

令和元年5月22日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11451

研究課題名(和文) 歯周病細菌特異的病原性LPSのO抗原鎖の組成と生合成機構の完全解明

研究課題名(英文) Complete analysis of the composition and biosynthesis mechanism of specific O-polysaccharides present in a periodontal pathogen's LPS

研究代表者

庄子 幹郎 (SHOJI, Mikio)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：10336175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000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として知られている。本菌は、病原タンパク質を9型分泌機構により菌体外に分泌する。分泌後、そのいくつかはA-LPSに共有結合し、菌体表面に把持される。本菌はA-LPSとO-LPSの二種類を有するが、それらの生合成機構は不明である。本研究では、両LPSのO多糖の生合成機構を解析した。

ゲノム情報から未だ解析していない14個の糖転移酵素について、その遺伝子変異株作製を試みた。得られた変異株の性状解析から、A-LPSとO-LPSにおけるそれぞれのO多糖生合成に関わる遺伝子を同定し、その生合成の順序を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は、歯周病細菌 Porphyromonas gingivalis の病原性プロテアーゼなどの分泌タンパク質が新規の分泌装置である9型分泌機構によって菌体表面に輸送されること、さらに、菌体表面に出たこれらのタンパク質は本菌特異的な病原性LPSのO多糖鎖に結合することで局在化すること、を見出していた。この病原性LPSのO多糖鎖については我々の知見と相反する報告があり、問題となっていた。本研究はその問題に取り組み、O多糖鎖の生合成機構を新規に提唱した。本研究成果は、将来の応用研究に展開させるうえで重要な基盤となる。

研究成果の概要(英文)： Porphyromonas gingivalis is known as a keystone pathogen of chronic periodontitis. This bacterium secretes many virulence proteins via the type 9 secretion mechanism (T9SS). Some of the T9SS cargo proteins are covalently bound to A-LPS and are anchored on the cell surface. This bacterium has two kinds of LPSs, A-LPS and O-LPS, however, their biosynthesis mechanism is unknown. In this study, we analyzed the biosynthesis mechanism of O polysaccharide of both LPSs.

About 14 glycosyltransferases that have not been characterized from genomic information, we tried to create their gene mutants. From the mutant study analysis, some genes involved in O-polysaccharide biosynthesis in A-LPS and O-LPS were identified, and the order of their biosynthesis was clarified.

研究分野：口腔病原微生物学分野

キーワード：歯周病関連細菌 リポ多糖

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が特に研究されている。オーストラリア・メルボルン大学の Reynolds らは、本菌のジンジパインを含む約 30 の外膜タンパク質の C 末端側には共通の C-terminal domain (CTD) が存在し、CTD は外膜への輸送に関わることを報告していた(Seers et al. J. Bacteriol. 2006)。彼らは、CTD 含有タンパク質は、菌体表面にて CTD がプロテアーゼにより切断された後、菌体表面への局在化が起こると報告していたが、その全容解明には至っていなかった(Glew et al. J. Biol. Chem. 2012)。イギリス・クィーンメアリー大学の Curtis らは、ジンジパインの一つである RgpA の酵素ドメインを抗原として作製されたモノクローナル抗体 mAb 1B5 は陰性荷電を O 多糖鎖にもつ A-LPS(4 つの単糖が多重に連結される O-LPS とは異なるもの)を認識することを報告していた(Curtis et al. Infect. Immun. 1999)。つまり、ジンジパインは A-LPS により菌体表面でアンカーされることを示唆していた。しかしながら、A-LPS を含む LPS の生合成機構については不明な点が多く、相反する報告もあったことから本研究課題を着想した。

