

平成21年4月27日現在

研究種目： 基盤研究 (C)  
 研究期間： 2007～2008  
 課題番号： 19592151  
 研究課題名 (和文) 歯周病原細菌アドヘジン蛋白とその内部領域ペプチドを利用する創薬にむけた基礎的研究  
 研究課題名 (英文) Basic studies for drug discovery using adhesin domain protein and interdomain regional peptide of *Porphyromonas gingivalis*  
 研究代表者  
 坂井 詠子 (SAKAI EIKO)  
 長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教  
 研究者番号： 10176612

## 研究成果の概要：

歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の *rgp A* 遺伝子産物である HGP44 の N 末端アミノ酸を欠失させた変異蛋白を作成し、赤血球凝集活性を調べた。N 末端 20 アミノ酸を欠失すると血球凝集活性が消失したため、この領域が活性中心である可能性が考えられた。シアル酸のはずれた糖蛋白と結合しやすく、また赤血球凝集の強さが動物種によって異なることから GalB1-4GlcNAc の糖鎖を介して糖蛋白と結合している可能性が示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 歯学・機能系基礎歯科学

キーワード： 歯科薬理学

## 1. 研究開始当初の背景

歯周疾患は口腔内に限局した慢性感染症にとどまらず、動脈硬化、脳卒中、糖尿病、骨粗鬆症、妊婦の低体重児出産などの全身疾患と深い関わりがあることが明らかになってきていた。歯周疾患と全身疾患の改善を期待するためには、細菌側と標的となる宿主側の分子レベルでの解明が重要である。歯周疾患を引き起す病因菌としてグラム陰性嫌気性桿菌である *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) が深く関わっていることが

明らかにされていた。

我々は *P. gingivalis* のジンジパイン遺伝子群にコードされるアドヘジン蛋白である HGP44 のリコンビナントを作成し、以下のことを明らかにしていた。

- (1) HGP44 の全長型には赤血球凝集活性はない。
- (2) HGP44 の C 末端 57 アミノ酸が欠失した成熟型にはリコンビナント蛋白単独で赤血球凝集活性がある。
- (3) 成熟型 HGP44 にはフィブリノーゲン、ファイブロネクチン、ラミニンなどの細胞

外基質蛋白と結合するが、アルブミンとは結合しない。

- (4) C末端 57 アミノ酸のうち、特徴的に塩基性アミノ酸を多く含んだ領域のアミノ酸配列に基づいて合成したペプチドは赤血球凝集活性を阻害する。

これらの結果は、HGP44 の構造を介して宿主側の標的分子へ結合することを示している。その過程を阻害することができれば、本菌の口腔内への感染を阻止でき得ることを示唆している。本研究によって、HGP44 による凝集や接着の機構をさらに詳細に解明することが、歯周病治療ならびに歯周病に関連した全身疾患の改善にむけた創薬開発にとって重要な知見になると考えられた。

## 2. 研究の目的

- (1) HGP44 の構造上の活性中心を明らかにする。N 末端 99 アミノ酸中には塩基性アミノ酸が 1 個も存在しないという特徴的なアミノ酸配列をもつことから、この領域と血球凝集活性との関係を明らかにすることを目的とした。
- (2) また HGP44 の結合する蛋白が糖蛋白であることから、結合と糖鎖構造との関係を明らかにすることも目的とした。

## 3. 研究の方法

- (1) N 末端 99 アミノ酸の中には 13 個の酸性アミノ酸が存在している。この N 末端側から 20 アミノ酸残基ずつ短くした変異 HGP44 を作成し、活性を成熟型 HGP44 と比較する。

以前作成してある成熟型 HGP44 の遺伝子組換え体である pCR-BlantII-TOPO vector を template にして、制限酵素部位 (NdeI/XhoI) を付加したプライマーを設計し、PCR で目的の大きさの HGP44 遺伝子の増幅を行う。制限酵素で切断後、His tag を付加した蛋白として発現させたいので pET22b(+) vector に組換えて大腸菌 XL-1 Blue を形質転換する。塩基配列の確認を行い、正しく入っていれば、DNA を調整する。次に BL-21 を形質転換させて His-tag を C 末端に付加した HGP44 蛋白を大量に発現させる。Ni-NTA カラムを用いて蛋白の精製をおこなう。

