

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09921

研究課題名(和文) 歯周病細菌の9型分泌機構(T9SS)の発現調節におけるフィードバック制御の解明

研究課題名(英文) Elucidation of feedback regulation of the expression of the type IX secretion system (T9SS) of *Porphyromonas gingivalis*

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)・客員研究員

研究者番号：80150473

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000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9型分泌機構(T9SS)の発現に関わるPorAはシグナルペプチド-FimH類似領域-CTD領域で構成されるタンパク質である。FimH類似領域はT9SS発現へのPorAの関与には無関係であり、CTD[PorA]が機能領域であることがわかった。さらに、CTD[PorA]はPorYセンサータンパク質のペリプラズム領域と結合することがわかった。ペリプラズム内でのCTD[PorA]量がPorA-PorY-PorX-SigPシグナル経路によるT9SS構成タンパク質群の発現を調節することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病細菌ポルフィロモナス・ジンジバリスは病原性プロテアーゼであるジンジパインなどの病原因子をT9SSで菌体表面や菌体外に分泌する。歯周病の治療戦略として本細菌のT9SSを標的とする分子標的薬の開発が有効と思われる。T9SSの発現を調節する分子機構に関わるPorAタンパク質の詳細な解析は分子標的薬を構築する上でPorA分子内のどこを標的とする化合物がT9SSを制御する可能性があるかを示唆しており、分子標的薬開発に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：PorA involved in the expression of the type IX secretion system (T9SS) of the periodontopathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis* is a protein composed of a signal peptide, a FimH-like domain, and a CTD domain. The FimH-like domain was found to be irrelevant to the involvement of PorA in T9SS expression, and CTD[PorA] was the functional domain. CTD[PorA] was found to bind to the periplasmic domain of the PorY sensor protein. It was suggested that the amount of CTD[PorA] in the periplasm regulates the expression of T9SS component proteins through the PorA-PorY-PorX-SigP signaling pathway.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：細菌 病原性 歯学 歯周病 分泌 調節

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ポルフィロモナス・ジンジバリス(以下、ジンジバリス菌)の9型分泌機構(T9SS)構成タンパク質遺伝子を探索する過程で二成分制御系の遺伝子(レスポンス・レギュレーター遺伝子 *porX* とセンサー・キナーゼ遺伝子 *porY*)を発見した。これらの遺伝子の変異株ではジンジバリス菌などのT9SSで分泌されるタンパク質の発現が顕著に減少していることからこの二成分制御系のT9SS構成タンパク質遺伝子の発現への関与が示唆された。そこで *porX* 株と *porY* 株でのT9SS構成タンパク質遺伝子の発現を調べたところ、顕著に減少していることがわかった。また、PorXとPorYとの関係についてそれらの結合性やリン酸基の受け渡しなどを調べたところ、それらはcognateな関係であることがわかった。さらに、PorXはECFシグマ因子SigPと相互作用することがわかり、二成分制御系PorXYの下流にSigPが存在し、このシグマ因子がT9SS構成タンパク質遺伝子の発現を直接、調節していることがわかった(文献)。しかし、センサー・キナーゼPorYの上流にはどのような因子が存在し、シグナリングしているかは不明であった。一方、T9SSCTDをもつタンパク質の遺伝子について網羅的に欠損変異株を作製する過程でPGN_0123変異株ではT9SS発現が顕著に減少していることがわかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、PorY-PorX-SigPシグナル経路の上流に位置する新規の外膜タンパク質PorAによるT9SSのフィードバック制御を解明することであり、その成果を用いて歯周病細菌を始めとするバクテロイデーテス門細菌のT9SSをコントロールする方法の開発という応用研究に発展させることにある。

3. 研究の方法

- (1) PorA欠損変異株について、SigPシグマ因子が制御しているT9SS構成遺伝子群の発現の転写レベルおよび翻訳レベルでの解析。
- (2) PorA完全欠損株からのT9SS発現調節機能の復帰変異株の単離とその変異遺伝子の同定。
- (3) PorAタンパク質の外膜上での存在様式およびフィードバック制御の可能性の検討。
- (4) PorAタンパク質の立体構造のX線結晶構造解析。
- (5) PorAタンパク質と相互作用する菌体タンパク質の解析。
- (6) PorAタンパク質内のT9SS発現調節機能に関わる領域の決定。

