歯周病原性細菌の外膜タンパクの病原性 —*A. actinomycetemcomitans* を中心として—

小松 澤 均

広島大学大学院・医歯薬学総合研究科・細菌学教室
〒734-8553 広島市南区霞 1-2-3

[受理：2004 年 6 月]

歯周病は細菌感染症であり、これまでに種々の歯周病原性細菌が報告されている。これまで、細菌側の病原性因子としては主として毒素を中心に研究がなされてきた。しかし、近年では宿主側の細菌の認識機構についての研究が進み、細菌と宿主の相互作用についての分子レベルでの解析の重要性が期待されている。これまで細菌の表層成分であるリポ多糖については詳細な検討がなされているが、タンパク成分についてはあまり検討されていない。そこで、歯周病原性細菌のこれまでに報告されている外膜タンパクについて要約し、今後の歯周病原性細菌の外膜タンパクの歯周病発症への関与についての研究の一助にしたいと考える。また、我々の行った *A. actinomycetemcomitans* の外膜タンパクの病原性因子としての解析結果を紹介し、*A. actinomycetemcomitans* と宿主細胞の相互作用について外膜タンパクを主眼とした観点から考察を行った。

1. はじめに

歯周病は細菌感染症の一つである。これまでに、その原因菌として *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans* 等種々の細菌が報告されている。これらの細菌は歯周病患者の炎症部位から高頻度で分離されていることから、デンタルプラークを形成し歯周組織に定着したこれらの細菌が、宿主に炎症を惹起し歯周病を発症することが考えられる。種々の細菌感染症を考えた際に、その原因菌は固有の病原性を有することで局所あるいは全身性に疾患を引き起こす。したがって、歯周病原性細菌もこれまでにその固有の病原性因子として毒素を中心として多くの因子が同定され、それらの機能について解明されてきている (11, 30, 54, 58, 92, 103)。また、近年ではこれらの病原性因子の病態との関連性についての研究とともに細菌の表層成分と宿主細胞との相互作用に関する研究が精力的になされてきている。特に宿主細胞の細菌に対するパターン認識機構として細胞表層因子である Toll-like receptor (TLR) や細胞内因子である NOD の解明が

なされ、パターン認識後の細胞内の情報伝達経路も明らかになってきている (1, 5, 39, 41)。宿主細胞は細菌を認識することで、サイトカインの産生誘導などの種々の応答を引き起こすと考えられる。歯周病においても宿主細胞が歯周病原性細菌を認識し、それに対して応答することにより炎症を引き起こしていることが予想される。これまでの研究で、宿主の認識する細菌側の因子として、ペプチドグリカン、リポ多糖、リポタイコ酸、リポタンパク等が歯周病原性細菌を含め多くの細菌で明らかになってきているが、今後宿主の認識機構のさらなる解明により細菌側の因子もさらに多くの因子が明らかになっていくと思われる。宿主との応答という点から考えた場合、細菌側の因子としては表層成分が重要であると思われるが、細菌の表層成分としてはグラム陽性菌ではリポ多糖、ペプチドグリカン、タイコ酸、タンパク質などが、グラム陰性菌ではリポ多糖、リポタンパク、外膜タンパクが考えられる。歯周病原性細菌はグラム陰性菌であり、これまでにリポ多糖に関しては多くの研究がなされてきているが、その他の因子については多くは検討されていない。歯周病原性細菌の外膜タンパクについてはこれまでに歯周病患者血清との反応性については報告があるものの、個々の外膜タンパクについての詳細な検討はほとんどされていない。しかし、歯周病患者血清と強い反応性を有することから、歯周病原性菌の持つ外膜タンパクのいくつかは抗原性タンパクとして働いているこ

Hitoshi KOMATSUZAWA
Virulence of outer membrane proteins of periodontopathogenic bacteria
Department of Bacteriology, Hiroshima University Graduate School of Biomedical Sciences

とが考えられる。そこで、今回これまでに報告されている歯周病原性細菌の外膜タンパクについての病原性についてまとめ、また私たちが同定した *A. actinomycetemcomitans* の外膜タンパクについての研究成果をあわせて紹介し、現時点で考えられる外膜タンパクと宿主細胞との関連性について考察したい。

2. 外膜タンパク

これまでに外膜タンパクの研究は主として大腸菌から始まり、現在では種々の細菌において研究がなされている。外膜タンパクは文字通り外膜に局在するタンパクのこと(図1)であり、病原性因子としての解析よりも生理作用としての解析が多くなされてきている。その代表としてポーリンタンパクがある(65, 66, 86)。ポーリンタンパクの多くは大腸菌の OmpF, OmpC のように非特異的に親水性の比較的小さい分子の通過に関与している。また、大腸菌の主要な外膜タンパクに OmpA があり、種々のグラム陰性細菌において OmpA と相同性のあるタンパクが同定され、これらのタンパク群を OmpA ファミリーとして総称している(42)。大腸菌の OmpA は外膜の維持・安定化に必須であり、ファージレセプターとしての報告もある(42, 62)。OmpA を分解するエラスターゼを処理することにより外膜が崩壊し、細胞死に至ることも報告されている(8)。また、OmpA は大腸菌の OmpC/F のようにチャネルを形成しているという報告もある(91)。その他には鉄、ビタミン、などのレセプターとしての報告も多数ある(12, 13, 56, 74)。また、タンパクの分泌機構 (typeI-IV) に関与する外膜タンパクの存在も知られている(20, 38)。

近年では種々の病原性細菌において外膜タンパクの病原性因子としての報告がなされている。特に大腸菌、Salmonella 属、Neisseria 属、Yersinia 属などで多数の報告がなされている(21, 36, 42, 60, 70, 73, 95)。外膜タンパクという局在性から特に付着・侵入因子としての研究がなされ、またその他には血清抵抗性因子等の報告もある。また、Klebsiella pneumoniae や Neisseria meningitidis においてその多様な病原性の点から、ワクチンへの応用が検討され

ている(9, 27, 42, 80)。
大腸菌の外膜タンパクの病原因子について表1に簡潔に示す。大腸菌においては Type III 分泌システムに関連した外膜タンパクであるインティミンとエフェクタータンパクである Tir との関連性についての報告が多数ある(17, 67)。インティミンのレセプターである細菌の産生した Tir を分泌システムにより細胞にインジェクションし細胞表層に局在させることで、細菌の表層タンパクであるインティミンを介して効率よく細胞へ付着できるシステムである。OmpA は内皮細胞の系で付着・侵入因子として報告されており、その細胞側のレセプター (gp96) も明らかになっている(47, 75-77)。また、糖タンパクである TibA および Efa1/LifA も付着因子として報告されている(6, 28, 40, 55)。付着因子以外の病原性としては OmpA が血清抵抗性因子であることが報告されている(78, 96)。IgG の Fc 結合タンパクとして同定された EibA-D タンパクはその後の研究で付着因子および血清抵抗性因子として報告されている(83, 84)。

