

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18475

研究課題名（和文）歯周病菌のIX型分泌機構関連遺伝子を持つオペロンの役割と病原性への関与

研究課題名（英文）Role of operon containing genes related to type IX secretion system of periodontal pathogens and involvement in pathogenicity

研究代表者

小野 晋太郎（ONO, Shintaro）

岡山大学・歯学部・客員研究員

研究者番号：80866517

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：Porphyromonas gingivalis がIX型分泌装置を通してプロテアーゼであるジンジパインを分泌することで歯周病の発症・進行に関わる。PGN_0296オペロンはIX型分泌装置に関わっており、その構成遺伝子であるPGN_0296はIX型分泌装置に直接的な影響はきたさなかった。PGN_0298遺伝子の欠損株作製を試みたが、P. gingivalisのゲノム上で破壊することは困難であったことから、PGN_0298は必須遺伝子である可能性が示唆された。PGN_0301遺伝子産物はジンジパインを含む外膜蛋白質を修飾するシャペロン活性を有する外膜タンパク質であ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

Porphyromonas gingivalis は歯周組織に定着、増殖しIX型分泌装置を通してプロテアーゼであるジンジパインを分泌することで、歯周病の病態に大きく影響を与える。さらに歯周病の進行は糖尿病や循環器疾患など全身性疾患にも関わっている。PGN_0296オペロンはIX型分泌装置に関わっており、その構成遺伝子であるPGN_0298は必須遺伝子の可能性があり、PGN_0301はジンジパインを含む外膜蛋白質を修飾するシャペロン活性を有する外膜タンパク質であることが示唆され、ジンジパイン分泌の機構がまた解析されたことで、歯周病予防・治療への一助となったと思われる。

研究成果の概要（英文）：Porphyromonas gingivalis is involved in the onset and progression of periodontal disease by secreting the protease gingipain through the type IX secretion system. PGN_0296 operon is involved in the type IX secretion system but its constituent gene PGN_0296 did not have a direct effect on the type IX secretion system. PGN_0298 was speculated an essential gene in P. gingivalis. It was suggested that the PGN_0301 gene product is an outer membrane protein with chaperone activity that modifies outer membrane proteins including gingipains.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：Porphyromonas gingivalis IX型分泌装置 ジンジパイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯の喪失の原因となる歯周病は細菌混合感染による慢性炎症性疾患である。口腔内細菌である *P. gingivalis* は歯周病の主要な原因細菌とされ、LPS や線毛、莢膜、さらにはプロテアーゼなどの病原因子を持つ。その中でも、ジンジパイン (アルギニン特異的ジンジパイン RgpA と RgpB, およびリジン特異的ジンジパイン Kgp) は強力なプロテアーゼ活性を持ち、歯周組織の破壊に関与すると考えられている。ジンジパインは本菌がもつ特有のタンパク分泌機構である IX 型分泌装置から分泌され、菌体外でプロセッシングされて成熟酵素となる。IX 型分泌機構は、C 末端側に特定のドメイン構造 (CTD: C-terminal domain) を持つタンパク質を分泌することがわかっており、ジンジパインも CTD を持つ。

我々はこれまでに *P. gingivalis* の歯周病における病原性を細菌学的観点から理解するために、*P. gingivalis* の性状・特徴など細菌側から理解を、また細菌と宿主の感染現象からの理解として宿主側に対する *P. gingivalis* の病原性発現機序に取り組んできた。生化学・分子生物学的研究による多くの成果・報告から、病原因子であるジンジパインが最も病原性に関与する因子の一つであることが明らかになってきた。ジンジパインは、その強力なタンパク分解活性によって組織侵襲因子として歯周組織の破壊、つまりは歯周ポケット形成に寄与すると考えられる。

その一方で、ジンジパインは細菌側への役割として、増殖・生存に必須な栄養源であるアミノ酸や鉄の獲得のために機能する。このように、ジンジパインは宿主への直接的な作用による歯周病態形成への寄与だけでなく、*P. gingivalis* の生存・増殖に必要な栄養源獲得に働き、歯周病巣における長期持続感染の成立に関わる重要な病原因子である。

