

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月1日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592364

研究課題名（和文） 歯周病原性プロテアーゼの分泌機構解明とその制御法探索

研究課題名（英文） Investigation of the secretion system of pathogenic proteinases in *Porphyromonas gingivalis* and study of the way to control the system

研究代表者

筑波（門脇）知子（TSUKUBA (KADOWAKI) TOMOKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70336080

研究成果の概要（和文）：

P. gingivalis の分泌・膜輸送に障害が起こると、病原性因子であるプロテアーゼや血球凝集素などが前駆体として菌体内に蓄積する。このような表現型を示す遺伝子変異株のうち、2つの遺伝子（*porX* と *porY*）について、二成分制御系遺伝子の可能性を検討した。PorY は自己リン酸化を起こし、そのリン酸基は時間依存性に PorX に転移した。PorY と PorX の相互作用は生体分子相互作用解析装置によっても確認され、両者が二成分制御系を構成することが示された。さらに外界に反応して転写を調節する ECF (Extracytoplasmic function) σ 因子の一つ PGN0274 もプロテアーゼ分泌装置である Por 分泌装置の転写調節をすることがわかった。PorX-Y システムと PGN0274 は独立した経路に位置し本菌の病原性因子分泌機構が、複数制御を受けて、巧みに調節されていることが示された。

研究成果の概要（英文）：

We investigated the secretion system of pathogenic proteinases/adhesins in periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis*. The secretion depends on a protein secretion system, Por secretion system (PorSS). We isolated several gingipain secretion-deficient mutants and found that two of them were deficient in a two-component system, which is a prokaryotic signal transduction system. PorY is a sensor histidine kinase and PorX acts as a response regulator. The recombinant PorY was autophosphorylated and the phosphoryl group on PorY was transferred to PorX. The interaction between PorY and PorX was also revealed by Surface plasmon resonance analysis. Gene expression of component proteins of the PorSS was also regulated by one of ECF sigma factors, PGN0274, independently of PorY-PorX system, suggesting that the secretion system is regulated by multiple regulatory mechanisms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物系

科研費の分科・細目：歯学・機能系基礎歯科学

キーワード：細菌, 歯周病, 輸送・分泌, 二成分制御系, プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

歯周病は、わが国でも 80% の高い罹患率を示す感染症であり、歯牙喪失の最大原因となっている。近年では、心血管疾患発症や早産・低体重児出産、糖尿病のリスクファクターであることが示され、全身的医療の点からも注目されている。偏性嫌気性グラム陰性細菌 *Porphyromonas gingivalis* は、歯周病の最も重要な病原性細菌であり、大きな特徴の 1 つは、強力なプロテアーゼ活性をもつことである。これは、本菌が糖発酵能を持たず、栄養・エネルギー源をもっぱら外界のタンパク質やペプチドに依存していることによる。このタンパク質分解活性の大部分を担っているのが、「ジンジパイン」と呼ばれるトリプシン様システインプロテアーゼであり、基質切断部位の特異性から Arg 特異的な Arg-ジンジパイン(Rgp)と Lys 特異的な Lys-ジンジパイン(Kgp)が存在する。ジンジパインはコラーゲンなどマトリックスタンパク質を分解し、内在性メタロプロテアーゼを活性化して組織の直接的破壊を引き起こすだけでなく、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を通して宿主防御機構を傷害する。これとともに血液凝固第 X 因子やプロトロンビンの活性化、カリクレイン・キニン系を活性化し、フィブリン・フィブリノーゲンを分解して、血液凝固誘導、血管透過性亢進、易出血性を引き起こす。このように多彩な方面から病原性を発揮するきわめて重要な因子である。

Rgp は *rgpA* および *rgpB* 遺伝子に、Kgp は *kgp* 遺伝子にコードされており、これらの遺伝子はプロテアーゼをコードする部分のほかに 3' 側にはアドヘジン (付着因子群) をコードしていることがわかっている。これらのアドヘジタンパクについては Hgp15 アド

