

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15776

研究課題名(和文) IX型分泌システムの二つの異なる制御系によるカスケード調節の解明

研究課題名(英文) Elucidation of cascade regulation by two different control systems of the type IX secretion system

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)・教授

研究者番号：80150473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病細菌ポルフィロモナス・ジンジバリスのIX型分泌装置(T9SS)を構成する成分タンパク質の発現調節を行うPorXY二成分制御系の調節機構を解析した。レスポンスレギュレータPorXはECFシグマ因子SigPと相互作用し、SigPがT9SSの成分タンパク質の遺伝子発現を調節していること、およびセンサーヒスチンキナーゼPorYはT9SSで分泌されるタンパク質の一つArtに支配されていることがわかった。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the regulatory mechanism of the PorXY two-component system that regulates the expression of component proteins constituting the type IX secretion system (T9SS) of the periodontal disease bacterium Porphyromonas gingivalis. It was found that the response regulator PorX interacts with the ECF sigma factor SigP, SigP regulates gene expression of T9SS component proteins, and Art, which is one of the T9SS cargo proteins, dominates the sensor histidine kinase PorY.

研究分野：口腔病原微生物学

キーワード：歯周病 細菌 分泌機構 発現調節

1. 研究開始当初の背景

私たちは歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* のジンジパインプロテアーゼなどの病原タンパク質の分泌機構 (IX 型分泌機構, T9SS) を発見した。T9SS は *P. gingivalis* ばかりでなく、バクテロイデーテス門の多くの細菌に存在する。いままでの私たちの研究から二成分制御系のセンサーヒスチジンキナーゼとレスポンスレギュレータと思われる PorY と PorX タンパク質が T9SS の成分タンパク質の発現を調節している可能性が示唆された。

2. 研究の目的

T9SS を構成する成分タンパク質は現在、15 個同定されているが、それらの大部分のタンパク質の発現調節については *porX* および *porY* 遺伝子が関与することがわかっているがその詳細については不明であった。今回、この発現調節に関わる PorY, PorX, ECF シグマ因子の一つである SigP タンパク質、さらに調節機構において PorY の上流に位置すると思われるタンパク質 Art について遺伝生化学的解析を行った。

3. 研究の方法

(1) *porX* 変異株での *sigP* 遺伝子の発現の有無を mRNA レベルとタンパク質レベルで調べる。(2) タンパク質レベルであれば、SigP タンパク質を分解しているプロテアーゼがなにかをプロテアーゼ変異株を用いて調べる。(3) PorX と SigP 間でどのような相互作用があるかを *in vivo* および *in vitro* で解析する。(4) SigP シグマ因子が T9SS 構成タンパク質の遺伝子のプロモータ領域に結合するかについてゲルシフト解析で調べる。(5) *sigP* 遺伝子の発現制御を調べる。(6) PorY センサーはなにを感知するか等、発現調節において PorY の上流に位置する因子について調べる。

4. 研究成果

(1) *P. gingivalis* における PorX および PorY の菌体内局在：菌体を破碎し、外膜画分、内膜画分、細胞質ペリプラズム画分に分離し、PorX および PorY に対する抗体を用いたイムノプロット解析を行ったところ、PorX は細胞質ペリプラズム画分に、PorY は内膜画分に存在することがわかった。PorY はアミノ酸

配列内に 2 つのトランスメンブレンドメインがあった。

(2) PorX と PorY との結合：PorX および PorY の組換えタンパク質を大腸菌にて産生させ、精製したタンパク質標品を用いて、表面プラズモン共鳴法により PorX と PorY との結合の有無を調べた結果、乖離定数 (K_D) が 1.409×10^{-6} M の結合を示した。この PorX と PorY の結合が特異的かどうかを調べるため、他のセンサーヒスチジンキナーゼである FimS との結合の有無を表面プラズモン共鳴法にて調べた。PorX は FimS とは結合しなかった。

(3) PorY の自己リン酸化と PorX へのリン酸基転移： $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ を用いて PorY の自己リン酸化と PorX へのリン酸基転移がおこるかどうかを調べた。その結果、1 分以内に PorY のリン酸化が生じること、さらに PorX の共存下では時間依存性に PorX へのリン酸基転移が生じることがわかった。これらの結果から PorX と PorY が二成分制御系のレスポンスレギュレータおよびセンサーヒスチジンキナーゼであることが示唆された。

(4) PorXY 二成分制御系は Mn^{2+} 依存性：一般的に二成分制御系の上記の反応には Mg^{2+} あるいは Mn^{2+} を必要とする。PorXY 二成分制御系では PorY の自己リン酸化は Mg^{2+} あるいは Mn^{2+} のいずれか PorX へのリン酸基転移には Mn^{2+} を必要とすることがわかった。

(5) ECF シグマ因子 SigP の関与：PorX の C 末端には DNA 結合ドメインが存在しない。一方、本菌の ECF シグマ因子の一つである SigP の欠損変異株は PorX 変異株および PorY 変異株と同様に T9SS によるタンパク質分泌が低下していた。そこでマイクロアレイ解析でどのような遺伝子が SigP によって制御されているかを調べたところ、PorX 制御下の遺伝子の多くが SigP によって制御されていること、さらにそのなかに PorT などの T9SS 構成遺伝子が多数含まれていることがわかった。さらに SigP はそれらの T9SS 構成遺伝子のプロモータ領域に結合することがゲルシフトアッセイでわかった。