2. 研究の目的

我々は、*P. gingivalis* の病原タンパク質が新規の分泌装置である 9 型分泌機構により輸送されること、分泌されたのち、そのいくつかが特異的な LPS である A-LPS に結合することで菌体表面に局在化することを見出していた。A-LPS の O 多糖鎖については、イギリス・Curtis グループによる組成分析の報告と我々の遺伝学的解析の報告で相反することがあり、問題となっていた。それ故、A-LPS を含む LPS の生合成機構と A-LPS の O 多糖鎖の組成を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) これまでに、本菌には 2 種類の組成の異なる O 多糖を持つ LPS が存在すると報告されており、それぞれ O-LPS、A-LPS と呼ばれている。このうち、CTD 含有タンパク質が菌体表面にアンカーされるのは A-LPS の存在に依存する。これまでに、トランスポゾン変異法等により A-LPS 生合成に関わる複数の遺伝子が同定されていた。しかしながら、まだ未同定の遺伝子も存在する可能性があった。そこで、*P. gingivalis* ATCC 33277 株のゲノム情報から未だ解析をしていない 14 個の糖転移酵素遺伝子に着目し、変異株作製を試みた。
- (2) *P. gingivalis* は血液寒天培地上で黒色コロニーを形成する。既に、A-LPS 生合成に関わる遺伝子変異株は黒色コロニー形成が減弱することが知られている。マリナートランスポゾン法を新規に用いて、黒色コロニー形成減弱株を分離し、その責任遺伝子の同定を試みた。本法により A-LPS 生合成に関わる新規遺伝子があるか否かを調べた。
- (3) これまでの我々の知見より、A-LPS の O 多糖には Wbp 経路の最終産物であるジアセチルグルクロン酸が含まれていることを予想している(Shoji et al. Sci Rep. 2014)。それ故、*P. gingivalis* の LPS を抽出し、その存在を検出できるかを調べた。A-LPS を抽出する為に温水フェノール法を使用するのであるが、A-LPS は CTD 含有タンパク質と結合しているためフェノール層に行く為、野生株を用いた場合には回収量のロスになっている可能性がある。それを回避する為に、9 型分泌機構の欠損株を親株として、LPS を回収した。具体的には、*porK*(A-LPS+ O-LPS+)、*porK* PGN_1239 (A-LPS+ O-LPS+)、*porK wbaP*((A-LPS- O-LPS+)、*porK* PGN_0361 (A-LPS- O-LPS+)株を嫌気下で大量培養して集

菌し LPS を抽出した後、O 多糖の組成解析を試みた。

4 . 研究成果

- (1) A-LPS の O 多糖の合成については、最初の糖転移酵素として WbaP (PGN_1896)、後期の糖転移酵素として GtfB (PGN_1251)が関わることを見出していた。しかしながら、それ以外の糖転移酵素については不明であった。*P. gingivalis* ATCC 33277 株のゲノム情報から未だ解析をしていない 14 個の糖転移酵素遺伝子について、変異株作製を試みた。その結果、4 個の遺伝子(PGN_1026, PGN_1651, PGN_1807, PGN_2087)については変異株が作製できなかった。残りの 10 個については変異株が作製できた。これらのうち、PGN_0361 (*gtfC*), PGN_1239 (*gtfD*), PGN_1240 (*gtfE*), PGN_1668 (*gtfF*)変異株は血液寒天培地上で黒色コロニー形成が減弱していた。これらの変異株は A-LPS を認識する抗体 (mAb 1B5)に全く反応しなかった。この表現型は A-LPS 生合成に関わることを示唆している。また、これら 4 個のうち、*gtfE* 変異株は LPS がラフ型であった。*gtfE* 変異株より抽出した LPS の分子量から GtfB の直前の糖転移酵素であることが示唆された。したがって、GtfE は A-LPS および O-LPS の両方の O 多糖合成に関わると推測された。一方、*gtfC* および *gtfF* 変異株の LPS はスムーズ型を示した。GtfC は GtfD のパラログであり、両者を変異すると LPS はラフ型を示し、その LPS の分子サイズより 2 番目の糖転移酵素であると示唆された。GtfD は大腸菌のラムノース転移酵素 WbbL の機能的ホモログであること、GtfC も弱い WbbL 様活性を示すことから、両 LPS の O 多糖の 2 番目の糖はラムノースであると考えている。GtfF については、A-LPS の O 多糖のどこに作用しているか不明である。これまでの知見と今回の結果から、A-LPS の O 多糖は細胞質内で、WbaP, GtfC, GtfE, GtfB の順序により主鎖の構造が構成され、VimF と GtfF により側鎖の構造が構成されるのではないかと考えている。一方、O-LPS の O 多糖については、WbaQ (PGN_1233), GtfD, GtfE, GtfB の順序により主鎖の構造が構成されると考えている(Shoji et al. Mol Oral Microbiol. 2018)。
- (2) *P. gingivalis* ATCC 33277 株にマリナートランスポゾンを導入し、血液寒天培地上で黒色コロニー形成が減弱した株を分離後、責任遺伝子の同定を行った。その結果、A-LPS 生合成に関わる遺伝子は 17 個同定された。それらの遺伝子はすべて既に報告されていた。本法により A-LPS 生合成に関わる新規遺伝子は得られなかった(Naito et al. Microbiol Immunol. 2019)。
- (3) 上述にあるように、*porK*(A-LPS+ O-LPS+), *porK* PGN_1239 (A-LPS+ O-LPS+), *porK wbaP*((A-LPS- O-LPS+), *porK* PGN_0361 (A-LPS- O-LPS+)株を嫌気下で大量培養して集菌し、LPS を抽出した。最初に、*porK* 変異株と *porK wbaP* 変異株由来の LPS を用いて、ABEE (4-アミノ安息香酸エチルエステル) 標識化法により単糖解析を試みた。その結果、これまでに報告されているような Gal, Glc, GalN, Rha の検出はできた。しかしながら、目的としているジアセチルグルクロン酸の検出はできなかった。ジアセチルグルクロン酸は構造が安定しているために単糖にまで分解できない可能性があると考えられた。そこで、トリフルオロメタンスルホン酸による分解により、ジアセチルグルクロン酸が検出されるか否かを継続して調べている。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

