

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 8 月 6 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592720

研究課題名(和文) 歯周病関連細菌が産生する蛋白質の翻訳後修飾：糖鎖修飾とリン酸化修飾の役割

研究課題名(英文) Post-translational modifications of proteins from periodontopathic bacteria: role of glycosylation and phosphorylation

研究代表者

村上 幸孝 (MURAKAMI, Yukitaka)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：60239506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病関連細菌 *P. gingivalis* の翻訳後修飾蛋白質を解析した。糖蛋白質として、OmpA様蛋白質のほかに新たに3種類の糖蛋白質が発見された。これらの糖蛋白質は、増殖やバイオフィーム形成に関与することが明らかになった。OmpA様蛋白質はレクチンカラムで効率的に分離が可能であった。また、リン酸化蛋白質をアフィニティーカラムで分離、同定を行ったところ、少なくとも6種類の新奇な蛋白質を見つけることができた。

研究成果の概要(英文)：Post-translationally modified proteins from periodontopathic *Porphyromonas gingivalis* were analyzed. Besides OmpA-like proteins, three novel glycoproteins were found. These glycoproteins were involved in bacterial growth and biofilm formation. OmpA-like proteins were effectively isolated using a lectin column. In addition, at least six novel phosphorylated proteins were identified after separation using an affinity chromatography column.

研究分野：口腔細菌学

科研費の分科・細目：医歯薬学・歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：歯周病関連細菌 蛋白質 翻訳後修飾 糖鎖修飾 リン酸化修飾 OmpA

1. 研究開始当初の背景

歯周病はプラーク中の細菌によって発症し進行する感染症である。そのうち歯周炎は特定の細菌感染によって引き起こされ、炎症が歯周組織の深部にまで波及すると、歯槽骨が破壊され、最終的には歯の喪失を招く。慢性歯周炎が最も一般的にみられる歯周炎であり、通常 35 歳以上で発症し、罹患率は加齢とともに増加する。高齢化社会を迎えた現在では、歯周病の予防および治療は、口腔の健康維持のための重要な課題である。

慢性歯周炎の有力な関連細菌として、いわゆる“Red complex”を形成する *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* および *Treponema denticola* のグラム陰性菌 3 菌種が挙げられる。病原細菌の表層成分は宿主の防御機構の標的となるため、表層成分の構造と機能を解明することは病原性を理解する上で非常に重要である。*P. gingivalis* においては、線毛やプロテアーゼをはじめとする多数の病原因子が調べられてきたが、外膜に関しては比較的注目されていなかった。

われわれは、*P. gingivalis* の外膜蛋白質の分離・精製方法を検討し、主要外膜蛋白質の同定を行った (Murakami et al, Eur J Oral Sci, 2002)。その結果、主要外膜蛋白質としてジンジパイン (Rgp と Kgp)、RagA、RagB および OmpA 様蛋白質が存在することを報告した。遺伝子欠失株を用いた研究により、OmpA 様蛋白質が 2 種類の蛋白質で構成されるヘテロ 3 量体を形成し、外膜の安定性に寄与していることを明らかにした (Nagano et al, J Bacteriol, 2005; Iwami et al, Oral Microbiol Immunol, 2007)。RagA および RagB は物理的に近接して外膜表層に存在し、比較的分子量の大きな蛋白質分解物の菌体内への取り込みと本菌の病原性の発揮に関与することを明らかにした (Nagano et al, J Med Microbiol, 2007)。患者血清を用いた研究により、RagB が、歯周病患者において重要な菌体表層抗原であることも明らかにした (Imai et al, Eur J Oral Sci, 2005)。

多くの蛋白質は翻訳後修飾を受けて多様化するとされている。翻訳後修飾には、リン酸化、メチル化などがあるが、最も多いのが糖鎖修飾である。糖鎖修飾は糖転移酵素により単糖が 1 つずつ付加されることにより起こる。この糖鎖による修飾は単にゲノムの情報では推定できない。一般的な糖修飾の意義として、付着への関与、蛋白質分解からの保護、三次構造の安定化、抗原の変異性の付与や免疫機能からの回避などが挙げられる。現在のところ、細菌においては、*Campylobacter* 属の糖蛋白質の研究が最も進展していると考えられる (Szymanski and Wren, Nature Rev, 2005)。歯周病関連細菌においては、糖蛋白質はほとんど研究されて

