

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：32667

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23592715

研究課題名(和文) 歯周炎原因菌のタンパク質毒素を分泌する外膜チャネルの解明

研究課題名(英文) Characterization of the outer membrane protein complex in the Por secretion pathway

研究代表者

才木 桂太郎 (Saiki, Keitarou)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：30297973

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：慢性歯周炎原因菌 *Porphyromonas gingivalis* の Por 分泌経路は C 末端領域ドメイン (CTD) が、ある病原性タンパク群を分泌する。その分泌反応は、CTD に依存した Por 分泌装置での外膜透過、シグナルペプチダーゼ PG0026 による CTD の切断、糖脂質修飾と表層膜への結合で構成される。PG0026 は CTD タンパクの一つであるが、例外的に分泌後の CTD 切断と脂質結合が起こらない。本研究は CTD 依存的に外膜を透過した PG0026 が糖脂質修飾反応に關与する外膜タンパク PG27 と特異的に結合することで自身を菌表層に機能的に局在させる機構を明らかにし、外膜分泌装置の構成を初めて示唆した。

研究成果の概要(英文)： *Porphyromonas gingivalis*, the etiologic agent of chronic periodontitis, secretes C-terminal domain (CTD) proteins, which are involved in virulence and proliferation of this bacterium, via the Por secretion pathway (PorSP). PorSP is composed of steps such as passage through the outer membrane via the CTD-dependent Por secretion system (PorSS), cleavage of their CTDs by the CTD signal peptidase PG0026, glycolipid-conjugation, and anchorage to the outer cell membrane and/or the extracellular vesicles. PG0026 is one of the CTD proteins and secreted via PorSS, but undergoes no successive modifications. In this study, I found that PG0026 anchors to the cell surface by interacting with outer membrane protein PG27 that is involved in the glycolipid modification of CTD proteins, and functions in processing of other CTD proteins such as gingipains. This study also demonstrates the complex formation of the outer membrane proteins in PorSP.

研究分野：生化学

キーワード：歯周病 タンパク分泌

1. 研究開始当初の背景

多くの成人日本人が罹患している慢性歯周炎は公衆衛生上の重要な疾病である。慢性歯周炎は複数菌種による細菌感染症であるが、グラム陰性の嫌気性菌 *Porphyromonas gingivalis* はその主たる原因菌である。*P. gingivalis* が分泌するタンパク質毒素ジンジパインは強力なトリプシン様活性を有しており、宿主の歯肉や歯周組織に異常な免疫応答や炎症反応を引き起こし本疾患の病態を進行させる。従ってジンジパインは本菌の重要な病原因子である。一方 *P. gingivalis* は糖非分解性であり、低分子量のペプチドを唯一のエネルギー源として代謝する。しかし本菌の感染部位である口腔内環境はペプチド断片の存在量が少ないため、積極的なタンパク質の消化反応が本菌の増殖には重要となる。研究代表者らは *P. gingivalis* 用のタンパク質含有最少培地を新規に開発し、タンパク質に依存した本菌の増殖にジンジパインが必須であることを明らかにした [Oda *et al.* (2007) *J. Periodont. Res.*, **42**, 438-442; Oda *et al.* (2009) *J. Periodont. Res.*, **44**, 362-367]。従ってジンジパインは本菌の感染部位での増殖に必須な因子でもある。ジンジパインが病原因子として、また増殖因子として機能するためには、ジンジパイン自身が菌体外に局在することが必須である。ジンジパインはシグナル配列を含む前駆体として翻訳され、Sec 複合体を介して細菌細胞の内膜を透過する。しかしそれ以降のジンジパインの分泌・成熟機構はほとんど明らかにされておらず、以下に述べる断片的な知見が知られるのみであった。それは、ポストゲノム解析から *P. gingivalis* には既存のタンパク質分泌経路が関与しないことが示唆された。ジンジパインを含む 34 個の分泌性タンパクの C 末端領

域には保存性で新規の C-terminal domain (CTD)が見出されることから、CTD 依存性の外膜透過装置の存在が予測された。[Seers *et al.*, (2006) *J. Bacteriol.* **188**, 6376-6386]。細胞外に分泌されたジンジパインは A-LPS (脱アシル化した LPS)の結合による糖脂質修飾を受けて外膜脂質層外葉に結合しているが、この糖脂質修飾反応が外膜透過反応と密に共役して CTD タンパクの分泌・成熟が完了することが推定された。これらの報告・知見はジンジパインの分泌・成熟機構の全体像の俯瞰的な理解が単純ではないことを示唆していた。