1. Naito M, Tominaga T, Shoji M, Nakayama K. PGN_0297 is an essential component of the type IX secretion system (T9SS) in *Porphyromonas gingivalis*: Tn-seq analysis for exhaustive identification of T9SS-related genes. *Microbiol Immunol.* 2019 63(1):11-20. doi: 10.1111/1348-0421.12665. 査読有り
2. Shoji M, Sato K, Yukitake H, Kamaguchi A, Sasaki Y, Naito M, Nakayama K. Identification of genes encoding glycosyltransferases involved in lipopolysaccharide synthesis in *Porphyromonas gingivalis*. *Mol Oral Microbiol.* 2018 33(1):68-80. doi: 10.1111/omi.12200. 査読有り
3. 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* 2017 49 (11): 538-541. 査読無し

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Yuko Sasaki, Mikio Shoji, Keiko Sato, Hideharu Yukitake, Mariko Naito, Koji Nakayama: Discovery of genes encoding glycosyltransferases in *Porphyromonas gingivalis* LPS synthesis(ポスター発表), International Symposium for Interface Oral Health Science 2019, Fujian Medical University, Fuzhou, China, January 11-12, 2019
2. 庄子幹郎, 佐藤啓子, 雪竹英治, 内藤真理子, 中山浩次: Glycosyltransferase-encoding genes involved in LPS synthesis in *Porphyromonas gingivalis*(ポスター発表), 第 91 回日本細菌学会総会, 2018 年 3 月 27 日 ~ 29 日, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市){*日本細菌学雑誌* 73(1), p126, 2018}
3. 庄子幹郎, 佐藤啓子, 雪竹英治, 内藤真理子, 中山浩次: *Porphyromonas gingivalis* LPS の合成に関わる 4 つの糖転移酵素遺伝子の発見(ポスター発表), 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 2017 年 9 月 16 日 ~ 18 日, 松本歯科大学(長野県・塩尻市){*Journal of Oral Biosciences*, Supplement, p360, 2017}
4. 内藤真理子, 庄子幹郎, 中山浩次: 高密度 Tn-seq 法による IX 型分泌機構関連遺伝子の探索(口頭発表), 第 70 回日本細菌学会九州支部総会・第 54 回日本ウイルス学会九州支部総会, 2017 年 9 月 8 日 ~ 9 日, 那覇市ぶんかテンプス館(沖縄県・那覇市)

〔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：橋本 雅仁

ローマ字氏名：(HASHIMOTO, Masahito)

所属研究機関名：鹿児島大学

部局名：理工学域工学系

職名：教授

研究者番号 (8 桁): 30333537

(2)研究協力者

研究協力者氏名：中山 浩次

ローマ字氏名：(NAKAYAMA, Koji)

研究協力者氏名：雪竹 英治

ローマ字氏名：(YUKITAKE, Hideharu)

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。