いなかった。

P. gingivalis の主要外膜蛋白質のうち、ジンジパインの糖修飾について、英国の Curtis らのグループが現在までに 4 編の論文を発表している (Curtis et al, Infect Immun, 1999; Slaney et al, J Periodont Res, 2002; Gallagher et al, Curr Protein Pept Sci, 2003; Rangarajan et al, Infect Immun, 2005)。菌体表層の多糖体産生に関わる領域がジンジパインの糖修飾に影響を及ぼすことが報告された (Shoji et al, Microbiology, 2002)。糖転移酵素がジンジパインの糖修飾と酵素活性を変化させるとする報告もある (Vanterpool et al, Infect Immun, 2005)。そのほかには、外膜蛋白質の OMP85 ホモログが糖鎖修飾蛋白質であり、バイオフィーム形成に関与することが報告された (Nakao et al, Biochem Biophys Res Commun, 2008)。ごく最近、Mfa1 線毛が糖鎖修飾されていることも発表された (Zeituni et al, J Bacteriol, 2010)。

われわれは、*P. gingivalis* の全菌体抽出液を調製し、レクチンカラムを用いて糖蛋白質の分離を試みたところ、WGA カラムにより主要外膜蛋白質の OmpA 様蛋白質が効率的に濃縮できるという知見を得た。菌体成分を二次元電気泳動によって展開し、糖鎖特異的染色を行った後に、網羅的に糖修飾蛋白質スポットを解析した。その結果、OmpA 様蛋白質以外に少なくとも数種類の糖蛋白質の存在が明らかになった。

並行して行った基礎的な実験結果から、修飾糖鎖は O 結合型糖鎖であり、N-アセチルグルコサミンが関与しているのではないかと (O-GlcNAc 修飾) との仮説を得た。この修飾様式は、真核生物では一般的にみられるもので、細胞の様々な機能に関連している。そして、リン酸化修飾と相互に関連していることも明らかになっている。細菌においては、*Listeria* の鞭毛が O-GlcNAc 修飾されていることが報告されているだけである (Shen et al, Genes Dev, 2006)。*P. gingivalis* の表層蛋白質の O-GlcNAc 修飾やリン酸化修飾についての報告はまだみられない。

2. 研究の目的

本研究では、歯周病関連細菌のうち *P. gingivalis* の表層蛋白質の翻訳後修飾、特に O-GlcNAc 糖鎖修飾とリン酸化修飾に関して検討し、病原性との関連性を明らかにしたいと考えている。すなわち、*P. gingivalis* の表層蛋白質の中から、翻訳後修飾された蛋白質を網羅的に検索し、同定する。糖鎖修飾蛋白質とリン酸化修飾蛋白質の全様を把握することにより、糖鎖修飾とリン酸化修飾の関連性についての情報を得る。その後、主な糖蛋白質の修飾糖鎖が O-GlcNAc であるかどうか

かを決定する。O-GlcNAc 修飾に関連する遺伝子をデータベースから検索し、これらの遺伝子の変異株を作製する。同様に、リン酸化に関わる遺伝子もデータベースから検索し、これらの遺伝子の変異株を作製する。遺伝子変異株を用いて、O-GlcNAc 糖鎖修飾やリン酸化の有無が病原性の発現に及ぼす影響を調べる。口腔細菌との共凝集能、バイオフィーム形成能、宿主細胞への付着能や動物に対する病原性を野生株と比較することによって、翻訳後修飾の生物学的意義を明らかにしたい。

