

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：平成 19 年度 ~ 平成 20 年度
 課題番号：19791358
 研究課題名 (和文) 歯周病原細菌の病原因子タンパクのメンブレン・トラフィックング
 研究課題名 (英文) The transporter related proteins of gingipains in *Porphyromonas gingivalis*
 研究代表者
 佐藤啓子 (SATO KEIKO)
 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
 研究者番号：70410579

研究成果の概要：歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* が産生するシステインプロテアーゼであるジンジパインは本菌の主要病原因子である。ジンジパインが菌体内で翻訳され、菌体表層でプロテアーゼ活性獲得に至るまで、いくつかの段階があると予想される。本研究ではジンジパインの新たな菌体内輸送因子を見つけるとともに、ジンジパイン活性化獲得、菌体表層への局在化には菌体表面多糖が関わることを示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 19 年度	2,200,000	0	2,200,000
平成 20 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	300,000	3,500,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔細菌学

1. 研究開始当初の背景

40 歳以上の日本人の約 40% が罹患している慢性歯周炎は感染性疾患であり、原因微生物は偏性嫌気性グラム陰性細菌とみなされている。

Porphyromonas gingivalis はそのなかでももっとも代表的な歯周病細菌であり、線毛、リポ多糖、凝集素、プロテアーゼなどの様々な歯周病原因子を持つ。これらの病原因子のなかで最も注目されているのが、システインプロテアーゼのジンジパインであり、この分子の菌体内成熟化機構を解析することにより *P. gingivalis* の病原因子制御につながることを期待した。

2. 研究の目的

(1) *Porphyromonas gingivalis* が産生するジンジパインは本菌の主要病原因子として知られる。このジンジパイン分泌装置はバクテロイデスフィラムの代表的分泌機構であり、この輸送システムの構成因子、基本的構造を明らかにすることを研究目的とする。

(2) 本菌の線毛、リポ多糖、凝集素など、他の病原因子の成熟化にはジンジパイン活性が関与していることが多く報告される。ジンジパインは菌体表層に輸送されるだけではプロテアーゼ活性を持ち得ないことから、菌体表層での活性獲得機構についても明らかにすることを研究目的とする。

3. 研究の方法

(1) ベン図解析からジンジパイン輸送関連因子候補遺伝子を絞り、遺伝学的手法を用いて変異株を作成、ジンジパイン輸送に影響を与える遺伝子を同定した。また、生化学的手法を用いてそれら変異株の性状解析を行った。近縁菌でも同様の解析を行い、輸送装置の共通性について解析を行った。

(2) トランスポゾン変異法からジンジパイン活性局在化変異株を得た。トランスポゾン挿入部位をサザン解析、DNA シークエンス解析を用いて決定した。変異株の性状解析は以下の方法を用いた。トランスポゾン挿入部位が表面多糖合成に関わる遺伝子だったことから、菌体表層多糖の精製し、SDS-PAGE に泳動、そして銀染色をおこない、野生株と比較した。また、ジンジパインの1つである Kgp に対する抗体を用いたイムノブロット解析およびジンジパイン活性測定から、変異株における活性型ジンジパインの局在を決定した。菌体表層多糖とジンジパインの親和性試験を行うため、96 穴 ELISA プレートに菌体表層多糖をコートし、キメラジンジパインとの親和性試験(ELISA)を行った。

4. 研究成果

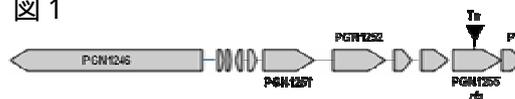
(1) ジンジパイン菌体内輸送機構

本研究で新たなジンジパイン輸送関連因子を見つけ、これらについて現在も解析中である。なお、平成 20 年度の学会発表では、これら結果について報告した。

(2) ジンジパイン活性獲得化

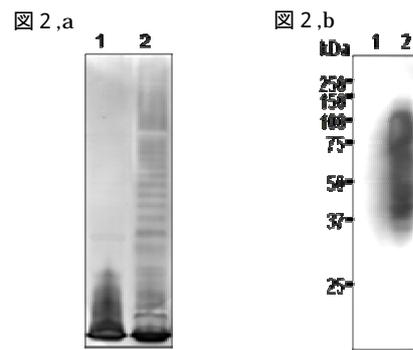
トランスポゾン変異法により、ジンジパインの活性化・局在化が異常となる変異株が得られていた。トランスポゾン挿入部位は菌体表層多糖の合成にあずかる酵素(PGN1255 ADP-heptose heptosyltransferase) をコードする遺伝子(図 1)であり、ADP-heptose heptosyltransferase は大腸菌、サルモネラ菌では LPS の inner core 合成に関わることが分かっている。