4. 研究成果

(1) ジンジバリス菌の黒色色素形成に関与する新規分子PorAの発見

我々はジンジバリス菌が新規の分泌機構であるT9SSを用いてジンジバリス菌プロテアーゼ(Rgp, Kgp)などを分泌することを発見した。T9SSは約20個のタンパク質から構成される。我々は、T9SSに含まれるPorP-PorK-PorL-PorM-PorNのクラスター遺伝子、PorT, Sov, およびPorVの遺伝子からの発現が二成分制御系PorXYおよびシグマ因子SigPにより正に調節されていることを以前の研究(文献)で報告している。

T9SSにより分泌されるタンパク質群のC末端側にはアミノ酸配列に共通性のあるドメイン(CTD)が存在する。ジンジバリス菌におけるCTD含有タンパク質はATCC 33277株において34個存在する。このうち分子サイズの小さい機能未知の分子(PGN_0123)について変異株作製を試みたところ、血液寒天培地上でのPGN_0123欠損株の集落では黒色色素形成性が明瞭に減弱していた。ジンジバリス菌の黒色集落形成に関与する遺伝子はKgpプロテアーゼ、T9SS、A-LPS生合成、およびPorXY-SigPシグナル伝達に関わる遺伝子に分類できる。PGN_0123遺伝子欠失変異株は数回継代すると白色コロニーから黒色コロニーに変化することがあることから、上記の遺伝子のなかで調節にかかわる遺伝子の可能性があると推測された。PGN_0123遺伝子は

本菌種以外に相同性の高い遺伝子がみつかっておらず、また、ジンジバリス菌では PGN_0123 遺伝子の上位に Omp28 遺伝子があるが、*Prevotella* 属などの近縁細菌の Omp28 ホモログの近傍の遺伝子は PGN_0123 遺伝子との相同性が低いことから、PGN_0123 はジンジバリス菌固有のものと考えられた。

PGN_0123 欠損株が PorXY-SigP シグナル伝達経路に異常があるかどうかはタンパク質や転写産物の量を比較することで明らかにすることができる。PGN_0123 欠損株およびその相補株についてそれらの性状を解析するとともに、イムノプロット法や Q-PCR 法を用いた解析を行った。性状解析およびイムノプロット法による解析にて、PGN_0123 欠損株では、血液寒天培地上にて白色コロニーを示すこと、血液凝集活性の減弱、菌体および培養上清のジンジバリンプロテアーゼ活性の減弱、PorA, Kgp, Rgp, Hbp35 といった T9SS 分泌タンパク質の分泌の減少、PorU, PorK, PorL, PorM などの T9SS 構成タンパク質の減少が認められた。Q-PCR 法による解析にて PorK, PorL, PorM, PorN, PorU, PorV および SigP の遺伝子の転写産物量の減少が認められた。これらの結果は、PGN_0123 が PorXY-SigP シグナル伝達経路の変異株の表現型と類似している。つまり、PGN_0123 は PorXY-SigP シグナル伝達経路に位置するタンパク質と考えられ、PorA と命名した。

(2) PorA 欠損株から得られた T9SS 発現調節機能復帰変異株の解析

前述のように PorA 欠損株は数回継代すると血液寒天培地上で黒色コロニーを形成する。独立に得られた黒色コロニーを呈する 2 株の全ゲノムシーケンズを行ったところ、内膜センサータンパク質である PorY の細胞質ドメインのヒスチジンキナーゼ付近にアミノ酸置換が生じていた。特に多く見られたのが PorY^{Ser266Trp} であった。この変異遺伝子を PorA 欠損株に導入すると導入株の形質は野生型に復帰し、その相補性は PorX 依存性であった。これらの結果から、PorA は PorXY-SigP シグナル伝達経路において PorY より上流で機能していると考えられた。