P. gingivalis の遺伝子番号で示される PGN_0297 遺伝子および PGN_0300 遺伝子は、既に我々のグループで IX 型分泌機構に関与することを報告した (Ono S., et al., Acta Med. Okayama. 2019, Taguchi Y. et al., Infect. Immun. 2015)。また PGN_0296 遺伝子から PGN_0301 遺伝子までの連続した 6 つの遺伝子はオペロンを形成 (以下 PGN_0296 オペロンとする) している。PGN_0297 遺伝子および PGN_0300 遺伝子はこのオペロンの構成遺伝子であった。現在のところ、PGN_0296 遺伝子、PGN_0298 遺伝子、PGN_0301 遺伝子の機能は、遺伝子情報から予測されるものの、実験的な解析などは報告されておらず明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯周病原細菌 *P. gingivalis* の歯周病における位置付けや重要性を明確にするために、細菌学的手法や分子生物学的実験法を用いて、PGN_0296 オペロンにコードされる各遺伝子の機能・役割を調べ、*P. gingivalis* の病原性との関連性を明らかにすることである。このオペロンの全容は明らかになっていないが、IV 型分泌機構関連遺伝子群と言えるほど遺伝子を保有している可能性がある。

PGN_0296 オペロンにコードされる各遺伝子が IX 分泌機構に関与していないことが判明した場合は、*P. gingivalis* の性状や発現遺伝子への影響解析を行い、その役割を明らかにしていく。

従って、*P. gingivalis* において未だ明らかになっていない PGN_0296 オペロンの各遺伝子の機能や役割に着目して、細菌学的基礎研究を推進することにより、歯周病における *P. gingivalis* の病原性の新たな理解の一助となると考えられる。

3. 研究の方法

計画1) PGN_0296 オペロンにおける機能未知遺伝子の欠損株と相補株の作製

P. gingivalis ATCC 33277 株を親株として、PGN_0296 遺伝子、PGN_0298 遺伝子、PGN_0301 遺伝子それぞれの欠損株および相補株を作製する。欠損株の作製は、薬剤耐性マーカーで遺伝子を用いて、エレクトロポレーション法にて導入を行い、用いた薬剤耐性遺伝子に対する薬剤含有培地で選択培養する。相補株の作製は、各遺伝子欠損株に欠損させた遺伝子を PGN_1045 遺伝子部に相同組み換えにより挿入することで作成する。もしくは *P. gingivalis* 用発現プラスミド pTIO-1 に欠損した遺伝子をクローニングし、エレクトロポレーション法にて導入後、薬剤含有培地で選択培養する。

計画2) 目的遺伝子の欠損株・相補株を用いた性状解析

計画1で作製した目的遺伝子の欠損株、相補株および *P. gingivalis* 親株の3種の性状を解析する。*P. gingivalis* は血液寒天培地上で黒色コロニーを形成する。これは *P. gingivalis* が産生する主要病原因子であるシステインプロテアーゼ“ジンジパイン”と密接な関係があり、リジン特異的ジンジパイン (Kgp) 欠損株では完全に白色コロニーになり、アルギニン特異的ジンジパイン (Rgps : RgpA と RgpB) 欠損株では白色より少し黒色気味のコロニーを形成することが知られている。この点を踏まえて作製した菌株のコロニーの色から、*P. gingivalis* が産生するジンジパインの酵素活性の有無を推測できる。コロニーの色素変化が無い場合でも、Rgps のようにやや黒色を帯びる可能性もあることから、Rgps や Kgp の基質を用いた酵素活性測定を行う。その測定には、菌体表面、培養上清、超音波破碎による菌体内溶解物についてジンジパインの酵素活性を測定する。

計画3) 目的遺伝子の必須性の確認およびタンパク質結晶化による機能評価

計画1において目的遺伝子の欠損株および相補株作製ができなかった場合、その遺伝子の必須性を確認し、さらにタンパク質結晶化による機能解析を実施する。

目的遺伝子のタンパク質結晶をX線回折することでタンパク質の立体構造を把握し、さらに、データベースから同様の構造を持つ他のタンパク質の機能を調査することで、目的遺伝子の機能を評価する。

4. 研究成果

①PGN_0296 遺伝子

P. gingivalis ATCC33277 株を親株として、ゲノム上の PGN_0296 遺伝子を欠失させ、PGN_0296 欠損株を作製した。親株と PGN_0296 欠損株のコロニー性状を観察したところ、親株と比較して性状に差は見られなかった。また、ジンジパイン活性が親株と比較して変化

