

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791964

研究課題名(和文)ポルフィロモナス・ジンジバリスが分泌する新規病原蛋白に関する解析

研究課題名(英文)The analysis of novel virulence proteins Tap secreted by Porphyromonas gingivalis

研究代表者

近藤 好夫(KONDO, YOSHIO)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：30581954

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：偏性嫌気性菌Porphyromonas gingivalisは成人性歯周炎の起因菌とされている。本菌の病原因子は数多く報告されているが、未知の因子も多く存在すると思われる。これまでに私たちの研究グループではTapA, TapB, TapCは宿主内で発現が上昇する新規病原蛋白であることを示した。これらの蛋白については報告が少なく、その機能や発現調節機構についても不明であった。そこで本研究では、菌体の表面蛋白であるTapA, TapCに着目し、これらの蛋白が宿主に与える影響について検討した。

研究成果の概要(英文)：Porphyromonas gingivalis is one of the most etiologically important microorganisms in periodontal disease. Although many studies have reported about virulence factors of P. gingivalis, expression of P. gingivalis in in vivo lesion is not completely understood. We reported in a previous study that TprA, TapA, TapB and TapC proteins are cooperatively involved in P. gingivalis virulence. However, function of these proteins are not certain. Then we focused on surface proteins TapA and TapC and investigate effect to host cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：形態系基礎歯科学

キーワード：歯学 歯周病 Porphyromonas gingivalis

1. 研究開始当初の背景

慢性歯周炎は40歳以上の日本人の半数以上が罹患している慢性感染症であり、歯の喪失の最大原因である。偏性嫌気性グラム陰性細菌 *Porphyromonas gingivalis* が慢性歯周炎のもっとも重要な原因細菌の1つと考えられている。*P. gingivalis* の歯周病原因子としてはLPS、線毛、プロテアーゼ等が知られているが、中でも本菌の菌体表面および菌体外のプロテアーゼ活性の大部分を占めるRgp プロテアーゼとKgp プロテアーゼは間質破壊や歯周ポケット形成を引き起こす。また、各種の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生体防御反応を不活化する能力がある。

Rgp プロテアーゼやKgp プロテアーゼは世界的に多くの研究が行われてきた。一方で、本菌の病態形成については、これら以外にも数多くの病原因子が存在し、宿主内で多くの蛋白を発現していると考えられる。そこで宿主内で発現が上昇する新規病原因子の探索を目的に、マウスに接種した菌と培地で培養した菌について、それぞれの菌体タンパク質を二次元ゲル電気泳動法で展開し、プロテオーム解析を行った。その結果、TprA、TapA は宿主内で発現が上昇するタンパク質であることを明らかにした。さらにマウス膿瘍試験において *tprA* 変異株の病変形成率は低下しており、TprA は病原性に強く関与していることが示唆された。(Yoshimura *et al.*, *Oral. Microbiol. Immun.*, 23: 413-418)。

また TprA には TPR ドメインが3つ存在し、このドメインは他の蛋白質と結合することが知られている。TprA は他に機能的なモチーフをもたないこと、ペリプラズムに局在することから、TprA は他のペリプラズム蛋白あるいは膜蛋白と結合し機能発現すると考えられた。実際にリコンビナント蛋白を用いて免疫沈降法や Biacore で分子間相互作用を解析

した結果、TprA とペリプラズム蛋白である TapB に特異的な結合が認められた。同様に TprA と膜蛋白である TapA についても解析し特異的な結合が確認できた。しかし TapC に関してはリコンビナント蛋白を得ることができなかったため、これらの解析を行うことができなかったが、推定アミノ酸配列より TapA と TapC は相同性が高く同様の機能を持つものと考えられる。

そこで TapA, TapB, TapC の病原性への関与を検討するため、それぞれの遺伝子変異株を作製し、マウスに接種した。特に *tprA* 変異株と *tapA-tapB-tapC* 三重変異株の死亡率は著しく低下しており、これまでの結果から TprA は TapA, TapB, TapC と協調して病原性に関与していることが示唆された (Kondo *et al.*, *Infect. Immun.*, 78; 2846-2856)。

2. 研究の目的

TapA および TapC は Rgp プロテアーゼや Kgp プロテアーゼとともに CTD family protein であることが報告されている。近年、CTD については数多くの研究がなされ、CTD family protein は *P. gingivalis* の Type IX secretion system (Sato *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 107: 276-281)によって分泌され、糖鎖修飾を介して菌体表面に局在すると考えられている。私たちのこれまでの研究結果もこれらの事実と一致している。さらに病原性蛋白の多くはこの CTD family protein であることも報告されている。このことから TapA および TapC は直接的に病原性に関わる新規病原因子であると考えられる。しかし、これまでに TapA および TapC に関する詳細な報告はなく、そこで本研究では TapA および TapC が宿主に与える影響について検討を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞侵入性について

細胞侵入性をスクリーニングすることを目的にヒトの歯肉上皮細胞を用いて antibiotic protection assay を行った。具体的には歯肉上皮細胞を培養し、ここへ *P. gingivalis* を MOI = 10^4 で感染させる（4時間または8時間）。感染後に液体培地を捨て、PBS で洗浄する。その後、細胞外の菌を殺滅するためにカナマイシン含有の液体培地で培養を行い、再び PBS にて洗浄を行う。歯肉上皮細胞を回収し破碎させたのち、細胞内に侵入した *P. gingivalis* の菌数測定を行った。