成熟型 HGP44 と 4 種類の変異 HGP44 蛋白が精製される。

これらの蛋白を用いて、赤血球凝集活性の有無を成熟型と比較する。

フィブリノーゲン、ファイブロネクチンなどとの結合を成熟型 HGP44 と比較する。

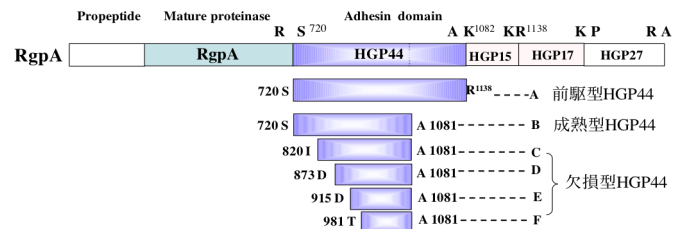
- (2) HGP44 の結合する標的分子について糖鎖構造を認識する可能性に重点をおいて以下の方法を行う。

スライドガラス上に糖鎖がスポットされた TaKaRa Glycoarray を用い、HGP44 蛋白を反応させ、以前我々が作製した HGP44 に対する特異抗体を用いて、糖鎖との結合があるか調べる。

フェツインやグライコホリンなどの糖蛋白が HGP44 による赤血球凝集活性を阻害するか、またこれらの糖蛋白の糖鎖構造と、その阻害の強さとの関係を調べる。HGP44 はヒト赤血球を凝集するが、他の動物種の赤血球に対する凝集活性を調べる。糖鎖構造を認識するレクチンを用い、赤血球膜上に存在する糖鎖構造を確認する。HGP44 が結合し、凝集できる動物の赤血球にはどのタイプの糖鎖が発現しているのか調べる。

これまでに我々は ELISA の結果から HGP44 がファイブロネクチンと結合することを明らかにしている。ファイブロネクチンの N 末端側には N 型糖鎖の付加するいわゆる 45kDa fragment が存在する。また C 末端よりには RGD 配列をもつ領域が存在する。さらにそれより C 末端に近いところにヘパリン結合ドメインが存在する。これらの領域への HGP44 の結合を調べる。

## 4. 研究成果



- (1) HGP44 の構造と活性との相関

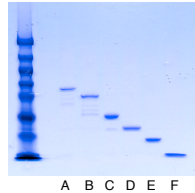
上図に示したように、

*P. gingivalis* の *rgpA* 遺伝子はオペロンを形成しておりプロテアーゼドメインである RgpA とアドヘジンドメインである HGP44、HGP15、HGP17、HGP27 をコードしている。これまでの研究から HGP44 が血球凝集ドメインではないかと予想されていたが、直接的に証明したものはなかった。*rgpA* 遺伝子産物のうち、720 番目セリンから 1138 番目アルギニンまでが HGP44 の領域であるが、菌体表面膜上に存在している膜蛋白質の MASS 解析から、HGP44 の C 末端が 1081 番目のアラニンで終わっていることが報告された。そこで、我々は 720 番目セリンから 1138 番目アルギニンまで

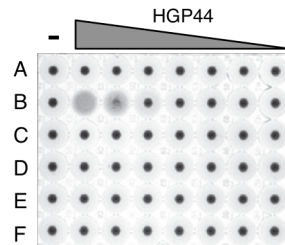
のHGP44（前駆型HGP44：A）、720番目セリンから1081番目アラニン（成熟型HGP44：B）を作成し、さらにN末端側を短く欠損させた欠損型として、N末端720番アミノ酸から819番目までを欠損させたC型、720番から872番目を欠損させたD型、914番目までを欠損させたE型、980番目までを欠損させたF型の4種類をまず作成した。

右に、その精製標品の電気泳動図を示す。

AからFまでのリコンビナントHGP44を精製することができた。これらのリコンビナントがヒト赤血球を凝集するか次に調べた。



右図にあるように赤血球の懸濁液を室温に放置しておくと、赤血球が沈降する。一番左の縦一列はHGP44を添加していないコントロールの列である。左から



2番目の列から各HGP44を濃い濃度から2倍希釈の系列で添加していくと、成熟型HGP44(B)のみに赤血球の凝集がみられた。N末端100アミノ酸を欠損させたC型ですでに凝集活性は全く認められなかった。C型よりさらに短いD型、E型、F型でも凝集は全く認められなかった。