蛋白質の翻訳後修飾は、特に真核生物においては高い頻度で生じ、その生物学的意義も徐々に解明されつつある。ところが、歯周病関連細菌 *P. gingivalis* においては、翻訳後修飾を網羅的に検討した例はまだない。この研究により歯周病関連細菌が菌体表層に持つ糖鎖修飾とリン酸化修飾に関するデータを蓄積することができると考えている。真核生物では、O-GlcNAc 糖鎖修飾は細胞内のシグナル伝達や機能維持に関わるだけでなく、糖尿病や心血管疾患等にも影響することが知られている。近年、歯周病と全身疾患との関係が注目されている。*P. gingivalis* は宿主の組織や細胞に侵入した後、修飾糖鎖を用いて生体の制御機能を攪乱している証拠が導けるかもしれない。また、翻訳後修飾が *P. gingivalis* の病原性に及ぼす影響を調べることにより、効果的な歯周病の予防や治療に繋がるワクチンの開発に結びつく可能性が考えられる。

3. 研究の方法

嫌気培養した *P. gingivalis* 菌体から、われわれが確立した方法に従って (Murakami et al, Eur J Oral Sci, 2002)、表層蛋白質の分離・精製を行った。すなわち、菌体を破碎して全菌体抽出液を得た後、超遠心による沈渣を外膜と内膜の両方を含んだエンベロープ画分として回収した。エンベロープ画分を界面活性剤によって処理し、内膜を選択的に溶解させた後、超遠心によって得られた沈渣を外膜画分として用いた。

二次元電気泳動による外膜画分の展開を行い、蛋白質染色、糖染色およびレクチン染色との比較から糖修飾蛋白スポットを検出後、詳細に分析した。リン酸化蛋白質は特異的な染色を行って検出した。

翻訳後修飾蛋白質のそれぞれについてゲル内トリプシン消化後に質量分析を行い、ゲノムプロジェクト等の結果から得られたデータベースを利用して、網羅的に蛋白質の同定を行った。

その後、特定の翻訳後修飾蛋白質に絞って解析を始めた。推定している糖鎖構造情報を基にして、アフィニティークラムクロマトグ

ラフィあるいは電気泳動による分離・精製を行った。修飾糖鎖が O-GlcNAc であるか否かは、特異抗体を用いた実験によって検討した。リン酸化蛋白質についても、アフィニティークラムにより濃縮を行い、リン酸化の有無を特異抗体等によって確認した。

翻訳後修飾に関わる *P. gingivalis* 遺伝子領域の検索をゲノムプロジェクトで明らかになった全ゲノム配列を用いて行った。糖転移酵素遺伝子や他の糖鎖合成関連遺伝子を選定し、それらの遺伝子を欠失させてみた。リン酸化に関わる遺伝子も選定し、欠失させた。野生株と遺伝子欠失変異株とを比較し、菌体全体および表層の翻訳後修飾蛋白質の変化を調べることにした。

翻訳後修飾関連遺伝子の機能を追究するために、口腔細菌との共凝集能やバイオフィーム形成能を野生株と比較した。さらに、遺伝子欠失変異株の病原性の変化を宿主細胞への付着・侵入性を通じて解析した。翻訳後修飾が宿主細胞のサイトカイン産生能に及ぼす影響も検討を行った。

4. 研究成果

P. gingivalis 菌体成分を二次元電気泳動により展開後、糖染色で網羅的に糖蛋白質を検出し、質量分析により同定を行った。その結果、OmpA 様蛋白質 PGN0729 に加えて、PGN0876、PGN0743 および PGN1513 が新たに糖蛋白質として見い出された。これらの糖蛋白質の変異株を作製し、野生株と比較したところ、増殖やバイオフィーム形成に関与することが明らかになった。以上の内容をまとめた論文を公表した。

P. gingivalis の糖蛋白質である OmpA 様蛋白質については、WGA レクチンアフィニティークラムで効率的に分離できること、そして特異抗体を用いた実験から、O-GlcNAc で修飾されていることを学会で報告した。*P. gingivalis* 以外の近縁の細菌においても、糖鎖修飾された OmpA 様蛋白質が広く分布していることをあわせて報告した。また、歯周病関連細菌 *Tannerella forsythia* の OmpA 様蛋白質が、菌体形態の維持や細胞外マトリックス蛋白質への付着に関与することを明らかにし、論文を公表した。

