

令和元年5月24日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05504

研究課題名(和文)バクテロイディア科細菌線毛の形成モデル X線結晶構造解析と分子再構成実験

研究課題名(英文)Formation model of Bacteroidia bacteria pilus-X-ray crystal structure analysis and molecular reconstruction experiment-

研究代表者

中山 浩次(NAKAYAMA, Koji)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員

研究者番号：80150473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：Porphyromonas gingivalisは慢性歯周炎の最重要原因細菌である。本菌は歯周局所への付着に關与する線毛を有している。本線毛には2種類あり、Fim線毛とMfa線毛という。両線毛ともそれらを構成するタンパク質がリポタンパク質輸送系で菌体表面まで運ばれることを以前の私たちの研究で明らかにしてきた。本研究ではそれらの構成タンパク質の重合様式について、X線結晶構造解析、クライオ電子顕微鏡解析等を用い、C末端をドナー鎖とするドナー交換反応にて重合していることを明らかにした。この線毛形成機構はいままで線毛形成機構として報告されたものとは全く異なることから5型線毛と命名された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本では歯周病は40歳以上の成人の半数以上が罹患している慢性感染症であり、その原因は口腔内の細菌である。そのなかでもPorphyromonas gingivalisは最重要原因細菌であり、本菌の歯周病原性の理解は歯周病の治療あるいは予防のうえで重要と考えられる。本研究では本菌のもつ病原因子のなかで歯周局所への付着に關与する線毛についてその形成機構を詳細に解析した結果、いままで線毛形成機構として報告されたものとは全く異なる機構であることがわかった。この研究成果は今後、線毛の形成阻害をおこす方法、引いては本菌の歯周病原性を武装解除する方法を開発するうえで重要な知見を与えた。

研究成果の概要(英文)：Porphyromonas gingivalis is the most important pathogen of chronic periodontitis. This bacterium has pilus involved in adhesion to the periodontal area. There are two types of pili: Fim pili and Mfa pili. Previous studies have shown that the proteins that make up both pili are transported to the cell surface by the lipoprotein transport system. In this study, it was clarified that the polymerization mode of these constituent proteins was polymerized by donor exchange reaction with C-terminal as donor chain using X-ray crystal structure analysis, cryo-electron microscopic analysis, etc. This pilus formation mechanism is named 5 type pilus because it is completely different from what has been reported as the pilus formation mechanism so far.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：線毛 付着 細菌 歯周病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病関連細菌の最重要細菌としてグラム陰性偏性嫌気性細菌である *Porphyromonas gingivalis* が知られている。本菌の病原因子として、菌体表面にある強力なタンパク質分解酵素であるジンジパインと歯周局所への付着に与る線毛が特に有力視されている。本菌の線毛は Fim 線毛と Mfa 線毛がある。それぞれの線毛の主要構成タンパク質は FimA と Mfa1 であり、それらを含む遺伝子はそれぞれゲノム上の異なる位置でクラスターになっている。我々は FimA と Mfa1 が成熟化するために、アルギニン残基の C 末端でペプチド鎖を切断するジンジパインである Rgp が関わることを見出した (Nakayama et al. J. Bacteriol. 1996)。また、FimA や Mfa1 が菌体表面への輸送に際して、脂質による修飾が起こりリポタンパク質として輸送されること(リポタンパク質輸送系)も見出した (Shoji et al. Mol Microbiol. 2004)。さらに、米国スクリプス研究所等との共同研究で FimA および *Bacteroidetes* 門に属する細菌の推定 FimA 類似タンパク質の X 線結晶構造を明らかにし、重合の際には C 末端側がリンカーとして寄与する可能性を発見した。しかしながら、線毛が重合する際に、本当に C 末端側がリンカーとして寄与しているかについては、さらなる詳細な解析が望まれていた。

