次元電気泳動、MALDI-TOF MS 分析、peptide mass fingerprinting 解析を用いて、p25 についての検討を行った。

本研究では、二次元電気泳動、ウエスタンブロットティング後、*P. gingivalis* LPS 刺激によりチロシンリン酸化の亢進が見られたスポットに対応するタンパク質スポットの検出と位置の対応を、内部標準スポットをもとに、PDQuest™ を用いて行った。その結果、p25 の候補となる 8 個のタンパク質スポットが認められた (Fig. 4 A, スポット a-h)。それらの MALDI-TOF MS 分析、peptide mass fingerprinting 解析の結果、2つのスポット (Fig. 4, スポット d および g) が Ran と同定された (Table 1 および Figs. 4, 5)。

Ran は Ras スーパーファミリーに属する small GTPase で主に核に局在し、他の G タンパクと同様に、GTP 結合型 (RanGTP) と GDP 結合型 (RanGDP) をサイクルすることによって機能することが示されている<sup>41,42)</sup>。Ran は、インポーションβファミリー分子に結合



し、核-細胞質間タンパク質輸送の方向性を保証する因子と考えられている<sup>43,44)</sup>が、さらに、Ranは核膜孔および紡錘体の形成やRNAの核-細胞質間輸送にも関与することが明らかになりつつあり、真核細胞での有糸分裂の進行を調節する重要な因子の一つとしても注目されている<sup>45,46)</sup>。Ranのリン酸化による機能変化についての報告はないが、癌細胞の増殖・生存にかかわるチロシンリン酸化の基質タンパク質の網羅的検索の中で、その一つとしてTyr147が挙げられている<sup>47)</sup>。LPSとRanの関連性については、これまでのところ、Wong<sup>48,49)</sup>らのC3H/HeJマウスのLPS低応答性の原因遺伝子*Lps*がRanであるとした報告以外にはない。Wongらの結果は、Poltorakら<sup>35)</sup>により*Tlr4*がクローニングされ、C3H/HeJマウスのLPSへの低応答性が示された結果とは明らかに矛盾するが、本研究結果を勘案すれば、LPSにより誘導される宿主免疫細胞の増殖反応の活性化経路/過程にRanが重要な役割を果たしているのかも知れない。

Fig. 6の結果からは、Ranには等電点の異なる複数の分子種が存在し、*P. gingivalis* LPSによるB細胞の増殖反応にともなって、Ranスポット量総和が上昇し、最も酸性側の分子種の発現量が上昇した。さらに、Ranの分子種のスポット2および3がCBB染色でのスポットdおよびgに相当することから、*P. gingivalis* LPS刺激によってリン酸化が誘導される最も酸性側のRanの分子種では、Tyr146以外のRanのチロシン残基のリン酸化が誘導されているものと推定される。しかし、Ranのチロシンリン酸化の質的および量的変動が、*P. gingivalis* LPSによるB細胞の増殖反応にいかなる役割を演じているかについては、その他のチロシンリン酸化基質タンパク質を含め、今後、さらに詳細な検討を行う必要があるものと思われる。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究を行う機会をあ

たえていただき、御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました口腔微生物学講座 木村重信 教授に深く感謝いたします。また、本研究に際し、終始ひとかたならぬ御指導、御助言をいただき、御懇篤な御校閲を賜りました長崎大学医歯薬学総合研究科 根本優子 博士に深甚なる謝意を表します。最後に、絶えず暖かい御支援ならびに御協力を頂きました口腔微生物学講座の皆様へ深く感謝いたします。