研究代表者はジンジパインの外膜透過装置を構成する外膜タンパクに着目してジンジパインの分泌に必須な因子のスクリーニングを行い、3 個の新規の外膜タンパク質 (Sov, PG27, PG534) を同定・報告した [Saiki and Konishi (2007) *Microbiol. Immunol.* **51**, 483-491; Ishiguro *et al.* (2009) *FEMS Microbiol. Lett.* **292**, 261-267; Saiki and Konishi (2010) *FEMS Microbiol. Lett.* **310**, 168-174]。同様に長崎大のグループは 9 個の新規タンパク質 (PorK, L, M, N, P, Q, T, U, W) を同定・報告した [Sato *et al.* (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 8668-8677; Sato *et al.* (2010) *P. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 276-281]。興味深いことに、これら 12 個のタンパク質因子の内、7 個のタンパク質因子 (PorK-N, PorT, PorW, Sov) は *F. johnsoniae* の滑走運動に必須なタンパク質因子 (GldK-N, SprT, SprE, SprA) と相同であった。しかし *P. gingivalis* は非運動性であることから、この 7 種のタンパク質因子は新規のタンパク質分泌装置の基本構造の共通部分を構築しており、PorK-N, PorT, PorW, Sov は病原因子の分泌を、GldK-N, SprT, SprE, SprA は運動性因子の分泌をそれぞれ

れ行っていると推定された。更に、この7種のタンパク質因子の中で、Sov タンパク質とそのホモログの SprA タンパク質は、外膜を貫通する膜内在性タンパク質であることが実験的に示された [Saiki and Konishi (2010) *FEMS Microbiol. Lett.* **302**, 166-174; Nelson *et al.* (2007) *J. Bacteriol.* **189**, 7145-7150]。従って Sov, タンパク質は、ジンジパインの外膜透過チャンネルの一部を構成している可能性が考えられた。しかしこれら Por タンパク群と Sov タンパクと PG534 タンパクの機能的役割はほとんど明らかにされていない。一方、研究代表者らと長崎大グループがそれぞれ最初に同定・報告した PG27 と PorU/PGN_0022/PG0026 の機能的役割に関しては重要な進展があった。PG27 はバレル構造の外膜タンパクで CTD タンパクの糖脂質修飾の基質である A-LPS の生合成反応において LPS の脱アシル基反応に関与することが示唆された [Chen *et al.*, (2011) *Mol. Microbiol.* **79**, 1380-1401]。PG0026 は CTD タンパクの一つであるが、CTD を切断するシグナルペプチダーゼであることが示された [Glew *et al.*, (2012) *J. Biol. Chem.* **287**, 24605-24617]。

この様にジンジパイン等の CTD タンパクの分泌・成熟に関わるタンパク因子の同定は成されたが、一方で分泌・成熟経路における機能的役割や複合体の構成に関する知見はほとんど明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究は慢性歯周炎原因菌 *Porphyromonas gingivalis* の新規タンパク分泌経路の構成や機能の解明を目的とする。しかしタンパク分泌装置の様な巨大な膜タンパク複合体の精製は困難であり、実際、CTD タンパクの外膜透過装置 Por

複合体の全体像もほとんど明らかにされていない。そこで本研究では研究代表者らが同定した Sov と PG27 に着目した。Sov は、外膜タンパクであり、CTD タンパクの外膜透過装置の外膜サブユニットであることが示唆されており、チャンネルを構成しうる巨大なタンパク質である(2,499 残基)ことから、CTD タンパクを分泌する外膜チャンネル本体である可能性が予測される。PG27 も外膜タンパクであり、外膜透過後に起こる糖脂質修飾反応に関与することが示されていた。しかし研究代表者は PG27 の変異が CTD タンパクであるジンジパインの分泌自体を完全にブロックすることを示している。これは、外膜透過反応と糖脂質修飾反応が密に共役していることを示唆するが、また PG27 が分泌タンパクの外膜透過反応において未知の重要な役割を果たしている可能性も示唆していると思われる。

本研究の独創的な点は Sov と PG27 に着目してジンジパインの外膜透過機構を解明することである。外膜タンパクは表層に露出する部位が阻害性薬剤の直接の結合部位となる魅力ある標的であり、基礎的研究データが臨床研究に移行し易い長所も含有する。しかし膜タンパクの研究には未変性で失活していないタンパク質の精製が困難である場合があり、目的の成果はおろか精製条件の設定すら得られない可能性も想定される。そこで Sov と PG27 の解析実験と並行して、CTD タンパクの分泌阻害性物質のスクリーニングの予備的実験も行う。

本研究の意義は、歯周炎原因菌の感染と歯周炎の発症に必須である新規タンパク分泌経路の知識を深められること、

ジンジパインの分泌装置を標的とする新たな歯周炎治療法の開発に向けた基盤を確立できること、更に グラム陰性細

菌における現在のタンパク質分泌経路のモデルに新たな知見を提供できることにある。

3. 研究の方法

外膜サブユニットである Sov あるいは PG27 と他のタンパク質因子との分子間相互作用のみに着目して生化学的および遺伝学的手法を用いて解析し、ジンジパインをはじめとする CTD タンパク群の外膜透過チャンネルや糖脂質修飾反応を行う外膜サブユニットの構成やと機能を解明する。

(1) Sov あるいは PG27 の精製標品の解析と CTD タンパク分泌経路の外膜チャンネル複合体や外膜サブユニット複合体の構成解析： Sov あるいは PG27 の遺伝子にヒスチジンタグ遺伝子を導入して、*Porphyromonas gingivalis* で発現させ、ニッケルカラムを用いてアフィニティ精製する。精製した Sov あるいは PG27 と共に精製されるタンパク因子を質量分析法で決定する。得られたタンパク因子の遺伝子 KO 株を構築し、Sov あるいは PG27 との関係性を遺伝学的に調べる。

(2) 96 穴のマルチプレートを用いて *Porphyromonas gingivalis* を植えた培養液とスクリーニングする化合物の混液を培養し、*P. gingivalis* の増殖性を調べる。申請者が開発した最少培地はジンジパインに依存した増殖が、複合培地は通常の増殖がそれぞれ調べられる。すなわち最少培地と複合培地で共に増殖を示さなければ増殖阻害性化合物が、最少培地で増殖が阻害され複合培地で増殖すればジンジパインの分泌阻害性化合物がそれぞれスクリーニングできる。

4. 研究成果

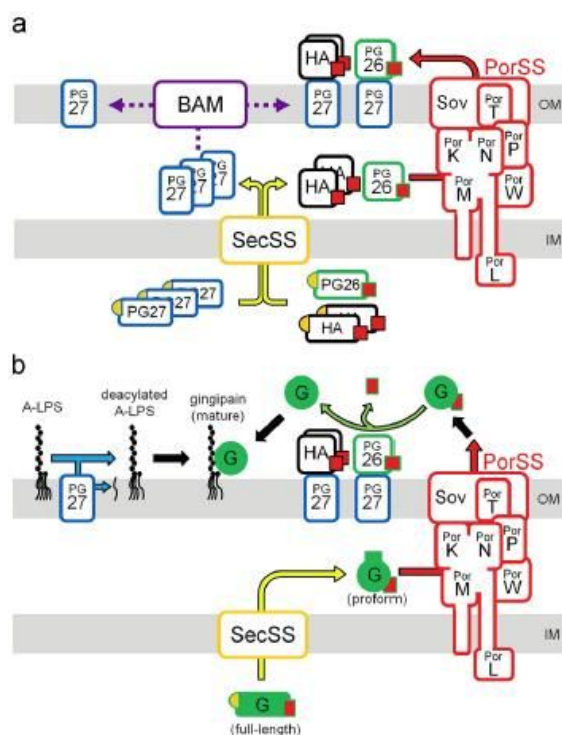
(1) PG27 複合体の解析：ヒスチジンタ

グを導入した PG27 の精製標品には2種類のタンパク質が結合していた。LC-MS/MS 分析の結果、CTD を切断するシグナルペプチダーゼ PG0026 と赤血球凝集因子 HagA を同定した。PG0026 と HagA は共に CTD タンパクであり、Por 分泌装置によって外膜を透過する。PG0026 をコードする PG0026 遺伝子は PG27 をコードする PG0027 遺伝子と密接しており、転写レベルで共発現すると推定される。PG0026 は *P. gingivalis* の外膜画分や細胞外分泌小胞画分に検出される。この外膜局在性は PG0026 が CTD シグナルペプチダーゼとして機能するために重要であると推定される。しかし発現する PG0026 タンパクは自身の CTD が切断されておらず糖脂質も結合していないことが明らかにされており、また PG0026 の一次構造には推定される膜貫通領域や膜結合配列が無いことから、PG0026 の外膜局在機構は不明であった。今回の結果は Por 分泌装置によって外膜を透過した PG0026 が膜タンパク PG27 の外膜からの露出部位と結合することで外膜に局在することを示している。更に PG27 は PG0026 を結合してシグナルペプチダーゼ反応を菌体表層で起こさせるという外膜透過反応に重要な機能を担うことを示した。