3. 歯周病原性細菌の外膜タンパク

これまでに報告されている歯周病原性細菌の外膜タンパクについて表2に示す。

Porphyromonas gingivalis

Murakamiらの報告(63)により、*P. gingivalis* ATCC33277株の主要な外膜タンパク7つが確認されており、そのうちの6つのタンパクについてその一次構造まで同定されている。その中には *P. gingivalis* の主要な病原性因子である Lys-gingipain と Arg-gingipain も含まれているが、このタンパクはいわゆる典型的な外膜タンパクに認められる膜に貫通した領域は保持していないと考えられる。しかし、外膜タンパク画分としてこれらのタンパクが同定されたのは興味深い。これらのタンパクの機能については他で詳細に掲載されているので本章では省略させて頂く。分子量 75 kDa, 43 kDa (PG32), 42 kDa (PG33) の外膜タンパクはこれまでも抗原性タンパクとして報告されている(82, 101)。分子量 110 kDa のタンパクは TonB-linked receptor antigen である RagA であり、7つのうち1つ未同定であった分子量 47 kDa のタンパクはリポタンパクである RagB であ

図1. グラム陰性菌の表層構造

表1. 大腸菌外膜に存在するタンパク性病原性因子

OMP	Characteristics	References
Intimin	Adhesin (binding to Tir: Type III secretion system)	17, 67
OmpA	Adhesin (binding to gp96 in endothelial cell)	47, 75, 76, 77
TibA	Serum resistance	78, 96
Efa1/LifA	Adhesin	28, 55
EibA-D	Fc binding, Adhesin, Serum resistance	6, 40
Ap58	Hemagglutinin, Adhesin	83, 84
		61

表 2. 歯周病原性細菌の外膜タンパク

M.W.	name	Characteristics (references)	M.W.	name	Characteristics (references)
<i>Porphyromonas gingivalis</i>			<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>		
110 kDa	RagA	TonB-linked receptor antigen (63)	29 kDa	Omp29	OmpA-like protein, immunoantigen (71, 97-99)
75 kDa		Immunoreactive (63, 102)			Lactoferrin binding, laminin binding (2, 3)
51 kDa	Lys-gingipain	Protease (63)	16 kDa	Omp16	Immunoantigen (3, 99)
47 kDa	RagB	Lipoprotein (34, 63)	39 kDa		Immunoantigen (48)
44 kDa	Arg-gingipain	Protease (63)	<i>Fusobacterium nucleatum</i>		
41/40 kDa	PG32, PG33	Immunoantigen (63, 82)	40 kDa	FomA	Porin, Fc binding (31, 43, 79)
34 kDa	IhtB	Ton-B dependent hemin receptor (23)	30 kDa		Coaggregation factor (85)
73 kDa	HmuR	Ton-B dependent hemin receptor (88)	60 kDa		Immunoantigen (7)
20 kDa		Unknown (89)	55 kDa		Immunoantigen (7)
53 kDa		Immunoantigen (68, 69)	65 kDa		Unknown (15)
40 kDa		Coaggregation factor (35, 64)	<i>Capnocytophaga gingivalis</i>		
<i>Treponema denticola</i>			155 kDa		Immunoantigen (44)
64 kDa		Bind to fibroblast (29)	110 kDa		Immunoantigen (44)
53 kDa		Laminin and fibronectin binding (29)	105 kDa		Immunoantigen (44)
		Pore-forming activity to HeLa cells (57)	45 kDa		Immunoantigen (44)
16 kDa	HbpA	Hemin-binding (100)	140 kDa		Adhesin (93)
39 kDa	HbpB	Hemin-binding (100)	<i>Prevotella intermedia</i>		
43 kDa		Unknown (29)	60 kDa		Hemoglobin binding (32)
			62 kDa		Laminin binding (45)

る可能性が高い。また、このタンパクは Hanley らが報告している分子量 55 kDa の immunodominant antigen と同じものである (34)。

これらの外膜タンパク以外に、TonB-dependent hemin receptor である推定分子量 73 kDa (HmuR) (87) と 34 kDa (IhtB) (23) の外膜タンパクや分子量 53 kDa の immunoantigen (68, 69) や分子量 28 kDa のタンパク (89) の存在も報告されている。また、分子量 40 kDa のタンパクは凝集因子として同定されている (35, 64)。

Fusobacterium nucleatum

F. nucleatum の主要な外膜タンパクとして分子量 40 kDa の FomA が研究されてきた (31, 43, 79)。このタンパクは非特異的なポーリンタンパクであり、FomA は IgG の Fc 部分との結合能があることも報告されている (31)。また、分子量 30 kDa の外膜タンパクは *P. gingivalis* や *Actinomyces israelii* などの他菌種との共凝集に関与しているという報告がある (85)。またその他の外膜タンパクとして分子量 60 kDa と 55 kDa のタンパクが抗原性タンパクとしてまた分子量 65 kDa のタンパクも報告されている (7, 15)。

Prevotella intermedia

これまでに分子量 60 kDa のヘモグロビン結合タンパクと分子量 62 kDa のラミニン結合タンパクが報告されている (32, 45)。

Treponema denticola

Msp (major outer sheath protein) として分子量 43 kDa, 53 kDa および 64 kDa のタンパクが同定されている (29)。53 kDa のタンパクは ECM の成分であるラミニンやフィブロネクチンとの結合が、64 kDa のタンパクも線維芽細胞への付着が報告されている (29, 57)。主要 Msp である 53 kDa

のタンパクは HeLa 細胞に対し、pore-forming 活性を有する (57)。ヘミン結合タンパクとして 2 つの Msp である HbpA と HbpB が明らかにされている (100)。

Capnocytophaga gingivalis

抗原性タンパクとして分子量 155 kDa, 110 kDa, 105 kDa, 45 kDa の外膜タンパクが同定されており (44), adhesin として分子量 140 kDa のタンパクが報告されている (93)。

Actinobacillus actinomycetemcomitans

我々が研究を始める以前より、外膜タンパクの同定がなされている (10, 99)。病原性としては主として Wilson らにより大腸菌の OmpA 様の分子量 29 kDa のタンパクと分子量 16 kDa のタンパクが歯周病患者血清と強く反応することを報告している (71, 97, 98, 99)。また、39 kDa のタンパクも Koikeguchi らにより歯周病患者との反応性が報告されている (48)。ラクトフェリン結合タンパクとして 29 kDa, 16.5 kDa タンパクの報告もある (3)。また、29 kDa タンパクはラミニン結合タンパクとしても報告されている (2)。