2. 研究の目的

目的は以下の 4 点である。

- (1) C 末端側ペプチドおよびその近傍に位置すると想定されるペプチド内のアミノ酸残基をシステインに置換した変異 FimA タンパク質を *P. gingivalis* で発現させた株を用いてクロスリンク実験を行い、C 末端側がドナー鎖として FimA タンパク質モノマーの重合がおこなわれているとの仮説を証明する。
- (2) 組換え FimA タンパク質と精製した Rgp を混和し、in vitro による線毛様構造作成を試み、その後、クライオ電子顕微鏡による詳細解析を行うことで線毛主要構成タンパク質の重合機構を明らかにする。
- (3) FimA は 6 種の型に分かれているが、1 型は健常時で分離される株に多く、2 型は病原性への関連があると報告されている。これまでに X 線結晶構造が明らかにされているのは 4 型のみである。本研究では、さらに 1 型(ATCC 33277 株由来)と 2 型(TDC60 株由来)の構造解析を試みる。それらの構造の差異を比較することで病原性に関わる分子内領域を明らかにする。
- (4) これまで、Fim 線毛のマイナータンパク質については、X 線結晶構造が明らかにされていないので、該当する FimC, FimD, FimE の構造解析を試み、主要線毛タンパク質 FimA との重合様式を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) Rgp の限定分解により形成された N 末端ドメインの空隙(A1 ストランドがあった部位)に、次の FimA タンパク質の open 構造の C 末端 A1' ストランドが嵌まり込むか否かを調べるために、in vivo Cys-Cys クロスリンク実験を行った。まず始めに FimA タンパク質にすでに存在する 3 つのシステイン残基をアラニンに置換した場合でも線毛形成に変化がないことをイムノプロット解析ならびに電子顕微鏡にて確認した。つぎに、結晶構造解析の結果から C 末端 A1' ストランドが N 末端ドメインの D1 と G1 ストランドの間に嵌まり込むのではないかと推測されたので、A1' ストランド内の 3 つのアミノ酸をシステインに置換し、先ほどの 3 つのアミノ酸に近接した D1 と G1 ストランド内にあるアミノ酸をシステインにそれぞれ置換した変異型 FimA タンパク質を発現

するプラスミドを作製した。*fimA* 変異株に各々のプラスミドを導入し変異型 FimA タンパク質を発現させた。もし、システイン残基どうしが近傍にある場合、過酸化水素処理によるジスルフィド形成によってモノマーへの解離が不十分なバンドがイムノブロット解析検出されると予想された。

- (2) 線毛主要構成タンパク質の重合機構を明らかにするため、大腸菌にて N 末端側にヒスタグを持つ組換え FimA タンパク質を発現し、TALON レジンによるアフィニティ精製により精製標品を得た。一方、*P. gingivalis* より His タグを有する RgpB (Prof. Potempa 教授より恵与) を TALON レジンにより精製した。その後、両者を混和し、in vitro による線毛様構造作成を試み、その後、クライオ電子顕微鏡による詳細解析を行った。
- (3) 1 型 (ATCC 33277 株由来) と 2 型 (TDC60 株由来) の FimA タンパク質について、大腸菌にて N 末端側にヒスタグを持つ組換え FimA タンパク質を発現し、TALON レジンによるアフィニティ精製により精製標品を得た。その後、X 線結晶構造解析を試みた。
- (4) ATCC 33277 株由来の FimC, FimD, FimE について、大腸菌にて N 末端側にヒスタグを持つ組換えタンパク質として発現し、TALON レジンによるアフィニティ精製により精製標品を得た。その後、X 線結晶構造解析を試みた。

4. 研究成果

- (1) A1' ストランド内の 3 つのアミノ酸をシステインに置換し、先ほどの 3 つのアミノ酸に近接した D1 と G1 ストランド内にあるアミノ酸をシステインにそれぞれ置換した変異型 FimA タンパク質を発現した株を過酸化水素で処理するとモノマーへの解離が不十分なバンドが検出された。この結果から FimA の N 末端ドメインの空隙 (A1 ストランドのあった部位) に次の FimA の C 末端先端のストランド A1' と A2' が嵌まり込むということが証明された。この研究成果は Cell 誌に発表された (Xu, Shoji et al. Cell 2016)。また、本論文中で FimA の構造と Fim 線毛の重合機構は既知の線毛のそれとは異なる、まったく新規な機構であることから 5 型線毛と命名した。
- (2) 大腸菌にて N 末端側にヒスタグを持つ組換え FimA タンパク質を過剰発現後、TALON レジンによるアフィニティ精製により精製標品を得た。一方、*P. gingivalis* より His タグを有する RgpB (Potempa 教授より恵与) を TALON レジンにより精製標品を得た。両者を混和した後、ポリエチレングリコール沈殿により、線毛様構造を示す重合産物を得ることに成功した。その後、沖縄科学技術大学院大学のクライオ電子顕微鏡により、線毛様構造を大量に撮影した。得られた写真をシンメトリーによらない単粒子解析を行い、線毛様構造を解像度 3Å のレベルで明らかにすることができた。予想していたように、線毛様構造は FimA の C 末端側がドナー鎖となっていることがわかった。現在、この成果については論文を作成中である。
- (3) 1 型 (ATCC 33277 株由来) と 2 型 (TDC60 株由来) の FimA タンパク質について、大腸菌にて N 末端側にヒスタグを持つ組換え FimA タンパク質を発現し、TALON レジンによるアフィニティ精製により精製標品を得た後、X 線結晶構造解析を試みた。その結果、それぞれ 1 型 (ATCC 33277 株由来) については 2.1Å、2 型 (TDC60 株由来) については、1.6Å の解像度で決定することができた。それぞれの構造を当てはめたところ、6 つの部分に構造の違いを確認することができた。今後、そのうちのどの部分が病原性に関わるかを明らかにする予定である。

- (4) ATCC 33277 株由来の FimC, FimD, FimE について、大腸菌にて N 末端側にヒスタグを持つ組換えタンパク質として発現し、TALON レジンによるアフィニティ精製を行ったところ、FimC および FimE の精製標品を得ることができた。そのうち、FimC については、X 線結晶構造解析が良好に進んでいる。しかしながら、FimD については発現そのものに成功しておらず、さらなる検討を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

1. 中山浩次: バクテロイデーテス門細菌の IX 型分泌機構および V 型線毛の研究. 日本細菌学雑誌 72(4): 219-227, 2017 査読有り
2. 庄子幹郎: 歯周病制圧に向けた最新の歯周病細菌の病原機構について. 月刊細胞 49 (11): 538-541, 2017 査読無し
3. 庄子幹郎, 中山浩次: Bacteroidia 綱細菌群に存在する V 型線毛の形成機構. 臨床免疫・アレルギー科 66 (6): 641-646, 2016 査読無し
4. 庄子幹郎, 中山浩次: ヒトの腸において優勢な Bacteroidetes 門細菌に見い出された線毛の新しい形成機構. ライフサイエンス新着論文レビュー doi: 10.7875/first.author.2016.032 査読無し
5. Xu Q*, Shoji M*, Shibata S, Naito M, Sato K, Elsliger MA, Grant JC, Axelrod HL, Chiu HJ, Farr CL, Jaroszewski L, Knuth MW, Deacon AM, Godzik A, Lesley SA, Curtis MA, Nakayama K, Wilson IA: A Distinct Type of Pilus from the Human Microbiome. Cell 165(3):690-703, 2016
* Co-first author, doi: 10.1016/j.cell.2016.03.016. 査読有り

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 柴田敏史, 庄子幹郎, 中山浩次, Matthias Wolf: V 型線毛のクライオ電子顕微鏡を用いた構造解析, 第 91 回日本細菌学会総会, 福岡, 2018 年 3 月 {日本細菌学雑誌 73(1), p91, 2018}
2. Nakayama K: Type V pili in the *Bacteroidia* class bacteria. IGER International Symposium on Cell Surface Structures and Functions 2017, Nagoya, Japan, November, 2017 {program and abstract, p8}
3. Nakayama K: The type IX secretion, gliding motility and the type V pilus in *Bacteroidetes* bacteria. International Symposium on “Harmonized supramolecular motility machinery and its diversity”, Nagoya, Japan, September, 2017
4. Nakayama K: The type IX secretion system, gliding motility and the type V pilus in the *Bacteroidetes* phylum bacteria. The 13th Nagasaki-Singapore Medical Symposium/Leading Program International Symposium 2017, Nagasaki, Japan, May, 2017 {program and abstract, p27}
5. Nakayama K: *Porphyromonas gingivalis* type V pili. The third International Conference on *Porphyromonas gingivalis* and Related Species in Oral and Systemic Diseases (PgMelbourne2017), Melbourne, Australia, May, 2017 {program and abstract, p7-8}
6. 柴田敏史, 庄子幹郎, 中山浩次: *Porphyromonas gingivalis* の V 型線毛の試験管内再構成による構造解析, 第 90 回日本細菌学会総会, 仙台, 2017 年 3 月 {日本細菌学雑誌 72(1), p84, 2017}

7. 庄子幹郎, Qingping Xu, 柴田敏史, 内藤真理子, 佐藤啓子, Ian A. Wilson, 中山浩次: The type V pili in the Bacteroidia class bacteria: novel assembly mechanism, 第 90 回日本細菌学会総会, 仙台, 2017 年 3 月 {日本細菌学雑誌 72(1), p42, 2017}
8. 中山浩次: バクテロイデーテス門細菌の IX 型分泌機構および V 型線毛の研究, 第 90 回日本細菌学会総会, 仙台, 2017 年 3 月 {日本細菌学雑誌 72(1), p1-2, 2017}
9. Nakayama K: The type IX secretion, gliding motility and the type V pilus, Protein Secretion in Bacteria Conference 2016, Tampa, Florida, USA, November, 2016 {program and abstract, p53}
10. 庄子幹郎, Qingping Xu, 柴田敏史, 内藤真理子, 佐藤啓子, Ian A Wilson, 中山浩次: Bacteroidia 綱細菌に存在する線毛の新たな形成機構, 第 69 回日本細菌学会九州支部総会・第 53 回日本ウイルス学会九州支部総会, 宮崎, 2016 年 9 月
11. 庄子幹郎, Qingping Xu, 柴田敏史, 内藤真理子, 佐藤啓子, Ian A Wilson, 中山浩次: Structural and mechanistic into a distinct type of pilus, 第 58 回歯科基礎医学会学術大会, 札幌, 2016 年 8 月 {Journal of Oral Biosciences, Supplement, p126, 2016}
12. 庄子幹郎, Qingping Xu, 柴田敏史, 内藤真理子, 佐藤啓子, Ian A Wilson, 中山浩次: Biogenesis mechanism of the Type V pili present in the Bacteroidia class, 新学術領域研究「運動超分子が織りなす調和と多様性」第 4 回領域全体会議, 長崎, 2016 年 6 月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称: メンブレンヴェシクル

発明者: 中尾龍馬, 庄子幹郎, 中山浩次

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 2019-80136

出願年: 2019

国内外の別: 国内

取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

長崎大学歯学部 口腔病原微生物学

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/mmi/ob/>

長崎大学歯学部 歯周病基盤研究センター

<http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/perio/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 今田 勝巳

ローマ字氏名: (IMADA, Katsumi)

所属研究機関名：大阪大学
部局名：理学研究科
職名：教授
研究者番号（8桁）：40346143

研究分担者氏名：内藤 真理子
ローマ字氏名：(NAITO, Mariko)
所属研究機関名：長崎大学
部局名：医歯薬学総合研究科（歯学系）
職名：准教授
研究者番号（8桁）：20244072

研究分担者氏名：庄子 幹郎
ローマ字氏名：(SHOJI, Mikio)
所属研究機関名：長崎大学
部局名：医歯薬学総合研究科（歯学系）
職名：助教
研究者番号（8桁）：10336175

(2)研究協力者
研究協力者氏名：柴田 敏史
ローマ字氏名：(SHIBATA, Satoshi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。