N末端の100アミノ酸を欠損させると凝集活性がなくなることから、活性中心がこの100アミノ酸の中にあるのではないかと考えた。そこでN末端720番目セリンから20アミノ酸ずつ欠損させた変異HGP44を4種類、これまでと同様の方法で作成し、赤血球凝集活性があるのか調べた。その結果、最初の20アミノ酸が欠損しただけで赤血球凝集活性が消失することが明らかになった。HGP44のN末端から99番目までは酸性アミノ酸が13個あるものの塩基性アミノ酸は存在せず、100番目に始めて塩基性アミノ酸であるリジンがあることから、N末端99番目までは電氣的に負の電荷を帯びていると考えられる。この負に帯電していることが、HGP44と標的分子との結合に大きく影響しているのではないかと考えている。N末端99アミノ酸中、酸性アミノ酸が13個存在するなかで、20アミノ酸ま

でに酸性アミノ酸は4個存在する。21番目から40番目までにさらに酸性アミノ酸は4個存在し、この領域に負電荷が集中していることがわかる。今回の結果より、最初の4個の負電荷を欠損させるだけで、赤血球凝集活性が消失することが明らかになった。

赤血球凝集性と同様に、成熟型HGP44はファイブロネクチン、フィブリノーゲンなどの蛋白と結合することをELISAで明らかにした。これらの蛋白との結合も欠損型ではみられず、やはりN末端領域の重要性が確認された。

## (2) HGP44の標的分子とその結合様式の解明

成熟型HGP44は、赤血球膜上の標的となる分子と結合することで赤血球を凝集させると考え、赤血球表面に存在する標的分子の解明を行った。プロテアーゼを用いて特異的に膜蛋白を分解した時に、凝集がなくなることやHGP44と赤血球膜とのクロスリンク実験から、赤血球膜蛋白であるグライコホリンが標的分子の候補として考えられた。赤血球懸濁液にグライコホリンを添加しておく、成熟型HGP44による凝集が濃度依存的に抑制されることからグライコホリンが標的分子であることが確認された。

これまでに赤血球をシアリダーゼ処理すると *P. gingivalis* 菌体懸濁液による凝集やHGP44による凝集がより強くおこることは明らかになっていた。このことから、赤血球表面の糖鎖からシアル酸を除くことが重要であることが示唆されていた。グライコホリンは1本のN型糖鎖と複数のO型糖鎖をもつ糖蛋白であり、それぞれの糖鎖末端には負電荷をもつシアル酸が結合している。シアル酸のはずれたアシアログライコホリンを赤血球懸濁液に添加するとグライコホリンの量よりもさらに少ない量で強く凝集を阻害した。シアル酸の有無で赤血球凝集抑制の程度が大きく異なることから、他にもシアル酸を糖鎖の末端にもつ糖蛋白を用いて、糖鎖構造と凝集活性抑制効果との関係を調べた。

末端にシアル酸が結合した3本の枝分かれN型糖鎖と3本のO型糖鎖をもつフェツインはHGP44による赤血球凝集活性を阻害したが、シアル酸のはずれたアシアロフェツインはさらに少ない濃度で凝集を強く阻害した。糖蛋白ではあるが、2本のN型糖鎖のみを持つトランスフェリンは赤血球凝集を阻害できなかった。成熟型HGP44とフェツインとが結合することはELISAで確認でき、アシアロフェツインとはさらに強く結合した。赤血球膜蛋白ではないフェツインとHGP44が結合することは、グライコホリンやフェツインに共通した構造を認識しているものと考えられ、シアル酸のはずれた糖鎖と結合している可能

性が示唆された。このことは、HGP44 を介した結合が赤血球膜蛋白以外の分子とも起こりうることを示しており、ヒト口腔上皮細胞である HSC2 細胞に成熟型 HGP44 が結合する結果とも一致する。また、HGP44 の N 末端側の負電荷を介して標的分子と結合することが考えられたが、標的分子のもつシアル酸の負電荷がなくなることで、より結合が増強されることは理にかなっていると思われる。

HGP44 の結合する糖鎖構造を明らかにするため、TaKaRa Glycoarray を使用した。スライドガラス上に 24 種類の糖脂質がスポットしてあり、その上から成熟型 HGP44 を反応させ、洗浄後、HGP44 に対するウサギ抗 HGP44 polyclonal 抗体と反応させ、蛍光標識した 2 次抗体で確認したところ、Glucopsychosine との結合が濃度依存的に見られたが、この結合は HGP44 全長型でもみられたことから、特異的な結合とは考えにくい。GM1、GM2、Lactosylceramides、Galactocerebroside などの糖脂質との結合はみられなかった。糖鎖構造はもつものの糖脂質であったためか、この方法では HGP44 の結合する糖鎖構造を明らかにすることができなかった。