赤血球凝集因子として同定された HagA は CTD が切断されており糖脂質修飾も受ける。しかし PG27 との結合性を示すタンパクとして同定された HagA は PG0026 と同様に CTD が切断されたおらず糖脂質修飾も受けてないことが示された。PG27-HagA 複合体の機能的役割は現在も解析中である。

(2) Sov 複合体の解析：Sov の精製条件の設定を行い精製系の構築を行った。

(3) *Porphyromonas gingivalis* の阻害性化合物のスクリーニング：およそ 10 万個の化合物の一次スクリーニングを完了した。



図：PG27 と PG0026 と HagA の分子集合 (a) とジンジパインの分泌・成熟 (b) のモデル。(a) PG27 と PG0026 (PG26) と HagA (HA) はシグナル配列 (黄色半円) 依存的に Sec 分泌装置 (SecSS) によって細胞質膜 (IM) を透過する。パレル構造の外膜タンパク PG27 は BAM 複合体によって外膜に挿入される。PG0026 (PG26) と HagA (HA) は CTD (赤色四角) 依存的に Por 分泌装置 (PorSS) によって外膜を透過する。PG0026 (PG26) と一部の HagA (HA) は PG27 に結合して外膜表層に局在する。(b) CTD タンパクの一つであるジンジパインの全長 (full-length) はシグナル配列 (黄色半円) 依存的に Sec 分泌装置 (SecSS) によって細胞質膜 (IM) を透過し (proform) CTD (赤色四角) 依存的に Por 分泌装置 (PorSS) によって外膜を透過、PG27 に結合したシグナルペプチダーゼ PG0026 (PG26) によって CTD (赤色四角) が切断される (ジンジパインの N 末領域にあるプロド

メインの切断がどの段階で起こるかは不明)。CTD が切断されたジンジパインポリペプチドには、PG27 を含む生合成経路で合成された A-LPS が結合して細胞表層や分泌小胞 (図には示してない) の外膜の脂質層外葉に結合して成熟型 (mature) となる。図は文献 K. Saiki, K. Konishi (2014) J. Oral Biosci., 56, 115-119. より引用。

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 3 件)

K. Saiki, K. Konishi (2014) Assembly and function of PG27/Lpt0, PG0026, and HagA in the secretion and modification system of C-terminal domain proteins. J. Oral Biosci., 56, 115-119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2014.07.001>

K. Saiki, K. Konishi (2014) *Porphyromonas gingivalis* C-terminal signal peptidase PG0026 and HagA interact with outer membrane protein PG27/Lpt0. Molec. Oral Microbiol., 29, 32-44. DOI: 10.1111/omi.12043

K. Saiki, K. Konishi (2012) Strategy for targeting the gingipain secretion system of *Porphyromonas gingivalis*. J. Oral Biosci., 54, 155-159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.job.2012.03.003>

[学会発表] (計 5 件)

才木桂太郎、古西清司：Porphyromonas gingivalis の C 末シグナルペプチダーゼとヘマグルチニンと外膜タンパク PG27 の結合：第 87 回日本細菌学会総会：平成 26 年 3 月 27 日～28 日：タワーホール船堀 (東京)

才木桂太郎、古西清司：ジンジバインの分泌機構：第55回歯科基礎医学会学術集会「サテライトシンポジウム10」：平成25年9月20日：岡山コンベンションセンター（岡山）

才木桂太郎、古西清司：Deletion and suppressor mutation analyses of Sov that functions in a novel protein secretion system：第85回日本細菌学会総会：平成24年3月27日：長崎ブリックホール（長崎）

才木桂太郎、古西清司：Porphyromonas gingivalisのジンジバイン分泌系を標的とした研究戦略：第53回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会：平成23年9月30日：長良川国際会議場（岐阜）

才木桂太郎、古西清司：歯周病原菌の病原因子分泌に関与するPG27/LptO蛋白の欠失変異および抑圧変異の解析と推定 バレル構造の検証：第84回日本生化学会大会：平成23年9月24日：京都国際会館（京都）

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

才木 桂太郎 (SAIKI, Keitarou)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：30297973

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：