上述のように歯周病原性細菌においても外膜タンパクの研究はなされているが、その多くは患者血清との反応性や抗原性物質としての報告であり、個々のタンパクについての機能解析はあまりなされていない。しかし、歯周病原性以外の病原性細菌については大腸菌等のいくつかの細菌で外膜タンパクの病原性について詳細な検討がなされていることから、歯周病原性細菌の外膜タンパクにも病原性因子としてのポテンシャルが多く残されていることが考えられる。

4. *A. actinomycetemcomitans* 外膜タンパクの病原性

歯周病原性細菌の外膜タンパクの病原性ポテンシャルに

図2. *A. actinomycetemcomitans* 外膜タンパクおよび歯周病患者血清との反応性

サルコシル不溶性外膜タンパク画分を12%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動後、クマシーブルー染色を行った (Lane 1; タンパクマーカー, 2; 外膜タンパク画分)。外膜タンパク画分を用い、*A. actinomycetemcomitans* が原因とされる患者血清 (Lane 3, 4) およびマウスに *A. actinomycetemcomitans* 菌体を静注し得られた抗血清 (Lane 5; 抗血清, Lane 6; 免疫前血清) を用い、ウェスタンブロッティングを行った。

について検討するため、まず私たちは患者血清との報告が比較的多く出されている *A. actinomycetemcomitans* の外膜タンパクに着目し、その同定および機能解析についての検討を試みた (4, 50, 51)。

1) *A. actinomycetemcomitans* の主要な外膜タンパクの同定

まず、*A. actinomycetemcomitans* の主要な外膜タンパクの同定を試みた。外膜タンパクの調整は通法に従い膜タンパクを調整後、サルコシル不溶性画分を1% SDSにて可溶化したものを外膜タンパク画分とした。SDS-PAGE後、クマシーブルー染色し、分子量100 kDa, 64 kDa, 39 kDa, 29 kDa, 18 kDa, 16 kDaの6つの外膜タンパクを同定した (図2)。それぞれの分子量に基づき Omp100, Omp64, Omp39, Omp29, Omp18, Omp16 と命名した。患者血清およびマウスに *A. actinomycetemcomitans* 死菌を免疫して得られた抗血清を用いたウェスタンブロッティングの結果、Omp29, Omp16およびOmp100のタンパクと反応性を示した (図2)。特に、過去の報告と一致して Omp29 のタンパクは特に強い反応を認めた (98, 99)。それぞれのN末端シーケンスを行い、得られたアミノ酸配列を基に公開されているゲノムデータの情報よりそれぞれのアミノ酸配列をコードする遺伝子を同定した。その結果、分子量 Omp18 と Omp16 のタンパクは同一のタンパク質に由来している可能性が示された。得られた遺伝子についてその領域を増幅させるための特異的プライマーを作製し、*A. actinomycetemcomitans* Y4株染色体DNAを鋳型としてそれぞれのDNA断片を得、塩基配列を決定した。そこから予想されるアミノ酸配列の相同性検索によりそれぞれのタンパクの性状について検討した。表3にその要約を示す。Omp100 および Omp16/18 は種々の細菌の付着・侵入因子と相同性を認め、Omp100 については血清抵抗性因子や免疫グロブリンのFc結合タンパクとの相同性も認められた。Omp64 は種々の鉄獲得性因子と Omp39 はポーリンタンパクとそれぞれ相同性を認めた。また、Omp29 は大腸菌の OmpA と相同性を有し、OmpA ファミリーに属するタンパクであった。

2) Omp100 の性状解析

主要な外膜タンパクの中で Omp100 が最も多くの種々の病原性因子との相同性を認めたため、このタンパクについての解析を試みた。

i) Omp100 構造解析

Omp100 の遺伝子マップを図3に示す。図3に示すようにこのタンパクをコードする遺伝子から予想される分子量は32 kDaであるのに比し、実際の電気泳動から算定される分子量は100 kDaである。Omp100 と相同性の認められるタンパクも同様に推定分子量と実際の分子量が異なることが報告されており、このタンパクが複合体を形成している可能性が考えられた。そこでこのタンパクを大腸菌の系で発現させ、抗血清により確認したところ、分子量100 kDaの位置に反応するタンパクバンドを認めた。*A. actinomycetemcomitans* Y4株から精製した Omp100 を TOF/MS解析により質量解析を行った結果、質量98 kDaのシングルピークとして得られた。また、精製 Omp100 を酸処理することによりその質量は32 kDaのシングルピークとして得られたことから、Omp100 は分子量32 kDaのタンパクのホモトリマーであることが明らかになった。相同性の認められるタンパクの構造解析およびアミノ酸配列から予想される Omp100 の構造を図4に示す。C末端側は細胞膜へのスパン領域で、中央部分は表層に突き出す茎状の領域、そして表層に突き出した頭の領域の3つの部分から構成されることが予想される。

ii) Omp100 の局在性

Omp100 が実際に表層に存在するか否かについて電子顕微鏡による観察を試みた。ウサギ抗 Omp100 抗体を作用後、ProteinA-Goldを作用させることで Omp100 の局在を検討した結果、細菌表層にランダムに Omp100 が存在していることが確認できた (図5)。

iii) Omp100 の病原性因子

・付着・侵入因子

Omp100 発現大腸菌株および Omp100 欠損 *A. actinomycetemcomitans* 株を作製し、親株と共に付着・侵入実験を

表 3. *A. actinomycetemcomitans* 外膜タンパクとの相同性

OMP	Homology (acc. no)	Sources	Characteristics
Omp100	putative adhesin/invasin (AAF42321)	<i>N. meningitidis</i>	putative
	UspA2 (AAB96391)	<i>M. catarrhalis</i>	serum resistance
	USAPA2H (AAF40120)	<i>M. catarrhalis</i>	adhesin, serum resistance
	EibA (AAF63234)	<i>E. coli</i>	Fc-binding, serum resistance
	YadA (CAA32086)	<i>Y. enterocolitica</i>	invasin, adhesin, serum resistance
Omp64	FrpB (AAF42315)	<i>N. meningitidis</i>	putative
	FrpB (AAC43332)	<i>N. gonorrhoeae</i>	iron-regulated Omp
	CopB (AAC05232)	<i>M. catarrhalis</i>	iron-regulated Omp
	HxuC (AAA87059)	<i>H. influenzae</i>	iron-regulated Omp
	ShuA (AAC27809)	<i>S. dysenteriae</i>	iron-regulated Omp
Omp29	OmpA (AAF37887)	<i>E. coli</i>	major outer membrane protein
	P5 (AAA03346)	<i>H. influenzae</i>	OmpA-like protein
	MOMP (AAB49273)	<i>H. ducreyi</i>	OmpA-like protein
Omp39	OmpH (AAC02250)	<i>P. multocida</i>	porin
	OMP P2 (CAA51810)	<i>H. influenzae</i>	porin
	OMP F (AAB41114)	<i>X. nematophilus</i>	porin
	OMP F (BAA35675)	<i>E. coli</i>	putative
	OMP pore protein E (CAA48164)	<i>S. typhimurium</i>	porin
Omp16/18	putative OMP (AF114793)	<i>Vitreoscilla</i> sp.	putative
	OmpA2 (AAB49274)	<i>H. ducreyi</i>	OmpA-Like protein
	AIL (AAA88694)	<i>Y. enterocolitica</i>	invasin, serum resistance
	opacity protein (AAC22827)	<i>H. influenzae</i>	putative
	opacity protein (CAA79363)	<i>N. gonorrhoeae</i>	invasin

