

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20249073

研究課題名（和文）

歯周病細菌の病原プロテアーゼ・アドヘジンの膜輸送・分泌機構の全容解明

研究課題名（英文） Secretion mechanism of pathogenic proteases and adhesions in the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*.

研究代表者

中山 浩次（NAKAYAMA KOJI）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：80150473

研究成果の概要（和文）：

口腔嫌気性細菌ポルフィロモナス・ジンジバリスは歯周病原性に関係の深いジンジパインというプロテアーゼを菌体表面および菌体外に分泌する。比較ゲノム解析および遺伝学的解析により、ジンジパイン分泌に必要なタンパク質を新たに発見した。それらはフラボバクテリウム・ジョンソニエの滑走運動に関与するタンパク質とアミノ酸配列において類似性があった。フラボバクテリウム・ジョンソニエの *porT* 類似遺伝子の変異株は滑走運動性がなく、キチン分解酵素の分泌を欠くことがわかった。これらの結果はバクテロイデーテスフィラムに位置する細菌には滑走運動と関連する新規なタンパク質分泌系があることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

Porphyromonas gingivalis secretes strong proteases called gingipains that are implicated in periodontal pathogenesis. Comparative genome analysis and genetic experiments revealed proteins involved in gingipain secretion. These proteins were similar in sequence to *Flavobacterium johnsoniae* gliding motility proteins. Disruption of the *F. johnsoniae porT* ortholog resulted in defects in motility and chitinase secretion, providing a link between a unique protein translocation system and a motility apparatus in members of the Bacteroidetes phylum.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	14,300,000	4,290,000	18,590,000
2009年度	11,800,000	3,540,000	15,340,000
2010年度	11,200,000	3,360,000	14,560,000
年度			
年度			
総計	37,300,000	11,190,000	48,490,000

研究分野：

科研費の分科・細目：

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

慢性歯周炎は 40 歳以上の日本人の半数以上が罹患している慢性感染症であり、歯の喪

失の最大の原因である。数多くの研究から慢性嫌気性グラム陰性細菌 *Porphyromonas gingivalis* が慢性歯周炎のもっとも重要な

原因細菌の1つと考えられている。*P. gingivalis*の歯周病原因子としてはLPS、線毛、プロテアーゼ等が知られているが、中でも本菌の菌体表面および菌体外のプロテアーゼ活性の大部分を占めるRgpプロテアーゼとKgpプロテアーゼは間質破壊や歯周ポケット形成を引き起こす、直接的な間質タンパク分解活性があるばかりか、内在性のmatrix metalloprotease産生刺激や活性化を引き起こすことによる間接的な間質タンパク分解性があることが知られている。また、各種のサイトカイン分解活性、好中球レセプターの破壊、補体系の活性化あるいは分解など生体防御反応を不全化する能力がある。さらにはX因子やプロトロンビンの活性化、カリクレイン・キニン系活性化、フィブリン・フィブリノーゲン分解活性があり、血液凝固反応誘導、血管透過性亢進、易出血性などを引き起こす本菌のきわめて重要な病原因子である。

Rgpプロテアーゼは*rgpA*および*rgpB*遺伝子に、Kgpプロテアーゼは*kgp*遺伝子にコードされている。これらの遺伝子およびその変異株の解析については私たちの研究を含め、世界的に多くの研究が行われた。遺伝子の構造解析からこれらの遺伝子はプロテアーゼをコードしているほかに遺伝子の3'側にはアドヘジンをコードしていることがわかった。これらのアドヘジンタンパクについては私たちの研究からHgp15アドヘジンはヘモグロビンやラクトフェリンに結合する活性があること、Hgp44アドヘジンは赤血球凝集活性があり、また本菌の血小板凝集活性に必須な分子であることがわかった。血液に対するこれらの活性は本菌と血管疾患とを関連させる重要な性質と考えられる。