## 文 献

- 1) Genco, R. J., and Mergenhagen, S. E. : Host-parasite Interactions in Periodontal Disease. American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1982.
- 2) Frank, R. M. : Bacterial penetration in the apical pocket wall of advanced human periodontitis. *J. Periodontol Res.* 15 : 563-573, 1980.
- 3) Mackler, B. F., Frostad, K. B., Robertson, P. B., and Levy, B. M. : Immunoglobulin bearing lymphocytes and plasma cells in human periodontal disease. *J. Periodontol Res.* 12 : 37-45, 1977.
- 4) Okada, H., Kida, T., and Yamagami, H. : Identification and distribution of immunocompetent cells in inflamed gingiva of human chronic periodontitis. *Infect. Immun.* 41 : 365-374, 1983.
- 5) Mayrand, D., and Holt, S. C. : Biology of asaccharolytic black-pigmented *Bacteroides* species. *Microbiol. Rev.* 52 : 134-152, 1988.
- 6) van Winkelhoff, A. J., van Steenberg, T. J., and de Graaff, J. : The role of black-pigmented *Bacteroides* in human oral infections. *J. Clin. Periodontol.* 15 : 145-155, 1988.
- 7) Slots, J., and Listgarten, M. A. : *Bacteroides gingivalis*, *Bacteroides intermedius* and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal diseases. *J. Clin. Periodontol.* 15 : 85-93, 1988.
- 8) van Winkelhoff, A. J., Kippuw, N., and de Graaff, J. : Cross-inhibition between black-pigmented *Bacteroides* species. *J. Dent. Res.* 66 : 1663-1667, 1987.
- 9) Lai, C. H., Listgarten, M. A., Shirakawa, M., and Slots, J. : *Bacteroides forsythus* in adult gingivitis and periodontitis. *Oral Microbiol. Immunol.* 2 : 152-157, 1987.
- 10) Zambon, J. J. : *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* 12 : 1-20, 1985.
- 11) Slots, J., and Genco, R. J. : Black-pigmented *Bacteroides* species, *Capnocytophaga* species, and *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human