図 1



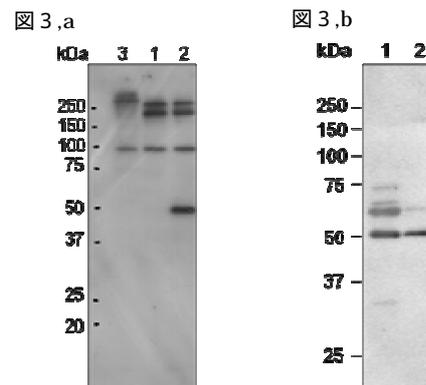
そこで、*P. gingivalis* の菌体表層多糖である Lipopolysaccharide(LPS)および Anionicpolysaccharide(APS)の解析を行った。その結果、PGN1255 完全欠損株から精製した LPS ではコア合成が不完全であり、それに続く O 抗原の合成も見られなかった(図 2,a)。また、APS に対する特異抗体(MAb-1B5)を用いたイムノブロット解析から APS が欠失していることが分かった(図

2,b)。



1, PGN1255 完全変異株 2, 野生株
図 2,a: 精製 LPS を SDS-PAGE に泳動
図 2,b: 抗 APS 抗体を用いてイムノブロット

PGN1255 変異株におけるジンジパイン局在について下記の解析をおこなった。ジンジパイン活性測定、抗 Kgp 抗体を用いたイムノブロット解析から、PGN1255 完全欠損株および挿入変異株ではジンジパインが菌体にアンカーされず(図 3, a) 培養上清中に放出されている(図 3, b)ことが分かった。培養上清中からは前駆体 Kgp が検出された。



1, PGN1255 変異株 2, 野生株
3, ジンジパイン完全欠損株
図 3, 全菌体(a), 培養上清(b)を SDS-PAGE に泳動、ジンジパインの1つである Kgp に対する抗 Kgp 抗体を用いてイムノブロットを行った。成熟型 Kgp は 51 kDa に検出される

また、PGN1255 変異株では、ジンジパイン活性が菌体からほとんど検出されず、培養上清のみに検出されたことから、ジンジパインは LPS または APS により菌体表層にアンカーされることが示された。

次に、ジンジパインの菌体表層多糖への親和性の有無を確認するため、以下の解析を行った。野生株、PGN1255 挿入変異株から、LPS を精製し、キメラ Kgp (図 4) との親和性試験

験 (ELISA) を行った。野生株から精製した LPS が濃度依存的にキメラ Kgp と結合するのに比べ、PGN1255 LPS はキメラ Kgp に対する親和性が低下していた (図 5)。

図 4



図 4, キメラ Kgp は Kgp のシグナル配列、プロ領域、プロテアーゼドメインに Rgp (ジンジパインの 1 つ) の C 末端領域をつないだキメラタンパク。キメラ Kgp の C 末端には精製のための Myc タグが付いている。これを *P. gingivalis* 内で発現させ精製し、親和性試験に用いた。

図 5

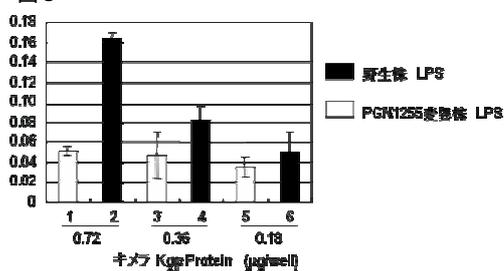


図 5, 96 穴 ELISA プレートに野生株または PGN1255 変異株から精製した LPS をコートし、キメラ Kgp タンパクとの親和性試験を行った。

以上の結果から、ジンジパインは前駆体で菌体表層まで輸送された後、LPS または APS の菌体表層多糖を介して菌体表層にアンカーされ、ジンジパイン活性型にプロセスを受ける可能性が示唆された。また、ジンジパイン、凝集素からなるジンジパイン複合体の菌体表層へのアンカーは LPS または APS を介していることが示唆された。

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)

K. Sato, N. Kido, Y. Murakami, C. I. Hoover, K. Nakayama, F. Yoshimura.

Lipopolisaccharide biosynthesis-related genes are required for colony pigmentation of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology*, 155, 1282-1293, 2009, 査読有

[学会発表](計 6 件)

1、佐藤啓子、第 49 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2007 年 8 月 31 日、北海道 北海道大学

2、佐藤啓子、Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides グループの菌体外酵素の分泌機構と滑走運動機構との関連、第 81 回日本細菌学会総会、2008 年 3 月 26 日、京都 京都国際会議場

3、佐藤啓子、Phylum Bacteroidetes に位置する細菌の菌体外タンパク分泌機構と滑走運動機構との関連性、第 2 回日本ゲノム微生物学会年会、2008 年 3 月 7 日、大阪 大阪大学

4、佐藤啓子、*Porphyromonas gingivalis* ジンジパイン輸送関連因子の探索、第 50 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2008 年 9 月 25 日、東京 TOC 有明

5、佐藤啓子、歯周病原菌産生プロテアーゼ輸送関連因子、BMB2008、2008 年 12 月 12 日、神戸 神戸ポートアイランド

6、佐藤啓子、ジンジパイン輸送関連因子、第 82 回日本細菌学会総会、2009 年 3 月 12 日、名古屋 名古屋国際会議場

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況（計0 件）

〔その他〕

6 . 研究組織

(1)研究代表者

佐藤啓子(SATO KEIKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70410579

(2)研究分担者

(3)連携研究者