P. gingivalis 菌体にはリン酸化修飾蛋白質が存在することが、リン酸化特異的染色によって明らかになった。そこで、*P. gingivalis* 菌体成分からリン酸化蛋白質をアフィニティークラムで分離し、SDS-PAGE により展開後、質量分析による同定を行った。その結果、少なくとも6種類の新奇な蛋白質がリン酸化されていることが分かった。糖鎖修飾とリン酸化修飾を併せてもつ蛋白質は、現在のところ見つかっていない。同定した蛋白

質のリン酸化の状態をさらに確認するために、特異的リン酸化蛋白質染色や抗リン酸化抗体を用いたウェスタンブロットによる検討を行った。その結果、セリン、スレオニンおよびチロシン残基にリン酸化が認められ、リン酸化修飾様式は蛋白質によっては異なることが明らかとなった。*P. gingivalis* のリン酸化に関わる酵素をデータベースから検索し、その遺伝子欠失株を作製中である。

一方、*P. gingivalis* の糖鎖修飾された OmpA 様蛋白質については、血管内皮細胞に対する影響を検討した。変異株を用いた実験から、*P. gingivalis* は OmpA 様蛋白質依存的にケモカインなどの発現誘導を抑制して宿主の免疫応答から逃れ、最終的に細胞毒性を誘導する可能性が考えられた。さらに、詳細に OmpA 様蛋白質の機能を調べているところである。

また、*P. gingivalis* の糖鎖修飾蛋白質である Mfa1 線毛に関して、その付随成分の Mfa3 が線毛の先端に局在し、自己凝集とバイオフィーム形成を調節する因子であることを明らかにした。

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)

Abe T, Murakami Y, Nagano K, Hasegawa Y, Moriguchi K, Ohno K, Shimozato K, Yoshimura F. OmpA-like protein that influences cell shape and adhesive activity of *Tannerella forsythia*. Mol Oral Microbiol. Vol. 26, No. 6, 2011, 374-387. 査読有.
DOI: 10.1111/j.2041-1014.2011.00625.x.

Kishi M, Hasegawa Y, Nagano K, Nakamura H, Murakami Y, Yoshimura F. Identification and characterization of novel glycoproteins involved in growth and biofilm formation by *Porphyromonas gingivalis*. Mol Oral Microbiol, Vol. 27, No. 6, 2012, 458-470. 査読有.
DOI: 10.1111/j.2041-1014.2012.00659.x.

Hasegawa Y, Nagano K, Ikai R, Izumigawa M, Yoshida Y, Kitai N, Lamont RJ, Murakami Y, Yoshimura F (2013): Localization and function of the accessory protein Mfa3 in *Porphyromonas gingivalis* Mfa1 fimbriae. Mol Oral Microbiol, Vol. 28, No. 6, 467-480. 査読有.
DOI: 10.1111/omi.12040

[学会発表](計 13 件)

村上 幸孝, 長谷川 義明, 吉村 文信. *Porphyromonas gingivalis* に近縁な細菌からの OmpA 様糖蛋白質の分離. 第 53 回歯科基礎医学会学術大会. 2011 年 10 月 1 日. 長良川国際会議場(岐阜市).

村上 幸孝, 長谷川 義明, 引頭 毅, 猪俣 恵. 歯周病関連細菌 *Tannerella forsythia* における OmpA 様タンパク質の機能に関する研究. 第 41 回東海乳酸菌研究会研究報告会. 2012 年 2 月 4 日. 中日パレス(名古屋市).

村上 幸孝, 長谷川 義明, 吉村 文信. *Porphyromonas gingivalis* から分離した OmpA 様糖蛋白質の修飾糖鎖の性質. 第 85 回日本細菌学会総会. 2012 年 3 月 29 日. 長崎ブリックホール(長崎市).