(3) PorA タンパク質の菌体表面への輸送

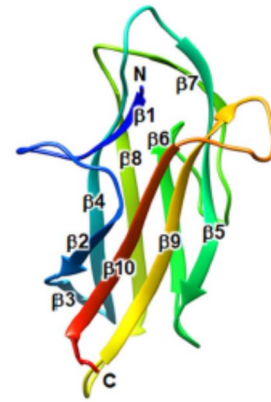
Hbp35 などの CTD 含有タンパク質は T9SS 依存性で分泌されるので、T9SS 構成タンパク質の欠損株では CTD 含有タンパク質は菌体の表面に輸送されないことを菌体のドットプロット法で確認できる。同様に PorA タンパク質が T9SS 構成タンパク質の欠損株で菌体表面に分泌されているか否かをドットプロット法で確認したところ、意外にも T9SS 構成タンパク質欠損株においても PorA は菌体表面に輸送されていた。T9SS 構成タンパク質の欠損株での PorA の菌体表面局在はピオチンラベル化実験においても確認された。これらの結果は PorA の菌体表面への輸送に T9SS 非依存性経路が存在することを示唆するが、その詳細は更なる検討が必要と思われる。

(4) PorA の CTD と相互作用する分子の探索

抗 PorA 抗体を用いたイムノプロット解析をすると野生株ではモノマー型の 23 kDa 分子のバンドと 30 ~ 70 kDa 分子のスメアなバンドが検出される。後者のスメアなバンドは T9SS にて菌体表面に輸送され、PorU プロテアーゼによる PorA の CTD 領域の直前での切断の後、A-LPS との共有結合によって生じたものと思われる。PorA と相互作用する分子として CTD 結合能がある PorV が予想されていた。PorV は菌体表面で T9SS 分泌タンパク質の CTD 領域と結合し、A-LPS との共有結合の場である Attachment complex への輸送に関わるシャトルタンパク質と考えられている。そこで、ジンジバリンプロテアーゼ完全欠損株から抗 PorA 抗体で免疫沈降し沈降産物を解析したところ、PorV が共沈された。さらにその共沈作用が PorA の CTD に依存しているかを調べるために Halo-CTD[PorA]を発現させ、Halo タグ精製した場合においても PorV の共沈を認めた。これらの結果から、菌体表面において PorV と結合している CTD 含有型 PorA と CTD を欠損している A-LPS 結合型 PorA という 2 形態があると考えられた。

(5) PorA タンパク質の結晶構造の解析

大腸菌を用いて PorA タンパク質の結晶構造解析を試みた。シグナル配列を除いた全長の PorA^{Q28-K246} を大腸菌で発現後、精製し、結晶化を試みたものの良い結晶は得られなかった。そこで、全長の PorA^{Q28-K246} をトリプシン消化後、PorA^{Q28-R171} を調製した結果、結晶化に成功した（解像度 1.3 Å；PDB ID code: 6KJK）（右図）。なお、PorA の CTD 領域は D163-K246 なので、PorA^{Q28-R171} は CTD 領域をほとんど含んでいない。Dali サーバーを用いて類似タンパク質を調べたところ、PorA^{Q28-R171} は大腸菌の 1 型線毛の先端タンパク質でマンノース結合性がある FimH に類似していることがわかった。FimH のマンノース結合部位はマンノースを挟むような形を示すが、PorA の当該部位は外に広がるような形をしていた。PorA^{Q28-R171} が何かに結合能があるかについてはさらなる解析が必要である。