ヘジンが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および血小板凝集に必須な分子であることが示されている。これらの活性は *P. gingivalis* と血管疾患とを関連させる重要な性質と考えられている。アドヘジンを含む大きな分子として転写翻訳された Rgp および Kgp プロテアーゼ前駆体は、自らの分解活性によってプロセッシングを行い、各機能ドメインを産生すると考えられている。このように、Rgp や Kgp、アドヘジン分子の病原性が明らかにされてきた一方で、これらの機能タンパクドメインの当該遺伝子からの転写、翻訳と菌体表面への輸送については未解決の部分が多い。英国の MA Curtis 教授らやオーストラリアの EC Reynolds 教授らが糖鎖修飾と膜輸送との関連について言及しているにすぎず、ほとんど解明されていなかった。

2. 研究の目的

Rgp、Kgp プロテアーゼは、単量体として分泌されるだけでなく、菌体外膜上で分子量約 660kDa の複合体を形成し、その複合体は Rgp と Kgp の両触媒ドメインのほか C 末端由来のアドヘジンドメイン Hgp44, Hgp15, Hgp17, Hgp27 および LPS を含む。*P. gingivalis* の全ゲノム遺伝子解析の結果から、本菌には *secA*, *DF*, *E*, *G*, *Y* の類似遺伝子が存在することから、分泌タンパク質は、まず N 末端シグナルペプチド依存性に一連の Sec 因子より構成される機構によって細胞膜を通過し、ペリプラスムに輸送されると考えられる。しかしながら、外膜の通過機構に関してはわかっていない。これらプロテアーゼ・アドヘジンは大きな一分子のタンパク質として転写翻訳され、外膜通過に前後してそれぞれの機能ドメインへとプロセッシング・活性化され、一部は

単量体として分泌され、プロテアーゼ・アドヘジン・LPS 複合体を形成すると考えられるが、その機序についてはわかっていない。

P. gingivalis *porT* 変異株においては、プロテアーゼ・アドヘジン前駆体がペリプラスム空隙に蓄積することが見出されており、この分子が *P. gingivalis* の膜輸送・分泌に関わる因子であると考えられる。本研究では、PorT をはじめとするこれらの因子が実際にどのように膜輸送に関わっているのか、その機構を詳細に解析する。この機構に関わっているそれぞれの因子を組換えタンパク質として分離・精製し、機能を明らかにする。

これまでに Rgp、Kgp プロテアーゼの遺伝子をさまざまな細菌に導入し、タンパク質を得ることを試みても、活性型の酵素として得られることは困難であった。また、*porT* が *P. gingivalis* の近縁種に存在しないことから、*P. gingivalis* の病原性プロテアーゼ・アドヘジンの膜輸送・分泌機構は、これまでに知られている分泌機構とは全く異なる新規の機構である可能性が高い。したがって、この機構を解明することは、歯学にとどまらず、細菌学分野全般としても学術的に極めて重要であると考えられる。しかも、先に述べたようにプロテアーゼ・アドヘジンは強力な病原性を発揮して、歯周病だけでなく心血管疾患の原因となるので、その膜輸送・分泌機構が特異的であるほど、病原性制御の新規創薬標的として臨床的に応用できる可能性が非常に高く、これらの制御を介する新たな歯周病と関連疾患の制圧が見込まれる。

3. 研究の方法

P. gingivalis の膜輸送・分泌機構に障害を示す変異株の作製やその原因となった遺伝子の解析をおこなう分子遺伝学的手法と、個々の遺伝子産物を組換えタンパク質として単

離し、タンパク質レベルでの解析や相互作用を行なう生化学的手法、また、細菌の性状を解析する細胞生物学的手法を駆使してアプローチを試みた。

1) プロテアーゼ・アドヘジンの膜輸送・分泌に関与する因子の探索

①PorT を足がかりとした解析

porT 遺伝子から組換えタンパク質を作製し、抗体を作製、免疫沈降法によって相互作用する因子を探索した。

②PorT 以外の因子について

porT 遺伝子以外にも独立した 11 つのプロテアーゼ・アドヘジン膜輸送変異株がすでに得られている。これらについても網羅的に組換えタンパク質として単離し、抗体を作製するとともに、相互作用するタンパク質の探索を行なった。

