歯周病関連グラム陰性桿菌の 細胞膜蛋白質の比較

小 中 島 諭 一 谷 明 大 浦 清*
中 沢 賢 一 柳 春 植 足 立 裕 亮
佐 川 寛 典 森 政 和*

大阪歯科大学細菌学教室(主任: 佐川寛典教授)

*大阪歯科大学薬理学教室(主任: 森 政和教授)

〔受付: 昭和63年8月25日〕

Comparison of cell membrane proteins from gram-negative rods related to periodontitis

Yuichi Konakajima, Akira Tani, Kiyoshi Ohura*,
Kenichi Nakazawa, Sik You Choon, Hiroaki Adachi,
Hirosuke Sagawa and Masakazu Mori*

Department of Bacteriology, Osaka Dental University
(Chief: Prof. Hirosuke Sagawa)

*Department of Pharmacology, Osaka Dental University
(Chief: Prof. Masakazu Mori)

1-47, Kyobashi, Higashi-ku, Osaka 540, Japan

〔Accepted for publication: August 25, 1988〕

Key words: Gram-negative rods / cell membrane protein / periodontitis / electrophoresis, polyacrylamide gel

Abstract: Cell membrane proteins of Gram-negative rods solubilized with sodium lauryl sarcosinate (Sarkosyl) were compared by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. The patterns obtained from the species of *Bacteroides* were different each other, and that was also so in *Fusobacterium*. Two strains of *B. asaccharolyticus*, three strains of *F. nucleatum* and two strains of *F. varium* showed different electrophoretic patterns. On the other hand, the patterns from *H. actinomyces* and *C. ochracea* were similar within each strain, the pattern from *Bacteroides asaccharolyticus* ATCC 25260 was found to be similar to that from *C. ochracea*, however. These results indicate that it is difficult to utilize this method to identify the *Bacteroides*, *Fusobacterium* and *C. ochracea* strains.

緒 言

歯周病の発病と進展に口腔の常在細菌が密接に関与していることは、多くの報告から明らかである¹⁾。近年、そのなかでもとくに、*Bacteroides* や

大阪市東区京橋 1-47 (〒540)

Fusobacterium などのグラム陰性桿菌の果たす役割が注目されている。それらの細菌、とくに *Bacteroides* 属では、わずかな表現形質の違いや、核酸の相同性などにより、これまで以上に細かく分類されつつある²⁾。一般に、細菌の分類の基準となる表現形質としては、各種の糖や蛋白質の分解

性などの生化学的性状が重視されている^{2,3)}。そして、これらの基質の分解性は、同定されようとする細菌が産生する各種の基質分解酵素と密接に関係している。しかし、それらの酵素の産生性は、たとえ同定されようとする細菌が表現形質としてもっていても、性状検査における培養条件のちがいや、検査法自体の再現性の問題などによってかならずしも検出できない場合があり、このために同定に不明確さが残ることは否定できない。そこで本実験では、細菌によって産生された酵素の多くが局在すると考えられる細胞膜画分を数種の細菌から分離し、これを N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム（サルコシル）によって可溶化したものをドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドスラブゲルを用いて電気泳動（SDS-PAGE）を行なった。そして、その泳動パターンの異同を比較することが、細菌同定の補助手段として応用できるかを検討した。

材料と方法

1. 供試菌株

Bacteroides

B. intermedius ATCC 25261

B. fragilis GM 7000

B. melaninogenicus ATCC 25845

B. oralis ODU 101

B. asaccharolyticus ATCC 25260

ATCC 27067

B. gingivalis 1312

381

Fusobacterium

F. nucleatum ATCC 10953

ATCC 25586

MW-42

F. rusii ATCC 25533

F. glutinosum Ju-21

F. varium J-43

ATCC 8501

F. freundii ATCC 9817

Leptotrichia

L. buccalis ATCC 19616

Capnocytophaga

C. ochracea M-12

SE-2

Haemophilus (*Actinobacillus*)

H. actinomycetemcomitans ATCC 29522

Y-4

Aa-13

Aa-54

Escherichia coli K-12

以上の *Bacteroides* 属 6 菌種 8 株, *Fusobacterium* 属 5 菌種 8 株, *Leptotrichia* 属 1 菌種 1 株, *Capnocytophaga* 属 1 菌種 2 株, *Haemophilus* 属 1 菌種 4 株, および、対照としての *Escherichia coli* 1 株の計 24 株を使用した。