レクチンを用いた以前の研究から、赤血球表面の糖鎖構造は種によって異なることが示唆されていた。そこで、ヒト、ウマ、ウシ、モルモット、ニワトリの赤血球を用いて HGP44 による血球凝集の強さを比較した。ウマの赤血球は HGP44 では全く凝集されなかったため、ヒトとウマの赤血球表面の糖鎖構造を、レクチンを用いて比較した。ウマの赤血球は、ConA、LCA といったレクチンによって凝集することから、糖鎖末端にマンノースが比較的多く付加されている糖鎖が多いことがうかがえる。それに対して、ヒトの場合はウマと違って、RCA によって凝集されることから、末端の糖鎖には、GalB1-4GlcNAc の構造が多いと思われる。ウシ、モルモット、ニワトリも RCA によって共通に赤血球が凝集されることから、HGP44 は GalB1-4GlcNAc を介して赤血球に結合し凝集をおこす可能性が考えられる。

これまでに、HGP44 がフィブロネクチンと結合することを ELISA 法によって明らかにしている。フィブロネクチンは N 末端側からフィブリン・ヘパリン結合領域である約 23kDa fragment、N 型糖鎖がありコラーゲン結合領域である 45kDa fragment、105kDa fragment、RGD 配列をもつ細胞表面結合領域である 34kDa fragment、ヘパリン結合領域である 30kDa fragment、さらに C 末端の 22kDa fragment から構成されている。我々は、RGD 配列を持つ 34kDa fragment と、ヘ

パリン結合領域である 30kDa fragment のリコンビナント蛋白を持っていた。また、N 型糖鎖結合部位である 45kDa fragment はシグマより購入し、それぞれの蛋白と HGP44 との結合を ELISA で確認した。30kDa や 45kDa fragment との結合は殆どみられなかったのに対して、RGD 配列のある 34kDa fragment とは強い結合が認められた。34kDa fragment は大腸菌で発現させた GST 融合蛋白であり、糖鎖の付加はないと考えられる。この結果よりフィブロネクチンと HGP44 との結合は糖鎖を介さない結合である可能性を示唆している。また 45kDa 領域との結合もなかったことから、この領域の N 型糖鎖が結合に関与しているわけではないことが明らかになった。

以上より、本研究において HGP44 が糖鎖と結合する直接的な結果は得られなかった。しかしながら、シアル酸が除去された方が同じ糖蛋白であっても結合が強くなることから、糖鎖との結合は完全に否定されたものではない。シアル酸という負電荷を除去することによって、認識するアミノ酸配列（ひとつの候補としては RGD 配列）により近づくことができるようになったとも考えられる。

## 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 2 件)

- ①. Ishida Y., Hu J.P., Sakai E., Kadowaki T., Yamamoto K., Tsukuba T., Kato Y., Nakayama K., Okamoto K. Determination of active site of lysine-specific cysteine proteinase (Lys-gingipain) by use of a *Porphyromonas gingivalis* plasmid system. *Arch Oral Biol* 53(6), 538-544, 2008. 査読有り
- ②. Sakai E., Naito M., Sato K., Hotokezaka H., Kadowaki T., Kamaguchi A., Yamamoto K., Okamoto K., Nakayama K. Construction of recombinant hemagglutinin derived from the gingipain-encoding gene of *Porphyromonas gingivalis*, identification of its target protein on erythrocytes, and inhibition of hemagglutination by an interdomain regional peptide. *J. Bacteriol.* 189(11), 3977-3986, 2007. 査読有り

[学会発表] (計 1 件)

中山浩次：歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* の赤血球凝集機構の解析、第 39

回九州微生物研究会、2007年、12月、福岡

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

坂井 詠子

長崎大学・医歯薬学総合研究科  
助教

10176612

### (2) 研究分担者

中山 浩次

長崎大学・医歯薬学総合研究科  
教授

80150473

岡元 邦彰

長崎大学・医歯薬学総合研究科  
准教授

10311846

内藤 真理子

長崎大学・医歯薬学総合研究科  
准教授

20244072

### (3) 連携研究者

なし