図 3. Omp100 をコードする遺伝子マップ
Omp100をコードする遺伝子は885 bpからなり、予想されるタンパクは 295 アミノ酸からなる推定分子量 32 kDa のタンパクである。

図 4. Omp100 の立体構造
Omp100 と相同性の認められるタンパクの構造解析結果および Omp100 の一次構造から、Omp100 は膜存在領域、茎状に表層に伸びた領域、最表層に突き出した領域からなることが予想される。また、*in vivo* においては外膜に 3 量体を形成し存在していると考えられる。

図 5. *A. actinomycetemcomitans* での Omp100 の局在
抗 Omp100 抗体を用いて、Omp100 の局在について検討した結果、Omp100 は広く菌体表層にランダムに存在していることが明らかになった。(A) : 免疫前抗血清を用いた場合、(B) : 抗 Omp100 抗体を用いた場合。線は 500 nm を示す。

行った。その結果、正常ヒト歯肉上皮細胞および KB 細胞において Omp100 発現大腸菌株は非発現株に比べ約 2 倍の付着効率の上昇、約 10 倍の侵入効率の上昇を認めた。また、*A. actinomycetemcomitans* 親株に比べ Omp100 欠損株では付着および侵入効率でおよそ 2 倍および 5 倍の減少を認めた。Omp100 はフィブロネクチンとの親和性を認め、また *A. actinomycetemcomitans* の細胞内への侵入にはフィブロネクチンの裏打ちタンパクであるインテグリン $\alpha 5 \beta 1$ を介していることが明らかになった。このインテグリンを介したシグナルはさらにその裏打ちタンパク群である focal adhesion kinase (FAK) や Src のリン酸化に伴う活性化によりアクチンの再重合を引き起こすことで細胞が *A. actinomycetemcomitans* 菌体を細胞内に取り込むことが考え

図 6. Omp100 を介する細胞へのシグナリング
Omp100はフィブロネクチンに結合することで、細胞内のインテグリンに刺激を送り種々のインテグリン裏打ちタンパクを活性化し、アクチンの再重合を引き起こす。

られた (図 6)。また、Omp100 の種々の部分欠失タンパクを作製し、発現させた大腸菌での付着・侵入実験の結果、フィブロネクチンへの付着は Omp100 の頭の部分が重要であることが示唆された。

・血清抵抗性因子

これまでに報告されている外膜タンパクの血清抵抗性の機序を図に示す (図 7)。血清感受性菌の場合、血清中の補体因子である C3b や C3bBb が細胞表面成分と結合することで安定化し、C3b の合成が促進され C3bBb3b が形成されることで、最終的に membrane attack component (MAC) が形成され溶菌を引き起こす。しかし、血清抵抗性を示す菌の中には血清中の因子である H 因子と外膜タンパクが親和性を示すことで細菌表面に H 因子を集積する。H 因子は C3b との結合性を有し、また I 因子は H 因子を認識しそこ

に結合している C3b を分解する。H 因子が細胞表面に集積することで C3b が効率的に分解される。したがって、補体の活性化の際に生じる MAC の形成を阻害することで血清抵抗性を示す。その可能性について検討した結果 Omp100 発現大腸菌株は非発現株に比べ約 1000 倍の血清抵抗性を示し、また Omp100 欠損 *A. actinomycetemcomitans* 菌においては約 10 倍血清抵抗性が減少した。また、Omp100 と H 因子の親和性も確認され、Omp100 が血清抵抗性因子の一端を担っていることが示唆された。

・サイトカイン誘導因子

ヒト正常歯肉上皮細胞に対する応答を検討した結果、mRNA レベルで Omp100 により $\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-1 β の産生誘導が認められた。

以上の結果から、Omp100 は複数の病原性因子を有するタンパクであることが明らかになった。興味深いことに、このタンパクと相同性の認められるタンパクは *Yersinia enterocolitica* の YadA (19, 36), *Escherichia coli* の Eib (83, 84), *Salmonella typhimurium* の Rck (21), *Moraxella catarrhalis* の UspA (22, 52) などいずれも複数の病原性因子が報告されている (表 3)。これらのタンパクとの相同性を検討すると、表面に突出している領域 (N 末端) には高い相同性は認められなかったが、外膜に存在している部分 (C 末端) との高い相同性を認め、新しい病原性因子ファミリーを形成していることが考えられた。今後、歯周病原菌を含めこのタンパクファミリーの解析がなされていくことが考えられる。

3) その他の Omp

それぞれの Omp の発現大腸菌株において付着・侵入実験を行った結果、Omp29 発現株において付着・侵入効率の増加が認められたが、Omp100 に比べるとその効率は低

図 7. 補体の活性化経路 (副経路) および外膜タンパクによる血清抵抗性機序
補体成分である C3b, C3bBb が細胞表面に結合することで安定化し、C3bBb3b の形成が亢進し membrane attack complex (C5b6789) が形成され溶菌を引き起こす。いくつかの外膜タンパク (Omp) は H 因子 (F-H) と親和性を有することで細胞表面の C3b の I 因子 (F-I) による分解を促進し、血清抵抗性を示す。

図 8. *A. actinomycetemcomitans* と上皮細胞との応答

上皮細胞と細菌が接触することにより、Omp100 あるいはその他の表層成分が細胞の種々のレセプターを介して刺激を入れ、細胞に種々の応答を引き起こす。

かった。現在、個々の Omp についてサイトカイン誘導能などについて性状解析を検討中である。

現在の研究成果をもとに *A. actinomycetemcomitans* の外膜タンパクの病原性を考えると、図 8 のように要約される。歯肉上皮細胞との相互作用を考えた際には、Omp100 が誘導する形で *A. actinomycetemcomitans* 菌体が歯肉上皮細胞にフィブロネクチンを介して結合する。細胞に結合することにより、両細胞間が近接することで細菌の外膜タンパクなどの表層成分と TLR やインテグリン等の細胞側のレセプターや細胞外基質 (ECM) との相互作用により細胞内に種々のシグナルが入る。その結果、細胞はサイトカインなどの種々の因子を産生、放出し、また、細菌を取り込むようなアクチンの再重合等の形態変化を引き起こす。このような、複数の現象が起こることで、歯周組織に種々の病態変化が起き、炎症が誘発されることが考えられる。その際には、細菌の産生するロイコトキシンや cytolethal distending toxin (CDT) などの外毒素やグラム陰性菌に広く存在するリポ多糖なども歯周病発症に大きく関与することが考えられる (16, 46, 49, 53, 72, 81, 90, 101)。また、線毛タンパク (FLP) も付着因子としての報告もされており (87)、これらのすべての因子が全体として宿主細胞に働き、最終的に歯周炎を引き起こしているのではないかと推測される。

5. おわりに

以上のように歯周病原性細菌の外膜タンパクに関してはまだ未知な部分が多く残されている。*P. gingivalis*, *F. nucleatum*, *P. intermedia* など種々の歯周病原性細菌において、宿主細胞への付着、侵入、サイトカイン誘導能などの報告が多くあるが (14, 18, 24, 25, 26, 33, 37, 59, 94)、その分子メカニズムについてはまだ明らかになっていない。しかし、これらの現象の多くにおいて外膜タンパクが関与している可能性は十分に考えられる。それぞれの歯周病原性細菌の外膜タンパクが同定され、その機能について

明らかになることで、細菌の産生する毒素などとの関連性も含めて生体に対する作用、ひいては歯周病発症の機序のさらなる解明につながるのではないかと考える。

謝 辞

A. actinomycetemcomitans の外膜タンパクに関する研究を遂行するにあたり、終始中心的に私と共に研究を行って頂いた浅川隆司博士に感謝致します。また、川崎医大・微生物学教室の山田作夫先生、Fosyth Institute の河井敬久先生、藤原環博士をはじめとする多くの先生方に感謝致します。

また、本研究ならびに本論文作成上に多くの助言を頂いた菅井基行先生に感謝致します。

文 献

- 1) Akira, S., Hemmi, H. (2003): Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol. Lett.* **85**, 85–95.
- 2) Alugupalli, K.R., Kalfas, S., Forsgren, A. (1996): Laminin binding to a heat-modifiable outer membrane protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol. Immunol.* **11**, 326–331.
- 3) Alugupalli, K.R., Kalfas, S., Edwardsson, S., Naidu, A.S. (1995): Lactoferrin interaction with *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol. Immunol.* **10**, 35–41.
- 4) Asakawa, R., Komatsuzawa, H., Kawai, T., Yamada, S., Goncalves, R.B., Izumi, S., Fujiwara, T., Nakano, Y., Suzuki, N., Uchida, Y., Ouhara, K., Shiba, H., Taubman M.A., Kurihara, H., Sugai, M. (2003): Outer membrane protein 100, a versatile virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Mol. Microbiol.* **50**, 1125–1139.
- 5) Athman, R., Philpott, D. (2004): Innate immunity via Toll-like receptors and NOD proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* **7**, 25–32.
- 6) Badea, L., Doughty, S., Nicholls, L., Sloan, J., Robins-Browne, R.M., Hartland, E.L. (2003): Contribution of Efa1/LifA to the adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Microbial Pathogenesis* **34**, 205–215.
- 7) Bakken, V., Aaro, S., Hofstad, T., Vasstrand, E.N. (1989): Outer membrane proteins as major antigens of *Fusobacterium nucleatum*. *FEMS Microbiol. Immunol.* **1**, 473–483.
- 8) Belaaouaj, A., Kim, K.S., Shapiro, S.D. (2000): Degradation of outer membrane protein A in *Escherichia coli* killing by

- neutrophil elastase. *Science* **289**, 1185–1188.
- 9) Bethell, D., Pollard, A.J. (2002): Meningococcal vaccines. *Expert. Rev. Vaccines* **1**, 75–84.
 - 10) Bolstad, A.I., Kristoffersen, T., Olsen, I., Preus, H.R., Jensen, H.B., Vasstrand, E.N., Bakken, B. (1990): Outer membrane proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Haemophilus aphrophilus* studied by SDS-PAGE and immunoblotting. *Oral Microbiol. Immun.* **5**, 155–161.
 - 11) Bolstad, A.I., Jensen, H.B., Bakken, V. (1996): Taxonomy, Biology, and Periodontal Aspects of *Fusobacterium nucleatum*. *Clin. Microbiol. Rev.* **9**, 55–71.
 - 12) Bradbeer, C. (1993): The proton motive force drives the outer membrane transport of cobalamin in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**, 3146–3150.
 - 13) Brickman, T.J., Armstrong, S.K. (1999): Essential role of the iron-regulated outer membrane receptor FauA in alcaligin siderophore-mediated iron uptake in *Bordetella* species. *J. Bacteriol.* **181**, 5958–5966.
 - 14) Brissette, C.A., Fives-Taylor, P.M. (1999): *Actinobacillus actinomycetemcomitans* may utilize either actin-dependent or actin-independent mechanisms of invasion. *Oral Microbiol. Immunol.* **14**, 137–142.
 - 15) Brokstad, K.A., Jensen, H.B. (1991): Purification and characterization of a 65-kilodalton diisopropylfluorophosphate-binding protein in the outer membrane of *Fusobacterium nucleatum* Fev1. *Scand. J. Dent. Res.* **99**, 20–29.
 - 16) Califano, J.V., Gunsolley, J.C., Nakashima, K., Schenkein, H.A., Wilson, M.E., Tew, J.G. (1996): Influence of anti-*Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 (serotype b) lipopolysaccharide on severity of generalized early-onset periodontitis. *Infect. Immun.* **64**, 3908–3910.
 - 17) Celli, J., Deng, W., Finlay, B.B. (2000): Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. *Cellular Microbiol.* **2**, 1–9.
 - 18) Chen, T., Nakayama, K., Belliveau, L., Duncan, M.J. (2001): *Porphyromonas gingivalis* gingipains and adhesion to epithelial cells. *Infect. Immun.* **69**, 3048–3056.
 - 19) China, B., Sory, M.-P., N'Guyen, B.T., de Bruyere, M., Cornelis, G.R. (1993): Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. *Infect. Immun.* **61**, 3129–3136.
 - 20) China, B., Goffaux, F. (1999): Secretion of virulence factors by *Escherichia coli*. *Vet. Res.* **30**, 181–202.
 - 21) Cirillo, D.M., Heffernan, E.J., Wu, L., Harwood, J., Fierer, J., Guiney, D.G. (1996): Identification of a domain in Rck, a product of the *Salmonella typhimurium* virulence plasmid, required for both serum resistance and cell invasion. *Infect. Immun.* **64**, 2019–2023.
 - 22) Cope, L.D., Lafontaine, E.R., Slaughter, C.A., Hasemann, Jr. C.A., Aebi, C., Henderson, F.W., McCracken, Jr., G.H., Hansen, E.J. (1999): Characterization of the *Moraxella catarrhalis* uspA1 and uspA2 genes and their encoded products. *J. Bacteriol.* **181**, 4026–4034.
 - 23) Dashper, S.G., Hendtlass, A., Slakeski, N., Jackson, C., Cross, K.J., Brownfield, L., Hamilton, R., Barr, I., Reynolds, E.C. (2000): Characterization of a Novel Outer Membrane Hemin-Binding Protein of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* **182**, 6456–6462.
 - 24) Deshpande, R.G., Khan, M.B., Genco, C.A. (1998): Invasion of aortic and heart endothelial cells by *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* **66**, 5337–5343.
 - 25) Dongari-Bagtzoglou, A.I., Ebersole, J.L. (1996): Production of inflammatory mediators and cytokines by human gingival fibroblasts following bacterial challenge. *J. Periodont. Res.* **31**, 90–98.
 - 26) Dorn, B.R., Leung, K.-P., Progulske-Fox, A. (1998): Invasion of human oral epithelial cells by *Prevotella intermedia*. *Infect. Immun.* **66**, 6054–6057.
 - 27) Fletcher, M.A. (2001): Vaccine candidates in STD. *Int. J. STD AIDS* **12**, 419–422.
 - 28) Elsinghorst, E.A., Weitz, J.A. (1994): Epithelial cell invasion and adherence directed by the enterotoxigenic *Escherichia coli* *tib* locus is associated with a 104-kilodalton outer membrane protein. *Infect. Immun.* **62**, 3463–3471.
 - 29) Fenno, J.C., Wong, G.W.K., Hannam, P.M., Muller, K.-H., Leung, W.K., McBride, B.C. (1997): Conservation of msp, the Gene Encoding the Major Outer Membrane Protein of Oral *Treponema* spp. *J. Bacteriol.* **179**, 1082–1089.
 - 30) Fives-Taylor, P., Meyer, D., Minz, K. (1996): Virulence factors of the periodontopathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontol.* **67**, 291–297.
 - 31) Guo, M., Han, Y.W., Sharma, A., De Nardin, E. (2000): Identification and characterization of human immunoglobulin G Fc receptors of *Fusobacterium nucleatum*. *Oral Microbiol. Immunol.* **15**, 119–123.
 - 32) Guan, S.M., Nagata, H., Maeda, K., Kuboniwa, M., Minamino, N., Shizukuishi, S. (2004): Purification and characterization of a hemoglobin-binding outer membrane protein of *Prevotella intermedia*. *FEMS Microbiol. Lett.* **15**, 333–339.
 - 33) Han, Y.W., Shi, W., Huang, G.T.-J., Haake, S.K., Park, N.-H., Kuramitsu, H., Genco, R.J. (2000): Interactions between periodontal bacteria and human oral epithelial cells: *Fusobacterium nucleatum* adheres to and invades epithelial cells. *Infect. Immun.* **68**, 3140–3146.
 - 34) Hanley, S.H., Aduse-Opoku, J., Curtis, M.A. (1999): A 55-kilodalton immunodominant antigen of *Porphyromonas gingivalis* W50 has arisen via horizontal gene transfer. *Infect. Immun.* **67**, 1157–1171.
 - 35) Hiratsuka, K., Abiko, Y., Hayakawa, M., Ito, T., Sasahara, H., Takiguchi, H. (1992): Role of *Porphyromonas gingivalis* 40-kDa outer membrane protein in the aggregation of *P. gingivalis* vesicles and *Actinomyces viscosus*. *Arch. Oral Biol.* **37**, 717–724.
 - 36) Hoiczky, E., Roggenkamp, A., Reichenbecher, M., Lupas, A., Heesemann, J. (2000): Structure and sequence analysis of *Yersinia* YadA and *Moraxella* UspAs reveal a novel class of adhesins. *EMBO J.* **19**, 5989–5999.
 - 37) Huang, G.T.-J., Haake, S.K., Park, N.H. (1998): Gingival epithelial cells increase interleukin-8 secretion in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans* challenge. *J. Periodontol.* **69**, 1105–1110.
 - 38) Hueck, C.J. (1998): Type III Protein Secretion Systems in Bacterial Pathogens of Animals and Plants. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 379–433.
 - 39) Inohara, N., Nunez, G. (2003): NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 371–382.
 - 40) Janka, A., Bielaszewska, M., Dobrindt, U., Karch, H. (2002): Identification and distribution of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* factor for adherence (*efa1*) gene in sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157: H-. *Int. J. Med. Microbiol.* **292**, 207–214.
 - 41) Janssens, S., Beyaert, R. (2003): Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 637–646.

- 42) Jeannin, P., Magistrelli, G., Goetsch, L., Haeuw, J.-F., Thieblemont, N., Bonnefoy, J.-Y., Delneste, Y. (2002): Outer membrane protein A (OmpA): a new pathogen-associated molecular pattern that interacts with antigen presenting cells-impact on vaccine strategies. *Vaccine* **20**, A23-A27.
- 43) Jensen, H.B., Skeidsvoll, J., Fjellbirkeland, A., Høgh, B., Puntervoll, P., Kleivdal, H., Tommassen, J. (1996): Cloning of the *fomA* gene, encoding the major outer membrane porin of *Fusobacterium nucleatum* ATCC10953. *Microbial Pathogenesis* **221**, 331-342.
- 44) Kagermeier, A., London, J. (1986): Identification and preliminary characterization of a lectinlike protein from *Capnocytophaga gingivalis*. *Infect. Immun.* **51**, 490-494.
- 45) Kalfas, S., Tigyí, Z., Wikström, M., Naidu, A.S. (1992): Laminin binding to *Prevotella intermedia*. *Oral Microbiol. Immunol.* **7**, 235-239.
- 46) Kiley, P., Holt, S.C. (1980): Characterization of the lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4 and N27. *Infect. Immun.* **30**, 862-873.
- 47) Kim, K.S. (2001): *Escherichia coli* translocation at the blood-brain barrier. *Infect. Immun.* **69**, 5217-5222.
- 48) Koikeguchi, S., Kato, K., Nishimura, F., Murayama, Y. (1991): Isolation and partial characterization of a 39 kDa major outer membrane protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Y4. *FEMS Microbiol. Lett.* **61**, 85-89.
- 49) Kolodrubetz, D., Dailey, T., Ebersole, J., Kraig, E. (1996): Molecular genetics and the analysis of leukotoxin in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontol.* **67**, 309-316.
- 50) Komatsuzawa, H., Kawai, T., Wilson, M.E., Taubman, M.A., Sugai, M., Suganaka, H. (1999): Cloning of the gene encoding the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b OmpA-like outer membrane protein. *Infect. Immun.* **67**, 942-945.
- 51) Komatsuzawa, H., Asakawa, R., Kawai, T., Ochiai, K., Fujiwara, T., Taubman, M.A., Ohara, M., Kurihara, H., Sugai, M. (2002): Identification of six major outer membrane proteins from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Gene* **288**, 195-201.
- 52) Lafontaine, E.R., Cope, L.D., Aebi, C., Latimer, J.L., McCracken, G.H. Jr., Hansen, E.J. (2000): The UspA1 protein and a second type of UspA2 protein mediate adherence of *Moraxella catarrhalis* to human epithelial cells in vitro. *J. Bacteriol.* **182**, 1364-1373.
- 53) Lally, E.T., Kieba, I.R., Demuth, D.R., Rosenbloom, J., Golub, E.E., Taichman, N.S., Gibson, C.W. (1989): Identification and expression of the *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **159**, 256-262.
- 54) Lamont, R.J., Jenkinson, H.F. (1998): Life below the gum line: pathogenic mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. *Microb. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1244-1263.
- 55) Lindenthal, C., Elsinghorst, E.A. (2001): Enterotoxigenic *Escherichia coli* TibA Glycoprotein Adheres to Human Intestine Epithelial Cells. *Infect. Immun.* **69**, 52-57.
- 56) Liu, J., Rutz, J.M., Feix, J.B., Klebba, P.E. (1993): Permeability properties of a large gated channel within the ferric enterobactin receptor, FepA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 10653-10657.
- 57) Mathers, D.A., Leung, W.K., Fenno, J.C., Hong, Y., McBride, B.C. (1996): The Major Surface Protein Complex of *Treponema denticola* Depolarizes and Induces Ion Channels in HeLa Cell Membranes. *Infect. Immun.* **64**, 2904-2910.
- 58) Mayer, D.H., Fives-Taylor, P.M. (1997): The role of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in the pathogenesis of periodontal disease. *Trends Microbiol.* **5**, 224-228.
- 59) Meyer, D.H., Sreenivasan, P.K., Fives-Taylor, P.M. (1991): Evidence for invasion of a human oral cell clone by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* **59**, 2719-2726.
- 60) Miller, V.L., Bliska, J.B., Falkow, S. (1990): Nucleotide sequence of the *Yersinia enterocolitica* ail gene and characterization of the Ail protein product. *J. Bacteriol.* **172**, 1062-1069.
- 61) Monteiro-Neto, V., Bando, S.Y., Moreira-Filho, C.A., Giron, J.A. (2003): Characterization of an outer membrane protein associated with haemagglutination and adhesive properties of enteroaggregative *Escherichia coli* O111:H12. *Cellular Microbiol.* **5**, 533-547.
- 62) Morona, R., Klose, M., Henning, U. (1984): *Escherichia coli* K-12 outer membrane protein (OmpA) as a bacteriophage receptor: analysis of mutant genes expressing altered proteins. *J. Bacteriol.* **159**, 570-578.
- 63) Murakami, Y., Imai, M., Nakamura, H., Yoshimura, F. (2002): Separation of the outer membrane and identification of major outer membrane proteins from *Porphyromonas gingivalis*. *Eur. J. Oral Sci.* **110**, 157-162.
- 64) Namikoshi, J., Otake, S., Maeba, S., Hayakawa, M., Abiko, Y., Yamamoto M. (2003): Specific antibodies induced by nasally administered 40-kDa outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis* inhibits coaggregation activity of *P. gingivalis*. *Vaccine* **22**, 250-256.
- 65) Nikaido, H., Vaara, M. (1985): Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *Microbiol. Rev.* **49**, 1-32.
- 66) Nikaido, H. (1992): Porins and specific channels of bacterial outer membranes. *Mol. Microbiol.* **6**, 435-442.
- 67) Nougayrede, J.-P., Fernandes, P.J., Donnenberg, M.S. (2003): Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cellular Microbiol.* **5**, 359-372.
- 68) Ohya, H., Matsushita, S., Kato, N., Nishimura, F., Oyaizu, K., Koikeguchi, S., Kurihara, H., Takashiba, S., Nishimura, Y., Murayama, Y. (1998): T cell responses to 53-kDa outer membrane protein of *Porphyromonas gingivalis* in humans with early-onset periodontitis. *Human Immunol.* **59**, 635-643.
- 69) Oyaizu, K., Ohya, H., Nishimura, F., Kurihara, H., Matsushita, S., Maeda, H., Koikeguchi, S., Hongyo, H., Takashiba, S., Murayama, Y. (2001): Identification and characterization of B-cell epitopes of a 53-kDa outer membrane protein from *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol. Immunol.* **16**, 73-78.
- 70) Osborn, M.J., Gander, J.E., Parisi, E., Carson, J. (1972): Mechanism of assembly of the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* **247**, 3962-3972.
- 71) Page, R.C., Sims, T.J., Engel, L.D., Moncla, B.J., Brainbridge, B., Stray, J., Darveau, R.P. (1991): The immunodominant outer membrane antigen of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is located in the serotype specific high-molecular-mass carbohydrate moiety of lipopolysaccharide. *Infect. Immun.* **59**, 3451-3462.
- 72) Perry, M.B., MacLean, L.L., Gmur, R., Wilson, M.E. (1996): Characterization of the O-polysaccharide structure of lipopolysaccharide from *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b. *Infect. Immun.* **64**, 1215-1219.
- 73) Postle, K. (1993): TonB protein and energy transduction between membranes. *J. Bioenerg. Biomembr.* **25**, 591-601.
- 74) Prasadara, N.V., Wass, C.A., Kim, K.S. (1996): Endothelial cell GlcNAc β 1-4GlcNAc epitopes for outer membrane protein A enhance traversal of *Escherichia coli* across the blood-brain barrier. *Infect. Immun.* **64**, 154-160.

- 75) Prasadarao, N.V., Wass, C.A., Weiser, J.N., Stins, M.F., Huang, S., Kim, K.S. (1996): Outer membrane protein of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infect. Immun.* **64**, 146–153.
- 76) Prasadarao, N.V., Wass, C.A., Stins, M.F., Shimada, H., Kim, K.S. (1999): Outer membrane protein A-promoted actin condensation of brain microvascular endothelial cells is required for *Escherichia coli* invasion. *Infect. Immun.* **67**, 5775–5783.
- 77) Prasadarao, N.V., Blom, A.M., Villoutreix, B.O., Linsangan, L.C. (2002): A Novel Interaction of Outer Membrane Protein A with C4b Binding Protein Mediates Serum Resistance of *Escherichia coli* K1. *J. Immunol.* **169**, 6352–6360.
- 78) Pierson, D.E., Falkow, S. (1993): The *ail* gene of *Yersinia enterocolitica* has a role in the ability of the organism to survive serum killing. *Infect. Immun.* **61**, 1846–1852.
- 79) Puntervoll, P., Kleivdal, H., Dahl, K. O., Bitter, W., Tommassen, J., Jensen, H.B. (2000): The *Fusobacterium nucleatum* porin FomA possesses the general topology of the non-specific porins. *Microbiology* **146**, 1437–1445.
- 80) Riddell, A. Buttery, J. (2001): Vaccines against meningococcal disease: current and future technologies. *Expert Opin. Biol. Ther.* **1**, 385–399.
- 81) Robertson, P.M., Lantz, M., Marucha, P.T., Kornman, K.S., Trummel, C.L., Holt, S.C. (1982): Collagenolytic activity associated with *Bacteroides* spp. and *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodont. Res.* **17**, 275–283.
- 82) Ross, B.C., Czajkowski, L., Vandenberg, K.L., Camuglia, S., Woods, J., Agius, C., Paolini, R., Reynolds, E., Barr, I.G. (2004): Characterization of two outer membrane protein antigens of *Porphyromonas gingivalis* that are protective in a murine lesion model. *Oral Microbiol. Immunol.* **19**, 6–15.
- 83) Sandt, C.H., Hill, C.W. (2000): Four different genes responsible for nonimmune immunoglobulin-binding activities within a single strain of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **68**, 2205–2214.
- 84) Sandt, C.H., Hill, C.W. (2001): Nonimmune binding of human immunoglobulin A (IgA) and IgG Fc by distinct sequence segments of the EibF cell surface protein of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **69**, 7293–7303.
- 85) Shanitzki, B., Hurwitz, D., Smorodinsky, N., Ganeshkumar, N., Weiss, E.I. (1997): Identification of a *Fusobacterium nucleatum* PK1594 galactose-binding adhesin which mediates coaggregation with periopathogenic bacteria and hemagglutination. *Infect. Immun.* **65**, 5231–5237.
- 86) Schulz, G.E. (1993): Bacterial porins: structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **5**, 701–707.
- 87) Schreiner, H.C., Sinatra, K., Kaplan, J.B., Furgang, D., Kachlany, S.C., Planet, P.J., Perez, B.A., Figurski, D.H., Fine, D.H. (2003): Tight-adherence genes of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are required for virulence in a rat model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 7295–7300.
- 88) Simpson, W., Olczak, T., Genco, C.A. (2000): Characterization and expression of HmuR, a TonB-dependent hemoglobin receptor of *Porphyromonas gingivalis*. *J. Bacteriol.* **182**, 5737–5748.
- 89) Slakeski, N., Margetts, M., Moore, C., Czajkowski, L., Barr, I.G., Reynolds, E.C. (2002): Characterization and expression of a novel *Porphyromonas* outer membrane protein, Omp28. *Oral Microbiol. Immunol.* **17**, 150–156.
- 90) Sugai, M., Kawamoto, T., Peres, S.Y., Ueno, Y., Komatsuzawa, H., Fujiwara, T., Kurihara, H., Suganaka, H., Oswald, E. (1998): The cell cycle-specific growth-inhibitory factor produced by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* is a cytolethal distending toxin. *Infect. Immun.* **66**, 5008–5019.
- 91) Sugawara, E., Nikaido, H. (1992): Pore-forming activity of OmpA protein of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**, 2507–2511.
- 92) Tanner, A., Stillman, N. (1993): Oral and dental infections with anaerobic bacteria: clinical features, predominant pathogens, and treatment. *Clin. Infect. Dis.* **4**, S304–309.
- 93) Tempro, P., Cassels, F., Siraganian, R., Hand, A.R., London, J. (1989): Use of adhesin-specific monoclonal antibodies to identify and localize an adhesin on the surface of *Capnocytophaga gingivalis* DR2001. *Infect. Immun.* **57**, 3418–3424.
- 94) Uchida, U., Shiba, H., Komatsuzawa, H., Takemoto, T., Sakata, M., Fujita, T., Kawaguchi, H., Sugai, M., Kurihara, H. (2001): Expression of IL-1 β and IL-8 by human gingival epithelial cells in response to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Cytokine* **14**, 152–161.
- 95) Vogel, U., Frosch, M. (1999): Mechanism of neisserial serum resistance. *Mol. Microbiol.* **32**, 1133–1139.
- 96) Weiser, J.N., Gotschlich, E.C. (1991): Outer membrane protein A (OmpA) contributes to serum resistance and pathogenicity of *Escherichia coli* K-1. *Infect. Immun.* **59**, 2252–2258.
- 97) White, P.A., Nair, S.P., Kim, M.-J., Wilson, M., Henderson, B. (1998): Molecular characterization of an outer membrane protein of *A. actinomycetemcomitans* belonging to the OmpA family. *Infect. Immun.* **66**, 369–372.
- 98) Wilson, M.E. (1991): IgG antibody response of juvenile periodontitis patients to the 29 kilodalton outer membrane protein of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *J. Periodontol.* **62**, 211–218.
- 99) Wilson, M.E., Hamilton, R.G. (1995): Immunoglobulin G subclass response of juvenile periodontitis subjects to principal outer membrane proteins of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immun.* **63**, 1062–1069.
- 100) Xu, X., Holt, S.C., Kolodrubetz, D. (2001): Cloning and expression of two novel hemin binding protein genes from *Treponema denticola*. *Infect. Immun.* **69**, 4465–4472.
- 101) Yamaguchi, N., Yamashita, Y., Ikeda, D., Koga, T. (1996): *Actinobacillus actinomycetemcomitans* serotype b-specific polysaccharide antigen stimulates production of chemotactic factors and inflammatory cytokines by human monocytes. *Infect. Immun.* **64**, 2563–2570.
- 102) Yoshimura, F., Watanabe, K., Takasawa, T., Kawanami M., Kato, H. (1989): Purification and properties of a 75-kilodalton major protein, an immunodominant surface antigen, from the oral anaerobe *Bacteroides gingivalis*. *Infect. Immun.* **57**, 3646–3652.
- 103) Zambon, J.J. (1985): *Actinobacillus actinomycetemcomitans* in human periodontal disease. *J. Clin. Periodontol.* **12**, 1–20.