rPorA^{Q28-R171} 結晶構造

(6) PorA の T9SS 発現調節機能は T9SS 欠損株でも機能する

T9SS 欠損株では、CTD 含有タンパク質である PorU プロテアーゼが菌体表面に分泌されないために PorA の A-LPS 結合型は存在せず CTD 含有型のみとなる。T9SS 構成タンパク質欠損株でも PorA が機能的であるか否かを調べた。PorU, PorV, Sov, PorT の欠損株からさらに PorA を欠損した二重変異株で、T9SS 構成タンパク質の発現が減少するか否かをイムノプロット解析法により調べた。その結果、PorV-PorA-, PorU-PorA-, PorL-PorA-, Sov-PorA-, PorT-PorA- の二重欠損株では、T9SS 構成タンパク質の発現が減少していた。このことから、CTD 含有型 PorA に T9SS 発現調節機能があること、また、その機能に T9SS 構成タンパク質の存在が必須でないことが示唆された。また、PorA の CTD が切断される部位は T162-D163 間である。その 2 アミノ酸を欠損した PorA 変異遺伝子を PorA 欠損株に入れると性状が野生型に復帰するが、A-LPS 結合型のスミアなバンドは検出されず CTD 含有型のみであった。これらの結果から、CTD 含有型 PorA が T9SS 発現調節機能を有することがわかった。

(7) PorA の FimH 類似領域欠損変異株の解析

PorA の FimH 類似領域に相当する 3 つの部分の変異遺伝子を作製し、それらが PorA 欠損株を相補できるかを調べた。PorA^{S68-T70}, PorA^{V107-V109}, PorA^{S141-A149} の変異遺伝子は PorA 欠損株を相補し、A-LPS 結合型も検出されたことから、これらの欠損株での結果からは PorA の FimH 類似領域に T9SS 発現調節機能があることは示唆されなかった。

(8) PorA の C 末端欠損株の解析

T9SS CTD 含有タンパク質の分泌には C 末端の数個のアミノ酸が重要であることが知られている。PorA の C 末端欠損遺伝子を作製し、PorA 欠損株を相補するか否かを調べた。PorA の C 末端の 3 アミノ酸欠損遺伝子は PorA 欠損株を相補した。しかし、C 末端 4 アミノ酸欠損もしくは 5 アミノ酸欠損遺伝子は相補できなかった。PorA の C 末端が 4 アミノ酸以上欠損した株では菌体内で PorA タンパク質が発現していないことから、相補性の欠如はそれに起因することが示唆された。そこで C 末端 4 アミノ酸を、構造をとらないことが知られている GSGS に置換した PorA を作製し、相補できるか否かを調べた。その結果、PorA-GSGS は PorA 欠損株を相補した。興味深いことに、この相補株では A-LPS 結合型は検出されず、ドットプロット解析にても菌体表面への分泌が減少していることがわかった。これらの結果から、PorA-GSGS の多くはペリプラズム内に留まり、T9SS 発現調節機能を発揮している可能性が示唆された。

(9) PorA に結合する菌体タンパク質の探索

PorA-GSGS がペリプラズム内に主に位置していることから、PorA が PorY と直接、相互作用す

る可能性が示唆された。まず、PorA の G145-T146 間に His タグを挿入した分子を作製した。この PorA^{G145}-His は PorA 欠損株を相補した。PorA-PorK-二重欠損株に PorA^{G145}-His を発現させた株のライセートから、His タグ精製を行った。その結果、PorA とともに PorV と PorY も回収された。また、野生株ならびに PorK 欠損株のライセートから抗 PorA 抗体で免疫沈降した場合でも PorY の共沈を認めた。逆に PorA-PorK-二重欠損株に PorA^{G145}-His を発現させた株から、抗 PorY 抗体で免疫沈降した場合には PorA の共沈を認めた。これらの結果から、PorA と PorY の直接的な相互作用が強く示唆された。

(10) PorA と PorY との結合性解析

PorA と PorY が相互作用を示すかを調べるために大腸菌のツーハイブリッドシステムを試みたが相互作用を示すポジティブな結果は得られなかった。大腸菌のツーハイブリッドシステムでは両者が強い結合の場合は検出できるが弱い結合の場合はそうならないことが多い。そこで大腸菌を用いたプルダウンアッセイを試みた。大腸菌から精製した rPorA^{G145}-His を His タグレジンに結合させたのち、PorY ペリプラズム領域の組換えタンパク質を含むライセートを添加後、イミダゾールで溶出するアッセイである。その結果、rPorA^{G145}-His の溶出とともに PorY ペリプラズム領域組換えタンパク質が溶出された。また、rPorA^{G145}-His をトリプシン消化した CTD 欠損型のものを調製し、同様の実験を行うと CTD 欠損型 rPorA^{G145}-His は溶出されるが、PorY ペリプラズム領域組換えタンパク質は回収されなかった。このことから、PorA の CTD 領域が PorY ペリプラズム領域と結合することが示唆された。