2) 二成分制御系の関与に関する解析

12 個の膜輸送変異株のうちの 2 つは、ORF のアミノ酸配列情報から、二成分制御系を構成する因子であると考えられた。一般的に二成分制御系は 2 つのタンパク質因子から構成される。ひとつは膜に貫通して存在し、環境状態を認識するセンサーキナーゼ(HK)であり、コンホメーション変化で内側ドメインに情報を伝え、ヒスチジンキナーゼ活性によって、自己リン酸化を起こす。このリン酸基がもうひとつの構成因子であるレスポンスレギュレーター(RR)に移行して、遺伝子転写を調節する。本研究では、これらに類似性が示唆された遺伝子産物 PorX (RR) と PorY (HK) が、それぞれ真に制御活性を持つのか検討を行った。

① 二成分制御系としての機能の検討

PorX と PorY が二成分制御系を構成する因子なのか、それぞれのリコンビナントタンパク質を大腸菌に発現させて精製し、

a. 両タンパク質の相互作用を BIA-CORE 生

体分子間相互作用解析装置を用いて調べた。また、

- b. 実際にリン酸基の授受が行なわれるかどうか、*in vitro*での $[^{32}\text{P}-\gamma]\text{ATP}$ を用いたリン酸化実験を行なった。

② PorX-PorY 相互作用の特異性検討

P. gingivalis (遺伝子数 2090) においては 6 つのヒスチジンキナーゼセンサータンパク遺伝子と 8 つのレスポンスレギュレータータンパク遺伝子の存在が示唆されている。*porY* および *porX* 遺伝子はオペロン構造をとらず、孤立遺伝子あることから、PorY-PorX タンパク質相互作用の特異性を、他の HK あるいは RR と組み合わせて実験することにより解析した。

3) プロテアーゼ・アドヘジンの分泌制御に関わる因子の探索～*in vivo* 解析系～

① PorX, PorY 以外の因子

PorXはRRでありながら、DNA結合能はなく、一般的なレギュレーターとは構造的にも機能的にも一線を画す。しかしながら、*porX* 変異株ではPorTやプロテアーゼ・アドヘジン輸送装置分子の転写が変化していることから、PorXが何らかの別の因子を介してそれらの調節を行なっていると考えられる。そこで、PorXと相互作用する因子を、共沈降法と質量分析を組み合わせた方法によって同定した。共沈は、④抗PorX抗体を用いた免疫沈降法、⑤PorXにタグをつけ、タグに親和性を示す物質による沈降法により行った。

② PorX と σ 因子との相互作用解析

porX の変異株では、病原性プロテアーゼの分泌が有意に低下するが、これと同じ表現型を示す ECF (extracellular function) σ 因子変異株(PGN0274)を見出した。そこで、本研究では、PorX とこの ECF σ 因子との関係を調べた。*porX* 変異株と PGN0274 変異株の遺伝子発現の違いを tiling array によって網羅的に

解析した。そして、PorX と PGN0274 の直接作用について、共沈実験を行った。

また、*porX* と PGN0274 の二重変異株を作製して、それぞれ単独変異株の性状と比較した。

4) PorY センサータンパク質の活性化機構の解明

PorY タンパク質は ORF のアミノ酸配列より、N 末端側に膜貫通ドメインをもち、ペリプラスム領域部分で外界因子を感知して、自己リン酸化を起こしていると考えられる。そこで、PorY-PorX システムの制御下にある遺伝子 *porT* のプロモーター領域に β -galactosidase 遺伝子を融合させた *P. gingivalis* レポーター株を作製し、種々の条件下での galactosidase 活性を測ることによって、本システムの認識因子について解析を試みた。