2. 細胞膜画分の調製法

細菌細胞からの細胞膜画分の調製は、Inoue ら⁴⁾, Spratt ら⁵⁾ の方法に準じて行なった。すなわち、1,000ml の GAM ブイヨン(ニッスイ)に、24 時間前培養した菌液 20ml を接種し、嫌気条件下 (N_2 , 80%; CO_2 , 10%; H_2 , 10%), 37°C で約 24 時間培養した。対数増殖期の後期に達した菌液を 4°C, 10,000×g で遠心沈殿して集菌した後、得られた菌体を 10mM リン酸二水素ナトリウム—リン酸水素二ナトリウム緩衝液 (リン酸ナトリウム緩衝液, pH 7.0) で 1 回洗浄し、60μg/ml フェニルメチルスルホニルフルオリド加 10mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に浮遊させ、超音波破砕器 (INSONATOR Model 200M, 久保田製作所) を用いて、4°C 水冷下 9,000Hz, 200W で 15 分間、菌体を破壊した。この試料を 4°C, 6,000×g で 30 分間遠心沈殿した後、上清をさらに、4°C, 100,000×g で 30 分間遠心沈殿した。沈渣を同緩衝液で 1 回洗浄し、20mg protein/ml となるように、50mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) に浮遊させ、膜標品とした。これを、30μl ずつマイクロチューブに分注し、-80°C で凍結保存した。SDS-PAGE にさいして、試料を室温で溶解後、30μl の膜標品に対して 2μl の 20% (W/V) サルコシルを添加し、20°C で 20 分間作用させ細胞膜のみを可溶化した⁷⁾。これを 10,000×g で 30 分間遠心沈殿し、上清に 3% (W/V) ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), 30% (W/V) グリセ

Fig. 1 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the cell membrane of *Bacteroides* species. Lane M, Molecular-weight standards; Lane A, *B. intermedius* ATCC 25261; Lane B, *B. fragilis* GM 7000; Lane C, *B. melaninogenicus* ATCC 25845; Lane D, *B. oralis* ODU 101; Lane E, *B. asaccharolyticus* ATCC 27067; Lane F, *B. asaccharolyticus* ATCC 25260; Lane G, *B. gingivalis* 381; Lane H, *B. gingivalis* 1312; Lane I, *E. coli* K-12.

リン、および0.02% (W/V) プロモフェノールブルーを含む0.2M トリス-塩酸緩衝溶液 (pH 6.8) 15 μ l と 5 μ l の2-メルカプトエタノールを加え、100°C の温水浴中で2分間処理した。この試料を次の SDS-PAGE に供試した。

3. 細胞膜蛋白質の SDS-PAGE

SDS-PAGE は Laemmli ら⁶⁾および Spratt ら⁵⁾の方法に準じて行なった。

すなわち、分離用には、10% (W/V) アクリルアミド、0.28% (W/V) N, N'-メチレンビス (アクリルアミド) および0.1% (W/V) SDS を含む37.4mM トリス-塩酸緩衝溶液 (pH 8.7) に、0.1% (W/V) N, N', N', N'-テトラメチレンジアミンならびに0.1% (W/V) 過硫酸アンモニウムを添加して調製した均一スラブゲルを、濃縮用には4%スラブゲルを用いて、0.1% (W/V) SDS, 0.05M トリス-0.38M グリシン緩衝液 (pH 8.3) を泳動用緩衝液として、前述の試料をスラブ・ディスク電気泳動装置 (SJ-1060・SDH, アトー)

で、100V 定電圧で約4時間泳動を行なった。泳動終了後ゲルをクマシーブリリアントブルーで染色したのち、観察を行なった。

結 果

1. *Bacteroides* の細胞膜蛋白質

サルコシルで可溶化した *Bacteroides* および *E. coli* の細胞膜蛋白質の泳動パターンを Fig. 1 に示した。

その結果、6種の *Bacteroides* の細胞膜蛋白質は、分子量約24,000から、約150,000の間に分布していた。これらの蛋白質の分布パターンは、菌種間において相違が認められたが、主要な蛋白質は、ほとんどの菌株で、分子量110,000~120,000, 65,000~70,000, および40,000~50,000の間に分布していた。また、全ての菌株に共通な分子量の蛋白質は存在しなかった。

B. asaccharolyticus 2株の同一菌種間においても、泳動パターンにわずかな相違が認められ

Fig. 2 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the cell membrane of *Fusobacterium* species and *Leptotrichia buccalis*. Lane M, Molecular weight standards; Lane A, *F. nucleatum* ATCC 10953; Lane B, *F. nucleatum* ATCC 25586; Lane C, *F. nucleatum* MW-42; Lane D, *F. rusii* ATCC 25533; Lane E, *F. glutinosum* Ju-21; Lane F, *F. varium* J-43; Lane G, *F. varium* ATCC 8501; Lane H, *F. freundii* ATCC 9817; Lane I, *L. buccalis* ATCC 19616; Lane J, *E. coli* K-12.

た。すなわち、Lane F の *B. asaccharolyticus* ATCC 25260 には、Lane E の *B. asaccharolyticus* ATCC 27067 で検出されなかった分子量 150,000 (矢印—1)、54,000 (矢印—2)、および 42,000 (矢印—3) のバンドがみられた。逆に、ATCC 27067 には、ATCC 25260 でみられなかった分子量 71,000 (矢印—4) のバンドが認められた。また、Lane F の *B. asaccharolyticus* ATCC 25260 は、Lane C の *B. melaninogenicus* ATCC 25845 の泳動パターンによく類似していた。

B. asaccharolyticus から新しい種に再分類された *B. gingivalis* 2 株のうち、Lane H の *B. gingivalis* 1312 の細胞膜蛋白質の泳動パターンは *B. asaccharolyticus* 2 株のそれとよく類似していたが、*B. gingivalis* 1312 には *B. asaccharolyticus* 2 株には見られなかった分子量 37,000 (矢印—5) のバンドが存在した。Lane G の *B. gin-*

givalis 381 の蛋白バンドの数は、他の細菌に比べて少なかった。しかし、それらのバンドのうち、*B. gingivalis* 381 には *B. gingivalis* 1312 に存在しない、分子量 48,000、52,000、56,000 および 60,000 の 4 本のバンドが存在した。

口腔には常在しない *B. fragilis* の細胞膜蛋白質の泳動パターン (Lane B) は、Lane A の口腔常在性の *B. intermedius* ATCC 25261 のそれとよく類似していたが、染色された蛋白バンドの濃度から、*B. intermedius* とは構成蛋白の量的比率に違いが認められた。

2. *Fusobacterium* および *L. buccalis* の細胞膜蛋白質

5 種 8 株の *Fusobacterium*、1 株の *L. buccalis*、および *E. coli* の細胞膜蛋白質の泳動パターンを Fig. 2 に示した。

Fusobacterium および *L. buccalis* も Bacte-

Fig. 3 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of the cell membrane of *Capnocytophaga ochracea* and *Haemophilus actinomycetemcomitans*. Lane M, Molecular weight standards; Lane A, *C. ochracea* M-12; Lane B, *C. ochracea* SE-2; Lane C, *H. actinomycetemcomitans* ATCC 29522; Lane D, *H. actinomycetemcomitans* Y-4; Lane E, *H. actinomycetemcomitans* Aa-13; Lane F, *H. actinomycetemcomitans* Aa-54; Lane G, *E. coli* K-12.

roides と同様に、それらの細胞膜蛋白質は分子量約 27,000~140,000 に分布していた。また、この 2 属の細菌には分子量約 60,000 (矢印-6) の等しい分子量の蛋白質が存在した。

F. nucleatum 3 株間で泳動パターンを比較した場合、3 株間でパターンに相違が認められた。とくに、Lane A の *F. nucleatum* ATCC 10953 には、他の 2 株には存在しない、分子量 46,000 (矢印-7) の太いバンドが認められた。また、Lane F および G の *F. varium* 2 株間においても同様にわずかなパターンの相違が認められた。

3. *C. ochracea* および *H. actinomycetemcomitans* の細胞膜蛋白質

C. ochracea 2 株, *H. actinomycetemcomitans* 4 株, および *E. coli* の細胞膜蛋白質の泳動パターンを Fig. 3 に示した。

C. ochracea 2 株の泳動パターンは、非常に良く類似していたが、Lane A の M-12 に存在した

分子量 83,000 (矢印-8) および 34,000 (矢印-9) のバンドは Lane B の SE-2 には存在しなかった。*C. ochracea* と他の属の細菌とを比較した場合、*C. ochracea* には、*B. asaccharolyticus* ATCC 25260 と数種の共通した分子量の蛋白質が存在した。

H. actinomycetemcomitans 4 株の主要な蛋白質のバンドは全て一致した。

考 察

本実験では、歯周病関連のグラム陰性桿菌の細胞膜を抽出し、SDS-PAGE によってその構成蛋白質を分析した。その結果、今回供試した *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *C. ochracea*, および、*H. actinomycetemcomitans* の細胞膜画分には多くの蛋白質成分が存在した。

Tanner ら⁸⁾の全菌体の泳動結果では、*B. gingivalis* は分子量 4,6000, 66,000, 84,000~85,000

および120,000に、*B. oralis* では分子量46,000に、*B. fragilis* でも分子量46,000に 主要蛋白 バンドの存在することが示されており、本実験における細胞膜画分の泳動結果とよく類似していた。また、彼の報告では、*F. nucleatum* においても分子量46,000に主要蛋白バンドが認められるとしているが、本実験では、*F. nucleatum* ATCC 10953株に同一分子量の蛋白バンドが認められた。一方 Grenier ら⁹⁾は、*B. gingivalis* の外膜蛋白の泳動パターンを示している。その結果では、外膜には分子量約100,000前後の2～3の主要蛋白のみが存在することを示している。Overbeeke ら¹⁰⁾は、*E. coli* の外膜蛋白質もやはり、主として、30,000～42,000の2～3種の主要蛋白質を有すると述べている。そして、*H. actinomycetemcomitans*¹¹⁾や *Actinobacillus pleuropneumoniae*¹²⁾の外膜の泳動結果でも、それらの細菌の外膜に含まれる蛋白質は、2～3種類であると報告されている。以上のように、外膜画分には、蛋白質の種類はそれほど多く存在しないこと、ならびに、全菌体の泳動結果と細胞膜画分の泳動結果とがよく一致することから、グラム陰性桿菌の構成蛋白質の多くは細胞膜画分に存在していると考えられる。

山口ら¹³⁾は、グラム陰性桿菌には、分子量60,000の共通蛋白質が存在することを報告しているが、本実験に供試した菌株のなかでは *Fusobacterium*、および *L. buccalis* で同一分子量の蛋白質が認められた。とくに、*F. nucleatum* 3株、*F. glutinosum*、および *F. varium* で明瞭であった。しかし、これらの蛋白質と山口ら¹³⁾の報告している蛋白質とで、抗原性や機能などについて共通性があるかについては現在のところ不明である。

本実験では、細胞膜画分のみを抽出し泳動した

が、その結果、*Bacteroides* 属、*Fusobacterium* 属では、同属の種間でその構成蛋白質に相違が認められた。Tanner ら⁸⁾は *Bacteroides* および *Fusobacterium* 全菌体の可溶性蛋白質画分を SDS-PAGE によって分析しており、その結果においても、同一の属に分類されている細菌でも種間で泳動パターンに相違が認められることを示している。これらのことから、細胞膜構成蛋白質は、分類学上の属のレベルではかならずしも一致しないといえる。また同一種の細菌間においては、*H. actinomycetemcomitans* および、*C. ochracea* ではその泳動パターンはよく類似していたが、*F. nucleatum* や *F. varium*、とくに *F. nucleatum* では、かなりの相違が見られた。Di Rienzo ら¹⁴⁾、¹⁵⁾も同様に、*H. actinomycetemcomitans* のエンベロープ蛋白質の泳動パターンは、同種の株間では、よく一致するが、他の口腔常在グラム陰性菌の同属、同種の株間ではかなりの相違がみられると述べている。以上のことから、*Bacteroides* や *Fusobacterium* では、分類学上同属同種におかれている細菌でも、株間で細胞膜構成蛋白質の泳動パターンに相違のあるものが存在すること。*C. ochracea* では、*B. asaccharolyticus* に類似の泳動パターンを示す株が存在すること、および、それぞれの菌種を特徴づけるような特定の蛋白バンドは存在しないことから、これらの細菌に本法を同定の手段として用いるのは困難であると考えられる。一方、*H. actinomycetemcomitans* の細胞膜構成蛋白質の泳動パターンは株間で共通性が認められた。また、今回供試した他の属の細菌には類似した泳動パターンを示すものが存在しないことから、本法は *H. actinomycetemcomitans* の検出には有用であることが示唆される。