(11) キメラ分子による相補性実験

他の T9SS 分泌タンパク質の CTD 領域が PorA[CTD]と同様な機能をもつかどうかを調べるため、T9SS 分泌タンパク質の一つであるジンジパイン RgpB と PorA との CTD 領域のスイッチ分子を作製し、PorA 欠損株の相補性を調べた。すなわち、PorA-CTD[RgpB]および RgpB-CTD[PorA]の遺伝子を作製し、PorA 欠損株に導入して相補できるか否かを調べた。その結果、RgpB-CTD[PorA]は相補したが、PorA-CTD[RgpB]は相補しなかった。このことから、PorA の CTD 領域が特異的に T9SS 発現調節機能を有する可能性が示唆された。さらに、Kgp の膜透過シグナル配列をもつ Kgp シグナル領域-Halo タグ-CTD[PorA]のキメラ分子も PorA 欠損株を相補した。これらの結果からも CTD[PorA]が PorA の T9SS 発現調節機能領域であることが示唆された。

(12) 総括

今回の研究から以下のことが示唆された。すなわち、PorA はシグナルペプチド - FimH 類似領域 - CTD 領域で構成されるタンパク質である。PorA は菌体表面に分泌されたのち、A-LPS と結合して菌体表面に留まる。FimH 類似領域は T9SS 発現への PorA の関与には無関係であり、CTD[PorA]が T9SS 発現調節機能領域である。CTD[RgpB]にはこの機能はない。CTD[PorA]は PorY センサータンパク質のペリプラズム領域と結合する。

PorA-PorY-PorX-SigP シグナル経路による T9SS 構成タンパク質群の発現調節はペリプラズム内での CTD[PorA]の量に依存することが予想され、今後の解析が待たれる。また、PorA の FimH 類似領域は T9SS 発現には無関係であるが、菌体表面で何らかの環境中の分子を捕捉している可能性があり、今後の課題である。

< 引用文献 >

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* 6:23288 (2016)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yukitake H, Shoji M, Sato K, Handa Y, Naito M, Imada K, Nakayama K	4. 巻 10
2. 論文標題 PorA, a conserved C-terminal domain-containing protein, impacts the PorXY-SigP signaling of the type IX secretion system	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 21109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-77987-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 雪竹英治, 庄子幹郎, 佐藤啓子, 反田祐介, 内藤真理子, 今田勝巳, 中山浩次
2. 発表標題 T9SS CTDタンパク質の一つであるPorAはT9SS構成タンパク質の遺伝子発現調節に関わる
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 雪竹英治, 庄子幹郎, 中山浩次, 内藤真理子
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisにおける9型分泌機構の発現制御
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 伊藤李香, 雪竹英治, 庄子幹郎, 田上直美, 藤原卓, 中山浩次, 内藤真理子
2. 発表標題 9型分泌機構の遺伝子発現制御に関わるPorAタンパク質のシグナル活性化機構
3. 学会等名 九州微生物フォーラム2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤季香, 雪竹英治, 庄子幹郎, 藤原卓, 中山浩次, 内藤真理子
2. 発表標題 The T9SS cargo protein PorA binds to a sensor kinase PorY to regulate the T9SS gene regulation
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	雪竹 英治 (YUKITAKE Hideharu) (30380984)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・技術職員 (17301)	
研究分担者	庄子 幹郎 (SHOJI Mikio) (10336175)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授 (17301)	
研究分担者	内藤 真理子 (NAITO Mariko) (20244072)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授 (17301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------