

原 著

糖鎖修飾関連酵素阻害剤が歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* に
及ぼす影響について

堀 江 俊 猪 俣 恵 安 部 雅 世 引 頭 毅

Effect of the inhibitors for protein glycosylation-associated enzymes on the
growth of the periodontopathic bacterium *Porphyromonas gingivalis*

TOSHI HORIE, MEGUMI INOMATA, MASAYO ABE, TAKESHI INTO

我々は以前、歯周病関連細菌の有する外膜タンパク質にO-結合型のN-アセチルグルコサミン (GlcNAc) やシアル酸が付加されていることを明らかにしてきた。その一方で歯周病関連細菌の糖タンパク質の役割については未だ不明な点が多い。本研究では、哺乳類細胞において糖タンパク質へのGlcNAc付加を仲介するGlcNAc転移酵素の阻害剤、ならびにシアル酸付加を仲介するシアル酸転移酵素の阻害剤を用い、これらが歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* の増殖、血清抵抗性ならびに糖タンパク質合成に対してどのような影響を及ぼすのか調べたので報告する。菌株は *P. gingivalis* ATCC 33277を用いた。GlcNAc転移酵素阻害剤としてBADGPおよびOSMI-1、シアル酸転移酵素阻害剤として3-Fax-Peracetyl Neu5AcおよびSoyasaponin Iを用いた。各阻害剤の *P. gingivalis* の増殖への影響は、阻害剤を添加した細菌用培地で菌株を培養後にATP産生量を測定して調べた。同様にsTSB培地に40%ヒト血清を加えた場合の *P. gingivalis* の増殖への各阻害剤の影響も調べた。また各阻害剤の存在下で増殖させた *P. gingivalis* の菌体は破碎してSDS-PAGEで展開後、糖タンパク質をPro-Q Emerald 300染色により検出し、阻害剤の影響を解析した。細菌用培地で *P. gingivalis* を培養した場合、OSMI-1とSoyasaponin Iで *P. gingivalis* の増殖がわずかに促進された。一方、血清を添加した培地で培養した場合には、BADGPのみ増殖を抑制したが、他の阻害剤では増殖が大きく促進された。これらの結果に反して、阻害剤により *P. gingivalis* の糖タンパク質の発現パターンに明確な変化は認められなかった。以上の結果より、糖鎖修飾関連酵素阻害剤は *P. gingivalis* の糖タンパク質産生には影響しないが、何らかの非特異的效果によって増殖に影響すると考えられた。

キーワード: *Porphyromonas gingivalis*, 糖タンパク質, GlcNAc転移酵素阻害剤, シアル酸転移酵素阻害剤

We have previously reported that periodontopathic bacteria possess outer membrane proteins that are linked to O-linked N-acetyl glucosamine (O-GlcNAc) and sialic acid. However, specific roles of these glycoproteins in the pathogenicity of periodontopathic bacteria have been remained largely unclear. In this study, we examined the effect of mammalian glycosyltransferase inhibitors—specifically, GlcNAc transferase inhibitors and sialyltransferase inhibitors, on the growth, serum resistance, and glycoprotein synthesis of *Porphyromonas gingivalis*. The strain of *P. gingivalis* ATCC 33277 was used in this study. BADGP and OSMI-1 were used as the GlcNAc transferase inhibitors, and 3-Fax-Peracetyl Neu5Ac and Soyasaponin I were used as the sialyltransferase inhibitors. Bacteria were cultured in sTSB or 40% inactivated bovine serum-containing sTSB supplemented with one of the inhibitors. Bacterial growth was monitored by measuring ATP production. Whole bacterial lysates were separated by SDS-PAGE, and glycoproteins were stained using Pro-Q emerald 300. In the bacterial medium lacking serum, OSMI-1 and Soyasaponin I were found to slightly enhance the growth of *P. gingivalis*. Interestingly, BADGP was found to have a suppressive effect on bacterial growth in serum-containing bacterial medium, whereas other inhibitors in the same serum-con-

taining medium greatly enhanced bacterial growth. Our studies did not detect any alteration in glycoprotein synthesis in the presence of the inhibitors. These findings indicate that mammalian glycosyltransferase inhibitors do not affect glycoprotein synthesis of *P. gingivalis*, but they exert significant regulatory effects on the bacterial growth possibly through non-specific mechanisms.