2. 研究の目的

ジンジパインの分泌に関与するタンパク質の候補遺伝子を網羅的に*P. gingivalis*ゲノムより抽出し、ジンジパイン分泌機構の全容を明らかにすることを目的とする。すでに比較ゲノム解析からある種の細菌の滑走運動能の遺伝子で*P. gingivalis*に類似遺伝子があるもの(*gldA*, *gldB*, *gldH*, *gldI*, *gldK*, *gldL*, *gldM*, *gldN*, *sprA*, *sprE*)が候補遺伝子として考えられているのでこれらすべての*P. gingivalis*での変異株を作製して病原プロテアーゼ・アドヘジンの膜輸送・分泌能を解析する。さらに個々の遺伝子産物を組換

えタンパクとして精製し、タンパク間の相互作用を調べ、*P. gingivalis*の病原プロテアーゼ・アドヘジンの膜輸送・分泌機構の全容を明らかにする。*P. gingivalis*で新たに発見した病原プロテアーゼ・アドヘジンの膜輸送・分泌能に関する遺伝子についての*F. johnsoniae*変異株を構築し、滑走運動能を調べる。このことにより両機構が共通性の高いシステムであるかについても明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) *P. gingivalis*, *B. fragilis*, *B. thetaiotaomicron*, *C. hutchinsonii*, *F. johnsoniae*のゲノム情報を比較したベン図解析
- (2) 二成分シグナル伝達系
- (3) *F. johnsoniae*の滑走運動関連遺伝子との関係
- (4) *P. gingivalis*の病原プロテアーゼ・アドヘジンの膜輸送システムを構成しているタンパク間の相互作用の解析
- (5) Tiling arrayを用いた遺伝子発現調節機構の解析
- (6) 病原プロテアーゼ・アドヘジンの膜輸送システムを利用して分泌されるエフェクター分子の解析

4. 研究成果

私たちはジンジパインの菌体外への分泌機構に異常を示す変異株を分離し、その変異遺伝子*porT*を同定した。*P. gingivalis*の遺伝子のもっとも類似性のあるhomologは近縁種である*Bacteroides*属菌に多く見つかるが、*porT*遺伝子については*Bacteroides*には存在せず、Phylum *Bacteroidetes*中の少し離れた菌種である*Cytophaga hutchinsonii*や*Flavobacterium johnsoniae*に見つかる。そこで*P. gingivalis*の遺伝子で*C. hutchinsonii*にはhomologが存在するが、*Bacteroides thetaiotaomicron*にはないもの、55遺伝子(*porT*を含まない)を同定し、その内の46遺伝子の変異株を作製したところ、10遺伝子の変異株(*porK*, *porL*, *porM*, *porP*, *porU*, *porQ*, *porW*, *porX*, *porY*, *sov*)がジンジパインの輸送・分泌機構に異常を示した。そのなかに*C. hutchinsonii*や*F. johnsoniae*の滑走運動に関わる遺伝子群のhomologが含まれていた。*F. johnsoniae*の*porT* homolog(*sprT*)の変異株を作製したところ、

その変異株は滑走運動に異常を示した。*F. johnsoniae* の滑走運動関連遺伝子変異株ではキチン利用能に障害があることが報告されている。そこで *F. johnsoniae* の *sprT* 変異株について菌体および培養上清中のキチン分解活性を合成基質を用いて調べたところ、野生株の培養上清にはキチン分解活性が検出されたが、変異株ではまったく検出されなかった。また、培養上清中には野生株では Fjoh_4555 タンパク質 (推定上のキチナーゼ) のタンパク質バンドがみられたが、変異株ではなかった。これらの結果は *F. johnsoniae* においてはある種のタンパク質の分泌と滑走運動とが密接な関係にあることを示唆した。前述の2つのタンパク質 (PorX, PorY) は二成分制御系のタンパク質のモチーフを有していた。Real-time RT-PCR 解析の結果、*porK*, *porL*, *porM*, *porN*, *porP*, *porT*, *sov* 遺伝子の発現は *P. gingivalis porX* および *porY* 変異株では減少していた。*P. gingivalis* において同定されたジンジパイン分泌機構に関与するタンパクはいままで報告のある分泌機構の構成タンパクとは類似性がなく、新規のタンパク分泌機構 (Por secretion system) を構成するものと思われる。

