

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5476297号
(P5476297)

(45) 発行日 平成26年4月23日 (2014. 4. 23)

(24) 登録日 平成26年2月14日 (2014. 2. 14)

(51) Int. Cl.

F 1

A 6 1 K 31/505	(2006. 01)	A 6 1 K 31/505
A 6 1 K 31/506	(2006. 01)	A 6 1 K 31/506
A 6 1 K 31/427	(2006. 01)	A 6 1 K 31/427
A 6 1 K 45/00	(2006. 01)	A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 31/04	(2006. 01)	A 6 1 P 31/04

請求項の数 7 (全 60 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2010-515319 (P2010-515319)
(86) (22) 出願日	平成20年7月11日 (2008. 7. 11)
(65) 公表番号	特表2010-532765 (P2010-532765A)
(43) 公表日	平成22年10月14日 (2010. 10. 14)
(86) 国際出願番号	PCT/AU2008/001017
(87) 国際公開番号	W02009/006699
(87) 国際公開日	平成21年1月15日 (2009. 1. 15)
審査請求日	平成23年7月7日 (2011. 7. 7)
(31) 優先権主張番号	2007903788
(32) 優先日	平成19年7月12日 (2007. 7. 12)
(33) 優先権主張国	オーストラリア (AU)

(73) 特許権者	510007610
	オーラル ヘルス オーストラリア ピー ティーワイ リミテッド オーストラリア国 3053 ビクトリア カールトン スワンストン ストリート 720 レベル 6 メルボルン デン タル スクール デンティストリー アン ド ヘルス サイエンスイズ ファカルテ ィ オブ メディシン
(74) 代理人	110000796 特許業務法人三枝国際特許事務所

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 バイオフィルム治療

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験体におけるポルフィロモナス・ジンジバリスのバイオフィルムを予防、抑制又は低減するための医薬組成物であって、活性成分として、バイオフィルム形成及び／又はバイオフィルム発達を調節するポリペプチドの阻害剤を含む、医薬組成物において、該阻害剤がオキサントール、モランテル又はチアベンダゾールから成る群から選択される、医薬組成物。

【請求項 2】

被験体におけるポルフィロモナス・ジンジバリス感染症及び／又は歯周病を予防、抑制又は治療するための医薬組成物であって、活性成分として、バイオフィルムの形成及び／又は発達を調節するポリペプチドの阻害剤を含む、医薬組成物において、該阻害剤がオキサントール、モランテル及びチアベンダゾールから成る群から選択される、医薬組成物。

【請求項 3】

阻害剤がオキサントールである、請求項 1 又は 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 4】

阻害剤がモランテルである、請求項 1 又は 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 5】

阻害剤がチアベンダゾールである、請求項 1 又は 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

抗生物質をさらに含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の医薬組成物。

【請求項 7】

被験体におけるポルフィロモナス・ジンジバリス感染症及び／又は歯周病を予防、抑制又は治療するための医薬組成物を製造するための、オキサニテル、モランテル及びチアペンダゾールから成る群から選択されるバイオフィルム形成及び／又はバイオフィルム発達を調節するポリペプチドの阻害剤の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、ポルフィロモナス・ジンジバリス (*Porphyromonas gingivalis*) を含有する細菌性バイオフィルム等の、細菌性バイオフィルムの形成及び／又は発達を予防又は変更する組成物及び方法に関する。特に本発明は、バイオフィルムの形成及び／又は発達を調節するための、バイオフィルムとしての又はヘム制限 (haem-limitation) 下での増殖のために重要なポリペプチドの使用及び阻害に関する。本発明はまた、細菌性酵素の調節を含む、バイオフィルムの形成及び／又は発達の調節のための組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

多くの細菌性治療が、浮遊状態 (planktonic state) にある細菌を対象とする。しかし、細菌性の病態は、バイオフィルム状態にある細菌を含む。例えば、ポルフィロモナス・ジンジバリスは、慢性の歯周病 (periodontal disease) の主要な原因となる作用因子であると考えられている。該疾患と関連する組織損傷は、歯の表面上で多微生物性の細菌性バイオフィルムの一部分として増殖するポルフィロモナス・ジンジバリスに対する宿主免疫応答の調節不全により引き起こされる。細菌性バイオフィルムは、自然界にどこにでも存在し、互いに対して及び／又は表面若しくは界面に対して接着性の、マトリクスに囲まれた細菌集団と定義される (1)。成熟バイオフィルムとして表面に接着し該表面上で増殖するこれらの固着性の細菌細胞は、抗菌剤の存在、せん断力及び栄養枯渇を含み得る厳しい環境で生存することができる。

20

【0003】

疾病対策予防センターは、ヒトの細菌性感染の 65% がバイオフィルムを含むと見積もっている。バイオフィルムは、免疫系から細菌を保護することにより、抗生物質の有効性を減少させ、再感染を助け得る離れた部位に浮遊細胞を分散させることで、慢性感染症の治療を複雑にすることが多い (2、3)。歯垢は、種の多様性の高さにより歯の表面上で増殖する異質な多微生物性バイオフィルムが形成される、細菌性バイオフィルムの古典的な例である。歯の表面は、人体では唯一の、硬く、永続的な、脱落しない表面であるので、特有の微生物生息環境である。このことは、上皮細胞の脱落がバイオフィルムの発達を制限する粘膜表面とは対照的に、長期間にわたる実質的な細菌性バイオフィルムの付着を可能にする。したがって、浮遊状態とバイオフィルム状態との間に生じるポルフィロモナス・ジンジバリスのプロテオームに対する変化は、慢性の歯周病の進行についての理解にとりて重要である。

30

40

【0004】

ポルフィロモナス・ジンジバリスは、動物病変モデルにおいて浸潤性であると説明されている W50 及び W83 を含む菌株と、一方で、非浸潤性であると説明されている 381 及び ATCC 33277 を含む菌株とを有する 2 つの広い菌株群に分類されている (4、5)。Griffen et al. (6) は、W83 / W50 様菌株が、381 様菌株を含む他のポルフィロモナス・ジンジバリス株よりも、ヒトの歯周病との関連性が高いことを見出したが、その一方で Cutler et al. (7) は、ポルフィロモナス・ジンジバリスの浸潤性菌株は非浸潤性菌株よりも貪食に対して抵抗性が高いことを実証した。配列決定したポルフィロモナス・ジンジバリス W83 株と、基準株 ATCC 33277 との比較は、33277 株

50

では遺伝子の7%が存在しないか、又は高度に異なっていることを示し、菌株間にはかなりの差異が存在することを示した(8)。興味深いことに、ポルフィロモナス・ジンジバリスW50株は、容易にバイオフィルムを形成する33277株と比較して、ほとんどの環境下でわずかにしかバイオフィルムを形成しない(9)。この結果として、ポルフィロモナス・ジンジバリスW50によるバイオフィルムの形成について行われた研究の数は比較的少ない。

【0005】

定量的なプロテオーム研究が、ゲル染色強度に基づきタンパク質の比を算出する二次元ゲル電気泳動アプローチを使用して、シュードモナス・エルギノーサ(*Pseudomonas aeruginosa*)、大腸菌及びストレプトコッカス・ミュータンス(*Streptococcus mutans*)等の浮遊状態からバイオフィルム状態への、ヒトの細菌性病原体のプロテオームの変化を決定するために採用されている(10~12)。代替手段は、MS定量法と共に、ICAT、iTRAQ又は重水($H_2^{18}O$)等の安定な同位体で標識化する技法を使用することである(13)。 $H_2^{18}O$ 標識化の基礎は、タンパク質の加水分解時に、トリプシン等のエンドペプチダーゼが、得られたペプチドのC末端に2個の ^{18}O 原子を組み込むことが実証されていることである(14、15)。タンパク質の相対存在量の決定における使用(16~19)に加えて、プロテオミクスにおいて ^{18}O 標識化は、タンパク質のC末端の同定、グリカンの酵素的除去後のN結合型付加糖鎖の同定、MS/MSのデータ解釈の単純化のためにも、より最近ではリン酸化部位の確認のためにも、使用されている(20~23)。タンパク質の相対存在量を測定するための ^{16}O / ^{18}O タンパク質分解標識化法は、一方の試料を $H_2^{16}O$ 中で、他方の試料を $H_2^{18}O$ 中で、消化することを含む。消化物はその後、LC-MS/MSによる分析の前に組み合わせられる。LCカラムから溶出するペプチドは、MSモードにおいてペプチドイオン対の相対シグナル強度を測定することにより、定量することができる。トリプシンにより消化されたペプチドのC末端への2個の ^{18}O 原子の組込みは、同位体の対の同定を可能にする+4 m/zの質量シフトをもたらす。

【0006】

プロテオームの複雑性のために、予備分画工程が、ペプチド及びタンパク質の同定数を増大させるために有利である。ほとんどの予備分画工程は、溶液内消化後のペプチドレベルでの二次元LCアプローチを含む(24、25)。しかし、タンパク質溶液の初期脱水工程時に試料が減少する可能性があるため、タンパク質レベルでのSDS-PAGE予備分画と、その後のゲル内消化時の ^{16}O / ^{18}O 標識化とがうまく実施されている(26~29)。 ^{16}O / ^{18}O タンパク質分解標識化は高度に特異的且つ多用途の方法論であるが、大規模な確認研究の実施数は少ない(30)。優れた確認研究がQian et al(18)により実施されたが、彼らは、2つの同様の一定分量の血清タンパク質を1:1の比で標識化し、891種類のペプチドから 1.02 ± 0.23 の平均比を得た。Lane et al(26)によるより最近の研究は、逆標識化戦略を使用して、ヒト腫瘍を移植した、対照マウスとチトクロムP450誘導因子で処理したマウスとの間における17種類のチトクロムP450タンパク質の相対存在量を決定し、 ^{16}O / ^{18}O 法の実行可能性をさらに実証した。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、ポルフィロモナス・ジンジバリスW50が連続培養で増殖し、長期間にわたりケモスタット容器中の垂直の表面上で成熟バイオフィルムが発達する系を使用した。最終的なバイオフィルムは、疾患進行の条件下で見られるバイオフィルムと類似しており、したがってバイオフィルム細胞と浮遊細胞との間の直接的な比較を可能にする。逆標識化戦略を使用する ^{16}O / ^{18}O タンパク質分解標識化を、ポルフィロモナス・ジンジバリス細胞外被画分のSDS-PAGEでの予備分画と、その後の、同定及び定量のためのオフラインLC-MALDI-TOF-MS/MSとの結合の後に実施した。同定した11

6種類のタンパク質のうち、81種類は2つの独立の連続培養研究において一貫して見出された。様々な機能を有する47種類のタンパク質のバイオフィルム細胞中の存在量が一貫して増大又は減少することが見出され、バイオフィルム制御戦略のための潜在的な標的をもたらした。これらの47種類のタンパク質のうち、本発明者らは、ポルフィロモナス・ジンジバリス感染症の治療及び／又は予防における標的として特に有用と考える24種類のタンパク質を選択した。これらを下記の表4内に列挙している。

【0008】

したがって本発明は、細菌によるバイオフィルム形成を調節する単離、精製又は組換え細菌性ポリペプチドを提供する。好ましくは、細菌は嫌気性である。一実施形態では細菌は、ポルフィロモナス属の細菌のように、フマル酸レダクターゼ(Frd)依存性である。

10

【0009】

ポルフィロモナス・ジンジバリスに関する本発明によるポリペプチドは、表4に列挙した配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を有する。本発明は、これらと少なくとも80%、好ましくは85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有する配列に及ぶ。

【0010】

本発明の別の態様は、ポルフィロモナス・ジンジバリス感染症に関して被験体を予防又は治療する方法であって、バイオフィルム形成、特に細菌性バイオフィルム形成から生じる又はこれと関連するポルフィロモナス・ジンジバリス感染を調節するポリペプチドの阻害剤を含む医薬組成物を該被験体に投与することを含む、方法である。歯周病に関して被験体を予防又は治療する方法であって、バイオフィルム形成、特に細菌性バイオフィルム形成から生じる又はこれと関連する歯周病を調節するポリペプチドの阻害剤を含む医薬組成物を該被験体に投与することを含む、方法も提供される。典型的にはポリペプチドは、ポリペプチドの活性の抑制がバイオフィルムの形成及び／又は発達を低減又は抑制するという意味で、バイオフィルム発達のために重要又は必要である。

20

【0011】

歯周病を予防又は治療するための薬物の製造における、バイオフィルム形成を調節するポリペプチドの阻害剤の使用も提供される。

【0012】

本発明の別の態様は、歯周病の予防又は治療に有用な組成物であって、本発明の第1の態様のポリペプチドのアンタゴニスト又はアンタゴニストの組合せ等の阻害剤を含む、組成物である。典型的には、組成物は、薬学的に許容される担体も含む。組成物は、アンタゴニスト(複数可)が感染症を抑制するように投与される。

30

【0013】

任意に、組成物は、グラム陰性嫌気性細菌に対して毒性を有する、又はその増殖を抑制する1つ又は複数の抗生物質をさらに含み得る。任意の静菌性又は殺菌性の抗生物質を、本発明の組成物に使用することができる可能性がある。好ましくは、適切な抗生物質は、アモキシシリン、ドキシサイクリン又はメトロニダゾールを含む。

【0014】

本発明の別の態様は、口腔における使用のための、歯周病又はポルフィロモナス・ジンジバリス感染症の予防、抑制又は治療に有用な組成物である。

40

【0015】

本発明の別の態様は、口腔において使用する場合の、歯周病又はポルフィロモナス・ジンジバリス感染症の予防、抑制又は治療に有用な組成物である。

【0016】

経口組成物が、歯上に若しくは歯肉上に、又はその両方に、沈着し得る。

【0017】

ポリペプチドは酵素であり得る。好ましくは酵素は、有機酸代謝、より好ましくはグルタミン酸/アスパラギン酸異化に関与する。一実施形態では、ポリペプチドはフマル酸レ

50

ダクターゼである。

【0018】

本発明の別の態様は、バイオフィルムの形成又は発達を調節するポリペプチドの阻害剤を活性成分として含む、ポルフィロモナス・ジンジバリス感染症の治療のための組成物である。

【0019】

本発明の別の態様では、各鎖中に少なくとも19塩基対の二本鎖領域を含む干渉RNA分子であって、二本鎖領域の鎖の一方が上述のようにバイオフィルム形成を調節するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの領域と実質的に相補的である、干渉RNA分子が提供される。一実施形態では、鎖の一方が、表4に列挙した配列のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの領域と相補的である。

10

【0020】

一実施形態では阻害剤は、ポリペプチドのアンタゴニストである。ポルフィロモナス・ジンジバリスに関しては、ポリペプチドはフマル酸レダクターゼであってもよく、そのアンタゴニストはフマル酸レダクターゼの阻害剤の1つ又は複数から選択される。付加的な適切な阻害剤は、デクルシン(decursin)、ベルチシピロン(verticipyron)、パシラミノール(paecilaminol)、ストレプトマイセス種由来の5-アルケニル-3,3(2H)-フラノン、ナフレジン(nafuredin)、メサコン酸、ロテノンを含むがこれらに限定されない天然生成物、並びにこれらの天然、半合成及び合成の類似体を含む。別の態様では、本発明の阻害剤は、2-置換4,6-ジニトロフェノール；メルカプトピリジン N-オキシド；L-092201(Merck Sharpe and Dohme)；フェクスインダゾール(fexindazole)、メガゾール(megazol)、ベンズニダゾール(benznidazole)、MK-436、L-634549、ミソニダゾール等のニトロ-イミダゾール；又はアルベンダゾール、カンベンダゾール、メベンダゾール、オキシフェンダゾール、バルベンダゾール(parebendazole)及びチアベンダゾール等のベンズイミダゾール；又はオキサテル若しくはモランテルを含むがこれらに限定されない合成化合物であり得る。好ましい阻害剤は、オキサテル、モランテル又はチアベンダゾールである。特に好ましい阻害剤は、オキサテルである。

20

【0021】

阻害剤の選択は、該阻害剤が或る臨床設定における使用にとって適当であるか否かを決定する多数の臨床的な因子に依存することを、当業者は理解するだろう。

30

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】特定のBSA比の $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ 定量を示す図である。既知量のBSAの定量を、バイオフィルム試料及び浮遊試料に関して、実験手順において報告したのと同じ方法で実施し、方法論をバリデーションした。簡潔には、所定量のBSAをNuPAGEゲルの隣接レーンにロードし、その後、等サイズのバンドの切り出しと、通常の又は逆のタンパク質分解標識化と、ナノHPLCと、MALDI TOF-MS/MSとを行った。(A) ^{16}O 及び ^{18}O で標識化したペプチドに関する特徴的なダブレット同位体エンベロープを示す、既知の $^{16}\text{O} : ^{18}\text{O}$ 標識化比(1:1(i)、2:1(ii)、1:5(iii)及び10:1(iv))でのBSAトリプシンペプチドRHPEYAVSVLLRのMSスペクトル(S0、S2及びS4は、同位体ピークの測定強度である)。(B)定量手順のために使用した既知のBSA比のSDS PAGEゲル。

40

【図2】ポルフィロモナス・ジンジバリス試料から得た、典型的な、順方向及び逆方向のMS及びMS/MSスペクトルを示す図である。(i、ii)通常の及び逆の標識化を行ったPG2082に属するペプチドGNLQALVGRの[M+H]⁺親前駆体イオンを示し、且つ1:1比で典型的な4Daの質量差を示す、マスペクトルの拡大部分。(iii、iv)通常の及び逆の標識化を行ったPG0232に属するペプチドYNANNVDLNRの[M+H]⁺親前駆体イオンを示し、且つ2:1比で典型的な4Daの質量差を示す、マスペクトル。(v、vi)全Yイオンの4Daシフトを特徴とする、重標識

50

化 (+ 2¹⁸O) Y N A N N V D L N R ペプチド及び非標識化 Y N A N N V D L N R ペプチドの MS / MS スペクトル。

【図 3】通常の / 逆の標識化を行った技術的反復測定結果の相関を示す図である。両方の生物学的反復測定結果について、通常の (バイオ 18、浮遊 16) 及び逆の (浮遊 18、バイオ 16) 標識化のペプチド存在量の比の、底を 10 として対数変換した散布図比較。逆標識化ペプチドの存在量比は、直接の比較に関しては逆数をとった。(A) 生物学的反復測定結果 1。(B) 生物学的反復測定結果 2。

【図 4】生物学的反復測定結果のタンパク質存在量の分布及び相関を示す図である。(A) 両方の生物学的反復測定において同定した 81 種類の定量化可能なタンパク質に関する正規化した平均フォールド変化は、ガウス様分布を示した。各タンパク質の存在量比を、0 に対してさらに正規化し (R - 1)、1 より小さい比は逆数を取り (1 - (1 / R)) として算出した (18)。各生物学的反復測定から得られた 81 種類の定量化可能なタンパク質の全てを、比 (バイオフィルム / 浮遊) の増大により選別し、等数のタンパク質を有する 6 つの群 (A - F) に等しく分割した。C 群及び D 群は、有意に調節されない (1.0 から 3 SD 未満) タンパク質を表す。(B) 順位付けに基づくタンパク質の分布。挿入表: 両方の生物学的反復測定結果の間の類似性の決定のための順位付け表。タンパク質を、両方の生物学的反復測定結果が同じ群内に入る場合には 1 が最も高い類似性を有するものとして、また 6 が最も低い類似性を有するものとして、降順に順位付けした。

【図 5】一方又は両方の生物学的反復測定結果での同定に基づき本研究で同定した 116 種類のタンパク質の分解 (Breakdown) と、同定した特有のペプチドの数とを示す図である。両方の生物学的反復測定から同定したタンパク質 (81 種類) を、表 2 に示す。説明書きは、タンパク質 1 種類当たりの同定した特有のペプチドの数を示す。

【図 6】ポルフィロモナス・ジンジバリスにおけるグルタミン酸及びアスパラギン酸発酵に関する異化経路を示す図である。各工程を触媒する同定した酵素は、表 3 に示すその T I G R アクセション番号により表される。下線を付したアクセション番号は、別のプロテオーム解析では検出されたが I C A T 研究では検出されなかった酵素を示す。

【図 7】ポルフィロモナス・ジンジバリス W 5 0 (A) 及び A T C C 3 3 2 7 7 (B) の 50 時間にわたる細胞増殖に対するオキサニテルの効果を示す図である。使用した濃度は、15.625 μ M ~ 1000 μ M であった。使用した陰性対照は、4 μ L の D M S O であった。ポルフィロモナス・ジンジバリス (P.ginivigalis) の M I C 及び M G T は、表 7 及び表 8 に示したようなものであった。結果は、異なる日に実施した 2 つの生物学的反復測定の平均を示す (n = 10)。

【0023】

【化 1】

(— DMSO, — 15.625 μ M, — 31.25 μ M, - - - 62.5 μ M, - · - · 125 μ M, · · · · · 250 μ M, — · · 500 μ M, - - - - 1000 μ M)

【図 8】ポルフィロモナス・ジンジバリスの 50 時間にわたる細胞増殖に対するモランテルの効果を示す図である。使用した濃度は、15.625 μ M ~ 1000 μ M であった。使用した陰性対照は、4 μ L の D M S O であった。ポルフィロモナス・ジンジバリスの M I C 及び M G T は、表 7 に示したようなものであった。

【0024】

【化 2】

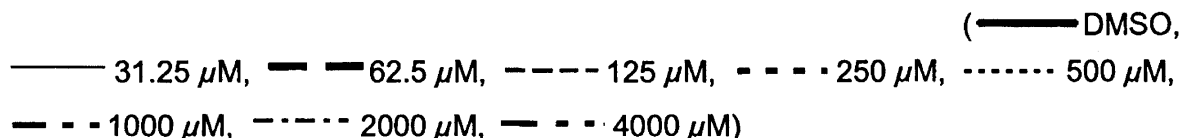
(— DMSO, — 19.53 μ M, — 39.06 μ M, - - - 78.13 μ M, - · - · 156.25 μ M, · · · · · 312.5 μ M, — · · 625 μ M, - - - - 1250 μ M, — · · 2500 μ M, - - - - 5000 μ M)

【図 9】ポルフィロモナス・ジンジバリスの 50 時間にわたる細胞増殖に対するチアベンダゾールの効果を示す図である。使用した濃度は、31.25 μ M ~ 4000 μ M であった。

た。使用した陰性対照は、4 μ L の DMSO であった。ポルフィロモナス・ジンジバリスの MIC 及び MGT は、表 7 に示したようなものであった。

【0025】

【化 3】

(DMSO,
 ——— 31.25 μ M, - - - 62.5 μ M, - · - · 125 μ M, · · · · 250 μ M, · · · · · 500 μ M,
 - · - · 1000 μ M, - · - · · 2000 μ M, - · - · · 4000 μ M)

【図 10】ポルフィロモナス・ジンジバリス 33277 株によるバイオフィルム形成 ((10
 A) 24 時間時点でのバイオフィルム、(B) 48 時間時点でのバイオフィルム) に対す
 るオキシサントールの効果を示す図である。アッセイの生物学的反復測定を実施し、エラーバ
 ーは両方の生物学的反復測定結果 ($n = 12$) の標準偏差を表す。

【図 11】水のみで処理し、Bac light で染色した対照 ATCC 33277 の CLSM 像を示す図である。画像は、2 μ m の間隔で得た全 z - stack の最大の投影像で
 ある。スケールバー (白色) = 10 μ m。

【図 12】125 μ M のオキシサントールで処理し、Bac light で染色した ATCC 3
 3277 の CLSM 像を示す図である。画像は、2 μ m の間隔で得た全 z - stack の
 最大の投影像である。スケールバー (白色) = 10 μ m。

【図 13】12.5 μ M のオキシサントールで処理し、Bac light で染色した ATCC 20
 33277 の CLSM 像を示す図である。画像は、2 μ m の間隔で得た全 z - stack
 の最大の投影像である。スケールバー (白色) = 10 μ m。

【図 14】静的 24 ウェルアッセイに基づく、オキシサントール処理後のポルフィロモナス・
 ジンジバリスのコロニー形成単位を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0026】

プロテオーム戦略を使用して、本発明者らは、116 種類のポルフィロモナス・ジンジ
 バリス細胞外被タンパク質の、バイオフィルム状態と浮遊状態との間の存在量の変化をう
 まく同定及び定量し、大部分のタンパク質が複数のペプチドヒットにより同定された。本
 発明者らは、RgpA、HagA、CPG70 及び PG99 を含む、細胞表面に位置する 30
 C 末端ドメインファミリータンパク質の大群の発現の増強を実証した。存在量の有意な変
 化を示す他のタンパク質は、輸送関連タンパク質 (HmuY 及び IhtB) と、代謝酵素
 (FrdA 及び FrdB) と、免疫原性タンパク質と、今のところ機能が未知の多数のタ
 ンパク質とを含んでいた。

【0027】

したがって、本発明は、表 4 に列挙したアクセッション番号に対応する配列と、それら
 と少なくとも 95 % の同一性を有する配列とから成る群から選択されるアミノ酸配列を有
 する、ポルフィロモナス・ジンジバリスの単離ポリペプチドを提供する。

【0028】

好ましくは、単離ポリペプチドは、表 4 に列挙したアクセッション番号に対応する配列 40
 のいずれか 1 つのアミノ酸配列と、少なくとも 96 %、97 %、98 %、99 % 又は 10
 0 % の同一性を有する。