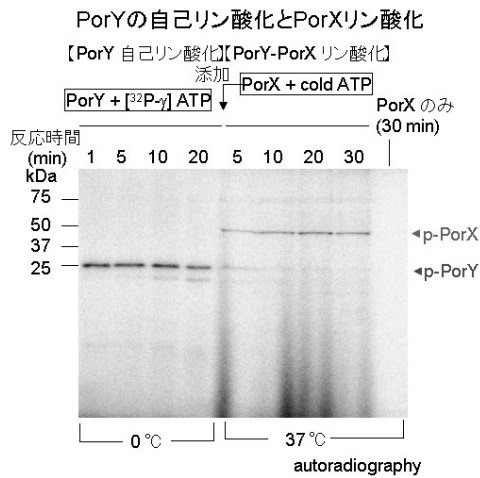
4. 研究成果

二成分制御系は細菌における環境センシングとそれに基づく代謝の制御（多くの場合、遺伝子発現調節）を行なう機構として最も重要なもののひとつである。本研究は、*P. gingivalis* において新しく見出されたふたつの遺伝子に関して、それらが実際に二成分制御系因子として機能することを示した。

porX あるいは *porY* の欠損変異株では、定量的 PCR 解析によりジンジパインの mRNA レベルは上昇するものの成熟タンパク質は菌体外に分泌されず、細胞質に不活性型分子が蓄積していた。これに反して、Por 分泌装置構成タンパク質の mRNA は有意に減少し、転写抑制されていた。

膜貫通領域を欠く組換え型 PorY タンパク質は $[^{32}\text{P}-\gamma]\text{ATP}$ と Mg^{2+} 存在下で自己リン酸化し、そのリン酸基はPorYからPorXに転移した。PorYとPorXの相互作用はBIA-CORE表面プラズモン生体分子相互作用解析装置によって

も確認され、両者が相互作用することが示された。



次に PorY-PorX リン酸化の特異性を調べる目的で、線毛形成にかかわる HK である FimS と PorX の相互作用を調べた。ATP 存在下で自己リン酸化したリコンビナント FimS のリン酸基は PorX には転移しなかった。さらに詳細な検討が必要であるが、PorY-PorX の相互作用は、特異性を有することが示唆される。

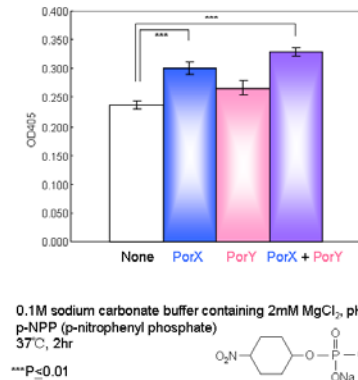
大多数のRRはそのC末端領域にDNA結合ドメインを有し、調節を受ける遺伝子上流に結合して転写を制御する。しかし、PorXにはDNA結合モチーフがなく、リコンビナント PorXは、ゲルシフト法によって、分泌装置タンパク質遺伝子群プロモーター領域に結合しなかった。

PorX は C 末端部分に DNA 結合モチーフの代わりに、アルカリフォスファターゼ族に分類される PglZ ドメインを有する。PorX について、アルカリフォスファターゼ活性の有無を調べてみると、基質として数種のいずれかを用いた場合でも弱い脱リン酸化活性を示した。このホスファターゼ活性が直接または間接的に遺伝子調節にかかわるかどうかがは今のところ不明である。

PorXと作用する因子が存在するならば、それがアルカリフォスファターゼ様活性の基質と

なる可能性がある。PorXに対する免疫沈降法およびPorX-Halo tag 融合タンパク質との共沈法により、この因子について探索を行い、候補分子が得られている。

Alkaline phosphatase activity of recombinant PorX.



二成分制御系とともに外界に反応して遺伝子転写を調節するECF σ 因子の一つである PGN0274遺伝子変異株においても、Por分泌装置遺伝子の転写が抑制され、ジンジパイン分泌障害を示すことがわかった。しかしながら Tiling arrayによって網羅的に遺伝子発現を調べたところ、調節を受ける遺伝子群はporX 変異株とは完全には一致しなかった。また、共沈実験によって、タンパク質レベルでのPorX と PGN0274の直接的相互作用も確認できなかった。porYと PGN0274遺伝子あるいはporXと PGN0274遺伝子の二重変異株では、相加的に Por分泌装置タンパク質の転写が抑制されたことから、これらは別の経路として存在し、本菌の病原因子分泌を巧みに調節していることを示唆している。

porTプロモーター領域にβ-galactosidase遺伝子を融合させたレポーターアッセイによっては、いくつかの条件（酸化状態、アミノ酸の存在、ジペプチドの添加など）で活性測定を行ったが、劇的にその活性が変化する外的因子は、今のところまだ見つかっていない。

以上のように、本研究において、PorY-PorX が、二成分制御系として機能すること、その

機能はPor分泌装置の遺伝子転写を制御すること、Por分泌装置の遺伝子転写には、ECF σ 因子も関与していることが明らかとなった。

PorTと相互作用する分子については、抗PorT抗体を用いた免疫沈降法によって、候補分子を得ている。現在、それらとPorTとの複合体について、機能と構造を解析中である。

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. Shoji M, Sato K, Yukitake H, Kondo Y, Narita Y, Kadowaki T, Naito M, and Nakayama K.

Por secretion system-dependent secretion and glycosylation of *Porphyromonas gingivalis* hemin-binding protein 35. PLoS One, 6: e21372 (2011)

2. Tsukuba T, Yanagawa M, Okamoto K, Okamoto Y, Yasuda Y, Nakayama KI, Kadowaki T, Yamamoto K.

Impaired chemotaxis and cell adhesion due to decrease in several cell-surface receptors in cathepsin E-deficient macrophages.

J Biochem. 145(5):565-573 (2009).

[学会発表] (計6件)

1. 庄子幹郎、佐藤啓子、雪竹英治、近藤好夫、

成田由香、門脇知子、内藤真理子、中山浩次 「*Porphyromonas gingivalis* HBP35 タンパク質の菌体表面局在化機構の解析」、第53回 歯科基礎医学会学術大会 2011年10月1日、於長良川国際会議場

2. 雪竹英治、佐藤啓子、庄子幹郎、筑波(門脇)知子、内藤真理子、中山浩次 「抗菌物質非鉄金属ポルフィリンの取り込みに関与する*P. gingivalis*外膜タンパク質」

第52回歯科基礎医学会学術大会

2010年9月22日 於タワーホール船堀

3. Yuka Narita, Mikio Shoji, Keiko Sato,

Hideharu Yukitake, Tomoko Kadowaki,

Mariko Naito¹, Yukitaka Murakami

Fuminobu Yoshimura, Koji Nakayama:

Characterization of a *porK* orthologue mutant in

Tannerella forsythia

第83回日本細菌学会総会 2010年8月

於パシフィコ横浜

4. Mikio Shoji, Keiko Sato, Yuka Narita,

Hideharu Yukitake, Tomoko Kadowaki,

Mariko Naito, Koji Nakayama: Role of the

C-terminal domain in a novel secretion system in *Porphyromonas gingivalis*

第83回日本細菌学会総会 2010年8月

於パシフィコ横浜

5. 筑波隆幸、柳川三千代、門脇知子、岡本

美子、坂井詠子、岡元邦彰、山本健二 「カ

テプシンE欠損によるオートファジー低下とそれに伴うミトコンドリア機能低下と

酸化ストレスの増大」

第14回日本病態プロテアーゼ学会、2009年

8月 於大阪

6. 筑波隆幸、門脇知子、坂井詠子、岡元邦

彰、山本健二 「カテプシンE欠損マクロファージにおけるオートファジーの低下とそ

れに伴うミトコンドリア機能異常と酸化ストレスの上昇」

第51回歯科基礎医学会総会 2009年9月、

於新潟

[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]

ホームページ (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科口腔病原微生物学分野)

<http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/mmi/ob/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筑波 (門脇) 知子

(TSUKUBA (KADOWAKI) TOMOKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 70336080

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

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