しないことを明確に示しました。(図 1)

また菌の増殖についても比較したところ、PGN_0296 欠損株の増殖は親株の増殖よりも遅くなった。(図 2)

したがって、PGN_0296 遺伝子は IX 型分泌装置機能に寄与していない可能性があります、PGN_0296 と IX 型分泌装置機能の関係を完全に排除することはできません。

PGN_0296 は外膜タンパク質とされており、細胞の表面構造が影響を受けた可能性があります。この点は、さらなる研究において PGN_0296 の局在化とともに分析される必要があります。

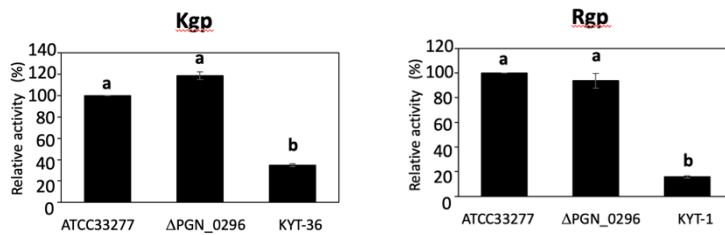


図 1.PGN_0296 欠失によるジンジバインの活性への影響

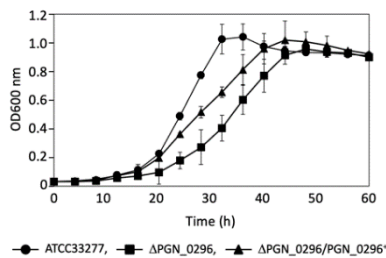


図 2.PGN_0296 遺伝子欠失による増殖への影響

②PGN_0298 遺伝子

P. gingivalis ATCC33277 株を親株として、ゲノム上に存在する PGN_0298 遺伝子を相同組換えにより破壊することを試みた。しかし、PGN_0298 遺伝子を破壊した株の作製はできなかったため、親株に PGN_0298 発現プラスミドを導入した株 (以下 pPGN_0298 とする) を作製後に相同組換えによりゲノム上の PGN_0298 遺伝子の欠損を試みたところ、ゲノム上の PGN_0298 遺伝子が欠損された株 (以下 ΔPGN_0298::pPGN_0298 とする) の作製に成功した。その後、プラスミドの保持試験を行い、*P. g*pPGN_0298 と *P. g* ΔPGN_0298::pPGN_0298 それぞれの 15 継代後のプラスミドの保持率を比較したところ、ΔPGN_0298::pPGN_0298 は保持率 100% に対して pPGN_0298 は多くの菌がプラスミドを脱落していた。このことから PGN_0298 は菌の生存に影響する遺伝子であることが示唆された。(図 3)

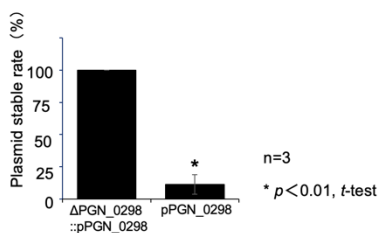


図 3.プラスミド保持試験

③PGN_0301 遺伝子

PGN_0301 遺伝子についても遺伝子欠損株の作製を試みているが、未だ成功していない。このことから、PGN_0301 遺伝子は本菌の必須遺伝子であり、遺伝子産物が必須の機能を担っている可能性を有していることが示唆された。

PGN_0301 遺伝子産物を構造から解析するため、大腸菌を用いて作製した組換えタンパク質を結晶化した。

推定された構造から、PGN_0301 遺伝子産物は外膜タンパク質であることが示唆された。またシャペロン活性を有することが推測された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masaaki Nakayama, Mariko Naito, Kazuhiro Omori, Shintaro Ono, Koji Nakayama, Naoya Ohara.	4. 巻 208(5)
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis gingipains induce cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin E2 production via ERK1/2-activated AP-1 (c-Jun/c-Fos) and IKK/NF- B p65 cascades.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Immunology	6. 最初と最後の頁 1146-1154
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4049/jimmunol.2100866	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shahriar Abu Saleh Muhammad, Ono Shintaro, Nakayama Masaaki, Ohara Naoko, Ohara Naoya	4. 巻 62
2. 論文標題 Construction and characterization of the PGN_0296 mutant of Porphyromonas gingivalis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 322 ~ 326
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2020.09.007	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------