抄録：嫌気性のグラム陰性桿菌、とくに *Bacteroides* 属は、表現形質や核酸の相同性により細分化されつつある。本実験では、歯周病関連グラム陰性桿菌のサルコシル可溶性細胞膜蛋白質を、SDS-ポリアクリルアミドスラブゲルを用いて電気泳動を行なった。そして、得られた泳動パターンの異同が、細菌の同定に応用できるかを検討した。その結果、*Bacteroides* 属、および *Fusobacterium* 属では、同属の菌種間で泳動パターンに相違がみられた。また、*B. asaccharolyticus*、*F. nucleatum*、および *F. varium* では、同種の株間でも相違がみられた。一方、*H. actinomycetemcomitans* および *C. ochracea* ではパターンの相違は殆どみられなかった。しかし、*Bacteroides* 属のなかに、*C. ochracea* と類似の泳動パターンを示す株が存在した。よって、本法を *Bacteroides*、*Fusobacterium* および *C. ochracea* の同定に応用するのは困難であると考えられる。

文 献

- 1) Jenco, R. J. and Mergenhagen, S. E. : Host-parasite interactions in periodontal diseases. Proceedings of a symposium held at Buffalo, New York 4-6 May 1981. Am. Soc. Microbiol. Washington, D. C. 1982.
- 2) 戴内英子他 : 新しい分類学に伴走する細菌同定法. 日本細菌学会教育委員会編. 菜根出版, 東京, 1987.
- 3) Krieg, N. R., Holt, J. G. : Bergey's manual of Systematic Bacteriology Volume 1. Williams & Wilkins, Baltimore, U.S.A., 1984.
- 4) Inoue, M. and Guthrie, J. P. : A mutation which changes a membrane protein of *E. coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **64** : 957-961, 1969.
- 5) Spratt, B. G. : Properties of the penicillin binding proteins of *Escherichia coli* K-12. Eur. J. Biochem. **72** : 341-352, 1973.
- 6) Laemmli, U. K. and Favre, M. : Mutation of the head of bacteriophage T4. J. Mol. Biol. **80** : 575-599, 1973.
- 7) Filip, C., Fletcher, G., Wulff, J. L. and Farhart, C. F. : Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate. J. Bacteriol. **115** : 717-722, 1973.
- 8) Tanner, A.C.R., Listgarten, M.A., Ebersole, J. L. and Strzempko, M. N. : *Bacteroides forsythus* sp. nov., a slow-growing, Fusiform Bacteroides sp. from the human oral cavity. Int. J. Syst. Bacteriol. **36** : 213-221, 1986.
- 9) Grenieer, D. and Mayrand, D. : Functional Characterization of Extracellular Vesicles Produced by *Bacteroides gingivalis*. Infect. Immun. **55** : 111-117, 1987.
- 10) Overbeeke, N. and Lugtenberg : Major outer membrane proteins of *Escherichia coli* strains of human origin. J. Gen. Microb. **121** : 373-380, 1980.
- 11) Scannapieco, F. A., Miller, S. J., Reynolds, H. S. and Zambon, J. J. : Effect of anaerobiosis on the surface ultrastructure and surface proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* (*Haemophilus actinomycetemcomitans*). Infect. Immun. **55** : 2320-2323, 1987.
- 12) MacInnes, J., I. and Rosendal, S. Z. : Analysis of major antigens of *Haemophilus* (*Actinobacillus*) *pleuropneumoniae* and related organisms. Infect. Immun. **55** : 1626-1634, 1987.
- 13) 山口博之, 田口晴彦, 石山業弘, 金森政人, 緒方幸雄 : グラム陰性桿菌に分布する共通蛋白抗原について. 日細菌誌 **41** : 701-707, 1986.
- 14) Di Rienzo, J. M. and Spieler, E. L. : Identification and characterization of the major cell envelope proteins of oral strains of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. Infect. Immun. **39** : 253-261, 1983.
- 15) DiRienzo, J. M. and Rosan, B. : Isolation of a major cell envelope protein from *Fusobacterium nucleatum*. Infect. Immun. **44** : 386-393, 1984.