同様な分泌機構は他の歯周病細菌の *Tannerella forsythia* や *Prevotella intermedia* にも存在することがゲノム情報から明らかであり、*P. gingivalis* を始めこれらの歯周病細菌の制圧にこの新規のタンパク分泌機構を標的とする制御薬物開発が考えられる。

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 19 件)

1. Yukitake H, Naito M, Sato K, Shoji M, Ohara N, Yoshimura M, Sakai E, and Nakayama K: Effects of non-iron metalloporphyrins on growth and gene expression of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Immunol*, 55:141-53 (2011)
2. Sato K, Naito M, Yukitake H, Hirakawa H, Shoji M, McBride MJ, Rhodes RG, and Nakayama K: A protein secretion system linked to bacteroidete gliding motility and pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107:276-281 (2010)
3. Ishii K, Hamamoto H, Imamura K, Adachi T, Shoji M, Nakayama K, and Sekimizu K.: *Porphyromonas gingivalis* peptidoglycans induce excessive activation of the innate immune system in silkworm larvae. *J Biol Chem*, 285: 33338-33347 (2010)
4. Yamaguchi M, Sato K, Yukitake H, Noiri Y, Ebisu S, and Nakayama K: *Porphyromonas gingivalis* mutant defective in a putative glycosyltransferase exhibits defective biosynthesis of polysaccharide portions of lipopolysaccharide, decreased gingipain activities, strong autoaggregation and increased biofilm formation. *Infect Immun* 78:3801-3812 (2010)
5. Kondo Y, Ohara N, Sato K, Yoshimura M, Yukitake H, Naito M, Fujiwara T, and Nakayama K: Tetratricopeptide repeat protein-associated proteins contribute to the virulence of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun* 78:2846-2856 (2010)
6. Shoji M, Shibata Y, Shiroza T, Yukitake H, Peng B, Chen Y-Y, Sato K, Naito M, Abiko Y, Reynolds EC, and Nakayama K: Characterization of hemin-binding protein 35 (HBP35) in *Porphyromonas gingivalis*: its cellular distribution, thioredoxin activity and role in heme utilization. *BMC Microbiol* 10:152 (online journal) (2010)
7. Nhien NT, Huy NT, Naito M, Oida T, Uyen DT, Huang M, Kikuchi M, Harada S, Nakayama K, Hirayama K, and Kamei K: Neutralization of toxic haem by *Porphyromonas gingivalis* haemoglobin receptor. *J. Biochem.* 147:317-325 (2010)
8. Shoji M, Yoshimura A, Yoshioka H, Takade A, Takuma Y, Yukitake H, Naito M, Hara Y, Yoshida S, and Nakayama K: Recombinant *Porphyromonas gingivalis* FimA preproprotein expressed in *Escherichia coli* is lipidated and a mature/processed recombinant FimA protein forms a short