Key words : *Porphyromonas gingivalis*, glycoprotein, GlcNAc transferase inhibitor, sialic acid transferase inhibitor

緒 言

近年、細菌の糖タンパク質が細菌の生理学的機能において重要な役割を果たすことが報告されている¹⁾。細菌の糖タンパク質は鞭毛や線毛などの菌体表層構造体として存在する場合が多く認められる^{2,3)}。一方、病原細菌の糖タンパク質は、抗原性変異による宿主免疫系からの回避、宿主免疫系の刺激、ならびに宿主プロテアーゼによる切断への耐性など、宿主への病原性に直接的に関与することも示唆されてきている⁴⁻⁷⁾。元来、タンパク質へのグリコシル化（糖付加）は最も一般的な翻訳後修飾の一つであり、アスパラギン残基に特異的に糖鎖構造を結合させる *N*-結合型経路と、セリン／スレオニン残基に糖鎖構造を結合させる *O*-結合型経路を介して起こりうる。これら両者の翻訳後修飾は真核生物では普遍的に見出されているが、細菌類での *N*-結合型経路はピロリ菌やカンピロバクター属菌などのイプシロンプロテオバクテリア綱の限られた菌種でのみで確認されており、細菌類で普遍的に認められるのは *O*-結合型経路である¹⁾。

細菌の *O*-結合型経路は糖転移酵素 *O*-オリゴサッカリルトランスフェラーゼ (OTase) に依存的な経路と非依存的な経路とに大きく分けられる¹⁾。OTase に依存的な経路では、細菌内膜のリピドにウリジン二リン酸 (UDP) - 2,4 - ジアセタミド - 2,4,6 - トリデオキシヘキソースなどが結合し、ここにガラクトース等が順次結合して糖鎖が形成されていき、フリッパーゼによりペリプラズム側へ反転させられ、ペリプラズムに存在する目的タンパク質のセリン／スレオニン残基に OTase に依存的に糖鎖が結合される¹⁾。一方 OTase に非依存的な経路では、細胞質に存在する目的タンパク質のセリン／スレオニン残基に糖転移酵素の働きによってシチジン一リン酸 (CMP) - プソイダミン酸や CMP - レギオナミン酸等が付加され、これにさらに種々の糖転移酵素が関与して順次糖鎖が構築されていくと考えられているが¹⁾、一部の病原細菌種のみでの知見しか得られておらず、この経路に関する多くの知見は不明なままである。

Porphyromonas gingivalis (*P.gingivalis*) は糖非発酵性の偏性嫌気性グラム陰性桿菌であり、最も重要な歯周病原細菌群 Red Complex の一員として知られている⁸⁾。*P. gingivalis* は成人の歯肉縁下細菌叢で顕著な増殖がみられることがあり、その細菌叢における割合は慢性歯周炎の重症度と関連して増加すると考えられている^{9,10)}。*P. gingivalis* は血清がもつ抗菌活性に対して強力に抵抗する様々な能力を有することが明らかにされており、これにより血清由来の歯肉溝浸出液中でも難なく増殖して慢性歯周炎の発症や増悪に多大に影響すると考えられる¹¹⁾。また、歯周組織で増殖した *P. gingivalis* は血行性に伝播し、アテローム性動脈硬化症などを含む心血管疾患の他、糖尿病、アルツハイマー症、早産など全身的に健康被害をもたらすことが知られている¹²⁻¹⁵⁾。*P. gingivalis* では現在までにいくつかの *O*-結合型糖鎖をもつ糖タンパク質の存在が明らかにされており、ジンジバイン、HBP35, OMP85, Pgm6/7などはこれに相当すると考えられる¹⁶⁻¹⁹⁾。また、我々は以前、*P. gingivalis* と同じ Porphyromonadaceae 科の細菌で Red Complex の一員として挙げられている *Tannerella forsythia* が有する外膜タンパク質に *O*-結合型の *N*-アセチルグルコサミン (*O*-GlcNAc) やシアル酸が付加されていることを明らかにした²⁰⁾。その一方で、これら歯周病関連細菌が有する *O*-結合型糖タンパク質の産生過程や病原性における役割についてはほとんど不明である。

本研究では、哺乳類細胞における糖転移酵素阻害剤、特に *O*-GlcNAc 付加を仲介する GlcNAc 転移酵素の阻害剤、ならびにシアル酸付加を仲介するシアル酸転移酵素の阻害剤を用い、これらが *P. gingivalis* の増殖、血清抵抗性ならびに糖タンパク質合成に対してどのような影響を及ぼすのか調べたのでここに報告する。

材料および方法

1. 試薬

GlcNAc 転移酵素阻害剤 BADGP (ベンジル 2 - アセトアミド - 2 - デオキシ - α - D - ガラクトピラノシド) および OSMI-1ならびに、シアル酸転移酵素阻害剤 3-Fax-

Peracetyl Neu5Ac および Soyasaponin I はメルク社から入手した。BADGP はメタノール、OSMI-I と 3-Fax-Peracetyl Neu5Ac はジメチルスルホキシド (DMSO)、Soyasaponin I はエタノールをそれぞれ溶媒として溶解させた。正常ヒト血清は BioWest 社から購入した。

2. 使用菌株と培地

P. gingivalis ATCC 33277 株を 2.5 mg/ml 酵母抽出物、2.5 μ g/ml ヘミンおよび 5 μ g/ml メナジオンを添加したトリプチカーゼ大豆ブロス (sTSB) で嫌気条件下 (10% CO₂, 10% H₂, および 80% N₂) で培養した。OD₆₀₀ 値を 0.8 に調整した菌液 (約 1×10^8 cfu/ml に相当) を準備し、 1×10^7 cfu 相当の菌を上記阻害剤と溶媒を含む sTSB または 40% 正常ヒト血清を含む sTSB 中で嫌気条件下で 24 時間または 48 時間培養した。

3. 菌株の増殖の定量

菌株の増殖は ATP 産生量によって評価した。培養液 100 μ l と BacTiter Glo microbial cell viability assay kit (プロメガ社) の試薬 100 μ l を 96F Nontreated White Microwell SI プレート (Thermo Fisher Scientific 社) のウェル中で混和した。反応による化学発光は Infinite M200 PRO プレートリーダー (Tecan 社) を用いて相対光単位 (RLU) として測定した。菌株の増殖 (%) は $100 \times (\text{対照 RLU}) / (\text{コントロール RLU})$ として計算した。コントロール RLU は溶媒のみを含む菌液の測定結果であり、また対照 RLU は阻害剤を含む菌液の測定結果である。データは平均 \pm 標準偏差 ($n = 3$) として表した。

4. 糖タンパク質の検出

培養された菌株は PBS で洗浄した後、プロテアーゼインヒビターカクテルを含む 10 mM HEPES バッファーに再懸濁した。菌体を超音波処理により完全に破碎した後、2-メルカプトエタノールを含む SDS サンプルバッファーと混合した。煮沸処理したサンプルは 10% アクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により展開した。ゲル中の糖タンパク質は Pro-Q emerald 300 glycoprotein gel and blot stain kit (Molecular Probes 社) を用いて染色後、紫外線照射下で可視化して撮影した。撮影後のゲルは CBB 染色を行い、全てのタンパク質を可視化した。

5. 統計解析

データ間の有意差は Student の *t* 検定法により解析を行った。有意水準は 5% に設定した。

結 果

1. GlcNAc 転移酵素阻害剤ならびにシアル酸転移酵素阻害剤の sTSB 中での *P. gingivalis* 菌株の増殖への影響

まず初めに、*P. gingivalis* 菌株を GlcNAc 転移酵素阻害剤またはシアル酸転移酵素阻害剤を含む sTSB 中で培養した場合の効果について検証した。培養時間は培養開始から 24 時間と 48 時間に設定し、産生された ATP 量を測定することで菌の増殖を評価した。GlcNAc 転移酵素阻害剤 BADGP を 2.5 nM ~ 25 μ M の濃度で添加して調べたところ、24 時間でも 48 時間でも有意な増殖への影響は認められなかった (図 1)。GlcNAc 転移酵素阻害剤 OSMI-I を 2.5 nM ~ 25 μ M の濃度で添加した場合には、それほど大きい効果ではないものの、有意に増殖が促進される傾向が認められた (図 1)。シアル酸転移酵素阻害剤 3-Fax-Peracetyl Neu5Ac を 2.5 nM ~ 25 μ M の濃度で添加して調べた場合、24 時間でも 48 時間でも有意な増殖への影響は認めなかった (図 1)。また、シアル酸転移酵素阻害剤 Soyasaponin I を 0.05 nM ~ 0.5 μ M の濃度で添加して調べた場合、一部で有意な増殖促進効果がみられたものの、ほとんどの濃度で有意な影響は認めなかった (図 1)。

2. GlcNAc 転移酵素阻害剤ならびにシアル酸転移酵素阻害剤の正常ヒト血清を含む sTSB 中での *P. gingivalis* 菌株の増殖への影響

次に *P. gingivalis* は血清由来の歯肉溝浸出液中で増殖していることから、GlcNAc 転移酵素阻害剤またはシアル酸転移酵素阻害剤を含む 40% 正常ヒト血清を含む sTSB 中で培養した場合の効果について検証した。前実験と同様に、培養時間は培養開始から 24 時間と 48 時間に設定し、産生された ATP 量を測定することで菌の増殖を評価した。BADGP を 2.5 nM ~ 25 μ M の濃度で添加して調べたところ、24 時間でも 48 時間でも、低濃度の検体で有意な増殖の抑制効果が認められた (図 2)。OSMI-I を 2.5 nM ~ 25 μ M の濃度で添加した場合には、24 時間で有意な増殖促進効果が低濃度で認められ、また 48 時間では増殖促進効果は非常に大きくなっていた (図 2)。3-Fax-Peracetyl Neu5Ac を 2.5 nM ~ 25 μ M の濃度で添加して調べた場合でも OSMI-I を添加した場合と同様に、24 時間で低濃度で有意な増殖促進効果を認め、また 48 時間では増殖促進効果は非常に大きくなっていた (図 2)。また、Soyasaponin I を 0.05 nM ~ 0.5 μ M の濃度で添加して調べた場合も OSMI-I や 3-Fax-Peracetyl Neu5Ac を

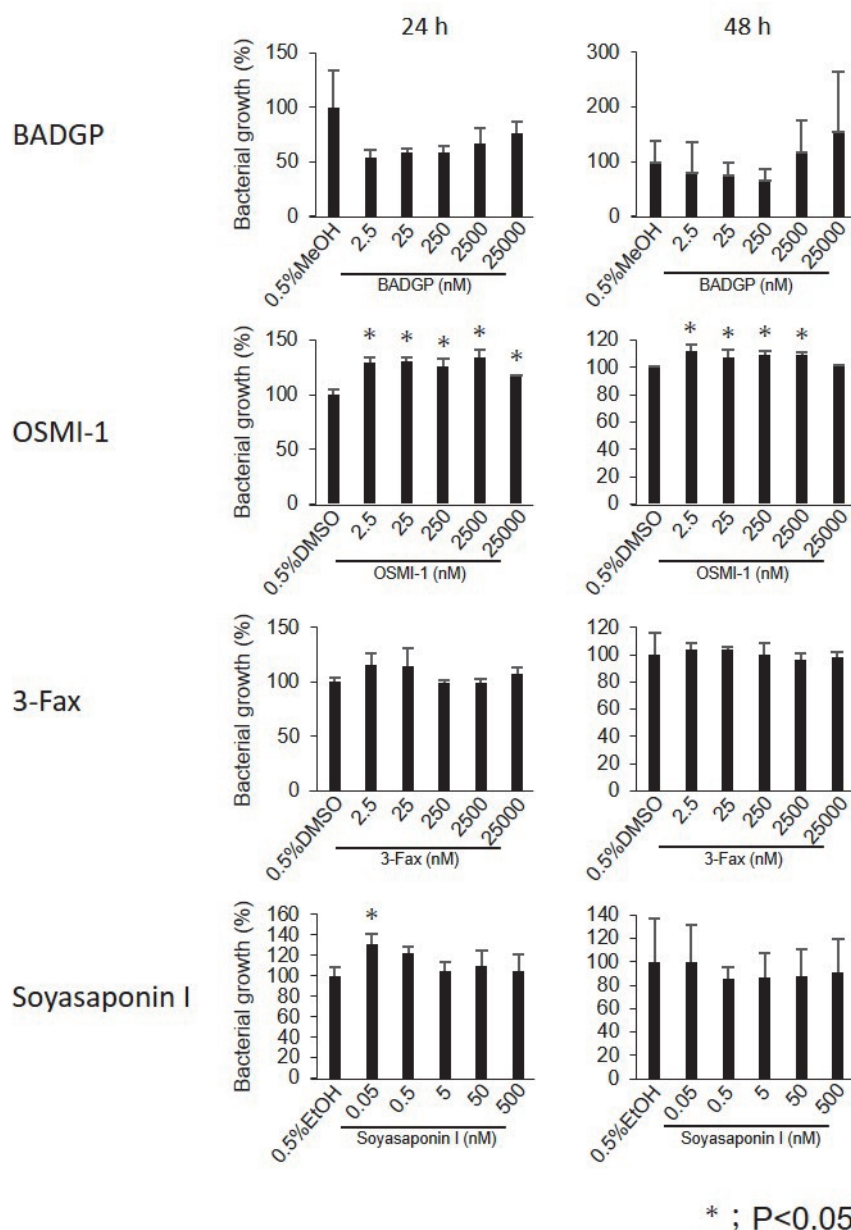


図1. sTSB 中における *P. gingivalis* 菌株の増殖への糖鎖修飾関連酵素阻害剤の影響

P. gingivalis 菌株を糖鎖修飾関連酵素阻害剤を含む sTSB 中で24時間または48時間培養した。菌の増殖は ATP 量を測定することで評価した。

添加した場合と同様に、24時間で低濃度で有意な増殖促進効果が認められたが、一方48時間では増殖促進効果は認められたものの、OSMI-I や3-Fax-Peracetyl Neu5Ac ほどの強力な増殖促進効果は認めず、効果は24時間と同程度であった（図2）。

- 糖タンパク質の合成における GlcNAc 転移酵素阻害剤ならびにシアル酸転移酵素阻害剤の効果
次に GlcNAc 転移酵素阻害剤またはシアル酸転移酵

素阻害剤が実際に *P. gingivalis* 菌株において糖鎖付加を阻害し、糖タンパク質合成を抑制しているのかどうかについて検証した。*P. gingivalis* 菌株を GlcNAc 転移酵素阻害剤またはシアル酸転移酵素阻害剤を含む sTSB 中で24時間培養した後、菌体を破碎して SDS-PAGE で展開し、糖タンパク質を特異的に染色可能な試薬を用いて可視化し、糖タンパク質の発現レベルを評価した。

BADGP を0.25 nM ~ 25 μ M の濃度で添加して調べ

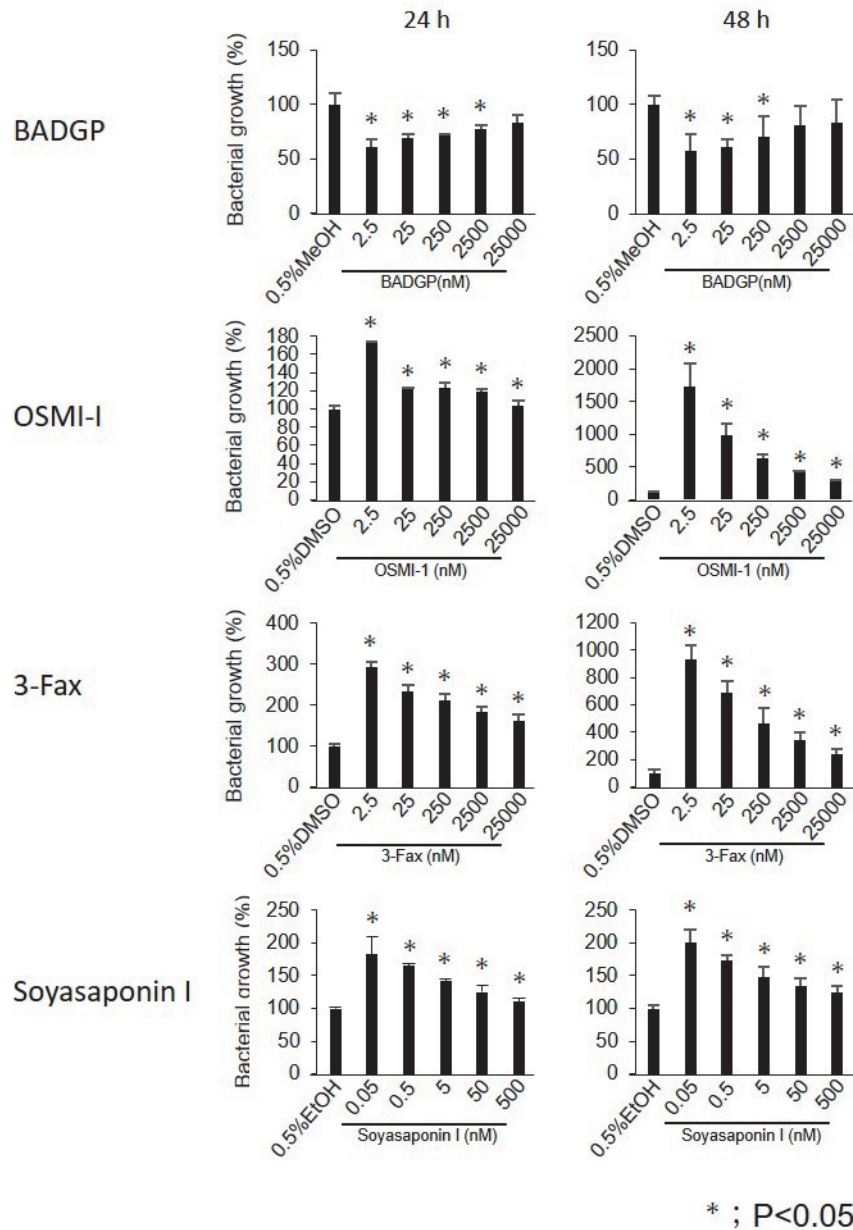


図2. 正常ヒト血清を含むsTSB中における *P. gingivalis* 菌株の増殖への糖鎖修飾関連酵素阻害剤の影響
P. gingivalis 菌株を糖鎖修飾関連酵素阻害剤および40%正常ヒト血清を含むsTSB中で24時間または48時間培養した。菌の増殖はATP量を測定することで評価した。

たところ、コントロールの検体における糖タンパク質の発現パターンと比較して明確な差を認める検体は無く、BADGPの存在下では糖タンパク質の発現レベルはむしろ増加していた(図3, 右上)。また、全タンパク質の発現パターンにおいても、BADGPにより発現抑制を受けている様子は伺えなかった(図3, 左上)。また3-Fax-Peracetyl Neu5Acを0.25 nM ~ 25 μ Mの濃度で添加して調べた場合でも、BADGPを添加した場合と同様に、コントロールの検体における糖タンパ

ク質の発現パターンと比較して明確な差は認めなかった(図3, 右下)。また同様に、全タンパク質の発現パターンにおいても、3-Fax-Peracetyl Neu5Acにより発現抑制を受けている様子は伺えなかった(図3, 左下)。さらに、OSMI-IとSoyasaponin Iを添加した場合も同様に、コントロールの検体における糖タンパク質の発現パターンと比較して明確な差は認めなかった(データ非表示)。

結 論

P. gingivalis 菌株の糖タンパク質合成に対して影響を及ぼす阻害剤が無かったため、本研究により、*P. gingivalis* の有する O-結合型経路の詳細を明らかにすることはできなかった。今後の研究では、糖転移酵素を特定して欠損株を作製するなど、アプローチの方法を根本的に見直して研究を進める必要があると考えられる。一方、本研究で用いた阻害剤による *P. gingivalis* の増殖促進効果は興味深いものであるため、今後メカニズムを追及する必要性があると思われる。

謝 辞

本研究は JSPS 科研費 (17K17114) の助成を受けたものです。本研究にご協力いただきました皆様に厚く御礼申し上げます。

利益相反 (COI)

本論文に関して、開示すべき利益相反状態はない。

文 献

- 1) Nothaft H, Szymanski CM. Protein glycosylation in bacteria: sweeter than ever. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8: 765-778.
- 2) Hanuszkiewicz A, Pittock P, Humphries F, Moll H, Rosales AR, Molinaro A, Moynagh PN, Lajoie GA, Valvano MA. Identification of the flagellin glycosylation system in *Burkholderia cenocepacia* and the contribution of glycosylated flagellin to evasion of human innate immune responses. *J Biol Chem.* 2014; 289: 19231-19244.
- 3) Zeituni AE, McCaig W, Scisci E, Thanassi DG, Cutler CW. The native 67-kilodalton minor fimbria of *Porphyromonas gingivalis* is a novel glycoprotein with DC-SIGN-targeting motifs. *J Bacteriol.* 2010; 192: 4103-4110.
- 4) Doig P, Kinsella N, Guerry P, Trust TJ. Characterization of a post-translational modification of *Campylobacter flagellin*: identification of a sero-specific glycosyl moiety. *Mol Microbiol.* 1996; 19: 379-387.
- 5) Guerry P, Doig P, Alm RA, Burr DH, Kinsella N, Trust TJ. Identification and characterization of genes required for post-translational modification of *Campylobacter coli* VC167 flagellin. *Mol Microbiol.* 1996; 19: 369-378.
- 6) Romain F, Horn C, Pescher P, Namane A, Riviere M, Puzo G, Barzu O, Marchal G. Deglycosylation of the 45/47-kilodalton antigen complex of *Mycobacterium tuberculosis* decreases its capacity to elicit in vivo or in vitro cellular immune responses. *Infect Immun.* 1999; 67: 5567-5572.
- 7) Herrmann JL, O'Gaora P, Gallagher A, Thole JE, Young DB. Bacterial glycoproteins: a link between glycosylation and proteolytic cleavage of a 19 kDa antigen from *Mycobacterium tuberculosis*. *EMBO J.* 1996; 15: 3547-3554.
- 8) Holt SC and Ebersol JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the 'red complex', a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis. *Periodontol 2000.* 2005; 38: 72-122.
- 9) Brown LJ, Loe H. Prevalence, extent, severity and progression of periodontal disease. *Periodontol 2000.* 1993; 2: 57-71.
- 10) Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD, Socransky SS. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol.* 2000; 27: 648-657.
- 11) Inomata M, Horie T, Into T. OmpA-like proteins of *Porphyromonas gingivalis* contribute to serum resistance and prevent Toll-like receptor 4-mediated host cell activation. *PLoS ONE.* 2018; 13: e0202791.
- 12) Genco R, Offenbacher S, Beck J. Periodontal disease and cardiovascular disease: epidemiology and possible mechanisms. *J Am Dent Assoc.* 2002; 133: 14S-22S.
- 13) Lundberg K, Wegner N, Yucel-Lindberg T, Venables PJ. Periodontitis in RA-the citrullinated enolase connection. *Nat Rev Rheumatol.* 2010; 6: 727-730.
- 14) Kamer AR, Fortea JO, Videla S, Mayoral A, Janal M, Carmona-Iragui M, Benejam B, Craig RG, Saxena D, Corby P, Glodzik L, Annam KR, Robbins M, de Leon MJ. Periodontal disease's contribution to Alzheimer's disease progression in Down syndrome. *Alzheimers Dement (Amst).* 2016; 2: 49-57.
- 15) Dasanayake AP, Russell S, Boyd D, Madianos PN, Forster T, Hill E. Preterm low birth weight and periodontal disease among African Americans. *Dent Clin North Am.* 2003; 47: 115-125.
- 16) Gallagher A, Aduse-Opoke J, Rangarajan M, Slaney JM, Curtis MA. 2003. Glycosylation of the Arg-gingipains of *Porphyromonas gingivalis* and comparison with glycoconjugate structure and synthesis in other bacteria. *Curr Protein Pept Sci.* 2003; 4: 427-441.
- 17) Shoji M, Sato K, Yukitake H, Kondo Y, Narita Y, Kadowaki T, Naito M, Nakayama K. Por Secretion System-Dependent Secretion and Glycosylation of *Porphyromonas gingivalis* Hemin-Binding Protein 35. *PLoS One.* 2018; 13: e21372.
- 18) Nakao R, Tashiro Y, Nomura N, Kosono S, Ochiai K, Yonezawa H, Watanabe H, Senpuku H. Glycosylation

- of the OMP85 homolog of *Porphyromonas gingivalis* and its involvement in biofilm formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008; 365: 784–789.
- 19) Murakami Y, Hasegawa Y, Nagano K, Yoshimura F. Characterization of wheat germ agglutinin lectin-reactive glycosylated OmpA-like proteins derived from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun.* 2014; 82: 4563–4571.
 - 20) Horie T, Inomata M, Into T, Hasegawa Y, Kitai N, Yoshimura F, Murakami Y. Identification of OmpA-Like Protein of *Tannerella forsythia* as an O-Linked Glycoprotein and Its Binding Capability to Lectins. *PLoS One.* 2016; 11: e0163974.
 - 21) Hang HC, Bertozzi CR. The chemistry and biology of mucintype O-linked glycosylation. *Bioorg Med Chem* 2005; 13: 5021–5034.
 - 22) Gill DJ, Clausen H, Bard F. Location, location, location: new insights into O-GalNAc protein glycosylation. *Trends Cell Biol* 2011; 21: 149–158.
 - 23) Yuzwa SA, Cheung AH2, Okon M, McIntosh LP, Vocadlo DJ. O-GlcNAc modification of tau directly inhibits its aggregation without perturbing the conformational properties of tau monomers. *J Mol Biol.* 2014; 426: 1736–1752.
 - 24) Ortiz-Meoz RF, Jiang J, Lazarus MB, Orman M, Janetzko J, Fan C, Duveau DY, Tan ZW, Thomas CJ, Walker S. A small molecule that inhibits OGT activity in cells. *ACS Chem Biol.* 2015; 10: 1392–1397.
 - 25) Wu CY, Hsu CC, Chen ST, Tsai YC. Soyasaponin I, a potent and specific sialyltransferase inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 284: 466–469.
 - 26) Wang YC, Stein JW, Lynch CL, Tran HT, Lee CY2, Coleman R, Hatch A, Antontsev VG, Chy HS, O'Brien CM, Murthy SK, Laslett AL, Peterson SE, Loring JF. Glycosyltransferase ST6GAL1 contributes to the regulation of pluripotency in human pluripotent stem cells. *Sci Rep.* 2015; 5: 13317.
-