井貝 亮太, 出水川 雅司, 長谷川 義明, 川端 淳司, 北井 則行, 村上 幸孝. 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* に存在するリン酸化蛋白質の同定. 第 54 回歯科基礎医学会学術大会. 2012 年 9 月 15 日. 奥羽大学(郡山市).

村上 幸孝, 長谷川 義明, 引頭 毅, 猪俣 恵. 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* から同定された糖蛋白質の増殖およびバイオフィーム形成への関与. 第 42 回東海乳酸菌研究会研究報告会. 2013 年 2 月 2 日. 中日パレス(名古屋市).

出水川 雅司, 井貝 亮太, 堀江 俊, 長谷川 義明, 川端 淳司, 北井 則行, 村上 幸孝. 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* に存在するリン酸化蛋白質の分離. 第 86 回日本細菌学会総会. 2013 年 3 月 20 日. 幕張メッセ(千葉市).

出水川 雅司, 井貝 亮太, 堀江 俊, 長谷川 義明, 川端 淳司, 北井 則行, 村上 幸孝. 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* に存在するリン酸化蛋白質の分離と修飾様式の検討. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会. 2013 年 9 月 22 日. 岡山コンベンションセンター(岡山市).

井貝 亮太, 長谷川 義明, 出水川 雅司, 堀江 俊, 川端 淳司, 北井 則行, 吉村 文信, 村上 幸孝. *Porphyromonas gingivalis* の Mfa1 線毛に付随する Mfa3 の局在化に関する研究. 第 55 回歯科基礎医学会学術大会. 2013 年 9 月 22 日. 岡山コンベンションセンター(岡山市).

出水川 雅司, 井貝 亮太, 堀江 俊, 長谷川 義明, 川端 淳司, 北井 則行, 村上 幸孝. *Porphyromonas gingivalis* 菌体

からのリン酸化蛋白質の分離．第 50 回日本細菌学会中部支部総会．2013 年 10 月 19 日．ホテル竹島（蒲郡市）．

村上 幸孝，長谷川 義明，猪俣 恵，引頭 毅．歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* の Mfa1 線毛における付随成分 Mfa3 の局在および機能に関する研究．第 43 回東海乳酸菌研究会研究報告会．2014 年 2 月 8 日．中日パレス（名古屋市）．

猪俣 恵，長谷川 義明，村上 幸孝．*Porphyromonas gingivalis* の OmpA 様蛋白質は細胞毒性の誘導および免疫応答の誘導に關与する．第 87 回日本細菌学会総会．2014 年 3 月 26 日．タワーホール船堀（東京都）．

出水川 雅司，井貝 亮太，堀江 俊，長谷川 義明，川端 淳司，北井 則行，村上 幸孝．*Porphyromonas gingivalis* 菌体に存在するリン酸化蛋白質の修飾様式の検討．第 87 回日本細菌学会総会．2014 年 3 月 28 日．タワーホール船堀（東京都）．

長谷川 義明，井貝 亮太，出水川 雅司，堀江 俊，永野 恵司，吉田 康夫，北井 則行，村上 幸孝，吉村 文信．*Porphyromonas gingivalis* における Mfa1 線毛の付随成分 Mfa3 の局在と機能．第 87 回日本細菌学会総会．2014 年 3 月 28 日．タワーホール船堀（東京都）．

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕
出願状況（計 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 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
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
村上 幸孝 (MURAKAMI, Yukitaka)
朝日大学・歯学部・教授
研究者番号：60239506

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
吉村 文信 (YOSHIMURA, Fuminobu)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号：50001962

長谷川 義明 (HASEGAWA, Yoshiaki)
朝日大学・歯学部・講師
研究者番号：70460524

引頭 毅 (INTO, Takeshi)
朝日大学・歯学部・講師
研究者番号：10360918

猪俣 恵 (INOMATA, Megumi)
朝日大学・歯学部・助教
研究者番号：40553798