【0029】

「ペプチド、タンパク質及びポリペプチド」という用語は、本明細書では交換可能な用
 語として使用される。本発明のポリペプチドは、融合ポリペプチド等の組換えポリペプ
 チドを含み得る。融合ポリペプチドを作製する方法は、当業者に既知である。

【0030】

当業者には十分に理解されるように、表 4 に列挙したアクセッション番号に対応するア
 ミノ酸配列に対して変更が行われ得る。これらの変更は、アミノ酸残基の欠失、挿入又は
 置換であり得る。変更されたポリペプチドは、天然 (すなわち、天然の供給源から精製若 50

しくは単離した)又は合成(例えば、コードするDNAに対する部位特異的な突然変異誘発による)のいずれかであり得る。表4に列挙したアクセッション番号に対応する配列と少なくとも85%、好ましくは少なくとも90%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するこのような変更されたポリペプチドは、本発明の範囲内であることが意図される。これらの変更されたポリペプチドに対して産生される抗体も、表4に列挙したアクセッション番号に対応する配列の1つを有するポリペプチドと結合する。

【0031】

保存的置換の概念は当業者により十分に理解されるが、明確化のために、保存的置換は以下のように記述される：

Gly、Ala、Val、Ile、Leu、Met；

Asp、Glu、Ser；

Asn、Gln；

Ser、Thr；

Lys、Arg、His；

Phe、Tyr、Trp、His；及び

Pro、N α -アルキル(alkal)アミノ酸。

10

【0032】

本発明の実施は、他に特に指示がなければ、当業者に既知の化学、分子生物学、微生物学、組換えDNA及び免疫学の従来技法を使用する。このような技法は、J. Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning, John Wiley and Sons (1984)、J. Sambrook et Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbour Laboratory Press (1989)、T. A. Brown (editor), Essential Molecular Biology: A Practical Approach, Volumes 1 and 2, IRL Press (1991)、D. M. Glover and B. D. Hames (editors), DNA Cloning: A Practical Approach, Volumes 1-4, IRL Press (1995 and 1996) 及びF. M. Ausubel et al. (Editors), Current Protocols in Molecular Biology, Greene Pub. Associates and Wiley-Interscience (1988、現在までの全ての更新情報を含む)のような出典の文献全体に記載及び説明されている。これらのテキストの開示は、参照により本明細書中で援用される。

20

【0033】

「単離ポリペプチド」とは、本明細書中で使用する場合、それが天然に生じるか、又はそれを使用してポリペプチド若しくはペプチドが合成的に合成され得る他のタンパク質、脂質及び核酸から分離されたポリペプチドを表す。好ましくはポリペプチドは、それを精製するために使用される物質(例えば抗体又はゲルマトリックス(例えばポリアクリルアミド))からも分離される。好ましくはポリペプチドは、精製した調製物の乾燥重量の少なくとも10%、20%、50%、70%及び80%を構成する。好ましくは調製物は、タンパク質シーケンシングを可能にするのに十分な量(即ち、少なくとも1mg、10mg又は100mg)のポリペプチドを含有する。

30

【0034】

本明細書中に記載される単離ポリペプチドは、標準技法、例えばカラムクロマトグラフィ(タンパク質生成物と相互作用する様々なマトリクス、例えばイオン交換マトリクス、疎水性マトリクス等を使用する)、アフィニティークロマトグラフィ(タンパク質又はタンパク質と結合する他のリガンドに特異的な抗体を利用する)により精製され得る。

40

【0035】

「連続アミノ酸配列」は、本明細書中で使用する場合、アミノ酸の連続するストレッチを表す。

【0036】

「組換えポリペプチド」は、組換えDNA技術の使用を含むプロセスにより産生されるポリペプチドである。

【0037】

2つのアミノ酸配列が特定の百分率限界内に入るか否かを決定する際には、当業者は、

50

配列を並べて比較すること、又は配列の多重アラインメントを実行することが必要であることに気づくだろう。このような比較又はアラインメントでは、アラインメントを実施するために使用するアルゴリズムによって、非同一残基の位置決めにおいて差異が生じる。本発明との関連では、2つ以上のアミノ酸配列間の同一性又は類似性の百分率への言及は、当業者に既知の任意の標準アルゴリズムを使用して決定されるような上記配列間のそれぞれ同一及び類似の残基の数を表すと解釈される。例えばアミノ酸配列の同一性又は類似性は、GAPプログラムを使用して算出することができ、及び/又はComputer Genetics Group, Inc., University Research Park, Madison, Wisconsin, United States of America (Devereaux et al et al., 1984) のPILEUPプログラムを使用して整列させることができる。GAPプログラムは、Needleman and Wunsch (1970) のアルゴリズムを利用して同一/類似の残基の数を最大化し、アラインメント中の配列ギャップの数及び長さを最小化する。代替的に又は付加的に、2つより多いアミノ酸配列が比較される場合、Thompson et al, (1994) のClustal Wプログラムが使用される。

10

【0038】

本発明の一態様は、歯周病に関して被験体を予防又は治療する方法であって、本発明による医薬組成物を該被験体に投与することを含む、方法である。

【0039】

一方法では被験体は、歯周病に関する予防的治療を含む治療を受ける。歯周病は、単なる歯肉の炎症から、歯を支持する軟組織及び骨に大きな損傷を引き起こす重度の疾患までに及ぶ。歯周病は、歯肉炎 (gingivitis) 及び歯周炎 (periodontitis) を含む。ポルフィロモナス・ジンジバリス等の細菌は、「歯肉炎」と呼ばれる歯肉の炎症を引き起こす。歯肉炎では、歯肉が赤くなり、膨潤し、容易に出血する可能性がある。歯肉炎を治療しないと、「歯周炎」(「歯の周囲の炎症」を意味する) に進行する可能性がある。歯周炎では、歯肉が歯から離れ、感染の対象となる「ポケット」を形成する。歯垢が歯肉線の下に広がり成長するにつれて、身体の免疫系は細菌と戦う。治療しないと、歯を支持する骨、歯肉及び結合組織が破壊される。歯は最終的に緩くなり、抜かなければならない場合がある。

20

【0040】

本発明は、歯周病の予防又は治療に有用な組成物であって、免疫原として有効量の少なくとも1つの本発明の第1の態様のポルフィロモナス・ジンジバリスのポリペプチドのアンタゴニストと、薬学的に許容される担体とを含む、組成物も提供し、該アンタゴニストはポルフィロモナス・ジンジバリス感染症を抑制する。

30

【0041】

上で言及した医薬組成物を含有する本発明の経口組成物は、歯磨きペースト、歯磨き粉及び液体歯磨き剤 (liquid dentifrices)、洗口剤、トローチ、チューインガム、歯科用ペースト、歯肉用マッサージクリーム、うがい用錠剤、乳製品、並びに他の食料品を含む歯磨き剤等の口に適用可能な様々な形態で調製及び使用され得る。本発明による経口組成物は、特定の経口組成物の種類及び形態に応じて、付加的な既知の成分をさらに含み得る。

【0042】

本発明の或る特定の好ましい形態では、経口組成物は、洗口剤又はリンス剤のように、その特徴として実質的に液体であり得る。このような調製物中では、ビヒクル (vehicle) は典型的には水-アルコール混合物であり、望ましくは以下で説明する保湿剤を含む。概して、水対アルコールの重量比は、約1:1から約20:1までの範囲である。この種類の調製物中における水-アルコール混合物の総量は、典型的には調製物の約70重量%~約99.9重量%の範囲である。アルコールは典型的にはエタノール又はイソプロパノールである。エタノールが好ましい。

40

【0043】

本発明のこのような液体及び他の調製物のpHは、概して約5~約9の、典型的には約5.0~7.0の範囲である。pHは、酸(例えばクエン酸若しくは安息香酸)若しくはは

50

塩基（例えば水酸化ナトリウム）で制御され得るか、又は（クエン酸ナトリウム、安息香酸ナトリウム、炭酸ナトリウム若しくは重炭酸ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム等で）緩衝され得る。

【0044】

本発明の他の望ましい形態では、医薬組成物は、歯磨き粉、歯科用錠剤若しくは歯磨きペースト（歯科用クリーム）又はゲル歯磨き剤のように、その特徴として実質的に固体又はペースト状であり得る。このような固体又はペースト状の経口調製物のビヒクルは、概して歯科用に許容される研磨材料を含有する。

【0045】

歯磨きペーストでは、液体ビヒクルは、典型的には調製物の約10重量%～約80重量%の範囲の量で、水及び保湿剤を含み得る。グリセリン、プロピレングリコール、ソルビトール及びポリプロピレングリコールは、適切な保湿剤/担体の範例である。水、グリセリン及びソルビトールの液体混合物も有利である。屈折率が重要な検討事項である透明なゲルでは、約2.5重量%～30重量%の水と、0重量%～約70重量%のグリセリンと、約20重量%～80重量%のソルビトールとが、好ましくは利用される。

【0046】

歯磨きペースト、クリーム及びゲルは典型的には、天然の又は合成の濃厚剤又はゲル化剤を、約0.1重量%～約10重量%、好ましくは約0.5重量%～約5重量%の割合で含有する。適切な濃厚剤は、合成ヘクトライト（hectorite）、例えばLaporte Industries Limitedにより市販されているLaponite（例えばCP、SP2002、D）として入手可能な、合成コロイド性ケイ酸マグネシウムアルカリ金属錯体粘土である。Laponite Dは、およそ58.00重量%のSiO₂と、25.40重量%のMgOと、3.05重量%のNa₂Oと、0.98重量%のLi₂Oと、幾らかの水と、微量金属とである。その真の比重は2.53であり、水分8%で1.0g/mlの見かけの容積密度（bulk density）を有する。

【0047】

他の適切な濃厚剤は、アイリッシュ・モス、イオタカラギーナン、トラガカント・ゴム、デンプン、ポリビニルピロリドン、ヒドロキシエチルプロピルセルロース、ヒドロキシブチルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース（例えば、Natosolとして入手可能）、カルボキシメチルセルロースナトリウム、及び微粉碎Sylod（例えば244）等のコロイド性シリカを含む。プロピレングリコール、ジプロピレングリコール及びヘキシレングリコール等の保湿性ポリオール、メチルセロソルブ及びエチルセロソルブ等のセロソルブ、オリーブ油、ヒマシ油及びワセリン等の直鎖中に少なくとも約12個の炭素を含有する植物油及びワックス、並びに酢酸アミル、酢酸エチル及び安息香酸ベンジル等のエステル等の可溶化剤も含まれ得る。

【0048】

従来のように、経口調製物は、適切なラベルを付した包装品で販売されるか、又はその他の方法で配布されるのが通常であることが理解される。したがって、マウスリンスのボトルは、それがマウスリンス又は洗口剤であることを十分に説明し、且つ使用のための指示を有するラベルを有し；歯磨きペースト、クリーム又はゲルは、押し出しチューブ（典型的にはアルミニウムの、鉛ライニングを付した、若しくはプラスチックの）、又は内容物を量り取るための他のスクイズ容器、ポンプ若しくは加圧ディスペンサに入っており、それが歯磨きペースト、ゲル又は歯科用クリームであることを十分に説明するラベルを有することが通常である。

【0049】

有機界面活性剤は、予防的作用の増大を達成し、口腔全体にわたる活性作用物質の徹底的且つ完全な分散を達成する際に助けとなり、本発明の組成物をより化粧品として許容されるものとするために、本発明の組成物中で使用され得る。有機界面活性材料は好ましくは本来的に陰イオン性、非イオン性又は両性であり、好ましくは活性作用物質と相互作用しない。組成物に洗浄特性及び発泡特性を付与する洗浄材料を、界面活性剤として利用す

ることが好ましい。陰イオン性界面活性剤の適切な例は、硬化ココナッツ油脂肪酸のモノ硫酸化モノグリセリドのナトリウム塩等の高級脂肪酸モノグリセリドモノ硫酸塩の水溶性塩、ラウリル硫酸ナトリウム等の高級アルキル硫酸塩、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム等のアルキルアリアルスルホン酸塩、高級アルキルスルホ酢酸塩、1,2-ジヒドロキシプロパンスルホン酸塩の高級脂肪酸エステル、及び脂肪酸、アルキル基又はアシル基等に12個～16個の炭素を有するもののような低級脂肪族アミノカルボン酸化合物の実質的に飽和した高級脂肪族アシルアミドである。最後に言及したアミドの例は、N-ラウロイルサルコシン、並びにセッケン又は類似の高級脂肪酸材料を実質的に含まないN-ラウロイルサルコシン、N-ミリストイルサルコシン又はN-パルミトイルサルコシンのナトリウム、カリウム及びエタノールアミン塩である。本発明の経口組成物におけるこれらのサルコナイト(sarconite)化合物の使用は、これらの材料は酸溶液中の歯のエナメル質の溶解性の幾らかの低減を発揮するのに加えて炭水化物の分解による口腔における酸形成の抑制における顕著な効果の延長を示すので、特に有利である。使用に適切な水溶性非イオン性界面活性剤の例は、疎水性長鎖(例えば、炭素原子数約12～20の脂肪族鎖)を有する、エチレンオキシドと、それと反応性を有する様々な反応性水素含有化合物との縮合生成物であり、該縮合生成物(「エトキサマー(ethoxamers)」)は、ポリ(エチレンオキシド)と、脂肪酸、脂肪アルコール、脂肪アミド、多価アルコール(例えばモノステアリン酸ソルビタン)及びポリプロピレンオキシド(例えばPluronic材料)との縮合生成物等の、親水性のポリオキシエチレン部分を含有する。

10

【0050】

20

界面活性剤は、典型的には約0.1重量%～5重量%の量で存在する。界面活性剤が、本発明の活性作用物質を溶解する際に助けとなり得ること、及びそれにより可溶化保湿剤の必要量を減少することは、注目に値する。

【0051】

白色化剤、保存料、シリコン、クロロフィル化合物、及び/又は尿素、リン酸二アンモニウム等のアンモニア化合物、並びにこれらの混合物等の様々な他の材料が、本発明の経口調製物中に組み込まれ得る。これらの補助剤は、存在する場合には所望の特性及び特徴にほとんど悪影響を及ぼさない量で、調製物中に組み込まれる。

【0052】

任意の適切な香味材料又は甘味材料も利用され得る。適切な香味構成要素の例は、香油(例えば、スペアミント油、ペパーミント油、ウインターグリーン油、ササfras油、クローブ油、セージ油、ユーカリ油、マジヨラム油、シナモン油、レモン油及びオレンジ油)、並びにサリチル酸メチルである。適切な甘味料は、スクロース、ラクトース、マルトース、ソルビトール、キシリトール、シクラミン酸ナトリウム、ペリラルチン(perillartine)、AMP(アスパルチルフェニルアラニン、メチルエステル)、サッカリン等を含む。適切には、香料及び甘味料は、各々又は共に、調製物の約0.1%～5%以上(more)含み得る。

30

【0053】

本発明の組成物は、ロゼンジ中に、又はチューインガム若しくは他の製品中に、例えば、加温したガム基剤中に攪拌すること、又はガム基剤の外表面にコーティングすることにより、組み込むこともでき、ここでこれらの基剤は例示的に、従来の可塑剤又は軟化剤、砂糖又は他の甘味料すなわち例えばグルコース、ソルビトール等を有することが望ましい、ジェルトン、ゴムラテックス、ビニライト樹脂等である。

40

【0054】

さらなる一態様では、本発明は、(a)ポリペプチド阻害剤の組成物と、(b)薬学的に許容される担体とを含む、部分のキットを提供する。望ましくは該キットは、このような治療を必要としている患者におけるバイオフィルム形成を抑制するためのその使用のための取扱説明書をさらに含む。

【0055】

経口使用を意図する組成物は、医薬組成物の製造のための当該技術分野で既知の任意の

50

方法に従い調製することができ、このような組成物は、薬学的に洗練され且つ風味の良い調製物を提供するために、甘味料、香料、着色料及び保存料から成る群から選択される１つ又は複数の作用物質を含有し得る。錠剤は、錠剤の製造に適した毒性を有しない薬学的に許容される賦形剤を有する混合物中に、活性成分を含有する。これらの賦形剤は、例えば、不活性希釈剤（炭酸カルシウム、炭酸ナトリウム、ラクトース、リン酸カルシウム又はリン酸ナトリウム等）、造粒剤及び崩壊剤（例えば、コーンスターチ又はアルギン酸）、結合剤（例えば、デンプン、ゼラチン又はアカシア）並びに滑沢剤（例えば、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸又はタルク）であり得る。錠剤はコーティングされていなくてもよく、又は胃腸管における崩壊及び吸収を遅延させることにより長期間にわたり持続的な作用をもたらすために既知の技法によりコーティングされていてもよい。例えば、モノステアリン酸グリセリン又はジステアリン酸グリセリン等の時間遅延材料が、利用され得る。

10

【 0 0 5 6 】

経口使用のための処方物は、不活性な固体希釈剤（例えば、炭酸カルシウム、リン酸カルシウム若しくはカオリン）と共に活性成分が混合されるハードゼラチンカプセルとして、又は水若しくは油媒体（例えばピーナッツ油、液体パラフィン若しくはオリーブ油）と共に活性成分が混合されるソフトゼラチンカプセルとして、提供することもできる。

【 0 0 5 7 】

水性懸濁液は、水性懸濁液の製造に適した賦形剤を有する混合物中に活性材料を含有する。このような賦形剤は、懸濁剤、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、メチルセルロース、ハイドロプロピル（hydropropyl）メチルセルロース、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリドン、トラガカント・ゴム及びアカシア・ゴムであり、分散剤又は湿潤剤は天然のリン脂質、例えばレシチン、又はアルキレンオキシドと脂肪酸との縮合生成物、例えばステアリン酸ポリオキシエチレン、又はエチレンオキシドと長鎖脂肪酸アルコールとの縮合生成物、例えばヘプタデカエチレンオキシセタノール、又はエチレンオキシドと脂肪酸及びヘキシトール（hexitol）から得られる部分エステルとの縮合生成物、例えばモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビトール、又はエチレンオキシドと脂肪酸及びヘキシトール無水物から得られる部分エステルとの縮合生成物、例えばモノオレイン酸ポリエチレンソルビタンであり得る。

20

【 0 0 5 8 】

水性懸濁液は、また、１つ又は複数の保存料（例えば、p - ヒドロキシ安息香酸エチル若しくはp - ヒドロキシ安息香酸n - プロピル等の安息香酸塩）と、１つ又は複数の着色料と、１つ又は複数の香料と、１つ又は複数の甘味料（例えばスクロース又はサッカリン）とを含有し得る。

30

【 0 0 5 9 】

油性懸濁液は、植物油（例えばラッカセイ油、オリーブ油、ゴマ油若しくはココナッツ油）中に、又は鉱物油（例えば液体パラフィン）中に活性成分を懸濁することにより処方され得る。油性懸濁液は、濃厚剤（例えば蜜ろう、固形パラフィン又はセチルアルコール）を含有し得る。上述したもののような甘味料と、香料とが、風味の良い経口調製物を提供するために添加され得る。これらの組成物は、アスコルビン酸等の酸化予防剤の添加により保存され得る。

40

【 0 0 6 0 】

バイオフィーム状態としての増殖と浮遊状態としての増殖との間のボルフィロモナス・ジンジバリスのタンパク質の存在量の比較は、この病原性細菌のプロテオームに対する多くの変化、特にグルタミン酸／アスパラギン酸異化に必須のフマル酸レダクターゼ酵素の存在量の低下を明らかにした。ヘム制限及びヘム過剰のボルフィロモナス・ジンジバリスのプロテオーム変化を比較することを含む別々の研究において、酢酸産生の増大をもたらし、且つボルフィロモナス・ジンジバリスの主要な異化経路の酵素の存在量の協調的な変化と一致するヘム制限時の発酵パターンにおける観察可能なシフトが存在した。ヘム制限及びバイオフィーム増殖時のフマル酸レダクターゼ酵素の存在量の一貫した低下には、特

50

に関心が持たれる。本発明者らはその後、ポルフィロモナス・ジンジバリスの生存に対する３種類のFrd阻害剤（オキサニテル、モランテル及びチアベンダゾール）の有用性と、バイオフィルムの正常な発達を妨げる最小抑制濃度以下の濃度（s u b M I C）とを実証した。

【 0 0 6 1 】

本明細書中で使用する場合、「アンタゴニスト」という用語は、対象のポリペプチドの生物学的活性を抑制する核酸、ペプチド、抗体、リガンド又は他の化学的実体を表す。特定のタンパク質の適切なアンタゴニストを試験及び選択する技法は当業者に既知であり、このような技法は結合アッセイを含み得る。

【 0 0 6 2 】

本発明の抗体及びアンタゴニストは多数の用途を有し、例えば、それらは、歯垢の抑制と齲歯及び歯周病に関連する病原体の抑制とのための口腔ケア製品（練り歯磨き及び洗口液）における抗菌保存料として使用することができる。本発明の抗体及びアンタゴニストは、薬学的調製物（例えば、局所用及び全身用抗感染薬）にも使用され得る。

【 0 0 6 3 】

本発明は、本発明の第１の態様のポリペプチドをコードするmRNA分子に対して標的とされる干渉RNA分子も提供する。したがって本発明の第７の態様では、各鎖中に少なくとも１９塩基対の二本鎖領域を含む干渉RNA分子であって、二本鎖領域の鎖の一方が本発明の第１の態様のポリペプチドをコードするmRNA分子の領域と相補的であり、又は通常の細胞内条件下で該領域とハイブリダイズすることが可能である、干渉RNA分子が提供される。

【 0 0 6 4 】

いわゆるRNA干渉又はRNAiは既知であり、RNAiに関するさらなる情報は、Hannon（2002）Nature 418: 244-251及びMcManus & Sharp（2002）Nature Reviews: Genetics 3（10）: 737-747（これらの開示は参照により本明細書中で援用される）に提供されている。

【 0 0 6 5 】

本発明は、siRNAの安定性を増強し、in vivoでのsiRNAの使用を支持するsiRNAの化学的修飾（複数可）も意図する（例えばShen et al.（2006）Gene Therapy 13: 225-234を参照されたい）。これらの修飾は、センス鎖オリゴヌクレオチドの5'末端及び3'末端での逆方向脱塩基部分と、アンチセンス鎖の3'末端での最後の２つのヌクレオチド間の単一ホスホルチオエート（phosphorthioate）結合を含み得る。

【 0 0 6 6 】

干渉RNAの二本鎖領域は、二本鎖領域の各鎖中に少なくとも２０塩基対、好ましくは少なくとも２５塩基対、最も好ましくは少なくとも３０塩基対を含むことが好ましい。本発明は、歯周病に関する被験体を治療する方法であって、本発明の干渉RNA分子のうち少なくとも１つを被験体に投与することを含む方法も提供する。

【 0 0 6 7 】

本明細書を通じて、「含む（comprise）」という単語、又は「含む（comprises）」若しくは「含む（comprising）」等の変化形は、上述の要素、整数若しくは工程、又は要素、整数若しくは工程の群を含むが、任意の他の要素、整数若しくは工程、又は要素、整数若しくは工程の群を排除しないことを示唆すると理解される。

【 0 0 6 8 】

本明細書で言及される全ての刊行物が、参照により本明細書に援用される。本明細書に含まれている文書、法令、材料、装置、論文等のいかなる議論も、単に本発明との関連を提示することのみを目的とする。これらの事項のいずれか又は全てが、従来技術の基礎の一部を形成する、又は本出願の各請求項の優先日前にオーストラリア若しくは他の場所に存在する本発明と関連する技術分野における共通の一般的な知識であったと認めるものと解釈すべきではない。

【 0 0 6 9 】

特定の実施形態に示した発明に対して、広く説明される本発明の精神又は範囲から逸脱することなく、多数の変形形態及び／又は修正形態が作られ得ることが当業者により理解される。本発明の実施形態は、したがって、全ての観点において、例示的なものであって限定的なものではないと考えられるべきである。本発明は、具体的には、本明細書に記載した特徴の全ての組合せを含む。

【0070】

本発明の性質をより明らかに理解することができるように、ここで、本発明の好ましい態様を以下の組成物の表及び実施例を参照しながらより詳細に説明する。

バイオフィルム対(v)浮遊の研究のためのポルフィロモナス・ジンジバリスの増殖及び回収

10

ポルフィロモナス・ジンジバリス W50 (ATCC 53978) を、400 mL の作業容積を有する model C-30 BioFlo chemostat (New Brunswick Scientific) を使用する連続培養で増殖させた。培養容器及び培地貯蔵槽の両方を、10% CO₂ 及び 90% N₂ で連続的に通気した。増殖温度は 37 °C であり、脳心臓点滴増殖培地 (Oxoid) を pH 7.5 に維持した。全増殖を通じて、酸化還元電位は -300 mV に維持した。希釈率は 0.1 h⁻¹ であり、6.9 h の平均世代時間 (MGT) をもたらしめた。滅菌シス테인 - HCl (0.5 g/L) 及びヘミン (5 mg/L) を添加した。培養は接種後約 10 日で定常状態に到達し、バイオフィルムの厚層が容器の垂直面上に発達するまでさらに 30 日間維持した。

【0071】

20

全ての細菌細胞の操作は、氷上で又は 4 °C で実施した。回収時に、浮遊細胞を清潔な容器中に静かに移し、バイオフィルムを PGA 緩衝液 (5 M NaOH により 37 °C で pH を 7.5 に調整した、10.0 mM NaH₂PO₄、10.0 mM KCl、2.0 mM クエン酸、1.25 mM MgCl₂、20.0 mM CaCl₂、25.0 mM ZnCl₂、50.0 mM MnCl₂、5.0 mM CuCl₂、10.0 mM CoCl₂、5.0 mM H₃BO₃、0.1 mM Na₂MoO₄、10 mM シス테인 - HCl) で穏やかに 2 回洗浄し、その後 50 mL 遠心分離チューブ中にバイオフィルムを回収した。

【0072】

浮遊細胞及びバイオフィルム細胞を、その後 PGA 緩衝液で 3 回 (7000 g) 洗浄し、両試料を最終体積 30 mL まで洗浄緩衝液 (50 mM トリス - HCl、150 mM NaCl、5 mM MgCl₂、pH 8.0、プロテイナーゼ阻害剤 (Sigma)) で再懸濁し、French Press Pressure Cell (SLM, AMINCO) を 138 MPa で 3 回通過させることにより溶解した。溶解した細胞を 2000 g で 30 分間遠心分離し、いずれかの破壊されていない細胞を除去した。上清をさらに 100000 g で 1 時間遠心分離し、溶解した細胞を可溶性画分と不溶性 (細胞外被) 画分とに分離した。細胞外被画分を、洗浄緩衝液でさらに 3 回、100000 g で 20 分間洗浄し、各々、いずれかの可溶性汚染を除去した。全試料を、その後 -80 °C で凍結及び貯蔵した。

30

ヘム制限及びヘム過剰の研究のためのポルフィロモナス・ジンジバリスの増殖及び回収

400 mL の作業容積を有する BioFlo 110 fermenter/bioreactor (New Brunswick Scientific) を使用して、ポルフィロモナス・ジンジバリス W50 を連続培養で増殖させた。増殖培地は、5 mg/mL の濾過滅菌した塩酸シス테인、5.0 µg/mL のヘミン (ヘム過剰) 又は 0.1 µg/mL のヘミン (ヘム制限) を添加した 37 g/L の脳心臓点滴培地 (Oxoid) であった。同一培地 (ヘム過剰) 中で増殖させたポルフィロモナス・ジンジバリスの 24 時間バッチ培養液 (100 mL) を培養容器に接種することにより増殖を開始した。24 時間のバッチ培養増殖後、培地貯蔵槽ポンプを作動させて、培地流を調整して、0.1 h⁻¹ の希釈率 (6.9 時間の平均世代時間 (MGT)) をもたらしめた。容器の温度を 37 °C に維持し、pH を 7.4 ± 0.1 に維持した。95% N₂ 中の 5% CO₂ で、培養液を連続的に通気した。定常状態増殖時に細胞を回収し、5000 g で 30 分間、洗浄緩衝液 (50 mM トリス - HCl (pH

40

50

8.0)、150 mM NaCl、5 mM MgCl₂)で3回洗浄し、138 MPaでFrench Pressure Cell (SLM, AMINCO)を3回通過させることにより破碎した。次に溶解した細胞を2000 gで30分間遠心分離して、破壊されていない細胞を除去し、その後100000 gで超遠心分離して、可溶性(上清)画分及び膜画分を生成した。全ての分画を氷上で実施した。

¹⁸Oタンパク質分解標識化バイオフィーム細胞及び浮遊細胞の外被画分の調製及び分析
細胞外被画分を、最初に、2% SDSを含有する氷冷した洗浄緩衝液1 mL中に再懸濁し、その後ペレットの再懸濁を促すために超音波処理及びボルテックス処理を実施した。再懸濁における最終工程は、粒子の破碎を助けるための29ゲージのインスリンニードルの使用を含んでいた。混合物をその後40000 gで遠心分離して不溶性粒子を除去し、上清のタンパク質濃度を製造業者の取扱説明書に従ってBCA reagent (Pierce)を使用して決定した。

【0073】

再懸濁した試料を、いずれかのタンパク質分解活性を不活性化することをさらに促す - 20 で、5倍量の氷冷したアセトンを終夜使用して沈殿させた。アセトン沈殿の後、両方の試料を、断続的超音波処理と、ボルテックス処理と、29ゲージのインスリンニードルの使用とにより支援した25 mMのトリス(pH 8.0)及び1%のSDSで最終濃度3 mg/mLまで再懸濁した。2回目のBCAタンパク質アッセイをその後実施し、最終タンパク質量を標準化した。

【0074】

NuPAGEゲル上でのゲル電気泳動を、MOPs running buffer (NuPAGE, Invitrogen)を使用して、MOPsをランニング緩衝液として用いる10ウェルの10% NuPAGEゲル上にロードする前に試料を99 で5分間煮沸した以外は製造業者のプロトコルに従って、実施した。バイオフィーム試料及び浮遊試料(各々30 µg)を、ゲル上の隣接レーンにロードした。SDS-PAGEを、その後、色素の前面がゲルの底部から約1 cmになるまで、4 、126 V(定圧)で実施した。生物学的反復測定のために、使用したゲルは、ランニング緩衝液としてMOPsを使用する4%~12%のNuPAGE勾配ゲルであり、2つの画分に分離されているタンパク質のバンドの変化の可能性を克服するために、類似するが正確ではない分離パターンをもたらした。染色を、クーマシーブリリアントブルーG-250(31)中で終夜実施し、その後、超純水中で終夜脱染した。

【0075】

2つのゲルレーンを、特注のステンシルを使用して10個の等サイズのゲルバンドに分割し、各切片を約1 mm³の立方体にカットした。脱染を、50 mM NH₄HCO₃/ACN(1:1)溶液中で3回実施した。脱染後、ゲル立方体を100% ACNで脱水し、その後ABC緩衝液(50 mM NH₄HCO₃)中の10 mMのジチオスレイトール溶液で56 で30分間、再水和/還元した。過剰の溶液を除去した後、暗所中、室温で60分間、ABC緩衝液中の55 mMのヨードアセトアミドを添加した。アルキル化反応後、ゲル立方体をABC緩衝液中で3回洗浄し、その後100%のACN中で10分間、2回脱水した。speed vacを使用する90分間の遠心分離下で、ゲル立方体をさらに乾燥した。ゲル切片1個当たり60 µLの、sequence grade modified trypsin (Promega) 2 µgと、H₂¹⁶O又はH₂¹⁸O(H₂¹⁸O、純度>97%、Marshall Isotopes)のいずれかにおいて調製された1/2の強度のABC緩衝液とを含有する溶液中で、37 で20時間、消化を実施した。消化後、各5分間の超音波処理により、それぞれの水(H₂¹⁶O/H₂¹⁸O)における50% ACN/0.1% TFAの溶液と、0.1% TFAとを使用して、ゲルからペプチドを2回抽出した。プールした抽出物を、トリプシンを不活性化させるために99 で5分間煮沸し、その後48時間凍結乾燥を行った。

【0076】

凍結乾燥したペプチドを、ナノHPLC及びMALDI TOF-MS/MS分析を使

10

20

30

40

50

用する分析の直前に、それぞれの水 ($\text{H}_2^{16}\text{O} / \text{H}_2^{18}\text{O}$) 中の 5 % $\text{ACN} / 0.1\%$ TFA の溶液中に再懸濁した。ペプチド溶液 ($20\ \mu\text{L}$) をその後、 FAMOS autosampler (LC Packings) をアドバンス μL ピックアップモードで使用して $\text{Ultimate Nano LC system}$ (LC Packings) 上にロードした。試料を最初に、 $200\ \mu\text{L} / \text{分}$ で 5 分間、捕捉カラム (内径 $300\ \mu\text{m} \times 5\ \text{mm}$) 上にロードした。分離は、逆相カラム (LC Packings、 C18 PepMap100 、内径 $75\ \mu\text{m} \times 15\ \text{cm}$ 、 $3\ \mu\text{m}$ 、 100°) を使用して $300\ \text{nL} / \text{分}$ の流量で達成し、0 分 ~ 5 分 (0 %)、5 分 ~ 10 分 (0 % ~ 16 %)、10 分 ~ 90 分 (16 % ~ 80 %)、90 分 ~ 100 分 (80 % ~ 0 %) の ACN グラジエントを用いて 0.1 % ギ酸中で溶出した。

10

【0077】

溶出液を、30 秒の間隔で、 $\text{Proteiner Fc robot}$ (Bruker Daltonics) を使用して、プレスポット済み $\text{anchor chip plates}$ (Bruker Daltonics) 上に垂直にスポットした。スポットする前に、各スポット位置に $0.2\ \mu\text{L}$ の超純水をプレスポットし、マトリクスでの結晶化プロセス時のアセトニトリル濃度を低減した。 MALDI-TOF/TOF ($\text{Ultraflex with LIFT II upgrade}$ 、Bruker Daltonics) を使用する自動化分析の前に、プレートを $10\ \text{mM}$ リン酸アンモニウム及び 0.1% TFA で洗浄し、風乾した。消化物の MS 分析を最初にリフレクトロンモードで実施し、 $25\ \text{kV}$ の加速電圧を使用して $800\ \text{Da}$ から $3500\ \text{Da}$ まで測定した。全ての MS スペクトルを 8 組の 30 のレーザーショットから生成した (各組はシグナル対ノイズ比 S/N が 6 より大きく、分解能 (Resolution) が 3000 より大きいことが含まれることを必要とした)。機器の較正を、4 つの試料の各群に関して、プレスポットした内部標準 (アンジオテンシン II、アンジオテンシン I、ニューロテンシン、レニン基質及び ACTH クリップ) の $[\text{M} + \text{H}]^+$ イオンで外部から行った。 MALDI-TOF/TOF に関する LIFT モードを、 Flexcontrol 及び Warp LC ソフトウェア (Bruker Daltonics) を使用して、完全に自動化したモードで実施した。 TOF 1 段階では、全イオンを $8\ \text{kV}$ まで加速し、その後 LIFT 細胞中で $19\ \text{kV}$ まで上昇させ、全ての MS / MS スペクトルを、蓄積している 550 の連続レーザーショットから生成した。

20

【0078】

親前駆体の選択を、 LC MALDI SILE (安定同位体標識化実験) のワークフローと共に、 Warp LC ソフトウェア (第 1.0 版) を使用して実施した。 $4\ \text{Da}$ で分離された各々の重い対又は軽い対の最も豊富なピークのみが選択され、その S/N は 50 より大きかった。6 個未満の LC MALDI 画分により分離された化合物は同じものとみなされたので、1 度しか選択されなかった。

30

【0079】

ピークのリストは、 $S/N > 6$ で Apex ピークファインダーアルゴリズムを用いる $\text{Flexanalysis 2.4 Build 11}$ (Bruker Daltonics) を使用して生成した。 MS スキャンは、 $0.2\ \text{m/z}$ の幅を使用する Savitzky Golay アルゴリズムを用いて 1 回スムージングし、基準線の差し引きは、 0.8 のフラットネスで Median アルゴリズムを使用して行った。

40

【0080】

タンパク質の同定を、ゲノム研究所 (TIGR) ウェブサイト (www.tigr.org) から得る Pulfiromonas ・ジンジバリスデータベースに対して問い合わせが行われる MS / MS データに関して MASCOT 検索エンジン (MASCOT 2.1.02 版、Matrix Science) を使用して行った。 MASCOT 検索パラメータは以下の通りであった：荷電状態 $1+$ 、プロテアーゼとしてトリプシン、1 の切断ミス (missed cleavage) が許容される、並びに MS に対しては $250\ \text{ppm}$ のトレランス、及び MS / MS ピークに対しては $0.8\ \text{m/z}$ 。固定修飾をシステインのカルバミドメチルに対して設定し、変動修飾は C 末端の ^{18}O 標識化リシン残基及びアルギニン残基であった。

50

【 0 0 8 1 】

以前に説明した (3 2) 逆データベース戦略を、単一ペプチド同定に関する偽陽性を除去するために必要な最小ペプチド M A S C O T スコアを決定するために、採用した。簡潔には、そのデータベースは、予測される全てのその通常の方法のポルフィロモナス・ジンジバリスタンパク質と、その逆の配列 (3 8 8 0 配列) を有する同じタンパク質との両方の配列から成る。その後全体の M S / M S のデータ組を、組み合わせたデータベースに対して検索し、0 % の偽陽性をもたらす最も低い M a s c o t スコアを決定した。偽陽性は、逆配列 (太字・赤字、及び上記ペプチド閾値スコア) との正の適合と定義された。単一のヒットペプチドに対する偽陽性率は 0 . 5 % であると決定され、M a s c o t ペプチドイオンスコアは閾値より大きく 2 5 より小さかった。M a s c o t ペプチドイオンスコアが 3 0 より大きい場合には、逆データベースとの適合はなかった。単一のヒットペプチドに関する同定の信頼性を増大させるために、本発明者らは、M a s c o t スコアリングアルゴリズムに従い、スコア 3 0 を使用した場合よりも 2 桁低い誤同定の確率を与える 5 0 より大きい最小の M a s c o t ペプチドイオンスコアを使用した。

10

【 0 0 8 2 】

適合したペプチドを、以下の基準を使用して評価した。i) 0 . 0 5 より小さい p 値に対応する確率基準のスコアを有する少なくとも 2 つの特有のペプチドは、正に同定された (所要の太字・赤字の適合) とみなされた (ここで、スコアは $-\log X 10 \log (P)$) であり、P は観察された適合が無作為な事象である確率である (3 3))、ii) 特定のタンパク質の同定の際に特有のペプチドを 1 つだけ使用した場合 (重標識化又は軽標識化ペプチドのいずれかの同定が 1 つとみなされる) には、M A S C O T ペプチドイオンスコアは 5 0 を超えていなければならず、又はそのペプチドは 4 つの独立の実験 (2 つの生物学的反復測定、及び 2 つの技術的反復測定) の 1 つより多くにおいて同定される。

20

【 0 0 8 3 】

ペプチド中への 1 つ又は 2 つの ^{18}O 原子の混合的な組込みのために、 ^{18}O 同位体の天然存在量と $\text{H}_2\ ^{18}\text{O}$ の純度 ($a = 0 . 9 7$) との寄与、ペプチドの比 R を、以下の式：

【 0 0 8 4 】

【 数 1 】

$$R = (I_1 + I_2) / I_0 \quad (1)$$

30

【 0 0 8 5 】

を使用して数学的に補正した。

【 0 0 8 6 】

I_0 、 I_1 及び I_2 は、以下の式に従って算出した (2 7) :

【 0 0 8 7 】

【 数 2 】

$$I_1 = \frac{aS_2 - [aJ_2 - 2(1-a)J_4]S_0 - 2(1-a)S_4}{a^2 - (2-a-a^2)J_2 + 2(1-a)^2J_4} \quad (2)$$

40

【 0 0 8 8 】

【 数 3 】

$$I_0 = S_0 - (1-a)I_1 \quad (3)$$

【 0 0 8 9 】

【数 4】

$$I_2 = \frac{1}{a^2} (S_4 - J_4 I_0 - J_2 I_1) \quad (4)$$

【0090】

ここで S_0 、 S_2 及び S_4 は、それぞれ、 ^{18}O 標識を有しないペプチドについてのモノアイソトピックピーク、モノアイソトピックピークより 2 Da 高いピーク、及びモノアイソトピックピークより 4 Da 高いピークの測定強度である（図 1A）。 J_0 、 J_2 及び J_4 は、MS - Isotope (<http://prospector.ucsf.edu>) から算出したペプチドの同位体エンベロープの対応する理論相対強度である。しかし第 2 の同位体ピーク（ S_1 及び S_5 ）の強度が第 1 の同位体ピーク（ S_0 及び S_4 ）より強い場合には、比は単純に S_1 を S_5 で除したものととして算出した。 ^{16}O 標識化ペプチドの第 5 の同位体ピークの S_4 ピークに対する寄与が顕著になる場合には、特に 2000 m/z を超える大きなペプチドについては、これは真であった。混合的な ^{16}O ^{18}O の組込みの算出は、実験的な S_4 の百分率としての実験的な S_2 と理論的な S_2 （ J_2 ）との差異により決定した。

【0091】

タンパク質存在量の比を、同じタンパク質が 2 つ以上のゲル切片で同定された場合であっても、同じタンパク質の全ての同定したペプチドを平均することにより決定した。各「通常の」反復測定からのデータを、それぞれの「逆の」反復測定からの逆数をとった比と組み合わせ、各生物学的反復測定における各タンパク質についての平均比と、標準誤差とを提供した。過去に報告した（34、35）ものと同様に、両方の生物学的反復測定結果の正規化を、その後実施した。簡潔には、各生物学的反復測定について平均した比に因子を乗じ、該比の幾何学平均が 1 に等しくなるようにした。

ICAT 標識化ヘム制限細胞及びヘム過剰細胞の調製及び分析

タンパク質の標識化及び分離は、cleavable ICAT reagent (Applied Biosystems) を使用する gel C - MS / MS アプローチ (Li et al., 2003) を基礎にした。別のプロテオームアプローチは、国際出願 PCT / AU 2007 / 000890 号明細書（参照により本明細書中で援用される）において行われている。TCA（16%）を使用してタンパク質を先ず沈殿させて、6M 尿素、5mM EDTA、0.05% SDS、及び 50mM トリス - HCl（pH 8.3）を使用して可溶化した。BCA タンパク質試薬を使用してタンパク質濃度を決定し、1mg/ml に調整した。各増殖条件由来のタンパク質 100 µg を、個々に、50mM のトリス（2 - カルボキシ - エチル）ホスフィン塩酸塩 2 µL を使用して、37 °C で 1 時間、還元した。次にヘム制限増殖条件由来の還元タンパク質を ICAT_{heavy} 試薬で、ヘム過剰増殖条件由来のタンパク質を ICAT_{light} 試薬でアルキル化した。次に 2 つの試料を組み合わせ、プレキャスト Novex 10% NUPAGE ゲル (Invitrogen) 上における SDS - PAGE に供した。ゲルを、Simply Blue（商標）SafeStain (Invitrogen) を使用して 5 分間染色し、その後、水で脱染した。次に、ゲルレーンを、ゲルの上部から色素の前面まで、切除して 20 個の切片とした。

【0092】

切除した切片をさらにさいの目に切って 1mm³ の立方体とし、終夜ゲル内消化し、上記手順に従い 2 回抽出した。プールした上清を減圧下で乾燥して約 50 µL とし、その後、500 µL のアフィニティーローディング緩衝液と混合した後、製造業者の取扱説明書 (Applied Biosystems) に従ってアフィニティーカラム上にロードした。溶出したペプチドを乾燥し、ピオチンタグを、37 °C で 2 時間、無希釈の (neat) TFA で切断し、その後減圧下で乾燥した。乾燥した試料を、0.1% の TFA 中の 5% のアセトニトリル 35 µL 中に懸濁した。

【0093】

Ultimate Nano LC system (LC Packings - Dionex) と連結し

た Esquire HCT ion trap mass spectrometer (Bruker Daltonics) を使用して、MS を実施した。LC Packings 逆相カラム (C18 PepMap100、内径 $75\mu\text{m} \times 15\text{cm}$ 、 $3\mu\text{m}$ 、100) を使用して分離を達成し、以下のアセトニトリルグラジエントを用いて 0.1% ギ酸で溶出した：0 分 ~ 5 分 (0%)、5 分 ~ 10 分 (0% ~ 10%)、10 分 ~ 100 分 (10% ~ 50%)、100 分 ~ 120 分 (50% ~ 80%)、120 分 ~ 130 分 (80% ~ 100%)。

【0094】

LC 出力を、ナノスプレーイオン源と直接接続した。100ms の最大蓄積時間で、300 ~ 1500 の m/z 範囲で、10000 のイオン荷電制御下で、MS の取得を行った。GPF を使用する場合、3 つの付加的な m/z 範囲 (300 ~ 800、700 ~ 1200 及び 1100 ~ 1500) を使用して前駆体イオンに関して選択し、各 m/z 範囲を二連で実施して、同定されるペプチドの数を増大させた。MS/MS の取得を、100 m/z ~ 3000 m/z の質量範囲にわたり得て、初期完全プロテオーム分析に関しては最大 10 個の前駆体で、2 分の能動排除時間を有する最も強度の大きい多重荷電イオンについての ICAT 分析に関しては 3 個の前駆体で実施した。

【0095】

化合物検出閾値 10000 及びシグナル対ノイズ閾値 5 で、Apex ピークファインダーアルゴリズムを使用する Data Analysis 3.2 (Bruker Daltonics) を使用して、ピークリストを生成した。エクスポートしたデータに関して、+2 及び +3 という全体的負荷制限を設定した。ゲノム研究所 (TIGR) ウェブサイト (www.tigr.org) から得られるボルフィロモナス・ジンジバリスデータベースに対して問い合わせが行われる MS/MS データに関して MASCOT 検索エンジン (MASCOT 2.1.02、Matrix Science) を使用して、タンパク質同定を達成した。以下の基準を使用して、適合したペプチドをさらに評価した：i) 最大でも 0.05 の p 値に対応する確率基準の MoWse スコアを有するペプチドは、正に同定されたものとみなされた (ここで、該スコアは $-\log X10 (\log (P))$ であり P は観察された適合が無作為な事象である確率である)、ii) 特定のタンパク質の同定に 1 つのペプチドだけを使用し、MASCOT スコアが 30 より低い場合、スペクトルの手作業での確認を行った。特に単一ペプチドヒットを有するものに関する ICAT 標識化タンパク質の同定における信頼性を増大させるために、付加的なフィルターを以下のように適用した：i) ICAT 対の重ペプチド及び軽ペプチドは、それらの抽出したイオンクロマトグラムから決定されるような溶出ピークを密接に示していなければならない、ii) 単一の特有のペプチドを有するタンパク質に関しては、このペプチドは (例えば、異なる SDS-PAGE 画分で、又は軽 ICAT 形態及び重 ICAT 形態の両方で) 2 回以上同定されていなければならない、iii) 単一ペプチドが (ii) の基準を満たさない場合、MASCOT スコアは 25 以上でなければならず、期待値 0.01、及び MS/MS スペクトルは、強いイオンが説明されている「b」型イオン又は「y」型イオンの連続シリーズを示していなければならない。偽陽性の判定は上述の通りである。

【0096】

同位体的に重い ^{13}C ICAT 標識化ペプチド対軽い ^{12}C ICAT 標識化ペプチドの比率を、Data Analysis (Bruker Daltonics) からのスクリプトを使用して決定し、単一 MS スペクトルでのモノアイソトピックピーク強度の測定値 (シグナル強度及びピーク面積) に基づいて、手作業で確認した。定量のために使用される親イオンの最小イオンカウントは 2000 であったが、重及び軽前駆体イオンの両方の 96% 超が、10000 を超えた。低分解度のスペクトルの場合、親イオンの再構成抽出イオンクロマトグラム (EIC) の面積から、比率を決定した。単一親タンパク質由来の複数のペプチドに関して平均を算定し、外れ値を、 $\alpha = 0.05$ で Grubbs 検定を使用して除外した。

【0097】

CELLO (<http://cello.life.nctu.edu.tw> (36)) を使用してボルフィロモナス

10

20

30

40

50

・ジンジバリスタンパク質の細胞局在性を予測した。細胞外、外膜、内膜及びペリプラズムに予測されたものは、外被画分由来であると考えられた。

【0098】

無細胞培養上清（無接種、ヘム過剰及びヘム制限）中の短鎖脂肪酸（SCFA）の濃度を、Richardson et al.（37）の誘導体化法に基づくキャピラリガスクロマトグラフィにより決定した。

【0099】

両方の生物学的反復測定結果の間の相関係数（ r ）を、Microsoft ExcelのPearsonの相関係数機能を使用して、評価した。変動係数（CV）を、ペプチド存在量比の標準偏差を平均値で除することにより算出し、百分率として表した。

10

トランスクリプトーム解析のための核酸の抽出

RNAを、ケモスタットから直接回収したボルフィロモナス・ジンジバリス細胞の5 mLの試料から抽出した。各試料に0.2倍量のRNA安定化試薬（無水エタノール中の5% v/vフェノール）を添加した。細胞を、遠心分離（9000g、5分間、25℃）によりペレットにし、直ぐに液体窒素中で凍結し、後の処理のために-70℃で保存した。凍結した細胞を、細胞数 1×10^{10} 個当たり1 mLのTRIzol reagent（Invitrogen）中に懸濁し、その後Lysing Matrix Beads（MP Biomedicals）及びPrecellys 24 homogeniser（Bertin Technologies、France）を使用して破碎した。ガラスビーズを遠心分離により除去し、RNA沈殿段階でイソプロパノールではなくエタノールを（最終濃度35%で）添加した以外はTRIzolの製造業者（Invitrogen）のプロトコルに従ってRNA画分を精製し、その後Illustra RNA spin Mini RNA Isolation kit（GE Healthcare）から入手したスピンカラムに試料を移した。任意の残りのDNAを除去するためのオンカラムDNase処理を含む前方への結合工程から、製造業者の取扱説明書に従ってRNAを精製した。RNAの完全性を、Experion自動化電気泳動ステーション（Bio-Rad）を使用して決定した。

20

【0100】

ゲノムDNAを、製造業者の取扱説明書に従ってDNeasy Blood & Tissue Kit（Qiagen）を使用して、連続培養で増殖するボルフィロモナス・ジンジバリス細胞から抽出した。

30

マイクロアレイの設計、ハイブリダイゼーション及び解析

マイクロアレイスライドは、オーストラリアゲノム研究所（Australian Genome Research Facility）によりプリントされ、ロスアラモス国立研究所Oralgenプロジェクト（Los Alamos National Laboratory Oralgen project）により予測された付加的なタンパク質コード領域を含むボルフィロモナス・ジンジバリスW83ゲノムの予測タンパク質コード領域に関する1977個の特注設計の60-merオリゴヌクレオチドプローブから成るものであった。強度依存性の正規化の助けとするために、マイクロアレイ試料プール（MSP）対照プローブを含むものとした。Corning UltraGAPSコーティングスライド上へ、マイクロアレイスライド1枚当たり3回、総数のプローブをプリントした。

40

【0101】

スライドを、Cy5で標識化したユニバーサルゲノムDNA基準（GE Lifesciences）と組み合わせて、Cy3で標識化したヘム過剰又はヘム制限試料を使用してハイブリダイズさせた。cDNA合成反応の開始のための5 µgのランダムヘキサマー（Invitrogen）と共にSuperScript plus indirect cDNA labelling system（Invitrogen）を使用して、10 µgの全RNAからcDNAを合成した。Amersham CyDye post-labelling reactive dye pack（GE Lifesciences）を使用してcDNAをCy3で標識化し、Invitrogen標識化システムの精製モジュールを使用して精製した。BioPrime Plus Array CGH Indirect Genomic Labelling

50

S y s t e m (Invitrogen) を使用して、C y 5 - d U T P 標識化ゲノム c D N A を 4 0 0 n g の D N A から同様に合成した。

【 0 1 0 2 】

ハイブリダイゼーションの前に、ブロッキング溶液 (3 5 % ホルムアミド、1 % B S A、0 . 1 % S D S、5 × S S P E [1 × S S P E は、1 5 0 m M N a C l、1 0 m M N a H ₂ P O ₄、1 m M E D T A]) 中でマイクロアレイスライドを 4 2 ° で 1 時間浸漬した。ブロッキング後、H ₂ O でその後 9 9 % エタノールでスライドを簡単に洗浄し、その後遠心分離により乾燥した。標識化した c D N A を、5 5 μ L のハイブリダイゼーション緩衝液 (3 5 % ホルムアミド、5 × S S P E、0 . 1 % S D S、0 . 1 m g / m L サケ精子 D N A) 中に再懸濁し、9 5 ° で 5 分間変性させ、その後スライドに適用し、L i f t e r S l i p s (Erie Scientific) でカバーした。ハイブリダイゼーションを 4 2 ° で 1 6 時間行った。ハイブリダイゼーション後、スライドを、2 × S S C を加えた 0 . 1 % の S D S [1 × S S C は、1 5 0 m M N a C l、1 5 m M クエン酸ナトリウム] (4 2 ° で 5 分、さらなる洗浄の全てを室温で行った)、0 . 1 × S S C を加えた 0 . 1 % S D S (1 0 分)、0 . 1 × S S C (洗浄 4 回、各 1 分) 中で続けて洗浄し、その後迅速に 0 . 0 1 × S S C、その後 9 9 % エタノール中に浸漬し、遠心分離を利用してスライドを乾燥した。

10

【 0 1 0 3 】

スライドを、GenePix 4000B microarray scanner を使用して走査し、GenePix Pro 6.0 ソフトウェア (Molecular Devices) を使用して画像を解析した。3 回の生物学的反復測定を表す各処理 (ヘム制限又はヘム過剰) のために、3 枚のスライドを使用した。

20

【 0 1 0 4 】

画像解析を、GenePix Pro 6.0 ソフトウェア (Molecular Devices) を使用して行い、さらなる解析におけるバックグラウンド評価値として、「モルフ (morph)」バックグラウンド値を使用した。差示的に発現した遺伝子を同定するために、L I M M A ソフトウェアパッケージを、 $P < 0.005$ のカットオフ値で使用した。M S P 対照スポットを介して全体的な l o e s s 曲線をフィッティングすること、及び他の全スポットに該曲線を適用することにより、アレイ内で正規化を行った。Benjamini Hochberg 法を使用して、複数の試験について補正するための偽の発見率を制御した。

30

【 0 1 0 5 】

遺伝子予測は、ゲノム研究所 (T I G R、www.tigr.org) から得られるボルフィロモナス・ジンジバリス W 8 3 のゲノム注釈を基礎とした。オペロン予測は、Microbesonline のウェブサイト (<http://microbesonline.org>) から行った。

D N A マイクロアレイ解析を使用して決定した、ヘム制限に対するボルフィロモナス・ジンジバリスの応答

ボルフィロモナス・ジンジバリスの全体的な遺伝子発現に及ぼすヘム制限増殖の影響の D N A マイクロアレイ解析を、プロテオーム解析のために採用した同一の増殖条件下で実施した。3 つの生物学的反復測定からのデータ解析により、ヘム過剰とヘム制限との間において統計的に有意な差示的な調節を示す総数 1 6 0 種類の遺伝子が同定され、これらの遺伝子の大部分はヘム制限の条件下で発現レベルの増大を示し、下向き調節されたのは 8 種類の遺伝子のみであった。上向き調節された遺伝子の多くはオペロン中に存在すると予測され、これらの大部分は転写レベルで同様の变化を示した (表 3 及び表 5)。ヘム制限に対する差示的な調節が観察された場合には、トランスクリプトームデータとプロテオームデータとの間に広範な一致が存在し、2 つのデータ組の間に有意な相関が存在した [S p e a r m a n の相関 0 . 6 3 6 4、 $p < 0.05$]。しかしプロテオーム解析からの存在量の差異を示す幾つかのタンパク質に関しては、対応する遺伝子のトランスクリプトーム解析は、m R N A の存在量においては統計的に有意な差異を全く検出しなかった。マイクロアレイ解析は、プロテオーム解析により決定されたような存在量の大きな変化を有

40

50

するタンパク質をコードするこれらの遺伝子のみを同定する傾向があった（表 3 及び表 5）。タンパク質と同じ遺伝子からの転写産物とがヘム制限により有意に調節されることが見出された場合には、その大部分は同じ調節方向を示した。例外は、P G 0 0 2 6（C T Dファミリー推定細胞表面プロテイナーゼ）及びP G 2 1 3 2（フィンブリリン（F i m A））という 2 種類の遺伝子産物であった。これらのタンパク質は、ヘム制限下でプロテオーム解析では存在量が減少したが、トランスクリプトーム解析により上向き調節されることが予測された。これらのタンパク質の両方が細胞表面に位置し、細胞表面から放出されるか、又は翻訳後に修飾され、それがプロテオーム解析において上向き調節されたと同定されることを妨げた可能性が非常に高い。

ポルフィロモナス・ジンジバリスの F r d 阻害剤に対する感受性

10

ポルフィロモナス・ジンジバリスに対する F r d 阻害剤の効果の評価を、液体培養で実施した。簡潔には、2 0 0 m L の B H I 培地中で O D が 0 . 6 ($\sim 2 . 9 \times 10^8$ c f u / m L) になるまで、W 5 0 を培養した。その後細胞を、新たな増殖培地中に再懸濁し、最終濃度を $2 . 5 \times 10^7$ c f u / m L とした。パモ酸 (pamotate) オキサントール、クエン酸モランテル及び及びチアベンダゾール (Sigma) を D M S O 中に溶解し、ストック溶液の濃度を 2 5 0 m M とした。その後、4 μ L の試験溶液を 1 9 6 μ L の細胞懸濁液と混合し、9 6 ウェルの平底プレートに移し、その後嫌氣的条件下において 3 7 でインキュベートし、i E M S m i c r o p l a t e r e a d e r (Labsystems OY Research Technologies Division) を使用して培養液の光学密度を 6 2 0 n m で測定することにより 5 0 時間にわたり毎時間モニタリングした。様々な阻害剤の存在下でのポルフィロモナス・ジンジバリスの平均世代時間を、倍加時間 $[(\log_{10} N_t - \log_{10} N_0) / \log_{10} 2]$ を時間 $(N_t - N_0)$ で除することにより算出した（ここで N_t 及び N_0 は、それぞれ時間 t 及び時間 0 での細胞集団である。）。

20

ポルフィロモナス・ジンジバリスのバイオフィルムに対する F r d 阻害剤の効果

静的 9 6 ウェルモデルでの 4 8 時間にわたるポルフィロモナス・ジンジバリスのバイオフィルム形成を、上記で説明したように決定した。簡潔には、ポルフィロモナス・ジンジバリス A T C C 3 3 2 7 7 細胞を、試験物質と混合する前に最終細胞密度が $2 . 5 \times 10^7$ となるように再懸濁し、その後 9 6 ウェルの平底プレートに移し、3 7 で嫌氣的にインキュベートした。バイオフィルム塊の評価を、2 4 時間及び 4 8 時間に、2 5 0 μ L の超純水で細胞を 2 回洗浄して緩く接着した細胞を除去しその後 3 7 で 3 時間乾燥させることにより、実施した。その後乾燥したバイオフィルムを、0 . 1 % のクリスタルバイオレット溶液中で 1 5 分間染色し、2 5 0 μ L の超純水で 2 回洗浄した。その後、6 2 0 n m での光学密度の測定のために新たな 9 6 ウェルプレートに移す前に、ピペット操作の繰り返しにより 8 0 % エタノール及び 2 0 % アセトンの溶液を 2 分間使用して、クリスタルバイオレット染色剤をバイオフィルムから溶解した。

30

フローセル (Flowcell) バイオフィルム培養及び C S L M 分析

フローセル中でのポルフィロモナス・ジンジバリス A T C C 3 3 2 7 7 のバイオフィルム培養は、上記で説明したものと類似しており且つ幾つかの修正を加えたものであった。3 - チャネルフローセルシステム (Stovall Life Science, USA) を、嫌気チャンバー (M K 3 A n a e r o b i c w o r k s t a t i o n, Don Whitley Scientific Ltd.) 中に設置し、細菌性バイオフィルムの接種、試験及び染色のためのシリコンポンプチューブ (Gilson, France) 及び栓で改造した。全てのパーツを組み立て、0 . 5 % の次亜塩素酸ナトリウムをシステムにポンプで注入し、終夜放置し、システムを滅菌した。その後増殖培地添加の前に、滅菌水 (2 0 0 m L) を使用しシステムを洗い流した。システムに、O D ₆₀₀ が 0 . 1 となるように希釈した、指数関数的に増殖しているポルフィロモナス・ジンジバリスの希釈液 1 m L を接種した。0 . 1 g / L のシステインと、1 m g / L のヘミンと、1 m g / L のビタミン K とを添加した 5 倍希釈の B H I (Oxoid) を定速 (0 . 2 m L / 分) で流す前に、システムを 1 時間インキュベートした。1 8 時間後に、1 2 5 μ M 若しくは 1 2 . 5 μ M のオキサントール又は滅菌水 1 m L をシステムの各チャンネルに注入し、3 0 分間インキュベートした。培地をさらに 1 0 分間再び流し、試験により結

40

50

合していない細胞を洗い落とした。その後 *BacLight stain* (Molecular Probes) を、*in situ* でバイオフィルムを染色するために使用した (以下を参照されたい)。

【0106】

倒立型ステージを有する *Meta 510 Confocal Microscope* (Zeiss) 上で、細菌性バイオフィルムの共焦点レーザー走査顕微鏡法 (CLSM) を実施した。水平の (x, y) オプトデジタルセクション、全厚にわたり各 $2\ \mu\text{m}$ 厚のバイオフィルム (z) を、 $143.86\ \mu\text{m}$ (x) $\times$ $143.86\ \mu\text{m}$ (y) の各フレームにおいて 512×512 ピクセル (1 ピクセル当たり $0.28\ \mu\text{m}$) で、 $63\times$ 対物レンズを使用して撮像した。バイオフィルム全体の再現性を決定するために、2つの生物学的反復測定 10
の各々から無作為の位置における5つの画像を、各チャンネルに関して $488\ \text{nm}$ 及び $568\ \text{nm}$ の波長で、取得した。取得した全画像を、COMSTATソフトウェアを使用して解析した。微小コロニーを、500を超えるピクセル数の細胞のクラスターと定義した。

オキシサンテル処理により分散した細胞の生存度

オキシサンテル処理により分散した細胞の生存度を試験するために、上述したものにわずかに修正を加えて、静的バイオフィルムアッセイを行った。簡潔には、*ボルフィロモナス・ジンジバリス* (ATCC 33277) を、18時間のインキュベート後に、24ウェルのマイクロプレート中でバイオフィルムを形成させた。自由に浮いている浮遊細胞を初めに除去し、バイオフィルムをPBSで1回洗浄した。 $125\ \mu\text{M}$ 若しくは $12.5\ \mu\text{M}$ の 20
オキシサンテル又は滅菌水 (陽性対照) $1\ \text{mL}$ を各ウェルに添加し、30分間インキュベートした。まだ生存する分散した*ボルフィロモナス・ジンジバリス*細胞の数を、BHIでの段階希釈後のウマ血寒天プレート上での培養分析により決定した。

統計解析

両方の生物学的反復測定結果の間の相関係数 (r) を、*Microsoft Excel* の *Pearson* の相関係数機能を使用して、評価した。変動係数 (CV) を、ペプチド存在量比の標準偏差を平均値で除することにより算出し、百分率として表した。

連続培養及びバイオフィルム形成

ボルフィロモナス・ジンジバリス W50 を40日の期間にわたる連続培養で培養し、その間該培養液の細胞密度は、最初の10日目後は一定のままであり、生物学的反復測定 30
1及び2について、 OD_{650} はそれぞれ 2.69 ± 0.21 及び 2.80 ± 0.52 であった。これは $1\ \text{mL}$ 当たり $\sim 3\ \text{mg}$ の細胞乾燥重量の細胞密度に等しい。この期間中、*ボルフィロモナス・ジンジバリス*細胞のバイオフィルムが、発酵槽容器の垂直ガラス壁上に発達した。このバイオフィルムは、回収の時点で $\sim 2\ \text{mm}$ の厚さであった。

BSAを使用する $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ 定量法のバリデーション

$^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ の定量法の正確度及び再現性を決定するために、既知量のBSAを隣接ゲルレーンにロードし、その比を1:1、1:2、1:5及び10:1とした。(図1B)。 $\text{H}_2\ ^{16}\text{O}$ 又は $\text{H}_2\ ^{18}\text{O}$ の存在下でバンドをゲル内トリプシン消化に供し、混合し、その後LC MALDI-MS/MSにより分析した。単一のBSAトリプシンペプチドに関するスペクトルの典型的な組は、4つの比を通じて2つの ^{18}O 原子の選択的組込み 40
を示し、そのことは10:1のBSA比において+4 Daピークが優勢であることにより最も明らかに見られ、1:1スペクトルにおけるほぼ対称的な二重ピーク (doublet) により、定量及び同定の両方を単純化する (図1A)。単一の ^{18}O 原子の平均的組込みは、1:1標識化を基準として7%未満であると評価された (補足表)。全ての同定されたBSAペプチドに関して算出された平均比は、1:1 (三連)、2:1 (及び1:2)、1:5及び10:1の比に関してそれぞれ 0.98 ± 0.12 、 2.22 ± 0.26 、 4.90 ± 0.75 及び 10.74 ± 2.04 であり、良好なダイナミックレンジと、 $\pm 2\% \sim 11\%$ の高い正確度と、 $11.75\% \sim 18.95\%$ の範囲の低いCVを示した (表1)。1:1混合物 (三連で行った) の再現性正確度 (reproducible accuracy) は、 50
標識化の偏りが非常に低かったことを示唆する。このことを、両方の実験で同定したペプ

チドのみを使用して、2 : 1 の比での通常の及び逆の標識化 B S A を比較することによりさらに確認した。通常の比は 2.11 ± 0.33 と決定されたのに対して、逆の比は 2.30 ± 0.20 と決定された (表 1)。

バイオフィーム試料及び浮遊試料の定量的分析のための実験デザイン

本研究のデザインは、2つの独立した連続培養であり、各々の培養液を容器の壁から得たバイオフィーム試料と容器の流体内容物から得た浮遊試料とに分割する、2つの生物学的反復測定結果の使用を含むものとした。各生物学的反復測定に関して2つの技術的反復測定を行い、本発明者らは B S A では顕著な標識化の偏りが存在しないことを示したが、複雑な生物学的試料に対しては $^{16}\text{O} / ^{18}\text{O}$ 標識化の確認研究は行われていないので、本発明者らは逆標識化戦略を利用することを選択した (30)。したがって全部で4つの実験があり、各々が、 2×10 個のゲル切片から生じる10回の L C - M A L D I M S / M S の運転から成っていた。

【0107】

図2は、典型的な逆標識化パターンを例示する、バイオフィーム試料 / 浮遊試料由来の2つの通常の及び逆の標識化ペプチドの典型的な M S 及び M S / M S スペクトルを示す。B S A データと同様に、高レベルの二重の ^{18}O 組込みが存在することを見ることができ平均の混合的な組込みが全ペプチドに関して15%未満であると算出され、 $^{16}\text{O} / ^{18}\text{O}$ タンパク質分解標識化法が複雑な試料でも効果的であることが確認された (データは示していない)。二重標識化ペプチドが優勢であることは、+2 Da 種に対する M a s c o t ヒットが相対的に少数であることにより、さらに確認された。重標識化ペプチドの M S / M S スペクトルは、Y イオンにおいて期待される +4 Da シフトをさらに明らかにした (図2)。

技術的反復測定結果の間の相関

生物学的データの技術的反復測定結果を比較するために、通常の及び逆の標識化実験の各々の対のタンパク質存在量比の、底を10として対数変換したものを、互いに対してプロットした (図3)。これらのプロットの線形回帰は、生物学的反復測定1及び2に関してそれぞれ0.92及び0.82の R^2 値で、各々の対が高い相関を有することを示した。各線形近似曲線 (linear fit) の傾きは、また、生物学的反復測定1及び2に関してそれぞれ0.97及び0.93であって期待値1.0と類似しており、技術的反復測定結果の間に標識化の偏りが無いことを示した (図3)。技術的反復測定結果からのタンパク質存在量比を平均し、各生物学的反復測定結果に対する単一の比をもたらした。

生物学的反復測定結果の相関

2つの生物学的反復測定に関する平均データを比較する前に、各生物学的反復測定結果のタンパク質存在量比を正規化し、1.0の平均比 (average mean ratio) をもたらした。両方の生物学的反復測定結果からの正規化したタンパク質存在量比のプロットは、他者が説明した (40、41) のと同様に、ゼロで中央近くとなるガウス様分布を示す (図4A)。2つの生物学的反復測定結果の間には有意な正の相関が存在し (P e a r s o n の相関係数 $r = 0.701$ 、 $p < 0.0001$)、バイオフィーム培養物 / 浮遊培養物の増殖と、試料の下流の処理の全てとが、満足なレベルまで再現され得ることを示した。どのタンパク質が2つの生物学的反復測定において一貫して調節されたかを決定するために、簡単な順位付けチャートを構築し、該チャートではタンパク質をその存在量比に従って6つの群 (A ~ F) に分割し、次に群を基準とした相関に従って1~6の順位付けを行い、或るタンパク質が両方の生物学的反復測定から同じ群内に入った場合には最も高い類似性を有するものとして1に順位付けした (図4B)。順位付けチャートを使用して、本発明者らは、両方の反復測定から同定したタンパク質81種類のうち、無作為の相関に関する期待値 (17% (すなわち $1/6$) である) よりもかなり高い、34種類 (42%) が1番に順位付けされることを決定することができた。残りのタンパク質の大部分は2番に順位付けされ、したがって全部で70種類 (86.4%) のタンパク質が、2つの実験の間で同様に調節される (1又は2に順位付けされる; 表2) と考えられた。

【0108】

2 : 1 の B S A 標識化実験 (表 1) で測定された標準偏差 (± 0.26) に基づき、標準偏差の 3 倍を超えるだけ 1.0 から異なる場合 (1.78 より大きい、又は 0.56 より小さいかのいずれか) には、タンパク質存在量の変化は生物学的に有意であると考えられた (18、42)。この基準を使用すると、両方の反復測定で同定された 81 種類のタンパク質のうち 47 種類の存在量は有意に変化しており (平均比に基づき)、またこれらのうち、42 種類は 1 又は 2 に順位付けされた (表 2)。1 及び 2 に順位付けされた 42 種類のタンパク質のうち、24 種類は存在量が有意に増大し、18 種類は存在量が減少した。

協調した調節を示す代謝経路の酵素

グルタミン酸 / アスパラギン酸の異化に関与する 20 種類のタンパク質を、I C A T 標識化戦略を使用するヘム制限対ヘム過剰の研究において同定した (表 3)。これらのうち、グルタミン酸の酪酸への異化に直接関与する 8 つの工程のうちの 6 つを触媒する酵素が同定され、ヘム制限下で 1.8 倍 ~ 4 倍増大したことが見出された (図 6、表 3)。他の 2 種類の触媒酵素 (P G 0 6 9 0 (4 - ヒドロキシ酪酸 C o A - トランスフェラーゼ) 及び P G 1 0 6 6 (酪酸 - アセト酢酸 C o A - トランスフェラーゼ)) は I C A T を使用して検出されなかったが、それらは別々の定量的研究において、表 3 で報告したこれらのタンパク質に匹敵する高いイオン強度で存在し (示していない)、上向き調節されることが示されたオペロンに属することが見出された。一方、アスパラギン酸異化経路の酵素の存在量に及ぼすヘム制限の影響は混合的であり、酸化的分解経路においてアスパラギン酸のオキサロ酢酸への分解を触媒する酵素は変化せず、ピルビン酸の酢酸への変換に関与する酵素は 2 倍 ~ 4.4 倍の増大を示した。

【 0 1 0 9 】

アスパラギン酸からの還元経路を介するフマル酸のコハク酸への変換を共に触媒する、2 種類の鉄含有フマル酸レダクターゼ酵素 F r d A (P G 1 6 1 5) 及び F r d B (P G 1 6 1 4) の存在量は、ヘム制限下で培養した細胞中において有意に低減した (図 6、表 3)。オペロン中にコードされている (Baughn et al., 2003) これらの 2 つのタンパク質は、ヘム制限に対する応答下で存在量の同様の变化を示す (F r d A L / E = 0.35 ; F r d B L / E = 0.25)。

有機酸最終生成物の分析

ヘム制限下で増殖したポルフィロモナス・ジンジバリスの使用済みの培養培地中の酢酸、酪酸及びプロピオン酸の量は、それぞれ、細胞乾燥重量 1 g 当たり 13.09 ミリモル $\pm$ 1.82 ミリモル、7.77 ミリモル $\pm$ 0.40 ミリモル及び 0.71 ミリモル $\pm$ 0.05 ミリモルであった。ヘム過剰下で増殖したポルフィロモナス・ジンジバリスの使用済みの培養培地中の酢酸、酪酸及びプロピオン酸のレベルは、それぞれ、細胞乾燥重量 1 g 当たり 6.00 ミリモル $\pm$ 0.36 ミリモル、6.51 ミリモル $\pm$ 0.04 ミリモル及び 0.66 ミリモル $\pm$ 0.07 ミリモルであった。

ポルフィロモナス・ジンジバリスの増殖に対する F r d 阻害剤の効果

様々な濃度の 3 種類の駆虫剤オキサニテル、モランテル及びチアベンダゾールの、50 時間にわたるポルフィロモナス・ジンジバリス W 5 0 の増殖に対する効果を、図 7、図 8 及び図 9 に示した。増殖に対する D M S O の効果は、以前に報告した研究でのポルフィロモナス・ジンジバリスの、及び W 5 0 単独の類似の M G T に見られた (43、44) ように、無視できる程度であった。これらの 3 種類の阻害剤のうち、ポルフィロモナス・ジンジバリスの増殖に対する最も深い効果が見られたのは、オキサニテルである (図 7)。増殖曲線から、ポルフィロモナス・ジンジバリスの増殖に対して、15 μ M を超える濃度でオキサニテルの正の抑制が存在することが明らかである。上記で説明した (45) ように、オキサニテルの最小抑制濃度 (M I C) を 112 μ M と決定した。オキサニテルの s u b M I C に関して見られるように、オキサニテルの濃度の増大と M G T の増大との間の顕著な相関も存在した (図 7 A)。モランテルの殺菌効果はオキサニテルよりも比較的 low、M I C は ~ 3 mM であったが、s u b M I C でも顕著な抑制効果を示す (図 8)。チアベンダゾールは、ポルフィロモナス・ジンジバリスの増殖に対してそれほど顕著な抑制効

果を有しないようであり、増殖に対するわずかな抑制効果のために 1 mM を超える濃度を明らかに必要とする (図 9)。結論として、様々な F r d 阻害剤の抑制効果を、オキサニテル > モランテル > チアベンダゾールの順であると評価した。

バイオフィーム形成に対する最小抑制濃度以下の濃度のオキサニテルの効果

ポルフィロモナス・ジンジバリス増殖に対する最も深い効果を有するオキサニテルを、バイオフィームの形成に対するその効果を研究するために使用した。W 5 0 はほとんどの環境下でわずかにしかバイオフィームを形成しないので、バイオフィーム試験では、ポルフィロモナス・ジンジバリス A T C C 3 3 2 7 7 株を W 5 0 の代わりに使用した。A T C C 3 3 2 7 7 株に対するオキサニテルの増殖抑制効果は 1 2 5 μ M での浮遊アッセイにおける W 5 0 に類似している (図 7 B) ので、したがってバイオフィーム形成に対するオキサニテルの効果を研究するための良好なモデルを表す。0 . 1 μ M もの低さの、最小抑制濃度以下の濃度 (S u b M I C) のオキサニテルは、2 4 時間でバイオフィーム塊を顕著に低減した (図 1 0 A) が、4 8 時間でバイオフィーム塊に対する抑制効果を有するためには 3 . 9 μ M 以上の濃度が必要であった (図 1 0 B)。

バイオフィーム分散に対するオキサニテルの効果

S u b M I C のオキサニテルの効果をより詳しく研究するために、ポルフィロモナス・ジンジバリスのバイオフィームに対してフローセル培養システムを使用した。成熟バイオフィームをオキサニテルで処理したときには、バイオフィームの深さと微小コロニーのサイズとが有意に低減した ($P < 0 . 0 1$) が、対照試料と処理試料との間における微小コロニーの数には有意な差異はなかった (図 1 1 ~ 図 1 3、表 6)。

【 0 1 1 0 】

バイオフィームから放出されたポルフィロモナス・ジンジバリス細胞は、特に 1 2 . 5 μ M のオキサニテルで処理したバイオフィームに関しては、生存したままであった (図 1 4)。非処理の対照細胞は、オキサニテルで処理した細胞と比較して分散に対して抵抗性がより高いようであった。バイオフィームから回収した細胞の数も、C L S M 下で見られたもの (図 1 1 ~ 図 1 3) と一致し、対照試料中では細胞数が顕著に多かった。

【 0 1 1 1 】

上記結果は、浮遊ポルフィロモナス・ジンジバリス細胞が固体表面に接着し成熟単一種バイオフィームの一部として増殖する場合に起こる、タンパク質存在量の変化を例示する。現在までに公表された他のこのような研究の全てが二次元ゲル電気泳動に基づく方法を利用して (1 0 ~ 1 2) ので、タンパク質存在量の変化を決定するために Gygi のグループの g e L C M S アプローチ (4 6)、又は $^{16}O / ^{18}O$ タンパク質分解標識化法を利用することは、細菌性バイオフィーム増殖対浮遊増殖の最初の比較研究である。2 つの技術的反復測定と 2 つの生物学的反復測定 $^{16}O / ^{18}O$ 逆標識化アプローチとをうまく採用し、タンパク質存在量の変化を定量及び確認した。

ポルフィロモナス・ジンジバリスの連続培養

本研究ではポルフィロモナス・ジンジバリス W 5 0 を、より伝統的な方法論であるバッチ培養とは対照的に、連続培養で培養した。バッチ培養は、バッチ間の変数 (例えば、接種菌液の大きさ及び生存度、細菌の回収時の厳密な増殖段階、培地中における利用可能な栄養素のレベル、並びに培地の酸化還元電位等の因子) のために、細菌分析に広い範囲及び程度の変化を導入する。連続培養では細菌は、増殖速度、細胞密度、栄養素濃度、温度、p H 及び酸化還元電位を含む厳密に制御された条件下で、多世代にわたり増殖する (4 4、4 7、4 8)。過去の研究は、様々な研究室においてケモスタット中で連続培養したサッカロミセス・セレビシエのトランスクリプトーム解析の高レベルの再現性を実証した (4 9)。さらに本発明者らの研究では、バイオフィーム細胞及び浮遊細胞の両方の増殖が単一の発酵容器中で実施され、分離培養と比較して変動 (variability) が低減した。本研究で見られた同定したタンパク質 (1 及び 2 に順位付けされた) の 8 6 . 4 % の生物学的反復測定の間におけるポルフィロモナス・ジンジバリス細胞外被タンパク質存在量の一貫した変化は、ポルフィロモナス・ジンジバリスのプロテオームに及ぼすバイオフィーム増殖の影響の解析に対する、連続培養システムと、 $^{16}O / ^{18}O$ タンパク質分解標識

化戦略との利用可能性を例示する。

^{18}O 標識化の効率

本研究で採用した基礎的なプロテオミクスの方法は、SDS-PAGE 法がもたらす膜タンパク質の高い分解能及び溶解性のために、gel MS 法であった(46、50)。この方法は、他者が説明した(26~29)手順と同様のゲル内消化手順時に、単一の ^{18}O 標識化反応と組み合わせられた。効率的な標識化は、各ペプチドのC末端への2個の ^{18}O 原子の組込みをもたらすものであり、 ^{16}O との再交換(back-exchange)に抵抗性を有するものとする。これは、単一の ^{18}O 原子の組込みのレベルが7%未満であると評価され、様々なBSA実験に関して得られた平均比が ^{16}O を有意に選好しないことが見出された(表1)、本発明者らのBSAでの研究におけるケースであることが見出され、通常の水との再交換は問題ではないことが示唆された。同様の結果が、生物学的試料に関するもので得られた。効率的な ^{18}O 標識化のための重要なステップには、「一回消化(single-digestion)」法を採用するトリプシン消化の前の、天然の H_2^{16}O の完全な除去と、その後の H_2^{18}O 中でのタンパク質の再可溶化とが必要であった。多数の研究が「二回消化(double digestion)」法を使用している(51、52)が、二回消化法ではトリプシンペプチドの中には初回の消化後に ^{18}O 原子の代わりにそのC末端の ^{16}O 原子のいずれかを交換することができないものがあつたので、一回消化法は、より高い ^{18}O 標識化の効率をもたらすという利点を有する(53)。本発明者らは、任意の標準的なゲル内消化プロトコルのように、有機溶媒を使用する初期脱水工程時にゲルマトリクス中にタンパク質を保持するゲル内消化法をさらに利用した。任意の微量天然 H_2^{16}O の完全な除去は、初期凍結乾燥工程時のさらなる吸着ロスを予防するためにタンパク質がまだゲルマトリクス内に存在する状態で、真空下での遠心分離による凍結乾燥を介して達成した。また H_2^{18}O 中で再構成した大過剰のトリプシンを含有する H_2^{18}O 中で再水和及びゲル内消化を実施した。消化手順時に、第1の ^{18}O 原子の組込み後にゲルから遊離したトリプシンペプチドは、過剰のトリプシンにより媒介される第2のカルボニル酸素交換プロセスの対象となり得る。遊離したペプチドは、タンパク質よりも高い溶解性を有することにより、より高いレベルの二重に ^{18}O 標識化したトリプシンペプチドをもたらすので、これは第2のカルボニル酸素の置換を促進するはずである(図1及び図2；(54))。通常の水との再交換を予防するために、効果的であることが以前に示されている(51、54)煮沸を行うことにより、トリプシンを非活性化した。加えて、乾燥した、非活性化した混合物はnanoLC上への注入の直前に、再懸濁及び混合のみを行い、自発的な交換を最小化した。この自発的な交換は低いことが分かっている(15、40)。

逆標識化

安定な同位体の標識化とMSを使用する定量の場合には、誤差が、標識化及びイオン化のプロセス時に導入される可能性がある。これらの誤差は、標識の親和性の潜在的な差異と、MALDIプロセス時の重又は軽標識化ペプチドの考え得る抑制効果とを含む(13、55)。同じ標識化を繰り返すことを含む伝統的な技術的反復測定は、特定の標識に対する未補正の偏り、又はピークを汚染することによる特定のペプチドの無作為誤差の増大をもたらし得る。本発明者らの通常及び逆の標識化技術的反復測定は、生物学的反復測定1及び2に関してそれぞれ0.97($R^2 = 0.92$)及び0.93($R^2 = 0.82$)の散布図の勾配(標識化しない場合の偏りに関する期待される比は1.0に近い)を有する、高度の相関を実証した(図3)。これらの勾配は、その方法が、タンパク質の評価と、ゲルのロードと、ゲルの切り出しと、ゲル内消化とに関して再現性を有していたことも示す。偏りが無いことは、マイクロアレイ実験で日常的に使用されるダイスワップ法又はLOWESSデータ正規化等の正規化ルーティン(35)が不必要であり得ることを示唆する。しかし、本研究で使用した細菌細胞外被よりも大幅に複雑な試料は、微量汚染ペプチドが $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$ 比の算出に及ぼす影響と、極端な変化を有するペプチドを確認する必要性とを考えると、逆標識化の確認をさらに必要とし得る。MS/MS取得法は断片に対する各重/軽対における最も強力なペプチドのみを選択したので、系統誤差を補正する評価及び手段を提供することに加えて、逆標識の設計は、重及び軽標識化ペプチドの

両方を容易に同定することを可能にするというさらなる利点を有するものであった。このように、誤った割り当ての可能性は低減する。本発明者らの知識では、これは、17種類のチトクロムP450タンパク質の最近の定量以外では複雑な生物学的試料における逆¹⁶O/¹⁸O標識化の最初の報告である(26、30)。

バイオフィーム対浮遊培養

本発明者らは、生物学的反復測定のための強力な正の相関($r = 0.701$ 、 $p < 0.001$)を実証し、バイオフィームの形成及び発達に再現性があることを示した。このことは、81種類の定量化可能なタンパク質のうち70種類が、両方の生物学的反復測定において同様の比を示すことが観察されるという知見によっても見られた(表2、1又は2に順位付けされる)。本研究で同定されたポルフィロモナス・ジンジバリスタンパク質の4分の3超が、3種類以上の特有のペプチドにより同定され、この標識化手順の同定及び定量の信頼性がさらに増大した。両方の生物学的反復測定から一貫して同定された81種類のタンパク質のうち、47種類は浮遊状態からバイオフィーム状態まで存在量が有意に変化した。特に細胞外被において、検出されたプロテオームの存在量の百分率の変化は、検出されたプロテオームの50%超が浮遊と成熟バイオフィームとの増殖期の間に変化の顕著な変化を示すことが示された、シュドモナス・エルギノーサ等のバイオフィーム形成細菌についての他の研究(12)と一致する。本発明者らは、バイオフィームとしての増殖に対するポルフィロモナス・ジンジバリスの細胞外被プロテオームにおける広範な応答をさらに観察した。バイオフィーム培養に対する応答下で存在量が変化することが以前に実証された多数のタンパク質は、本発明者らの研究において、存在量が変化することも見出された。注目すべきことに、幾つかのタンパク質では最大5倍存在量が変化することが観察され(表2)、バイオフィーム培養に応答したプロテオームの幾つかの主要なシフトが示唆された。

代謝

ポルフィロモナス・ジンジバリスに関する主要なエネルギー源は、宿主タンパク質のタンパク質分解性加水分解によりペプチド形態で得られるアミノ酸の発酵に由来する(47、80、81)。ポルフィロモナス・ジンジバリスの主要な異化経路は、グルタミン酸及びアスパラギン酸の発酵であり、該発酵ではグルタミン酸は酪酸、プロピオン酸及びアンモニアに代謝され、アスパラギン酸は酪酸、プロピオン酸、酢酸及びアンモニアに代謝される(図6)。以前の報告は、ポルフィロモナス・ジンジバリスが、培養培地からアスパラギン酸/アスパラギン、グルタミン酸/グルタミン、トレオニン、セリン、ロイシン及びバリンを選択的に利用することを示している(47、81、82)。

【0112】

グルタミン酸異化に関与するポルフィロモナス・ジンジバリスの2種類のタンパク質であるPG1076(L/E = 1.8)及びPG1078(L/E = 2.0)は、ヘム制限時に存在量が有意に増大した。これらのタンパク質は、15種類の遺伝子の、予測される大きなオペロン中に配置される遺伝子によりコードされる。これらの遺伝子上流は、その存在量がヘム制限時にも増大した仮説タンパク質及び保存仮説タンパク質(それぞれ、PG1067、L/E = 2.4、及びPG1068、L/E = 1.7)をコードする2つの遺伝子である。この大きなオペロンの解析は、多数の鉄調節性遺伝子に特徴的な推定Furコンセンサス結合領域(83)の存在をさらに明らかにし、発現が鉄の利用能により制御され得ることを示唆している。本発明者らは1つのオペロン中にコードされる全てのタンパク質のフォールド変化が同じであると予想したが、転写産物のレベルはタンパク質のレベルと相関しないことがあるので(84)、これは必ずしも全ての例に当てはまるわけではない。このことは、転写産物の翻訳後修飾又は安定性のためであることがあり、mRNA存在量が見かけ上変化することなく、細胞の事象の実質的な調節がタンパク質レベルで起こることを可能にする。

【0113】

アスパラギン酸からの経路によるコハク酸へのフマル酸の変換は、2種類の細胞質酵素FrdA(1615)及びFrdB(1614)と、膜貫通型FrdC(1616)とか

ら成るヘテロ三量体のコハク酸 - キノンオキシドレダクターゼ (S Q O R) 複合体により触媒される。2種類の細胞質フマル酸レダクターゼ酵素、F r d A (P G 1 6 1 5) 及び F r d B (P G 1 6 1 4) の存在量は、ヘム制限 (それぞれ、3 倍及び 4 倍) 並びにバイオフィルム増殖 (それぞれ、1 7 倍及び 5 . 9 倍) で培養した細胞中で、有意に低減した。オベロン中にコードされる (8 5) これらの 2 種類のタンパク質は、ヘム制限 (F r d A L / E = 0 . 3 5、F r d B L / E = 0 . 2 5) 並びにバイオフィルム増殖 (F r d A B / P = 0 . 0 6、F r d B B / P = 0 . 1 7) に応答して存在量が類似した変化を示す。バクテロイデス・フラジリス (*Bacteroides fragilis*) における以前の研究は、チトクロム - b - 依存性 F r d 複合体の合成のためにヘムが要求されることを示唆している (8 6)。したがって、それが新規に P P I X を合成することができないことを考慮すると、ポルフィロモナス・ジンジバリスにおいてヘム制限増殖条件時の F r d のレベルの低さが見られることは驚くべきことではない。バクテロイデス・フラジリス及びポルフィロモナス・ジンジバリスの両方の増殖研究は、それらが増殖のためにヘムを要求すること、及びこの要求性が外来のコハク酸により部分的に置換され得ることを示している (8 7、8 8)。この観察は、その増殖がヘムによっては刺激されずコハク酸の添加により刺激されたバクテロイデス・フラジリス F r d 欠損変異株を使用して、確認された (8 5)。モル増殖収量研究は、バクテロイデス・フラジリス F r d 欠損突然変異体が、ヘム制限下の野生株の A T P 収量と同様の A T P 収量を有することをさらに示した。最適増殖時に、エネルギー産生経路に入れるため、又は必須アミノ酸 (リシン及びメチオニン) の生合成のために、コハク酸はサクシニル - C o A に変換される。これらの研究は、均衡のとれた増殖のための、アスパラギン酸のコハク酸への変換の重要性を証明する。ヘム過剰条件下では、ポルフィロモナス・ジンジバリスにより異化されたアスパラギン酸の部分は最初に、フマル酸レダクターゼ酵素 (F r d A 及び F r d B) によりコハク酸に還元され、その後グルタミン酸経路を介して異化され酪酸を産生する (図 6)。ヘム制限時のこれらのフマル酸レダクターゼ酵素の存在量の 3 倍 ~ 4 倍の減少は、グルタミン酸異化経路に入るアスパラギン酸がより少なくなり、この結果として異化されたアスパラギン酸のほとんどが、酸化経路を介して酢酸に変換されることを示す (図 6)。この仮説を検証するために、本発明者らは、連続培養で増殖したポルフィロモナス・ジンジバリス由来の使用済みの培養培地に対して有機酸分析を実施した。これは、他の主要な最終産物である酪酸及びプロピオン酸のレベルは両増殖条件下で類似していたのに対して、ヘム過剰下 (細胞乾燥重量 1 g 当たり 6 . 0 0 ミリモル $\pm$ 0 . 3 6 ミリモル) で産生されるレベルと比較してヘム制限下 (細胞乾燥重量 1 g 当たり 1 3 . 0 9 ミリモル $\pm$ 1 . 8 2 ミリモル) では産生される酢酸が 2 倍高いレベルであることを示した。このことは、アスパラギン酸発酵のために使用される経路のシフトの、本発明者らの仮説と一致する。ピルビン酸の酢酸への変換を触媒する酵素 (酢酸キナーゼ P G 1 0 8 1、ホスホトランスアセチラーゼ P G 1 0 8 2 及びピルビン酸フェレドキシン P G 0 5 4 8) の存在量の増大も、使用済みの培養培地で見出される酢酸の量の増大と一致する (表 2、図 6)。

【 0 1 1 4 】

したがってこれらの結果は、この繊細な代謝調節経路の抑制により細菌を制御する方法についての調査に、本発明者らを駆り立てた。

増殖に対するフマル酸レダクターゼ阻害剤の効果

本発明者らは、ヘム制限増殖時の F r d A 及び F r d B の 3 倍及び 4 倍の低減よりもさらに大きい、ポルフィロモナス・ジンジバリスのバイオフィルム増殖時の F r d 複合体 (それぞれ、F r d A 及び F r d B) の存在量の 1 7 . 0 倍及び 5 . 9 倍の低減を示した。F r d 複合体の一貫してより低い存在量は、バイオフィルム及びヘム制限の両方の増殖条件時の、ヘムの制限と関連する該細菌の増殖の減弱と相関する。Smith et al. (8 9) は、カンピロバクター (*Campylobacter*) 種の F r d 活性が指数関数的に増殖中の培養物においてより高いが、定常期に入ると減少することを以前に証明した。したがって、これは、F r d 活性が増殖速度を制限することを示唆しており、それが魅力的で新規な治療標的であることを強調している。フマル酸呼吸は最も広範な種類の嫌気呼吸であり、電子 1 個

当たり～0.5個のATPを産出する電子受容体として働き最終産物としてコハク酸を形成することが知られている唯一の代謝中間体である(90)。Shah and William(91)は、ポルフィロモナス・ジンジバリスがアスパラギン酸(asparatate)からコハク酸を産生することを報告し、Takahashi et al.(81)は、産生されたコハク酸がサクシニル-CoAに変換され、その後酪酸又はプロピオン酸に変換されることを提唱した。

【0115】

動物及びヒトにおける蠕虫感染症を治癒させるために通常使用される駆虫剤が、ヘリコバクター・ピロリ(*Helicobacter pylori*)及びカンピロバクター・ジェジュニ(*Campylobacter jejuni*)に対して抑制効果及び殺菌効果を有することが実証された(89、94)。これらの薬剤の1つであるオキサニテルは、推定では未知のメカニズムを介しFr d 10
複合体の親水性サブユニット上において、ヘリコバクター・ピロリ及びカンピロバクター・ジェジュニにおけるフマル酸レダクターゼ酵素の阻害剤であることが示されている(94～96)。

【0116】

興味深いことに、全ての嫌気性細菌がFr dを有するわけではなく、Fr dを有する細菌の中にはFr dが抑制された場合の生存のために代替的な生化学的経路を有するものがある(97、98)。したがって、Fr d阻害剤の存在下でポルフィロモナス・ジンジバリスの生存度が著しく影響を受けるという発見(図7～図10)は、増殖とアスパラギン酸経路からのATPの寄与とのために絶対必須である酵素がポルフィロモナス・ジンジバリスの生存において重要な役割を果たし得ることを示唆する。ヒト及び他の動物にはFr d 20
複合体が存在しない(92、93)ので、Fr d阻害剤は、病原体、特にFr dに対して必須の要求性を有する病原体により引き起こされる疾患に対する標的を提供する。

バイオフィーム形成に対するフマル酸レダクターゼ阻害剤の効果

以下は、ポルフィロモナス・ジンジバリスのバイオフィーム形成能力に対するFr d阻害剤の効果を例示する。subMICオキサニテル濃度でのバイオフィーム塊の低減は、最適なバイオフィーム形成のために要求される最小量のFr d又はエネルギーが存在することを示唆するので、非常に興味深い。

【0117】

subMIC濃度のFr d阻害剤によるFr dの部分的な抑制は、栄養の乏しい環境におけるようなものと類似のシグナルとして翻訳され得る。例えば、炭素調節性バイオフィーム形成は、シュードモナス・エルギノーサ及び大腸菌を含む多数の細菌において十分に裏付けられており、栄養制限時にRpoS、Crc及びCsrA等の転写調節因子により媒介される(99～101)。大腸菌ではcsrA遺伝子は、グリコーゲン合成及び糖新生等の或る特定の代謝経路を抑制する、グローバル調節タンパク質CsrA(炭素貯蔵調節因子)をコードする(101、102)。大腸菌におけるcsrAの破壊はバイオフィーム形成の増強を引き起こし(101、103)、興味深いことに、ネズミチフス菌(*Salmonella enterica serovar Typhimurium*)におけるCsrAホモログの活性化は、他の標的に対するCsrAの効果のために、上皮細胞の浸潤の増大を引き起こした(104、105)。したがって、ヘム制限下のポルフィロモナス・ジンジバリスはFr d活性の低減の結果としてのATPレベルの低さのためにバイオフィームを形成する可能性が低く、40
それによりインターナリンを含む宿主細胞浸潤タンパク質が栄養枯渇の終了までの上皮細胞中への逃避を促すために上向き調節されると推測することは非常に魅力的である。

【0118】

浮遊状態と比較してバイオフィーム状態時では、解糖酵素グリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素(GAPDH)はより高い存在量で存在し、リステリア・モノサイトゲネス(*Listeria monocytogenes*)及びシュードモナス・エルギノーサに関して得られた以前の結果と一致する(12、106)。GAPDHは解糖及び糖新生に関与する四量体NAD結合酵素として分類されるがこのタンパク質が多機能性であるという多数の報告が存在しており、グラム陽性細菌の細胞表面で発現する場合には、プラスミン、プラスミノゲン及びトランスフェリンの結合に関与するようである(107、108)。興味深いことに 50

、ストレプトコッカス・オラリス (Streptococcus oralis) とポルフィロモナス・ジンジバリス 33277 との間における共凝集が、ポルフィロモナス・ジンジバリスの線毛とストレプトコッカス・オラリスの GAPDH との相互作用により媒介されることが示されている (109)。しかし、ポルフィロモナス・ジンジバリスでの基質結合における GAPDH の正確な役割は、存在するとしても、それについてはまだ答えが得られていない。

バイオフィルム形成

ユニバーサルストレスタンパク質 (UspA) は、バイオフィルム細胞と比較して浮遊細胞において顕著に高い存在量で存在していた。様々な細菌中での Usp の産生は、定常期に入ること、或る特定の栄養素の欠乏、酸化剤、及び他の刺激等の多様な条件により刺激されることが見出された (110、111)。浮遊期の細胞における存在量の増大は、ポルフィロモナス・ジンジバリスがバイオフィルムの一部分として進展して増殖するという事実、及び浮遊期がよりストレスが多いと思われるという事実と一致する。UspA の不活性化は浮遊細胞による初期バイオフィルム形成の減少をもたらしたので、ポルフィロモナス・ジンジバリスにおける UspA の発現は、バイオフィルム形成と関連すると考えられる (112)。本研究ではバイオフィルムは確立され成熟に到達しているの、自由に浮いている浮遊細胞と比較して UspA に対する必要性はより低いようである。

【0119】

インターナリンファミリータンパク質 InlJ (PG0350) のホモログで、バイオフィルム状態時の存在量がより高いことが観察された。PG0350 は、遺伝子の不活性化がバイオフィルム形成の低減をもたらしたので、ポルフィロモナス・ジンジバリス 33277 のバイオフィルム形成にとって重要であることが示されている (39)。バイオフィルムにおけるより高いレベルの PG0350 は、このタンパク質が初期バイオフィルム形成のためのみに要求され得るのではなく、ポルフィロモナス・ジンジバリスを互いと、又はバイオフィルム内の細胞外基質と結合させるアドヘンシに作用することを示唆し得た。

機能が未知のタンパク質

本研究で同定した最大のタンパク質群は、本研究で最初に同定した 4 種類のタンパク質を含む機能が未知の 41 種類のタンパク質であった (表 2)。同定した 41 種類のタンパク質のうち 37 種類は細胞外被由来であると予測され、この群内で 17 種類のタンパク質はバイオフィルム細胞と浮遊細胞との間において有意な変化を示す。これらのタンパク質の大部分は、名称は定義されているが機能は十分に定義されていない GenBank のタンパク質と相同性を有する。バイオフィルム状態において存在量が実質的に増大することが一貫して見出された複数のタンパク質、すなわち PG0181、PG0613、PG1304、PG2167 及び PG2168 に特に関心がもたれる。

【0120】

上記結果は、複雑な混合物に適用される ¹⁶O / ¹⁸O タンパク質分解標識化法の大規模の確認を表すものであり、細菌のバイオフィルム増殖状態と浮遊増殖状態との比較のためにこのアプローチを使用した最初のものである。様々な機能を有する相当数のタンパク質が、バイオフィルム細胞中の存在量において一貫して増大又は減少することが見出され、細胞がどのようにしてバイオフィルム条件に適応するのかを示し、また、バイオフィルム制御戦略のための潜在的な標的をもたらした。

【実施例】

【0121】

治療を対象とする本発明の一態様を具体化する組成物の例示を助けるために、以下の実施例の処方提供される。

【0122】

以下は、練り歯磨き処方の例である。

成分	重量 %
リン酸二カルシウム二水和物	50.0
グリセロール	20.0

10

20

30

40

50

カルボキシメチルセルロースナトリウム	1 . 0
ラウリル硫酸ナトリウム	1 . 5
ラウロイルサルコシンナトリウム (Sodium lauroyl sarcosinate)	0 . 5
香料	1 . 0
サッカリンナトリウム	0 . 1
グルコン酸クロルヘキシジン	0 . 0 1
デキストラナーゼ	0 . 0 1
バイオフィルム阻害剤 (パモ酸オキサニテル)	0 . 2
水	残り (balance)

以下は、練り歯磨き処方の例である。

10

成分	重量 %
リン酸二カルシウム二水和物	5 0 . 0
ソルビトール	1 0 . 0
グリセロール	1 0 . 0
カルボキシメチルセルロースナトリウム	1 . 0
ラウリル硫酸ナトリウム	1 . 5
ラウロイルサルコシンナトリウム	0 . 5
香料	1 . 0
サッカリンナトリウム	0 . 1
モノフルオロリン酸ナトリウム	0 . 3
グルコン酸クロルヘキシジン	0 . 0 1
デキストラナーゼ	0 . 0 1
バイオフィルム阻害剤 (パモ酸オキサニテル)	0 . 2
水	残り

20

以下は、練り歯磨き処方の例である。

成分	重量 %
リン酸二カルシウム二水和物	5 0 . 0
ソルビトール	1 0 . 0
グリセロール	1 0 . 0
カルボキシメチルセルロースナトリウム	1 . 0
ラウロイルジエタノールアミド	1 . 0
モノラウリン酸スクロース	2 . 0
香料	1 . 0
サッカリンナトリウム	0 . 1
モノフルオロリン酸ナトリウム	0 . 3
グルコン酸クロルヘキシジン	0 . 0 1
デキストラナーゼ	0 . 0 1
バイオフィルム阻害剤 (パモ酸オキサニテル)	0 . 1
水	残り

30

以下は、練り歯磨き処方の例である。

40

成分	重量 %
ソルビトール	2 2 . 0
アイリッシュ・モス	1 . 0
水酸化ナトリウム (5 0 %)	1 . 0
G a n t r e z	1 9 . 0
水 (脱イオン化)	2 . 6 9
モノフルオロリン酸ナトリウム	0 . 7 6
サッカリンナトリウム	0 . 3
ピロリン酸	2 . 0
水和アルミナ	4 8 . 0

50

フレーバーオイル	0 . 9 5	
バイオフィルム阻害剤（パモ酸オキサニテル）	0 . 3	
ラウリル硫酸ナトリウム	2 . 0 0	

以下は、液体練り歯磨き（liquid toothpaste）処方の例である。

成分	重量%	
ポリアクリル酸ナトリウム	5 0 . 0	
ソルビトール	1 0 . 0	
グリセロール	2 0 . 0	
香料	1 . 0	
サッカリンナトリウム	0 . 1	10
モノフルオロリン酸ナトリウム	0 . 3	
グルコン酸クロルヘキシジン	0 . 0 1	
エタノール	3 . 0	
バイオフィルム阻害剤（パモ酸オキサニテル）	0 . 2	
リノール酸	0 . 0 5	
水	残り	

以下は、洗口剤処方の例である。

成分	重量%	
エタノール	2 0 . 0	
香料	1 . 0	20
サッカリンナトリウム	0 . 1	
モノフルオロリン酸ナトリウム	0 . 3	
グルコン酸クロルヘキシジン	0 . 0 1	
ラウロイルジエタノールアミド	0 . 3	
バイオフィルム阻害剤（パモ酸オキサニテル）	0 . 2	
水	残り	

以下は、洗口剤処方の例である。

成分	重量%	
G a n t r e z（登録商標）S - 9 7	2 . 5	
グリセリン	1 0 . 0	30
フレーバーオイル	0 . 4	
モノフルオロリン酸ナトリウム	0 . 0 5	
グルコン酸クロルヘキシジン	0 . 0 1	
ラウロイルジエタノールアミド	0 . 2	
バイオフィルム阻害剤（パモ酸オキサニテル）	0 . 3	
水	残り	

以下は、ロゼンジの処方の例である。

成分	重量%	
砂糖	7 5 ~ 8 0	
コーンシロップ	1 ~ 2 0	40
フレーバーオイル	1 ~ 2	
N a F	0 . 0 1 ~ 0 . 0 5	
バイオフィルム阻害剤（パモ酸オキサニテル）	0 . 3	
ステアリン酸 M g	1 ~ 5	
水	残り	

以下は、歯肉用マッサージクリーム処方の例である。

成分	重量%	
白色ワセリン	8 . 0	
プロピレングリコール	4 . 0	
ステアリルアルコール	8 . 0	50

ポリエチレングリコール 4 0 0 0	2 5 . 0
ポリエチレングリコール 4 0 0	3 7 . 0
モノステアリン酸スクロース	0 . 5
グルコン酸クロルヘキシジン	0 . 1
バイオフィルム阻害剤（パモ酸オキサニテル）	0 . 3
水	残り

以下は、歯周ゲルの処方例である。

成分	重量 %	
Pluronic F 1 2 7（BASFから入手）	2 0 . 0	10
ステアリルアルコール	8 . 0	
パモ酸オキサニテル	3 . 0	
コロイド性二酸化ケイ素（Aerosil（登録商標）2 0 0（商標）等）	1 . 0	
グルコン酸クロルヘキシジン	0 . 1	
水	残り	

以下は、チューインガムの処方例である。

成分	重量 %	
ガム基剤	3 0 . 0	20
炭酸カルシウム	2 . 0	
結晶性ソルビトール	5 3 . 0	
グリセリン	0 . 5	
フレーバーオイル	0 . 1	
バイオフィルム阻害剤（パモ酸オキサニテル）	0 . 3	
水	残り	
【 0 1 2 3 】		

【表 1 - 1】

表 1 : $^{16}\text{O}/^{18}\text{O}$ タンパク質分解標識化を使用する所定の BSA 比の定量

期待される比 1 : 1 a)	三連分析			平均比 (±SD)
CCTESLVNR	0. 8 3	0. 8 4	0. 8 8	0. 8 5 ± 0. 0 3
DLGEEHFK	0. 9 5	1. 0 6	0. 8 5	0. 9 5 ± 0. 1 0
EACFKVEGPK	1. 0 9	1. 1 2	1. 0 9	1. 1 0 ± 0. 0 2
ECCDKPLLEK	1. 0 1	0. 9 6	0. 8 7	0. 9 4 ± 0. 0 7
EYEATLEECCA K	1. 0 5	1. 0 1	1. 0 5	1. 0 4 ± 0. 0 2
LVTDLTKVHK	0. 8 6	0. 9 1	1. 0 2	0. 9 3 ± 0. 0 8
RHPEYAVSVLLR	1. 0 7	0. 9 6	0. 9 4	0. 9 9 ± 0. 0 7
YICDNQDTISSK	1. 0 0	1. 1 5	1. 0 3	1. 0 6 ± 0. 0 8
平均	0. 9 8 ± 0. 1 0	1. 0 0 ± 0. 1 0	0. 9 7 ± 0. 0 9	0. 9 8 ± 0. 0 8
全 I D ペプチドの平均**				0. 9 8 ± 0. 1 2
全 I D ペプチドの C V				1 3. 1 %
	期待される比 2 : 1 b) (¹⁸ O / ¹⁶ O)	期待される比 1 : 2 b) (¹⁸ O / ¹⁶ O)		
QTALVELLK	1. 9 2	0. 4 4 (2. 2 7)	2. 1 0	
LVNELTEFAK	2. 4 5	0. 4 6 (2. 1 7)	2. 3 1	
RHPEYAVSVLLR	1. 8 2	0. 4 2 (2. 3 6)	2. 0 9	
LGEYGFQNALIV R	2. 2 1	0. 4 3 (2. 3 1)	2. 2 6	
MPCTEDYLSLIL NR	2. 5 9	0. 4 0 (2. 5 0)	2. 5 5	
KVPQVSTPTLVE VSR	2. 3 5	0. 3 9 (2. 5 7)	2. 4 6	
LFTTFHADICTLP DTEK	1. 7 2	0. 4 4 (2. 2 7)	2. 0 0	
RPCFSALTPDET YVPK	1. 8 2	0. 5 2 (1. 9 2)	1. 8 7	
平均	2. 1 1 ± 0. 3 3	2. 3 0 ± 0. 2 0	2. 2 4 ± 0. 2 4	
全 I D ペプチドの平均***				2. 2 2 ± 0. 2 6
全 I D ペプチドの C V				1 1. 7 5 %
期待される比 1 : 5		期待される比 1 0 : 1		
	(¹⁸ O / ¹⁶ O)		(¹⁸ O / ¹⁶ O)	
AEFVEVTK	0. 2 3 2 (4. 3 2)	AEFVEVTK	1 2. 3 8	
CCTESLVNR	0. 1 8 4 (5. 4 2)	QTALVELLK	1 0. 4 0	
SHCIAEVEK	0. 1 7 6 (5. 6 7)	LVNELTEFA K	1 4. 1 7	
ECCDKPLLEK	0. 1 6 9 (5. 9 1)	FKDLGEEHF	9. 4 1	

【0124】

【表 1 - 2】

		K	
HPEYAVSVLLR	0. 218 (4. 58)	HPEYAVSVL LR	11. 76
YICDNQDTISSK	0. 187 (5. 36)	YICDNQDTI SSK	10. 16
LKECCDKPLLEK	0. 252 (3. 97)	RHPEYAVSV LLR	10. 14
SLHTLFGDELCK	0. 183 (5. 45)	SLHTLFGDE LCK	7. 58
RHPEYAVSVLLR	0. 201 (4. 97)	EYEATLEEC CAK	14. 07
VPQVSTPTLVEV SR	0. 206 (4. 86)	ETYGDMADC CEK	12. 67
ECCHGDLLECAD DR	0. 298 (3. 35)	LGEYGFQNA LIVR	9. 36
LFTFHADICTLP DTEK	0. 210 (4. 76)	VPQVSTPTL VEVSR	8. 34
		KVPQVSTPT LVEVSR	8. 86
		LFTFHADIC TLPDTEK	11. 08
		RPCFSALTP DETYVPK	10. 26
平均	0. 210 ± 0. 04 (4. 90 ± 0. 75)		10. 74 ± 2. 04
全IDペプチドのCV	15. 26%		18. 95%

10

20

a) 1 : 1 の期待される比に関しては、3回の別々の実験全てにおいて同定されたペプチドのみがこの表に含まれている。

b) 2 : 1 及び 1 : 2 の期待される比に関しては、両方の実験において同定されたペプチドのみがこの表に含まれている。

** n = 55 *** n = 24

【0125】

30

【表 2 - 1】

表 2 : ポルフィロモナス・ジンジバリス細胞外被画分の生物学的反復測定 of 両方から同定された 81 種類のタンパク質のリスト。1 より大きい存在量は、浮遊状態に対してバイオフィルムにおけるタンパク質の存在量がより高いことを示す。比が所定の B S A 比から、3 倍超の S D (0.26) で 1 と異なる (1.78 より大きい、又は 0.56 より小さい) 場合には、そのタンパク質を有意に変化したとみなした。その平均比に基づき、灰色で強調したタンパク質は有意な変化を表す。

Tigr #	タンパク質	生物学的反復測定 1				生物学的反復測定 2				特有のペプチドの総数	順位 (群) e
		位置 a	# quant のためのペプチド数	Mascot スコア b	正規化比 (B/P) c	SEd	# 定量的なペプチド数	Mascot スコア	正規化比 (B/P)	SE	
CTD ファミリータンパク質											
	プロテアーゼ										
PG0232	亜鉛カルボキシペプチダーゼ, CPG70	OM	13	71/20	1.67	0.08	26	74/21	2.53	0.08	3 (DF)
PG0553	細胞外プロテアーゼ、リジンプロテアーゼ前駆体 (A1)	OM/EX	1	65/23	3.33		2	62/19	3.45		1 (FF)
PG1424	ペプチダルギニナーゼ	PP	9	86/22	0.49	0.05	15	89/20	3.16	0.33	4 (BF)
PG1837	ヘマグルチニンタンパク質 HagA	OM	3 (15) *	59/20	2.73	0.44	3 (15) *	42/21	4.21	0.36	3 1 (FF)
PG1844	リジン特異的システインプロテアーゼ	OM	3 (13) *	78/20	0.43	0.04	9 (24) *	77/18	0.40	0.04	10 1 (BB)
PG2024	アルギニン特異的プロテアーゼ Arg1 プロテイン (RgpA)	OM	3 (12) *	76/22	1.63	0.10	3 (22) *	72/20	3.78	0.61	4 3 (DE)
	ヘム結合										
PG0616	チロチン、推定	PP/CY	14	96/20	2.23	0.20	14	96/20	3.69	0.20	6 2 (EF)
	ペプチド関連										
PG0350	インターリン関連タンパク質	OM/EX	2	42/21	1.99		2	53/21	4.27		3 2 (EF)
	機能が未知のタンパク質										
PG1798	免疫反応性 46kDa 抗原 PG99	PP/EX	1	36/20	5.94		1	30/21	4.07		1 1 (FF)
PG2216	無名タンパク質 (保存)	OM/EX	2	36/22	0.72	NA	4	51/21	0.68	0.06	3 1 (CC)
	輸送										

【 0 1 2 6 】

10

20

30

40

【表 2 - 2】

Tigr #	タンパク質	生物学的反復測定 1				生物学的反復測定 2				特有のペプチドの総数	順位(群)e
		位置 a	# 定量のためのペプチド数	Mascot スコア b	正規化比 (B/P) c	SED	# 定量のためのペプチド数	Mascot スコア	正規化比 (B/P)	SE	
PG0669	ヘム結合タンパク質 IhtB	OM	16	120/21	0.25	0.03	14	69/20	0.16	0.02	1 (AA)
PG0707	TonB依存性受容体, P92	OM	5	110/21	0.14	0.02	30	117/20	0.31	0.04	1 (AA)
PG0782	MotA/TolQ/ExbB7°ロトンチヤネンファミリー-タンパク質	IM	7	80/19	0.86	0.14	4	78/19	0.92	0.12	1 (CC)
PG1006	推定TonB依存性受容体	OM/EX	6	59/21	1.42	0.12	9	90/20	1.50	0.11	1 (DD)
PG1414	TonB連結外膜受容体, P G47	OM	11	88/21	3.81	0.43	3	49/19	3.69	NA!	1 (FF)
PG1551	HmuYタンパク質	UN	4	75/20	2.57	0.71	4	74/20	2.78	0.21	1 (DD)
PG1626	考え得る (possible) 外膜関連タンパク質 P58 (推定ヘム受容体タンパク質)	OM	41	113/21	2.37	0.22	37	122/19	3.68	0.26	2 (EF)
PG2008	TonB依存性受容体, P90	OM	24	68/21	2.08	0.17	26	112/20	3.12	0.21	2 (EF)
PG0185	RagAタンパク質	OM	58	89/21	0.42	0.02	109	126/20	0.79	0.04	2 (BC)
PG0186	リボタンパク質 RagB	OM	51	142/22	0.34	0.04	56	142/19	0.26	0.02	1 (AA)
PG1010	ABC輸送体, ATP結合タンパク質	IM	1	69/21	1.41		2	60/19	1.26		1 (DD)
PG1762	タンパク質排出膜タンパク質 SecD/タンパク質排出膜タンパク質 SecF	IM	14	91/22	0.76	0.07	4	99/20	0.48	0.09	2 (CB)
PG2082	POTファミリー-タンパク質	IM	13	75/23	0.80	0.06	6	48/22	0.52	0.10	1 (CC)
鉄/ヘム貯蔵及び酸化的ストレス応答											
PG0090	Dpsファミリー-タンパク質	CY	3	72/19	1.37	0.15	1	40/21	1.27		1 (DD)
PG1286	フェリチン	CY	5	73/22	1.50	0.04	7	124/19	2.42	0.14	2 (DE)
ハイドロリウム及び浸潤関連											
PG0159	イントロペプチダー PepO	PP/CY	8	122/20	0.35	0.08	3	60/19	0.18	NA!	2 (BA)
PG0245	ユニバーサルストレスタンパク質 ユニミリン	CY	1	67/22	0.41		2	64/20	0.25		2 (BA)
PG2132	フィムブリリン (Fimbrillin)	EX	1	31/22	1.14		2	66/20	0.85		2 (DC)

【 0 1 2 7 】

10

20

30

40

【表 2 - 3】

タンパク質		生物学的反復測定 1				生物学的反復測定 2				特有のペプチドの総数	順位(群)e
Tigr #		位置 a	# 定量(quant)のためのペプチド数	Mascot スコア b	正規化比(B/P) ^c	SEd	# 定量のためのペプチド数	Mascot スコア	正規化比(B/P)	SE	
エネルギー代謝											
PG0249	オキサロ酢酸デカルボキシラーゼ、推定	CY	1	44/22	3.50		1	37/21	2.00		1 2 (FE)
PG0306	電子輸送複合体、RnfAB CDGE 型、G サブユニット	PP	2	108/22	1.08		1	61/19	0.72		1 2 (DC)
PG1084	チロドキシゲナーゼタンパク質	CY	2	87/22	1.07		1	132/20	0.14		1 4 (DA)
PG1612	メチルコニル CoA デカルボキシラーゼ、α サブユニット (mmdA)	CY	1	65/21	0.73		2	55/21	0.42		1 2 (CB)
PG1614	フマル酸レタクターゼ、鉄-硫黄タンパク質 (frdB)	UN	2	60/20	0.15		2	53/21	0.19		2 1 (AA)
PG1615	フマル酸レタクターゼ、フラヒンタンパク質サブユニット (frdA)	UN	3	58/19	0.06	NA!	1	43/20	NA**		3 NA
PG1704	チオール:シスルワイド交換タンパク質 dsbD、推定	IM	3	64/23	2.14		3	68/20	0.46	0.08	1 4 (EB)
PG2181	NADH:ニキノンキントレタクターゼ、Na 転位 (translocating)、B サブユニット (nqrB)	IM	1	91/21	1.32		1	69/20	0.38		1 3 (DB)
PG2124	グリセラルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ	CY	3	105/22	3.39	0.62	2	94/19	2.45		3 2 (FE)
PG2157	グリタミンクロトランスフェラーゼ	PP/EX	2	70/21	0.11		3	53/20	0.45	NA!	3 2 (AB)
関連タンパク質											
リボソームタンパク質											
PG0167	リボソームタンパク質 L25	CY	4	57/20	0.27	0.05	2	50/21	0.30		3 1 (AA)
PG0375	リボソームタンパク質 L13 (rpl M)	CY	2	69/21	0.28		1	116/20	0.18		2 1 (AA)
PG0392	リボソームタンパク質 L10 (rpl J)	CY	2	97/21	0.33		5	68/22	0.37	0.02	3 2 (AB)

【 0 1 2 8 】

10

20

30

40

【表 2 - 4】

Tigr #	タンパク質	生物学的反復測定 1				生物学的反復測定 2				特有のペプチドの数	順位(群)e
		位置 a	# 定量 (quant) のためのペプチド数	Mascot スコア b	正規化比 (B/P) c	SEd	# 定量のためのペプチド数	Mascot スコア	正規化比 (B/P)	SE	
PG0393	リボリンタンパク質 L7/L12	CY	6	81/20	0.68	0.03	4	79/21	0.56	0.03	2 (CB)
機能が未知のタンパク質											
内在性外膜タンパク質											
PG0027	存在し得る (Probable) 内在性外膜タンパク質 P40	OM	11	143/21	0.74	0.06	23	111/20	0.81	0.02	1 (CC)
PG0613	考え得る外膜関連タンパク質 P23	EX	3	55/19	4.41	0.56	1	43/20	3.24		1 (FF)
PG0694	外膜タンパク質 40	OM	37	116/20	3.62	0.37	77	86/20	3.39	0.24	1 (FF)
PG0695	外膜タンパク質 41	OM	100	110/21	2.31	0.21	53	124/19	3.18	0.20	2 (EF)
PG1652	存在し得る内在性外膜タンパク質 P64	OM	2	53/20	1.04		14	67/20	1.70	0.27	2 (CD)
PG1786	存在し得る内在性外膜タンパク質 P30	EX/OM	5	56/21	0.99	0.17	5	56/26	1.33	0.08	2 (CD)
PG1823	存在し得る内在性外膜タンパク質 P20	PP/OM	26	117/21	0.39	0.03	18	91/20	0.98	0.10	2 (BC)
PG2106	存在し得る内在性外膜タンパク質 P22	IM/OM	15	73/20	0.31	0.04	13	103/17	0.45	0.04	2 (AB)
リボタンパク質											
PG0188	リボタンパク質、推定	PP/EX	7	72/23	0.92	0.09	4	40/20	1.18	0.11	2 (CD)
PG0241	リボタンパク質、推定	OM/EX	4	93/20	0.45	0.08	2	44/20	0.16		2 (BA)
PG0906	リボタンパク質、推定	PP/CY	1	42/22	0.48		5	97/20	0.40	0.05	1 (BB)
PG2173	外膜リボタンパク質 0mp28	PP/OM	8	109/22	0.77	0.1	12	89/18	0.71	0.04	1 (CC)
他のタンパク質											
PG0179	無名タンパク質 (保存)	PP/EX	1	64/22	1.23		1	61/19	3.55		3 (DF)
PG0181	免疫反応性 32kDa 抗原 PG49	PP/OM	4	46/20	2.08	0.84	1	31/21	3.14		2 (EF)
PG0217	無名タンパク質 f	OM	4	74/21	1.58	0.34	7	79/18	1.78	0.07	2 (DE)

【 0 1 2 9 】

10

20

30

40

【表 2 - 5】

Tigr #	タンパク質	生物学的反復測定 1				生物学的反復測定 2				特有のペプチドの総数	順位(群)c
		位置 a	# 定量 (quant) のためのペプチド数	Mascot スコア b	正規化比(B/P)c	SEd	# 定量のためのペプチド数	Mascot スコア	正規化比(B/P)		
PG0218	無名タンパク質	OM	4	61/20	2.10	0.55	11	55/20	1.59	0.17	2 (ED)
PG0287	無名タンパク質	IM/OM	3	77/21	1.32	0.06	7	53/20	1.90	0.21	2 (DE)
PG0409	無名タンパク質 (保存)	PP	4	82/22	2.20	0.38	2	69/19	2.28		1 (EE)
PG0423	無名タンパク質 (保存)	CY	2	90/23	3.62		1	72/21	0.68		4 (FB)
PG0452	無名タンパク質 (保存)	OM	1	53/20	0.39		3	81/20	0.40	0.11	1 (BB)
PG0448	無名タンパク質 (保存)	OM	11	74/22	1.05	0.11	10	58/20	1.44	0.08	1 (DD)
PG0449	TPR トメインタンパク質	PP	2	68/23	1.28		1	64/18	1.19		1 (DD)
PG0602	無名タンパク質 (保存)	OM	3	63/21	0.65	0.07	1	37/21	NA**		NA
PG0914	無名タンパク質	OM	1	66/21	2.23		1	27/22	2.91		2 (EF)
PG1028	TPR トメインタンパク質	PP	2	78/21	0.37		5	70/19	0.48	0.08	1 (BB)
PG1035	無名タンパク質 (保存)	OM	1	42/21	0.31		5	62/21	1.16	0.16	4 (AD)
PG1304	無名タンパク質 (保存)	OM	3	52/20	2.80	1.00	1	34/20	2.93		2 (EF)
PG1356	無名タンパク質 (保存)	CY	2	60/21	0.31		1	43/21	0.12		1 (AA)
PG1382	無名タンパク質 (保存)	OM	3	63/21	1.89	0.29	1	51/21	4.43		2 (EF)
PG1493	無名タンパク質 (保存)	OM	6	67/22	1.85	0.15	8	79/17	2.20	0.17	1 (EE)
PG1621	無名タンパク質 (保存)	OM	2	51/21	1.10		4	60/21	0.42	0.05	2 (CB)
PG1684	無名タンパク質	EX/IM	1	58/22	1.25		1	73/20	0.79		2 (DC)
PG1715	無名タンパク質 (保存)	OM	4	51/20	1.10	0.04	13	71/20	0.97	0.14	2 (DC)
PG1881	無名タンパク質 (保存)	OM	2	49/22	0.61		4	48/19	0.82	0.16	1 (CC)
PG1889	無名タンパク質	CY	12	99/20	0.16	0.02	8	85/20	0.25	0.03	1 (AA)
PG2049	無名タンパク質	IM/CY	3	48/21	0.63	0.06	1	27/21	0.82		1 (CC)
PG2167	免疫反応性 53kDa 抗原 PG123	OM	7	64/20	2.84	0.73	4	45/20	2.26	0.06	1 (EE)
PG2168	無名タンパク質 (保存)	UN	3	47/21	4.90	1.97	4	74/21	2.04	0.14	2 (FE)
PG2174	無名タンパク質	OM	5	58/21	0.78	0.06	15	102/21	0.37	0.04	2 (CB)

【 0 1 3 0 】

10

20

30

40

【表 2 - 6】

a CELL O プログラムにより決定した位置。EX：細胞外、OM：外膜、IM：内膜、PP：ペリプラズム、CY：細胞質、UN：未知。

b 最大 M a s c o t ペプチドイオンスコア／同一性閾値

c 正規化比。B＝バイオフィルム、P＝浮遊。正規化プロセスは実験手順で説明した。

d S E＝平均の標準誤差

e 図 4 B で説明した順位付け及び群分け

f 本研究でのみ同定されたタンパク質

！ 3 つのペプチドのうち 1 つの未分解（unresolved）／重複のために、S E 測定を実施していない。

* これらのタンパク質の間における同一のペプチドの存在のために、得られた比は、これらのタンパク質のみに特有のペプチドに由来するものであった。括弧内の値は、適合したペプチドの総数である。

** 未分解／重複ピークのため。

10

20

30

40

【表 3 - 1】

表 3. ヘム過剰と比較してヘム制限における増殖時のポルフィロモナス・ジンジバリスでのグルタミン酸／アスパラギン酸異化に関するタンパク質を
る遺伝子産物のプロテオーム解析及びトランスクリプトーム解析。網掛けは、オペロン中にコードされることが予測されるタンパク質を
示す。

No	Tigr Acc#	同定したタンパク質及びペプチドの配列	スコア ¹	N ²	n-ICA T ³	プロテオ ームのフ ォールト 変異 ⁴	SD (±)	トランスクリ プトームのフォ ールト変異	トランスクリ プトーム のP値
1	PG0329	ホムイミトランスフェラーゼ・シクロデアミナーゼ・関連タンパク質 ・ IMEC*VPNFSEGR	30/14	2	1	2.9	-	NS ⁵	
2	PG0548	ヒールン酸フェルト・キシノフラボ・トキシノキシト・レダ・クタ・ゼ・ファミリータンパク質 ・ IAGELLPC*VFHVSAR	33/15	1	1	2.0	-	NS	
3	PG0687	コハク酸-セミアルデヒド・デヒド・ロゲナーゼ ・ AFDNGIIC*SGEQSIYNEADK ・ C*SAHAVR ・ EYQATHNQEAVDNIC*R ・ GVGAEDVIC*K ・ NHGAYFC*DEAGDR ・ TC*NAIIIIAPHR	37/18 22/16 18/13 43/13 53/14 66/13	27	6	4.0	1.6	1.77	0.066
4	PG0689	NAD依存性4-ヒド・ロキシ酪酸・ヒド・ロゲナーゼ ・ ELIIVPTTC*GTGSEVTNISIAEIK ・ ILNC*QPEYVYPK ・ LDELLGC*LLTK	35/19 41/18 35/14	12	3	2.8	0.8	1.93	8.892 E-05
5	PG0690 ⁶	4-ヒド・ロキシ酪酸-CoAトランスフェラーゼ						3.31	0.03
6	PG0691 ⁶	NiFU様タンパク質						1.60	0.0002
7	PG0692	4-ヒド・ロキシ・チリル-CoAデヒド・ラクター ・ AGNYMIDLLANVC*K ・ TASC*FQR	42/15 20/15	5	2	2.9	0.7	1.65	0.054
8	PG1067	仮説タンパク質 ・ TDISESAADVLDEPIVVC*R	64/14	2	1	2.4	-	NS	
9	PG1068	保存仮説タンパク質 ・ MLITAAIC*GAEVLK ・ AVC*PDVIIQPSTGGVGMTNDER	40/12 38/15	3	2	1.7	0.1	NS	

【表 3 - 2】

No	Tigr Acc#	同定したタンパク質及びペプチドの配列	入射 ¹	N ²	n-ICA T ³	プロテオ -ムのフ ォルト ⁴ 変化	SD (±)	トランスクリ プ ト-ム のP値
10	PG1076 ⁶	酪酸-アセチル-CoA トランスアセチル-ゼ						0.05
11	PG1076	アシル-CoA デヒド'ロゲ'ナ-ゼ、短鎖特異性 ・ LYC'AETAMDMTK ・ SIAQFQNTQFLADLQC'R	26/14 23/19	3	2	1.8	0.2	NS
12	PG1078	電子伝達ワレ'ンタン'ク質、αサブ'ユニット ・ VTAILC*GYK ・ TGLTADC*TSLEIGDER	22/15 55/15	5	2	2.0	0.4	NS
13	PG1079 ⁶	エノイル-CoA						1.3
14	PG1081	酢酸キ-ゼ' ・ VLVLC*GSSSVK ・ AC*EILGLDYDK ・ VBEC*IPLAPLHPANLK	42/14 29/15 42/14	9	3	3.5	0.9	NS
15	PG1082	ホル'トランス'セチラ-ゼ' ・ AAEVENPLYLGC*LIVK ・ GC*SVEDIYR	52/15 45/15	5	2	4.4	1.6	NS
16	PG1232	グルタミン酸デ'ヒド'ロゲ'ナ-ゼ'、NAD 特異性 ・ C*MLDLR ・ LRPESTGFGAVYFVQNMCK	28/14 54/15	10	2	2.3	1.2	NS
17	PG1271	オル'ニチン'アミ'ノトランス'フェラ-ゼ' ・ AVIIVC*DGNFHGR ・ YFDFLSAYSAVNQCHC*HPK	42/19 32/19	3	2	0.09	-	NS
18	PG1417	アミ'ロ'ラタ-ゼ' クラス I、嫌気性 ・ GQLPFC*QDTGTALILGK ・ HGASC*PYGCMGVSC*SADR	57/15 18/16	3	2	1.0	0.2	NS
19	PG1612	メチル'コリン-CoA デ'カル'キシラ-ゼ'、αサブ'ユニット ・ FNGQSVGIVANQPQVMAGC*LDSNASR ・ C*TNFGIDK	28/14 21/15	2	2	2.4	-	NS
20	PG1614	アミ'ロ'ラタ-ゼ'、鉄、硫黄タン'ク質 (FrdB) ・ MDELGFNGC*TNTR ・ APVYFDHDC'R	45/15 36/13	6	2	0.25	0.1	NS

【 0 1 3 3 】

10

20

30

40

【表 3 - 3】

No	Tigr Acc#	同定したタンパク質及びペプチドの配列	スコア ¹	N ²	n-ICA T ³	プロテオ- ムのフォ- ルト ⁴ 変化 ⁴	SD (±)	トランスクリプ- ト-ムのフォ- ルト ⁴ 変化	トランスクリ プ-ト-ム のP値
21	PG1615	アラニンドキチン酸、アラニンドキチン酸、アラニンドキチン酸 (FrdA) LAEVSNALIDQCVAQVPPAR	29/14	1	1	0.35	-	NS	
22	PG1741	アラニンドキチン酸、アラニンドキチン酸、アラニンドキチン酸 C*GLHEFNLPANQPGSSIMPGK VNPVPIPEVMNQIC*YK	24/14 20/15	4	2	1.0	0.2	NS	
23	PG1810	2-オキソグルタル酸、2-オキソグルタル酸、2-オキソグルタル酸 IADMLALLDGTCLVTR	54/16	3	1	2.5	0.5	NS	
24	PG1949	リンゴ酸、リンゴ酸、リンゴ酸 LTPNLC*LYDPFAVGLGVAEIR	35/15	3	1	1.0	0.2	NS	

1 最高のスコアとなったペプチドスコア/閾値スコア (P=0.05)
2 各タンパク質に関する独立のペプチド同定事象の総数
3 各タンパク質に関して同定された特有のICAT標識化ペプチドの数
4 フォールド変化における各タンパク質に関して定量された全ペプチドの平均比 (ヘム制限/過剰)
5 NS 統計的に有意な変化は検出されなかった。
6 マイクロアレイ解析でのみ同定された。
C* ICAT修飾システインを示す。

【 0 1 3 5 】

表4. バイオフィルム形成の抑制のための24種類のポリロモナス・ジンジバリスポリププチド。

Tigr #	タンパク質	予測される位置	比(B/P) 生物学的反復測定 ₁	比(B/P) 生物学的反復測定 ₂	順位(群)	7クセーション番号*	7クセーション番号版
CTD ファミリー-タンパク質							
PG0232	亜鉛加縛キシン ⁺ プロチン ⁺ -ゼ、CPG70	OM	1.67	2.53	3 (DF)	AAQ65462	AAQ65462.1
PG0553	細胞外プロチン ⁺ -ゼ、リシエン ⁺ プロチン ⁺ -ゼ前駆体 (API)	OM/EX	3.33	3.45	1 (FF)	AAQ65742	AAQ65742.1
PG2024	アルギニン特異的プロチン ⁺ -ゼ Arg1 ⁺ プロチン (RgpA)	OM	1.63	3.78	3 (DE)	AAQ66991	AAQ66991.1
	ハム結合						
PG0616	フォレトキシン、推定	PP/CY	2.23	3.69	2 (EF)	AAQ65800	AAQ65800.1
	ハムイオノム関連						
PG0350	インターリン関連タンパク質	OM/EX	1.99	4.27	2 (EF)	AAQ65561	AAQ65561.1
	アドヘン						
PG1837	ハムグリンチンタンパク質 HagA	OM	2.73	4.21	1 (FF)	AAQ66831	AAQ66831.1
	機能が未知のタンパク質						
PG1798	免疫反応性 46kDa 抗原 PG99	PP/EX	5.94	4.07	1 (FF)	AAQ66797	AAQ66797.1
輸送							
PG1414	TonB 連結外膜受容体、PG47	OM	3.81	3.69	1 (FF)	AAQ66469	AAQ66469.1
PG1551	HmuY タンパク質	OM	2.57	2.78	1 (DD)	AAQ66587	AAQ66587.1
PG1626	考え得る外膜関連タンパク質 P58 (推定ハム受容体タンパク質)	OM	2.37	3.68	2 (EF)	AAQ66654	AAQ66654.1
PG2008	TonB 依存性受容体、P90	OM	2.08	3.12	2 (EF)	AAQ66977	AAQ66977.1
機能が未知のタンパク質							
	内在性外膜タンパク質						
PG0613	考え得る外膜関連タンパク質 P23	EX	4.41	3.24	1 (FF)	AAQ65797	AAQ65797.1
PG0694	外膜タンパク質 40	OM	3.62	3.39	1 (FF)	AAQ65867	AAQ65867.1
PG0695	外膜タンパク質 41	OM	2.31	3.18	2 (EF)	AAQ65868	AAQ65868.1
	他のタンパク質						

【表 4 - 2】

Tigr #	タンパク質	予測される位置	比(B/P) 生物学的反復測定 ₁	比(B/P) 生物学的反復測定 ₂	順位(群)	アクセッション番号*	アクセッション番号版
PG0181	免疫反応性32kDa抗原 PG19	PP/OM	2.08	3.14	2(EF)	AAQ65416	AAQ65416.1
PG0218	無名タンパク質	OM	2.10	1.59	2(ED)	AAQ65449	AAQ65449.1
PG0914	無名タンパク質	OM	2.23	2.91	2(EF)	AAQ66051	AAQ66051.1
PG1304	無名タンパク質(保存)	OM	2.80	2.93	2(EF)	AAQ66377	AAQ66377.1
PG1382	無名タンパク質(保存)	OM	1.89	4.43	2(EF)	AAQ66444	AAQ66444.1
PG1493	無名タンパク質(保存)	OM	1.85	2.20	1(EE)	AAQ66538	AAQ66538.1
PG2167	免疫反応性53kDa抗原 PG123	OM	2.84	2.26	1(EE)	AAQ67117	AAQ67117.1
PG2168	無名タンパク質(保存)	UN	4.90	2.04	2(FE)	AAQ67118	AAQ67118.1
	エリトリン - 代謝						
PG1614	フマル酸レダクターゼ、鉄-硫黄タンパク質(frd B)	UN	0.15	0.19	1(AA)	AAQ66642	AAQ66642.1
PG1615	フマル酸レダクターゼ、フラビンタンパク質サブユニット(frdA)	UN	0.06	-	NA	AAQ66643	AAQ66643.1

* これらのアクセッション番号は、本明細書中で言及したポルフィロモナス・ジンジバリスタンパク質に関する配列を提供する。そのアクセッション番号に対応する配列は、参照により援用される。

【表 5】

表 5. ヘム過剰と比較してヘム制限において増殖したボルフィロモナス・ジンジバリスのプロテオーム解析及びトランスクリプトーム解析。網掛けは、オペロン中にコードされることが予測されるタンパク質を示す。

No	T i g r A c c #	同定したタンパク質及びベ プチドの配列	N 2	n - I C A T 3	プロテオ- ムの変化 ⁴	S D (±)	トランスクリプ トームのフォー ルド変化	トランスクリプ トームの P 値
13	PG06 44 ⁶	H t r E (T l a) T o n B 連結受容体					2. 0 5	1. 5 4 E - 0 4
18	PG15 52	H m u R . M N S D E L F E E 2 5 / 1 5 I T Y P G Y T I C * R	1	1	4. 0	-	3. 1 3	0. 0 0 3
21	PG10 19	仮説タンパク質 . T Y M I D T N D S 7 0 / 1 4 E N D C * I A R	2	1	2 5. 0	-	2. 5 7	0. 0 0 3
22	PG10 20 ⁶	保存仮説タンパク質、考え 得る外膜受容体タンパク質					3. 3 6	3. 0 E - 0 4

その他

33	PG18 74 ⁶	保存仮説タンパク質					1. 5 2	0. 0 5
34	PG18 75 ⁶	ヘモリシン A					1. 4 0	0. 0 5

- 1 最高のスコアとなったペプチドスコア/閾値スコア (P = 0. 0 5)
 - 2 各タンパク質に関する独立のペプチド同定事象の総数
 - 3 各タンパク質に関して同定された特有の I C A T - 標識化ペプチドの数
 - 4 フォールド変化における各タンパク質に関して定量された全ペプチドの平均比 (ヘム制限/過剰)
 - 5 N S 統計的に有意な変化は検出されなかった。
 - 6 マイクロアレイ解析でのみ同定された。
- C * I C A T 修飾システインを示す。

【表 6】

表 6. 3-チャネルフローセルシステムにおいて COMSTAT を使用して決定した、16 時間のボルフィロモナス・ジンジバリスのバ
イオフィームに対するオキサンテル添加の効果

	生物学的反復測定 1				生物学的反復測定 2				
	対照	12.5 μ M	低減%	125 μ M	低減%	対照	12.5 μ M	12.5 μ M	低減% ¹
総バイオマス (μ m ³ / μ m ²)	1.80	1.26 ^a	30.1	1.00 ^a	44.4	2.68	1.451 ^a	1.621 ^a	42.8
表面対生体体積比 (μ m ² / μ m ³)	1.50	2.04 ^a		2.27 ^b		1.86	2.331 ^a	2.541 ^a	
平均厚 (μ m)	1.16	0.70 ^a	39.7	0.43 ^a	63.2	1.80	0.911 ^a	0.891 ^a	49.9
平均微小コロニー (ピクセルによる、最小500)	21.2	17.4		20.8		24.8	18.4	19.2	
平均微小コロニー面積 (μ m ²)	235.26	147.65 ^a	37.2	115.42 ^a	50.94	180.62	119.571 ^a	104.881 ^a	37.9

¹ 対照試料に対する両方の反復測定の平均値に基づく低減の百分率。

^a 対照と比較して $P < 0.01$

^b 対照と比較して $P < 0.05$

【表 7】

表 7. 50 時間にわたるボルフィロモナス・ジンジバリス W50 の増殖に対するオキサニテル、モランテル又はチアベンダゾールの効果

	MIC	MGT h ⁻¹ (DMSO)	MGT h ⁻¹ (31.25 μM)	MGT h ⁻¹ (62.5 μM)
オキサニテル	112 μM	6.62	19.28	23.77
モランテル	2800 μM	6.85	10.97	11.28
チアベンダゾール	>3 mM*	6.25	6.80	6.22

* より高濃度の MIC は、3 mM を超えるチアベンダゾールの不溶性のために、決定することができなかった。

【 0 1 3 9 】

10

20

30

40

【表 8】

表 8. 50 時間にわたるボルフィロモナス・ジンジバリスATCC 33277 の増殖に対するオキシサントールの効果

	MIC	MGT h ⁻¹ (DMSO)	MGT h ⁻¹ (31.25 μM)	MGT h ⁻¹ (62.5 μM)
オキシサントール	125 μM	6.62	10.0	24.0

10

20

30

40

【表 9 - 1】

参照文献

1. Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., and Lappin-Scott, H. M. (1995) *Annu. Rev. Microbiol.* **49**, 711-745
2. Cvitkovitch, D. G., Li, Y. H., and Ellen, R. P. (2003) *J. Clin. Invest.* **112**(11), 1626-1632
3. Cochrane, D. M., Brown, M. R., Anwar, H., Weller, P. H., Lam, K., and Costerton, J. W. (1988) *J. Med. Microbiol.* **27**(4), 255-261
4. van Steenberg, T. J., Kastelein, P., Touw, J. J., and de Graaff, J. (1982) *J. Periodontal Res.* **17**(1), 41-49
5. Neiders, M. E., Chen, P. B., Suido, H., Reynolds, H. S., Zambon, J. J., Shlossman, M., and Genco, R. J. (1989) *J. Periodontal Res.* **24**(3), 192-198
6. Griffen, A. L., Becker, M. R., Lyons, S. R., Moeschberger, M. L., and Leys, E. J. (1998) *J. Clin. Microbiol.* **36**(11), 3239-3242
7. Cutler, C. W., Arnold, R. R., and Schenkein, H. A. (1993) *J. Immunol.* **151**(12), 7016-7029
8. Chen, T., Hosogi, Y., Nishikawa, K., Abbey, K., Fleischmann, R. D., Walling, J., and Duncan, M. J. (2004) *J. Bacteriol.* **186**(16), 5473-5479
9. Davey, M. E. (2006) *Periodontol.* **2000** **42**, 27-35
10. Orme, R., Douglas, C. W., Rimmer, S., and Webb, M. (2006) *Proteomics* **6**(15), 4269-4277
11. Rathsam, C., Eaton, R. E., Simpson, C. L., Browne, G. V., Valova, V. A., Harty, D. W., and Jacques, N. A. (2005) *J Proteome Res* **4**(6), 2161-2173
12. Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., and Davies, D. G. (2002) *J. Bacteriol.* **184**(4), 1140-1154
13. Ong, S. E., and Mann, M. (2005) *Nat. Chem. Biol.* **1**(5), 252-262
14. Bender, M. L., and Kemp, K. C. (1957) *J. Am. Chem. Soc* **79**, 116
15. Schnolzer, M., Jedrzejewski, P., and Lehmann, W. D. (1996) *Electrophoresis* **17**(5), 945-953
16. Yao, X., Freas, A., Ramirez, J., Demirev, P. A., and Fenselau, C. (2001) *Anal Chem* **73**(13), 2836-2842
17. Blonder, J., Hale, M. L., Chan, K. C., Yu, L. R., Lucas, D. A., Conrads, T. P., Zhou, M., Popoff, M. R., Issaq, H. J., Stiles, B. G., and Veenstra, T. D. (2005) *J. Proteome Res* **4**(2), 523-531
18. Qian, W. J., Monroe, M. E., Liu, T., Jacobs, J. M., Anderson, G. A., Shen, Y., Moore, R. J., Anderson, D. J., Zhang, R., Calvano, S. E., Lowry, S. F., Xiao, W., Moldawer, L. L., Davis, R. W., Tompkins, R. G., Camp, D. G., 2nd, and Smith, R. D. (2005) *Mol. Cell Proteomics* **4**(5), 700-709
19. Zang, L., Palmer Toy, D., Hancock, W. S., Sgroi, D. C., and Karger, B. L. (2004) *J. Proteome Res.* **3**(3), 604-612
20. Kuster, B., and Mann, M. (1999) *Anal. Chem.* **71**(7), 1431-1440
21. Takao, T., Hori, H., Okamoto, K., Harada, A., Kamachi, M., and Shimonishi, Y. (1991) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **5**(7), 312-315
22. Shevchenko, A., Chernushevich, I., Ens, W., Standing, K. G., Thomson, B., Wilm, M., and Mann, M. (1997) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **11**(9), 1015-1024
23. Gevaert, K., Staes, A., Van Damme, J., De Groot, S., Hugelier, K., Demol, H., Martens, L., Goethals, M., and Vandekerckhove, J. (2005) *Proteomics* **5**(14), 3589-3599

10

20

30

40

【表 9 - 2】

24. Chen, X., Cushman, S. W., Pannell, L. K., and Hess, S. (2005) *J. Proteome Res.* **4**(2), 570-577
25. Stockwin, L. H., Blonder, J., Bumke, M. A., Lucas, D. A., Chan, K. C., Conrads, T. P., Issaq, H. J., Veenstra, T. D., Newton, D. L., and Rybak, S. M. (2006) *J. Proteome Res.* **5**(11), 2996-3007
26. Lane, C. S., Wang, Y., Betts, R., Griffiths, W. J., and Patterson, L. H. (2007) *Mol. Cell Proteomics*
27. Korb, S., Schumann, M., Bittorf, T., and Krause, E. (2005) *Rapid Comm. Mass Spectrom.* **19**(16), 2259-2271
28. Bantscheff, M., Dumpelfeld, B., and Kuster, B. (2004) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **18**(8), 869-876
29. Jia, J. Y., Lamer, S., Schumann, M., Schmidt, M. R., Krause, E., and Haucke, V. (2006) *Mol. Cell Proteomics* **5**(11), 2060-2071
30. Miyagi, M., and Rao, K. C. (2007) *Mass Spectrom. Rev* **26**(1), 121-136
31. Veith, P. D., Talbo, G. H., Slakeski, N., Dashper, S. G., Moore, C., Paolini, R. A., and Reynolds, E. C. (2002) *Biochem. J.* **363**(Pt 1), 105-115
32. Qian, W. J., Liu, T., Monroe, M. E., Strittmatter, E. F., Jacobs, J. M., Kangas, L. J., Petritis, K., Camp, D. G., 2nd, and Smith, R. D. (2005) *J. Proteome Res* **4**(1), 53-62
33. Perkins, D. N., Pappin, D. J., Creasy, D. M., and Cottrell, J. S. (1999) *Electrophoresis* **20**(18), 3551-3567
34. Xia, Q., Hendrickson, E. L., Zhang, Y., Wang, T., Taub, F., Moore, B. C., Porat, I., Whitman, W. B., Hackett, M., and Leigh, J. A. (2006) *Mol. Cell Proteomics* **5**(5), 868-881
35. Quackenbush, J. (2001) *Nat. Rev. Genet.* **2**(6), 418-427
36. Yu, C. S., Chen, Y. C., Lu, C. H., and Hwang, J. K. (2006) *Proteins* **64**(3), 643-651
37. Richardson, A. J., Calder, A. G., and Stewart, C. S. (1989) *Letters in Applied Microbiology* **9**, 5-8
38. O'Toole, G. A., and Kolter, R. (1998) *Mol Microbiol* **28**(3), 449-461
39. Capestany, C. A., Kuboniwa, M., Jung, I. Y., Park, Y., Tribble, G. D., and Lamont, R. J. (2006) *Infect. Immun.* **74**(5), 3002-3005
40. Lopez-Ferrer, D., Ramos-Fernandez, A., Martinez-Bartolome, S., Garcia-Ruiz, P., and Vazquez, J. (2006) *Proteomics* **6** Suppl 1, S4-S11
41. Staes, A., Demol, H., Van Damme, J., Martens, L., Vandekerckhove, J., and Gevaert, K. (2004) *J Proteome Res* **3**(4), 786-791
42. Patwardhan, A. J., Strittmatter, E. F., Camp, D. G., 2nd, Smith, R. D., and Pallavicini, M. G. (2006) *Proteomics* **6**(9), 2903-2915
43. Smalley, J. W., Birss, A. J., McKee, A. S., and Marsh, P. D. (1993) *J Gen Microbiol* **139**(9), 2145-2150
44. McKee, A. S., McDermid, A. S., Baskerville, A., Dowsett, A. B., Ellwood, D. C., and Marsh, P. D. (1986) *Infect. Immun.* **52**(2), 349-355
45. Dashper, S. G., Butler, C. A., Lissel, J. P., Paolini, R. A., Hoffmann, B., Veith, P. D., O'Brien-Simpson, N. M., Snelgrove, S. L., Tsiros, J. T., and Reynolds, E. C. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**(30), 28095-28102
46. Li, J., Steen, H., and Gygi, S. P. (2003) *Mol. Cell Proteomics* **2**(11), 1198-1204
47. Dashper, S. G., Brownfield, L., Slakeski, N., Zilm, P. S., Rogers, A. H., and Reynolds, E. C. (2001) *J. Bacteriol.* **183**(14), 4142-4148
48. Hoskisson, P. A., and Hobbs, G. (2005) *Microbiology* **151**(Pt 10), 3153-3159