- filament in vitro. *Can J Microbiol*, 56: 959-967 (2010)
9. Ito R, Ishihara K, Shoji M, Nakayama K, and Okuda K.: Hemmagglutinin/adhesion domains of *Porphyromonas gingivalis* play key roles in coaggregation with *Treponema denticola*. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 60: 251-260 (2010)
 10. Nakayama K: *Porphyromonas gingivalis* cell-induced hemagglutination and platelet aggregation. *Periodontol 2000* 54:45-52 (2010)
 11. Yoshida A, Yoshimura M, Ohara N, Yoshimura S, Nagashima S, Takehara T, and Nakayama K: Hydrogen sulfide production from cysteine and homocysteine by oral bacteria. *J Periodontol*, 80:1845-1851 (2009)
 12. Haruyama K, Yoshimura A, Naito M, Kishimoto M, Shoji M, Abiko Y, Hara Y, and Nakayama K: Identification of a gingipain-sensitive surface ligand of *Porphyromonas gingivalis* that induces TLR2- and TLR4-independent NFκB activation in CHO cells. *Infect Immun*, 77:4414-4420 (2009)
 13. Kikuchi Y, Ohara N, Ueda O, Hirai K, Shibata Y, Nakayama K, and Fujimura S.: *Porphyromonas gingivalis* mutant defective in a putative ECF sigma factor shows a mutator phenotype. *Oral Microbiol Immunol* 24:377-383 (2009)
 14. Kuboniwa M, Amano A, Hashino E, Yamamoto Y, Inaba H, Hamada N, Nakayama K, Tribble GD, Lamont RJ, and Shizukuishi S: Distinct roles of long/short fimbriae and gingipains in homotypic biofilm development by *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiol*, 9:105-115 (2009)
 15. Sato K, Kido N, Murakami Y, Hoover CI, Nakayama K, and Yoshimura F: Lipopolysaccharide biosynthesis-related genes are required for colonial pigmentation of *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiology-SGM*, 155:1282-1293 (2009)
 16. Yoshimura M, Ohara N, Kondo Y, Shoji M, Okano S, Nakano Y, Abiko Y, and Nakayama K: Proteome analysis of *Porphyromonas gingivalis* cells placed in a subcutaneous chamber of mice. *Oral Microbiol Immunol*, 23:413-418 (2008)
 17. Naito M, Hirakawa H, Yamashita A, Ohara N, Shoji M, Yukitake H, Nakayama K, Toh H, Yoshimura F, Kuhara S, Hattori M, Hayashi T, and Nakayama K: Determination of the genome sequence of *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC33277 and genomic comparison with strain W83 revealed extensive genome rearrangements in *P. gingivalis*. *DNA Res*, 15:215-225 (2008)
 18. Ishida Y, Hu J-P, Sakai E, Kadowaki T, Yamamoto K, Tsukuba T, Nakayama K and Okamoto K: Functional expression of lysine-specific cysteine proteinase(Lys-gingipain) by a *Porphyromonas gingivalis* plasmid system. *Arch Oral Biol*, 53:538-544 (2008)
 19. Uehara A, Naito M, Imamura T, Potempa J, Travis J, Nakayama K, and Takada H: Dual regulation of IL-8 production in human oral epithelial cells upon stimulation with gingipains from *Porphyromonas gingivalis*. *J Med Microbiol*, 57:500-507 (2008)
- [学会発表] (計 59件)
1. Nakayama K: Genome analysis and a novel secretion system of the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. 第3回日中科学フォーラム, 武漢, 中国. (2010) 招待講演
 2. 中山浩次: 比較ゲノム解析から発見されたグラム陰性細菌の新規タンパク分泌機構. 第4回日本ゲノム微生物学会年会, 福岡, (2010) 招待講演
 3. Nakayama K: Secretion of Pathogenic Proteins in the Periodontopathic Bacterium *Porphyromonas gingivalis*. US-Japan Symposium, Niigata, Japan. (2009) 招待講演
 4. Nakayama K: Secretion of Pathogenic Proteins in *Porphyromonas gingivalis*. IADR Miami, Florida, USA. (2009) 招待講演

5. 中山浩次: 歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* の pathology. 第 52 回日本歯周病学会春季学術大会, 岡山 (2009) 招待講演

[図書] (計 1 件)

1. Nakayama K: Genomics of *Porphyromonas gingivalis*. Periodontal Medicine and Systems Biology, chapter 13, pp193-204, Wiley-Blackwell (2009)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

長崎大学歯学部歯周病基盤研究センターホームページ

(http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/index_j.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 浩次 (NAKAYAMA KOJI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号: 80150473

(3) 連携研究者

内藤 真理子 (NAITO MARIKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 20244072

庄子 幹郎 (SHOJI MIKIO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 10336175

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

雪竹 英治 (YUKITAKE HIDEHARU)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・技術職員

研究者番号: 30380984

平川 英樹 (HIRAKAWA HIDEKI)

かずさ DNA 研究所・植物ゲノム情報研究室・研究員

研究者番号: 80372746