(6) *porX* 欠失変異株での SigP タンパク質の消失：イムノプロット解析の結果、*porX* 欠失変異株では SigP タンパク質が完全に消失して

いることがわかった。*porX* 欠失変異株では *sigP* 遺伝子の転写は野生株と比較して減少していることがわかった。

(7)PorX と SigP の結合：in vivo での免疫沈降法および in vitro での表面プラズモン共鳴法を用いた解析から PorX は SigP と直接、結合することがわかった。

(8)T9SS によって分泌されるタンパク質 Art：現在、*P. gingivalis* T9SS によって分泌されるタンパク質は少なくとも 35 遺伝子産物であることが明らかになっている。そのなかの一つ、Art は約 24 kDa のタンパク質である。このタンパク質の C 末端領域を Halo タグと融合させたキメラ遺伝子を作製し、T9SS 構成タンパク質で外膜に位置する PorN の欠損株にてこのキメラ遺伝子を発現させた。DTBP にてクロスリンクを行ったのち、Halo-link レジンにて回収し、SDS-PAGE をおこない、抗 PorV 抗体にてイムノプロット解析を行った。その結果、Art の C 末端領域は PorV と結合することがわかった。この結果は Art の C 末端領域は T9SS によって分泌されるタンパク質のシグナル領域であることを強く示唆した。抗 Art 抗体を用いて *P. gingivalis* 野生株および各種の変異株の cell lysate について SDS-PAGE・イムノプロット解析を行ったところ、35~100 kDa の領域にスミアなバンドが野生株では検出された。また、T9SS 構成タンパク質の欠損株である *porK*, *porT* および *porU* 株、さらに A-LPS の欠損株である *porR* および *wbpB* 株では野生株でみられたスミアなバンドはみられなかった。この結果は Art タンパク質が T9SS で分泌され、菌体表面の A-LPS に結合することを示唆した。

(9)Art 欠損株の性状：*art* 欠失変異株 (*art*) およびその変異株にプラスミド性に野生型 *art* 遺伝子を導入した株 (*art/art⁺*) を作製し、それらの性状を解析した。本菌は血液寒天平板上で特徴的な黒色集落を形成するが、*art* 株は無色の集落を形成した。

art/art⁺ 株は野生株同様に黒色集落を形成した。T9SS 構成タンパク質である PorK, PorL, PorM について SDS-PAGE・イムノプロット解析を行ったところ、*art/art⁺* 株は野生株同様、検出されたが、*art* 株ではほとんど検

出できなかった。*porK*, *porL*, *porM* 遺伝子の mRNA を測定したところ、*art* 株は野生株の 20%以下であった。

(10)Art の X 線結晶構造解析：Art タンパク質の X 線結晶構造解析を行った。28 から 161 アミノ酸残基までの構造について分解能 1.4 Å で解析できた。その結果、Art はシートから成るイムノグロブリン様構造を呈していることがわかった。構造類似性のあるタンパク質を検索したところ、1 型線毛の FimH と構造類似性があることがわかった。FimH は 1 型線毛の先端にあり、宿主細胞表面の多糖体のマンノース残基に結合するタンパク質であることから Art についてもなんらかの物質と結合する可能性が示唆された。

(11) *art* 株からの黒色集落を形成する変異株の分離：*art* 株を血液寒天平板に塗抹するとある頻度で黒色集落が出現する。この表現型復帰株は PorK, PorL, PorM タンパク質が野生株同様に検出された。表現型復帰株の複数個についてゲノム解析を行ったところ、すべて *porY* 遺伝子に変異が生じていることがわかった。これらの変異により 204, 241 および 266 アミノ酸残基は他のアミノ酸に置換していた。また、これらの残基は PorY タンパク質の細胞質内ドメインに位置した。この変異 *porY* 遺伝子の一つをプラスミド性に *art* 株に導入した株では黒色集落を形成し、PorK, PorL, PorM タンパク質の発現が検出された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 1 件)

Kadowaki T, Yukitake H, Naito M, Sato K, Kikuchi Y, Kondo Y, Shoji M, Nakayama K. A two-component system regulates gene expression of the type IX secretion component proteins via an ECF sigma factor. Sci Rep. 2016, 6:23288. doi: 10.1038/srep23288. 査読有

[学会発表](計 4 件)

雪竹英治, 反田祐介, 門脇知子, 佐藤啓

子, 庄子幹郎, 内藤真理子, 今田勝巳,
中山浩次, A T9SS cargo protein
involved in regulation of the T9SS
expression in *Porphyromonas*
gingivalis(ポスター), 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)

中山浩次, Type IX secretion system in
the Bacteroidetes phylum (シンポジウ
ム・口頭発表), 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)

雪竹英治, 門脇知子, 内藤真理子, 佐藤
啓子, 庄子幹郎, 中山浩次,
Porphyromonas gingivalis IX型分泌機
構の調節メカニズムに関する分子の解析
(ポスター), 第90回日本細菌学会総会,
2017年3月19日~21日, 仙台国際セン
ター(宮城県・仙台市)

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(浅
川賞受賞講演・口頭発表), 第90回日本
細菌学会総会, 2017年3月19日~21日,
仙台国際センター(宮城県・仙台市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

取得年月日:

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/>
6. 研究組織

(1)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)・
教授

研究者番号: 80150473

(2)研究分担者

筑波(門脇) 知子 (TSUKUBA (KADOWAKI),
Tomoko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
准教授

研究者番号: 70336080

(3)連携研究者

雪竹 英治 (YUKITAKE, Hideharu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
技術職員

研究者番号: 30380984

(4) 連携研究者

庄子 幹夫 (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