【表 9 - 3】

49. Piper, M. D., Daran-Lapujade, P., Bro, C., Regenber, B., Knudsen, S., Nielsen, J., and Pronk, J. T. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**(40), 37001-37008
50. Siroy, A., Cosette, P., Seyer, D., Lemaitre-Guillier, C., Vallenet, D., Van Dorsselaer, A., Boyer-Mariotte, S., Jouenne, T., and De, E. (2006) *J. Proteome Res.* **5**(12), 3385-3398
51. Hood, B. L., Lucas, D. A., Kim, G., Chan, K. C., Blonder, J., Issaq, H. J., Veenstra, T. D., Conrads, T. P., Pollet, I., and Karsan, A. (2005) *J Am Soc Mass Spectrom* **16**(8), 1221-1230
52. Yao, X., Afonso, C., and Fenselau, C. (2003) *J Proteome Res* **2**(2), 147-152
53. Eckel-Passow, J. E., Oberg, A. L., Therneau, T. M., Mason, C. J., Mahoney, D. W., Johnson, K. L., Olson, J. E., and Bergen, H. R., 3rd. (2006) *Bioinformatics* **22**(22), 2739-2745
54. Storms, H. F., van der Heijden, R., Tjaden, U. R., and van der Greef, J. (2006) *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**(23), 3491-3497
55. Zenobi, R., and Knochenmuss, R. (1998) *Mass Spectrom. Rev.* **17**(5), 337-366
56. Seers, C. A., Slakeski, N., Veith, P. D., Nikolof, T., Chen, Y. Y., Dashper, S. G., and Reynolds, E. C. (2006) *J. Bacteriol.* **188**(17), 6376-6386
57. Curtis, M. A., Kuramitsu, H. K., Lantz, M., Macrina, F. L., Nakayama, K., Potempa, J., Reynolds, E. C., and Aduse-Opoku, J. (1999) *J. Periodontal Res.* **34**(8), 464-472
58. O'Brien-Simpson, N. M., Paolini, R. A., Hoffmann, B., Slakeski, N., Dashper, S. G., and Reynolds, E. C. (2001) *Infect. Immun.* **69**(12), 7527-7534
59. O'Brien-Simpson, N. M., Veith, P. D., Dashper, S. G., and Reynolds, E. C. (2003) *Curr. Protein Pept. Sci.* **4**(6), 409-426
60. Abe, N., Kadowaki, T., Okamoto, K., Nakayama, K., Ohishi, M., and Yamamoto, K. (1998) *J. Biochem. (Tokyo)* **123**(2), 305-312
61. Potempa, J., Pike, R., and Travis, J. (1995) *Infect. Immun.* **63**(4), 1176-1182
62. Pathirana, R. D., O'Brien-Simpson, N. M., Brammar, G. C., Slakeski, N., and Reynolds, E. C. (2007) *Infect. Immun.* **75**(3), 1436-1442
63. Chen, Y. Y., Cross, K. J., Paolini, R. A., Fielding, J. E., Slakeski, N., and Reynolds, E. C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**(26), 23433-23440
64. Zhang, Y., Wang, T., Chen, W., Yilmaz, O., Park, Y., Jung, I. Y., Hackett, M., and Lamont, R. J. (2005) *Proteomics* **5**(1), 198-211
65. Sato, K., Sakai, E., Veith, P. D., Shoji, M., Kikuchi, Y., Yukitake, H., Ohara, N., Naito, M., Okamoto, K., Reynolds, E. C., and Nakayama, K. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**(10), 8668-8677
66. Nguyen, K. A., Travis, J., and Potempa, J. (2007) *J. Bacteriol.* **189**(3), 833-843
67. Dashper, S. G., Cross, K. J., Slakeski, N., Lissel, P., Aulakh, P., Moore, C., and Reynolds, E. C. (2004) *Oral Microbiol. Immunol.* **19**(1), 50-56
68. Lewis, J. P., Dawson, J. A., Hannis, J. C., Muddiman, D., and Macrina, F. L. (1999) *J. Bacteriol.* **181**(16), 4905-4913
69. Shi, Y., Ratnayake, D. B., Okamoto, K., Abe, N., Yamamoto, K., and Nakayama, K. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**(25), 17955-17960
70. Sroka, A., Sztukowska, M., Potempa, J., Travis, J., and Genco, C. A. (2001) *J. Bacteriol.* **183**(19), 5609-5616
71. Simpson, W., Olczak, T., and Genco, C. A. (2000) *J Bacteriol* **182**(20), 5737-5748
72. Lewis, J. P., Plata, K., Yu, F., Rosato, A., and Anaya, C. (2006) *Microbiology* **152**(Pt 11), 3367-3382

【 0 1 4 3 】

【表 9 - 4】

73. Olczak, T., Siudeja, K., and Olczak, M. (2006) *Protein Expr. Purif.* **49**(2), 299-306
74. Olczak, T., Simpson, W., Liu, X., and Genco, C. A. (2005) *FEMS Microbiol. Rev.* **29**(1), 119-144
75. Veith, P. D., Chen, Y. Y., and Reynolds, E. C. (2004) *Infect. Immun.* **72**(6), 3655-3657
76. Shibata, Y., Hiratsuka, K., Hayakawa, M., Shiroza, T., Takiguchi, H., Nagatsuka, Y., and Abiko, Y. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**(2), 351-356
77. Tatusov, R. L., Fedorova, N. D., Jackson, J. D., Jacobs, A. R., Kiryutin, B., Koonin, E. V., Krylov, D. M., Mazumder, R., Mekhedov, S. L., Nikolskaya, A. N., Rao, B. S., Smirnov, S., Sverdlov, A. V., Vasudevan, S., Wolf, Y. I., Yin, J. J., and Natale, D. A. (2003) *BMC Bioinformatics* **4**, 41
78. Ratnayake, D. B., Wai, S. N., Shi, Y., Amako, K., Nakayama, H., and Nakayama, K. (2000) *Microbiology* **146** 1119-1127
79. Smalley, J. W., Birss, A. J., McKee, A. S., and Marsh, P. D. (1991) *FEMS Microbiol. Lett.* **69**(1), 63-67
80. Dashper, S. G., Hendtlass, A., Slakeski, N., Jackson, C., Cross, K. J., Brownfield, L., Hamilton, R., Barr, I., and Reynolds, E. C. (2000) *J Bacteriol* **182**(22), 6456-6462
81. Takahashi, N., Sato, T., and Yamada, T. (2000) *J. Bacteriol.* **182**(17), 4704-4710
82. Takahashi, N., and Sato, T. (2001) *J Dent Res* **80**(5), 1425-1429
83. Litwin, C. M., and Calderwood, S. B. (1993) *Clin Microbiol Rev* **6**(2), 137-149
84. Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R., and Aebersold, R. (1999) *Mol. Cell Biol.* **19**(3), 1720-1730
85. Baughn, A. D., and Malamy, M. H. (2003) *Microbiology* **149**(Pt 6), 1551-1558
86. Macy, J., Probst, I., and Gottschalk, G. (1975) *J Bacteriol* **123**(2), 436-442
87. Baughn, A. D., and Malamy, M. H. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(7), 4662-4667
88. Mayrand, D., and McBride, B. C. (1980) *Infect Immun* **27**(1), 44-50
89. Smith, M. A., Mendz, G. L., Jorgensen, M. A., and Hazell, S. L. (1999) *Int J Biochem Cell Biol* **31**(9), 961-975
90. Kroger, A., Geisler, V., Lemma, E., Theis, F., and Lenger, R. (1992) *Archives of Microbiology* **158**(5), 311-314
91. Shah, H., and Williams, R. (1987) *Current Microbiology* **15**, 241-246
92. Klein, R. A., Linstead, D. J., and Wheeler, M. V. (1975) *Parasitology* **71**(1), 93-107
93. Turrens, J. F. (1989) *Biochem J* **259**(2), 363-368
94. Mendz, G. L., Hazell, S. L., and Srinivasan, S. (1995) *Arch Biochem Biophys* **321**(1), 153-159
95. Mendz, G. L., Meek, D. J., and Hazell, S. L. (1998) *J Membr Biol* **165**(1), 65-76
96. Mileni, M., MacMillan, F., Tziatzios, C., Zwicker, K., Haas, A. H., Mantele, W., Simon, J., and Lancaster, C. R. (2006) *Biochem J* **395**(1), 191-201
97. Nealson, K., and D, S. (1994) *Annual review of microbiology* **48**, 311-343
98. Sellars, M. J., Hall, S. J., and Kelly, D. J. (2002) *J Bacteriol* **184**(15), 4187-4196
99. O'Toole, G. A., Gibbs, K. A., Hager, P. W., Phibbs, P. V., Jr., and Kolter, R. (2000) *J Bacteriol* **182**(2), 425-431
100. Whiteley, M., Bangera, M. G., Bumgarner, R. E., Parsek, M. R., Teitzel, G. M., Lory, S., and Greenberg, E. P. (2001) *Nature* **413**(6858), 860-864
101. Romeo, T., Gong, M., Liu, M. Y., and Brun-Zinkernagel, A. M. (1993) *J Bacteriol* **175**(15), 4744-4755

【 0 1 4 4 】

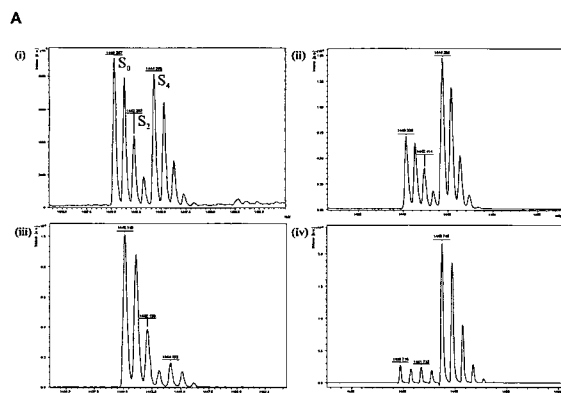
【表 9 - 5】

102. Sabnis, N. A., Yang, H., and Romeo, T. (1995) *J Biol Chem* **270**(49), 29096-29104
103. Mercante, J., Suzuki, K., Cheng, X., Babitzke, P., and Romeo, T. (2006) *J Biol Chem* **281**(42), 31832-31842
104. Altier, C., Suyemoto, M., and Lawhon, S. D. (2000) *Infect Immun* **68**(12), 6790-6797
105. Lawhon, S. D., Frye, J. G., Suyemoto, M., Porwollik, S., McClelland, M., and Altier, C. (2003) *Mol Microbiol* **48**(6), 1633-1645
106. Hefford, M. A., D'Aoust, S., Cyr, T. D., Austin, J. W., Sanders, G., Kheradpir, E., and Kalmokoff, M. L. (2005) *Can. J. Microbiol.* **51**(3), 197-208
107. Pancholi, V., and Fischetti, V. A. (1992) *J. Exp. Med.* **176**(2), 415-426
108. Taylor, J. M., and Heinrichs, D. E. (2002) *Mol. Microbiol.* **43**(6), 1603-1614
109. Maeda, K., Nagata, H., Yamamoto, Y., Tanaka, M., Tanaka, J., Minamino, N., and Shizukuishi, S. (2004) *Infect. Immun.* **72**(3), 1341-1348
110. Gustavsson, N., Diez, A., and Nystrom, T. (2002) *Mol. Microbiol.* **43**(1), 107-117
111. Kvint, K., Nachin, L., Diez, A., and Nystrom, T. (2003) *Curr. Opin. Microbiol.* **6**(2), 140-145
112. Kuramitsu, H. K., Chen, W., and Ikegami, A. (2005) *J. Periodontol.* **76**(11 Suppl), 2047-2051

10

【図 1】

Figure 1



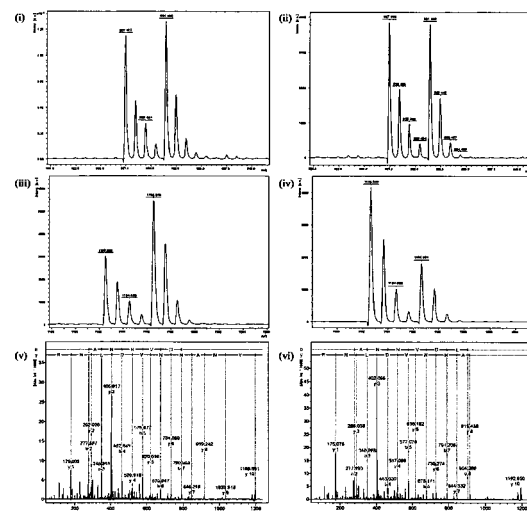
B

(1 : 1) (2 : 1) (1 : 5) (10 : 1)



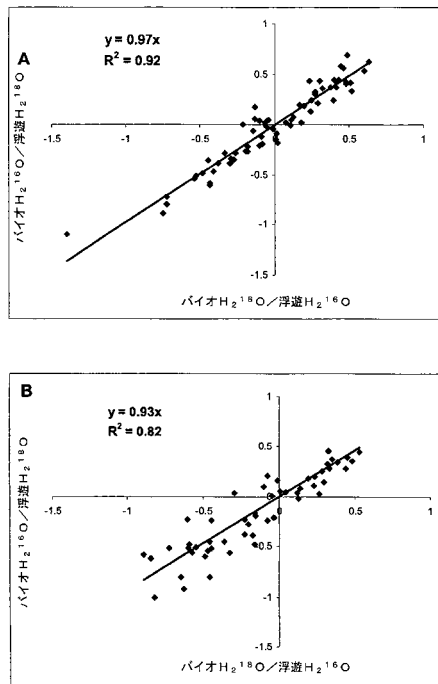
【図 2】

Figure 2



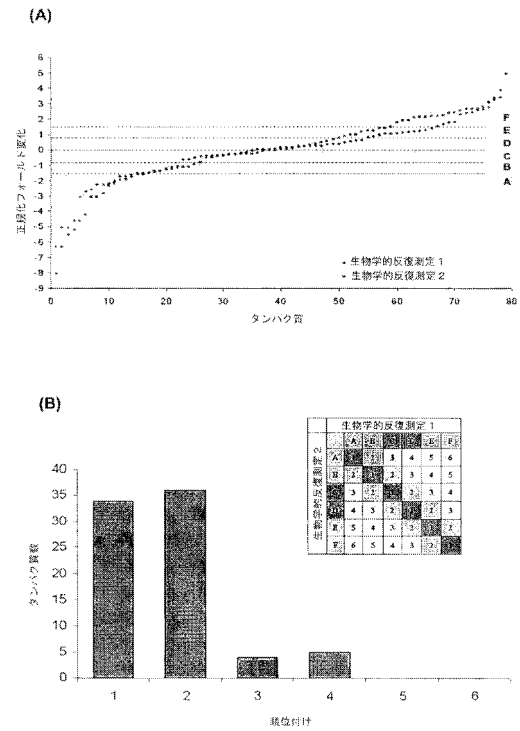
【図 3】

Figure 3



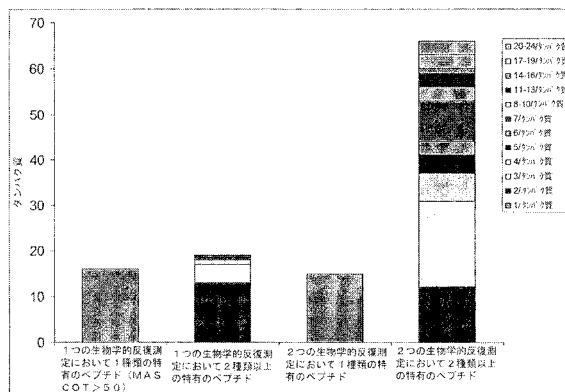
【図 4】

Figure 4



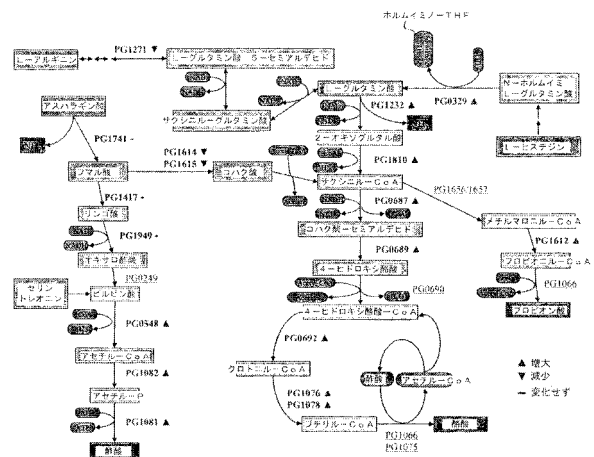
【図 5】

Figure 5



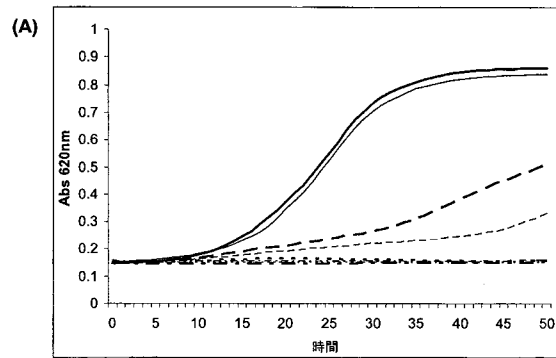
【図 6】

Figure 6



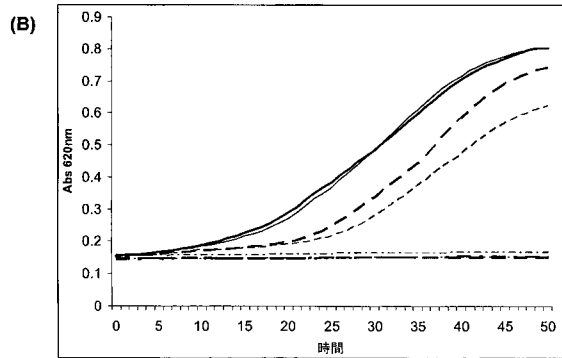
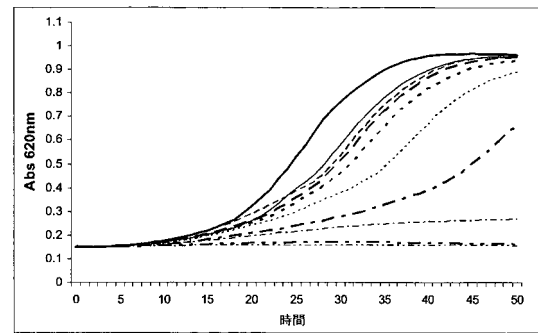
【 図 7 】

Figure 7



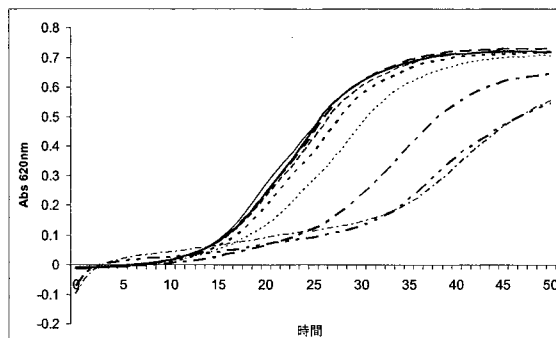
【 図 8 】

Figure 8



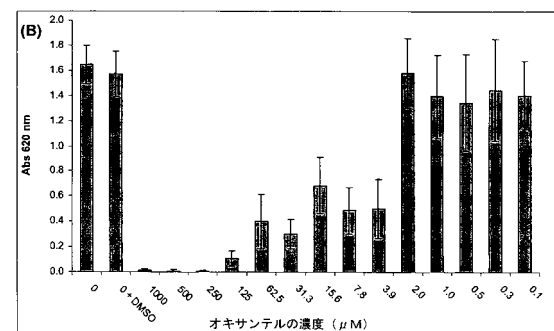
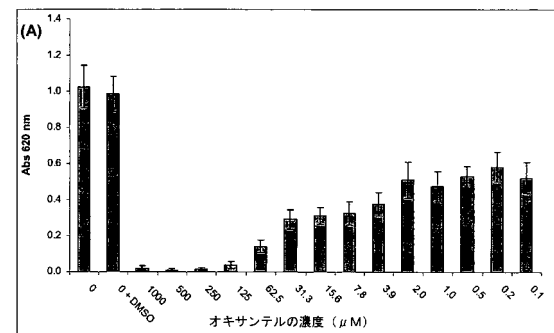
【 図 9 】

Figure 9



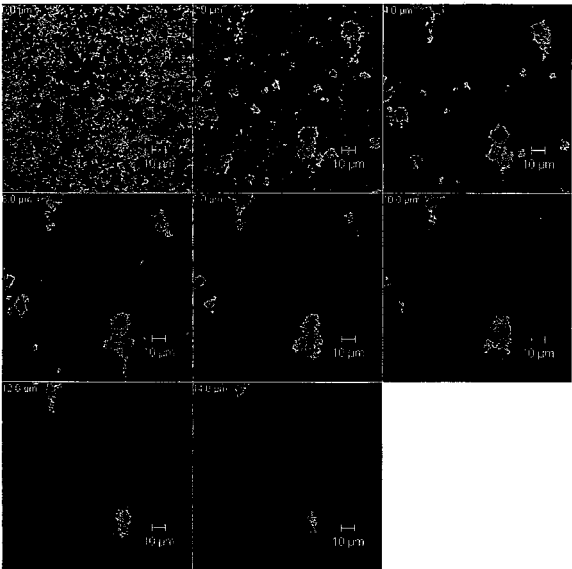
【 図 10 】

Figure 10



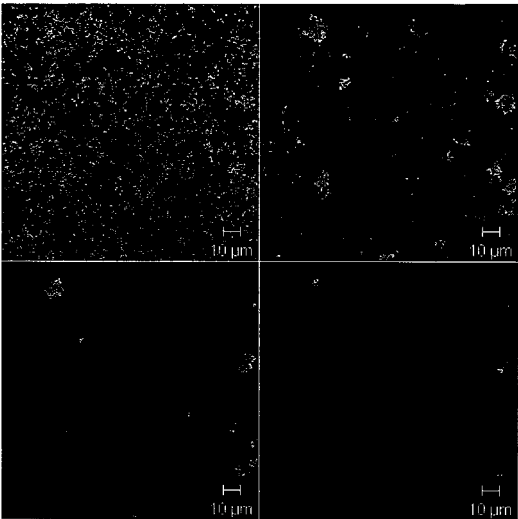
【 図 1 1 】

Figure 11



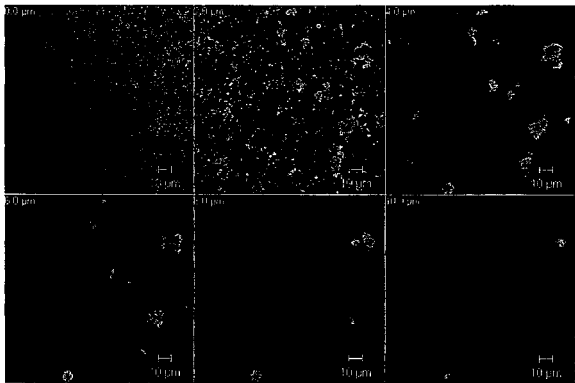
【 図 1 2 】

Figure 12



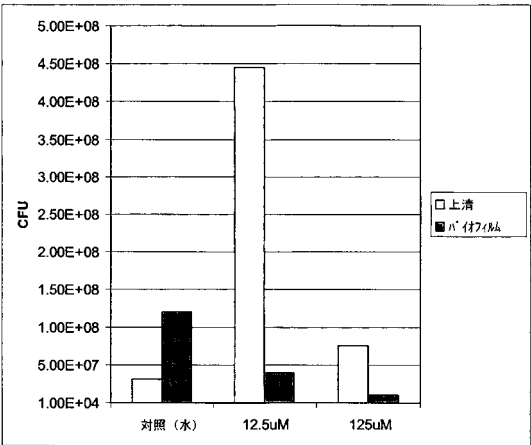
【 図 1 3 】

Figure 13



【 図 1 4 】

Figure 14



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
 A 6 1 K 8/49 (2006.01) A 6 1 K 8/49
 A 6 1 Q 11/00 (2006.01) A 6 1 Q 11/00

(72)発明者 ダッシュパー スチュアート ジョフリー
 オーストラリア国 3 0 5 3 ビクトリア カールトン スワンストン ストリート 7 2 0 ザ
 ユニバーシティ オブ メルボルン
 (72)発明者 レイノルズ エリック チャールズ
 オーストラリア国 3 0 5 3 ビクトリア カールトン スワンストン ストリート 7 2 0 ザ
 ユニバーシティ オブ メルボルン
 (72)発明者 ベイス ポール デイビッド
 オーストラリア国 3 0 5 3 ビクトリア カールトン スワンストン ストリート 7 2 0 ザ
 ユニバーシティ オブ メルボルン
 (72)発明者 アン チン ソン
 オーストラリア国 3 0 3 1 ビクトリア ケンジントン アルтна ストリート 8 4 ユニッ
 ト 2 0 5

審査官 関 景輔

(56)参考文献 英国特許出願公開第0 2 3 8 1 4 4 9 (G B , A)
 国際公開第9 4 / 0 2 7 6 0 6 (W O , A 1)
 国際公開第2 0 0 8 / 0 0 0 0 2 8 (W O , A 1)
 国際公開第0 2 / 1 0 2 3 7 0 (W O , A 1)
 米国特許第0 6 7 2 6 8 9 8 (U S , B 1)
 米国特許出願公開第2 0 0 7 / 0 0 9 8 6 4 9 (U S , A 1)
 国際公開第2 0 0 5 / 0 1 9 2 4 9 (W O , A 1)
 米国特許第0 7 2 0 4 9 9 1 (U S , B 1)
 Oral Diseases , 2 0 0 0 年 , 6 , p.297-302
 INFECTION AND IMMUNITY , 2 0 0 6 年 , vol. 74, no. 10 , p.5756 - 5762
 JOURNAL OF BACTERIOLOGY , 2 0 0 0 年 , vol. 182, no. 17 , p.4704 - 4710
 ARCHIVES OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS , 1 9 9 5 年 , vol. 321, no. 1 , p.153 - 159

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
 A 6 1 K 3 1 / 5 0 5
 A 6 1 K 8 / 4 9
 A 6 1 K 3 1 / 4 2 7
 A 6 1 K 3 1 / 5 0 6
 A 6 1 K 4 5 / 0 0
 A 6 1 P 3 1 / 0 4
 A 6 1 Q 1 1 / 0 0
 C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)