- periodontal disease : virulence factors in colonization, survival, and tissue destruction. *J. Dent. Res.* 63 : 412-421, 1984.
- 12) Mayer, H., Tharanathan, R. N., and Weckesser, J. : Analysis of lipopolysaccharides of gram-negative bacteria. *Methods Microbiol.* 18 : 157-207, 1985.
- 13) Morrison, D. C., and Ulevitch, R. J. : The effects of bacterial endotoxins on host mediation systems. *Am. J. Pathol.* 93 : 526-617, 1978.
- 14) Nagai, Y., Garrett, K. P., Ohta, S., Bahrn, U., Kouro, T., Akira, S., Takatsu, K., and Kincade, P. W. : Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity* 24 : 801-812, 2006.
- 15) Lien, E., Chow, J. C., Hawkins, L. D., McGuinness, P. D., Miyake, K., Espevik, T., Gusovsky, F., and Golenbock, D. T. : A novel synthetic acyclic lipid A-like agonist activates cells via the lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 276 : 1873-1880, 2001.
- 16) Hoebe, K., Du, X., Georgel, P., Janssen, E., Tabeta, K., Kim, S. O., Goode, J., Lin, P., Mann, N., Mudd, S., Crozat, K., Sovath, S., Han, J., and Beutler, B. : Identification of *Lps 2* as a key transducer of MyD88-independent TIR signalling. *Nature* 424 : 743-748, 2003.
- 17) Youn, H. S., Lee, J. Y., Fitzgerald, K. A., Young, H. A., Akira, S., and Hwang, D. H. : Specific inhibition of MyD88-independent signaling pathways of TLR 3 and TLR 4 by resveratrol : Molecular targets are TBK 1 and RIP 1 in TRIF complex. *J. Immunol.* 175 : 3339-3346, 2005.
- 18) Kimura, S., Tamamura, T., Nakagawa, I., Koga, T., Fujiwara, T., and Hamada, S. : CD14-dependent and independent pathways in lipopolysaccharide-induced activation of a murine B-cell line, CH12.LX. *Scand.J.Immunol.* 51 : 392-399, 2000.
- 19) 及川ありさ : *Porphyromonas gingivalis* LPS による B 細胞活性化における CD14 の関与. 岩医大歯誌 27 : 261-269, 2002.
- 20) Dearden-Badet, M. T., and Revillard, J. P. : Requirement for tyrosine phosphorylation in lipopolysaccharide-induced murine B-cell proliferation. *Immunology* 80 : 658-660, 1993.
- 21) Kimura, S., Koga, T., Fujiwara, T., Kontani, M., Shintoku, K., Kaya, H., and Hamada, S. : Tyrosine protein phosphorylation in murine B lymphocytes by stimulation with lipopolysaccharide from *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 130 : 1-6, 1995.
- 22) Hamada, S., Fujiwara, T., Morishima, S., Takahashi, I., Nakagawa, I., Kimura, S., and Ogawa, T. : Molecular and immunological characterization of the fimbriae of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol. Immunol.* 38 : 921-930, 1994.
- 23) Hamada, S., Amano, A., Kimura, S., Nakagawa, I., Kawabata, S., and Morisaki, I. : The importance of fimbriae in the virulence and ecology of some oral bacteria. *Oral Microbiol. Immunol.* 13 : 129-138, 1998.
- 24) Kontani, M., Kimura, S., Nakagawa, I., and Hamada, S. : Adherence of *Porphyromonas gingivalis* to matrix proteins via a fimbrial cryptic receptor exposed by its own arginine-specific protease. *Mol. Microbiol.* 24 : 1179-1187, 1997.
- 25) Kontani, M., Amano, A., Nakamura, T., Nakagawa, I., Kawabata, S., and Hamada, S. : Inhibitory effects of protamines on proteolytic and adhesive activities of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* 67 : 4917-4920, 1999.
- 26) Fujiwara, T., Ogawa, T., Sobue, S., and Hamada, S. : Chemical, immunobiological and antigenic characterizations of lipopolysaccharides from *Bacteroides gingivalis* strains. *J. Gen. Microbiol.* 136 : 319-326, 1990.
- 27) Koga, T., Nishihara, T., Fujiwara, T., Nisizawa, T., Okahashi, N., Noguchi, T., and Hamada, S. : Biochemical and immunobiological properties of lipopolysaccharide (LPS) from *Bacteroides gingivalis* and comparison with LPS from *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 47 : 638-647, 1985.
- 28) Kimura, S., Eldridge, J. H., Michalek, S. M., Morisaki, I., Hamada, S., and McGhee, J. R. : Immunoregulation in the rat : ontogeny of B cell response to type 1, 2, and T-dependent antigen. *J. Immunol.* 134 : 2839-2846, 1985.
- 29) Rosenfeld, J., Capdevielle, J., Guillemot, J. C., and Ferrara, P. : In-gel digestion of proteins for internal sequence analysis after one- or two-dimensional gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 203 : 173-179, 1992.
- 30) Qureshi, S. T., Lariviere, L., Leveque, G., Clermont, S., Moore, J. K., Gros, P., and Malo, D. : Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (*Tlr 4*). *J. Exp. Med.* 189 : 615-625, 1999.
- 31) Coats, S. R., Pham, T. T., Bainbridge, B. W., Reife, R. A., and Darveau, R. P. : MD-2 mediates the ability of tetra-acylated and penta-acylated lipopolysaccharides to antagonize *Escherichia coli* lipopolysaccharide at the TLR 4 signaling complex. *J. Immunol.* 175 : 4490-4498, 2005.
- 32) Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K., and Kimoto, M. : MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 189 : 1777-1782, 1999.
- 33) Wright, S. D., Ramos, R. A., Tobias, P. S., Ulevitch, R. J., and Mathison, J. C. : CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide

- (LPS) and LPS binding protein. *Science* 249 : 1431-1433, 1990.
- 34) Lee, J. D., Kato, K., Tobias, P. S., Kirkland, T. N., and Ulevitch, R. J. : Transfection of CD14 into 70 Z/3 cells dramatically enhances the sensitivity to complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *J. Exp. Med.* 175 : 1697-1705, 1992.
- 35) Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M. Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., Freudenberg, M., Ricciardi-Castagnoli, P., Layton, B., and Beutler, B. : Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice : Mutations in *Tlr4* Gene. *Science* 282 : 2085-2088, 1998.
- 36) Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K., and Akira, S. : Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide : evidence for TLR4 as the *Lps* gene product. *J. Immunol.* 162 : 3749-3752, 1999.
- 37) Nagai, Y., Akashi, S., Nagafuku, M., Ogata, M., Iwakura, Y., Akira, S., Kitamura, T., Kosugi, A., Kimoto, M., and Miyake, K. : Essential role of MD-2 in LPS responsiveness and TLR4 distribution. *Nat. Immunol.* 3 : 667-672, 2002.
- 38) Yazawa, N., Fujimoto, M., Sato, S., Miyake, K., Asano, N., Nagai, Y., Takeuchi, O., Takeda, K., Okochi, H., Akira, S., Tedder, F. T., and Tamaki, K. : CD19 regulates innate immunity by the toll-like receptor RP105 signaling in B lymphocytes. *Blood* 102 : 1374-1380, 2003.
- 39) Tsuneyoshi, N., Fukudome, K., Kohara, J., Tomimasu, R., Gauchat, J. F., Nakatake, H., and Kimoto, M. : The functional and structural properties of MD-2 required for lipopolysaccharide binding are absent in MD-1. *J. Immunol.* 174 : 340-344, 2005.
- 40) Nagai, Y., Kobayashi, T., Motoi, Y., Ishiguro, K., Akashi, S., Saitoh, S., Kusumoto, Y., Kaisho, T., Akira, S., Matsumoto, M., Takatsu, K., and Miyake, K. : The radioprotective 105/MD-1 complex links TLR2 and TLR4/MD-2 in antibody response to microbial membranes. *J. Immunol.* 174 : 7043-7049, 2005.
- 41) Drivas, G. T., Shin, A., Coutavas, E., Rush, M. G., and D'Eustachio, P. : Characterization of four novel *ras*-like genes expressed in a human teratocarcinoma cell line. *Mol. Cell. Biol.* 10 : 1793-1798, 1990.
- 42) Bischoff, F. R., and Ponstingl, H. : Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* 354 : 80-82, 1991.
- 43) Moore, S. M., and Blobel, G. : The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* 365 : 661-663, 1993.
- 44) Gorlich, D., Pante, N., Kutay, U., Aebi, U., and Bischoff, F. R. : Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J.* 15 : 5584-5594, 1996.
- 45) Ren, M., Villamarin, A., Shih, A., Coutavas, E., Moore, M. S., Locurcio, M., Clarke, V., Oppenheim, J. D., D'Eustachio, P. and Rush, M. G. : Separate domains of the Ran GTPase interact with different factors to regulate nuclear protein import and RNA processing. *Mol. Cell. Biol.* 15 : 2117-2124, 1995.
- 46) Zhang, T., Delestienne, N., Huez, G., Kruys, V., and Gueydan, C. : Identification of the sequence determinants mediating the nucleo-cytoplasmic shuttling of TIAR and TIA-1 RNA-binding proteins. *J. Cell Sci.* 118 : 5453-5463, 2005.
- 47) Rush, J., Moritz, A., Lee, K. A., Guo, A., Goss, V. L., Spek, E. J., Zhang, H., Zha, X., Polakiewicz, R. D., and Comb, M. J. : Immunoaffinity profiling of tyrosine phosphorylation in cancer cells. *Nat. Biotech.* 23 : 94-101, 2005.
- 48) Wong, M. C., Kang, A., Chen, H., Yuan, Q., Fan, P., Sultzter, B. M., Kan, Y. W., and Chung, S. W. : *Lps<sup>d</sup>/Ran* of endotoxin-resistant C3H/HeJ mice is defective in mediating lipopolysaccharide endotoxin responses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96 : 11543-11548, 1999.
- 49) Wong, M. C., Yuan, Q., Chen, H., Sultzter, B. M., and Chung, S. W. : A single point mutation at the 3'-untranslated region of Ran mRNA leads to profound changes in lipopolysaccharide endotoxin-mediated responses. *J. Biol. Chem.* 276 : 33129-33138, 2001.