また、これをさらに検証するために蛍光顕微鏡下での観察を行うために、まずは蛍光蛋白を発現する菌株の作成を試みた。同株の作成はこれまでも行っており、蛍光蛋白の発現株を得ることはできていたものの、十分な蛍光強度ではなかった。このことから蛋白の発現量が増加するようプロモーター配列の変更を計画した。あるいは蛍光蛋白が菌体表層で発現した方が観察に有利かと考え、外膜蛋白との融合も計画した。

(2) 付着因子の同定について

細胞侵入生試験の結果より、TapA あるいは TapC は細胞表面への接着あるいは細胞内への侵入に関与する蛋白質である可能性があることから、宿主の標的蛋白の同定を考えた。そこで、TapA, TapC の精製蛋白を用いて pull-down 法など相互作用解析を計画した。

4. 研究成果

(1) 細胞侵入性について

antibiotic protection assay の結果、細胞内に侵入した菌数については、感染4時間では野生株が 3.3×10^3 、TapA 変異株が 2.3×10^3 、TapC 変異が 2.1×10^3 であった。また感染8時間では野生株が 1.2×10^4 、TapA 変異株が 9.0×10^3 、TapC 変異株が 8.5×10^3 であった。つまり、TapA 変異株あるいは TapC 変異株では

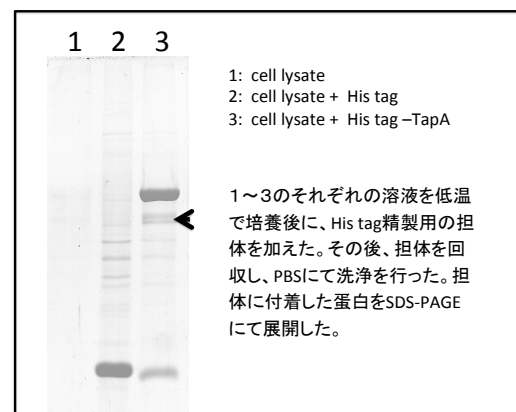
細胞侵入生が低下しており、表面蛋白である TapA および TapC が宿主内への侵入に関わる因子であることが示唆された。

このことをさらに検証をするために、細胞へ侵入している様子を観察することを試みた。観察にあたっては前述の通り蛍光蛋白を発現する菌株の作成を引き続き行った。しかし、今回も十分な蛍光を発する菌株を得ることができず、今後は蛍光色素で菌株を標識する方法で実験を行うこととした。

(2) 付着因子の同定について

TapA についてはすでにリコンビナント蛋白を得ていた。しかし TapC に関しては、リコンビナント蛋白を得ることができず、発現条件の変更やタグを変えるなど様々な試みを行ってきたが、不溶性画分での発現でしか成功しなかった。そこで、不溶性蛋白ではあつたが、これを抗原として抗体作製も試みたが、これについても得ることができなかった。そこで、本年度は TapA のみに焦点をおき実験を行った。

pull-down 法については、歯肉上皮細胞の溶解液と His tag 付きの TapA リコンビナント蛋白を用いて行った。実験対照として細胞溶解液のみ、細胞溶解液と His tag を用いた。一定時間、低温にて培養後、His tag 精製用の担体を用いて結合蛋白の回収を行った。担体を洗浄し、担体に付着した蛋白を SDS-PAGE にて展開した（下図）。



図内の矢印に示す蛋白は TapA と特異的に結合する候補蛋白と思われる。今後、質量分析を行い蛋白の同定を行うとともに、さらなる相互間作用解析を進めて行く予定である。

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0件)

なし

[学会発表] (計5件)

① 久保寺友子、近藤好夫、世川晶子、深町厚子、池田正一、佐々木康成：血友病患者の実態調査—最近10年間の歯科初診患者について—、第30回日本障害者歯科学会、2013年10月13日、兵庫

② 近藤好夫、世川晶子、久保寺友子、佐々木康成：唇顎口蓋裂児に対する手術前早期治療の院内連携と歯科的管理、第30回日本小児歯科学会九州地方会、2012年10月28日、長崎

③ 釜崎陽子、西口美由季、佐藤恭子、藤原卓、近藤好夫：乳歯および永久歯の根尖病巣が原因と考えられた重症顎骨炎の3例、第30回日本小児歯科学会九州地方会、2012年10月28日、長崎

④ 久保寺友子、近藤好夫、岡野恭子、小西真理子、世川晶子、佐々木康成：転倒により下顎骨骨折をきたした福山型先天性筋ジストロフィーの一例、第29回日本障害者歯科学会、2012年10月29日、北海道

⑤ 西俣はるか、佐藤恭子、近藤好夫、星野

倫範、藤原卓：ミュータンスレンサ球菌における PRG バリアコートの抗菌作用と平滑面付着抑制作用について、第50回日本小児歯科学会、2012年5月12日、東京

[図書] (計1件)

① 近藤好夫、藤原卓：手足口病、感染炎症免疫42巻2号79～81頁、2012年7月

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

なし

○取得状況 (計0件)

なし

[その他]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤好夫 (KONDO YOSHIO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：30581954

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし