

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462863

研究課題名(和文) 歯周病細菌における病原タンパク質の菌体表面局在化機構の解明

研究課題名(英文) Study of localization mechanism of cell surface proteins in *Porphyromonas gingivalis*

研究代表者

庄子 幹郎 (SHOJI, Mikio)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：10336175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病細菌として知られる *Porphyromonas gingivalis* は、約30個のC末端に共通したアミノ酸領域(C-terminal domain)をもつものがありCTD含有タンパク質と呼ばれている。我々は、CTD含有タンパク質が9型分泌機構により菌体表面へ分泌されること、および分泌されたCTD含有タンパク質のいくつかは菌体表面のA-LPSによってアンカーされるという事を報告している。しかしながら、A-LPSの生合成については不明な点が多い。本研究において、A-LPSの生合成に関わる分子として、WzzP, Wzx, WbaP, PGN\_0002の4つを新たに見出した。

研究成果の概要(英文)：The periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* has approximately 30 proteins (called CTD proteins) that contain a conserved C-terminal domain. We have reported that CTD proteins are secreted onto the cell surface via the Type IX secretion system, and some of CTD proteins are anchored on the cell surface by binding to A-LPS. However, the mechanism of A-LPS biosynthesis remains to be determined.

In this study, we found that WzzP, Wzx, WbaP, PGN\_0002 are involved in the A-LPS biosynthesis.

研究分野：口腔病原微生物学

キーワード：歯周病細菌 リポ多糖

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病細菌として知られる *Porphyromonas gingivalis* は、血液寒天培地上で黒色集落を形成する。この黒色集落形成の基本的なメカニズムは、ジンジパイン群の一つである KGP がヘモグロビンを分解し、遊離されたヘムが菌体表面に蓄積することによるものと考えられている。

我々は、トランスポゾン変異法により黒色集落形成に関与する遺伝子として、*porR* および *porT* 遺伝子を報告している。*porR* 遺伝子産物はアミノトランスフェラーゼを持つと予想されており、Anionic lipopolysaccharide (A-LPS)の生合成に関与する。一方、*porT* 遺伝子産物は、ジンジパイン群を分泌する装置(9型分泌機構)に関与する。つまり、本菌にはジンジパイン群にも存在するようなC末端ドメイン(CTD)を有するタンパク質群があり、それらは9型分泌機構にて菌体表面に分泌される。分泌されたCTD含有タンパク質はA-LPSに結合することで菌体表面に局在化すると考えられている。

ところで、本菌はA-LPSとO-LPSというO抗原の組成が異なる2種類のLPSを持つと報告されている。前述にあるように、A-LPSは9型分泌機構にて分泌される病原タンパク質を菌体表面にアンカーする役割を持つと考えられており、その生合成機構の解明は重要である。しかしながら、その生合成機構には不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

- (1) *P. gingivalis* のA-LPSの生合成機構を明らかにする。
- (2) 従来知られていた黒色集落形成減弱株であるHG66株はA-LPSが欠損している。その原因を明らかにする。

## 3. 研究の方法

- (1) トランスポゾン変異法を用いて黒色集落形成減弱株を分離し、トランスポゾンが挿

入されている遺伝子を同定する。

- (1)- 他菌の先行研究により明らかにされているLPS合成遺伝子に相同な遺伝子について変異株作製を試み、A-LPSおよびO-LPSの有無を特異抗体により調べる。
- (2) HG66株が何故、黒色集落形成減弱を示すかを明らかにする為に、既知のA-LPS生合成関連遺伝子を導入することにより相補されるか否かを調べる。

## 4. 研究成果

- (1)- トランスポゾン変異法により、*P. gingivalis* の黒色集落形成減弱株を分離した。その挿入部位はPGN\_2005遺伝子のORF内部であった。PGN\_2005タンパク質の二次構造予測およびPGN\_2005変異株の表現型としてA-LPS, O-LPSともにO抗原鎖が短くなることから、PGN\_2005タンパク質はLPS生合成機構に関わるO抗原鎖調節因子(Wzz)と推測された。これまでに知られている他の細菌のWzzは、内膜にて二回膜貫通型の構造を持つことが知られている。O抗原鎖を適切な長さに規定している機構は、ペリプラスム空間にある領域がO抗原鎖を保持するのに重要なことが明らかとなっており、それ故にC末端側は短いことが知られている。一方、*Porphyromonas* 属のPGN\_2005タンパク質ホモログはadditionalにおよそ160アミノ酸のC末端側を持っていることが特徴的であり、故にWzzPと命名した。PGN\_2005タンパク質は内膜に存在すること、さらに、大腸菌のwzz変異株にプラスミド性でPGN\_2005遺伝子を発現するとO抗原鎖の長さが相補されることを確認した(Shoji et al. 2013)。

- (1)- 次に、LPS合成に関してO抗原リガーゼ(WaaL: PGN\_1302)やO抗原ポリメラーゼ(Wzy: PGN\_1242)については明らかになっていたもののO抗原フリッパーゼ(Wzx)については明らかになっていなかった。O抗原フリッパーゼについては、*porR* 遺伝子の下

流にある PorS がその候補としてあげられ、大腸菌を用いた相補系で機能分子であることが既に報告されている。*porS* 変異株は A-LPS の反応産物が野生株に比べて減少しているものの Smooth 型の LPS を持つことより、それ以外の分子があると推測された。そこで、我々は相同性解析から PGN\_1033 がその候補として考え、その変異株を作製したところ、抗 A-LPS 抗体および抗 O-LPS 抗体に対して反応しなかった。したがって、A-LPS 及び O-LPS の O 抗原は、Wzx(PGN\_1033), Wxy(PGN\_1242), WzzP(PGN\_2005)を利用して生合成され、その後 Lipid A-core に WaaL(PGN\_1302)により結合されると考えられた。

また、O 抗原鎖合成の initial phosphate glycosyltransferase として、PGN\_1233 および PGN\_1896 が推測された。PGN\_1233 変異株は野生株と同じ表現型を示したが、PGN\_1896 変異株は黒色集落形成が減弱しており A-LPS のみ欠損していた。したがって、PGN\_1896 遺伝子(*wbaP*)は A-LPS 生合成関連遺伝子であると示唆された(Shoji et al. 2013)。

(2) 1990 年代半ば頃、Potempa 博士らは HG66 株という黒色集落形成が減弱した自然変異株を見出した。その株は、培養上清中にはジンジパインが存在するものの、菌体表面に局在するジンジパインの量が顕著に減少していた。その後、HG66 株では、ペプチジルアーヂニンデイミネラーゼ (PAD) やカルボキシルペプチダーゼ(CPG70)もジンジパインと同様に局在化の変化が起きることが 2000 年代初頭までに報告されていた。しかしながら、HG66 株が何故このような変化が起きるのかについては不明であった。

本菌は A-LPS と O-LPS という O 抗原の組成が異なる 2 種類の LPS を持つと報告されており、A-LPS には mAb 1b5 という特異抗体を用いて、その存在を確認してきた。一方、我々

は O-LPS を認識する特異抗体として、mAb TDC-5-2-1 を報告した(Shoji et al. 2013)。それらを用いて、HG66 株のライセートに対してイムノプロット解析を行うと、抗 O-LPS 抗体には反応するものの抗 A-LPS 抗体には全く反応しなかった。つまり、HG66 株は A-LPS のみ欠損していると考えられた。O-LPS は存在しながら A-LPS は欠損するタイプになる遺伝子として、*porR* 遺伝子を含めて 6 つが候補に挙げられた。そのうち、*wbpB* 遺伝子をシャトルベクターに組み込んで、HG66 株に導入すると黒色集落形成を示すようになることを見出した。次に、HG66 株の *wbpB* 遺伝子のシーケンス解析を行ったところ、240 番目のグルタミンが終始コドンに変異していた。これらの結果から、*wbpB* 遺伝子産物は A-LPS 生合成に重要な役割を果たしていることと示唆された。*wbpB* 遺伝子産物については、緑膿菌の B-band O 抗原にある構成糖(ジアセチルマンノウロン酸)の生合成に関与することが報告されている。緑膿菌において、ジアセチルマンノウロン酸は UDP-GlcNAc から WbpA, WbpB, WbpE, WbpD, WbpI というタンパク質のシーケンシャルな酵素反応により合成される。そこで、これらのタンパク質について、*P. gingivalis* のゲノムから相同な分子を調べた結果、WbpA ホモログに UgdA(PGN\_0613)および PGN\_1243、WbpB ホモログに PGN\_0168、WbpE ホモログに PorR(PGN\_1236)、WbpD ホモログに PGN\_0002、WbpI ホモログはない、という事が分かった。これまでに PGN\_0002 は解析されていなかったことから、PGN\_0002 遺伝子変異株を作製したところ、その変異株は *porR* 遺伝子変異株や *wbpB* 遺伝子変異株と同様な性状を示した。したがって、*P. gingivalis* も緑膿菌が持つジアセチルマンノウロン酸の生合成に関与する遺伝子を持つものの最後の WbpI ホモログはないことから、最終産物としてジアセチルグルクロン酸を合成し、

A-LPS の O 抗原に存在している可能性が示唆された(Shoji et al. 2014)。

今後の課題として、A-LPS の中にジアセチルグルクロン酸が本当に存在するのか、また、CTD 含有タンパク質と A-LPS はどのようなメカニズムで結合するのか、を明らかにする必要がある。

#### 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 7 件)

(1) Kadowaki T, Yukitake H, Naito M, Sato K, Kikuchi Y, Kondo Y, Shoji M, Nakayama K, A two-component system regulates gene expression of the type IX secretion component proteins via an ECF sigma factor, Scientific reports, 査読有、6 巻、2016、23288

DOI: 10.1038/srep23288

(2) Naito M, Ogura Y, Itoh T, Shoji M, Okamoto M, Hayashi T, Nakayama K, The complete genome sequencing of *Prevotella intermedia* strain OMA14 and a subsequent fine-scale, intra-species genomic comparison reveal an unusual amplification of conjugative and mobile transposons and identify a novel *Prevotella*-lineage-specific repeat, DNA research, 査読有、23 巻 1 号、2016、11-19

DOI: 10.1093/dnares/dsv032

(3) 庄子幹郎、竹下徹、丸山史人、稲葉裕明、今井健一、松尾美樹、口腔細菌研究の新展開、日本細菌学雑誌、査読有、70 巻 2 号、2015、333-338 <http://doi.org/10.3412/jsb.70.333>

(4) Narita Y, Sato K, Yukitake H, Shoji M, Nakane D, Nagano K, Yoshimura F, Naito M, Nakayama K, Lack of a surface layer in *Tannerella forsythia* mutants deficient in the type IX secretion system, Microbiology-SGM, 査読有、160 巻 10 号、2014、2295-2303

DOI: 10.1099/mic.0.080192-0

(5) Nonaka M, Shoji M, Kadowaki T, Sato K, Yukitake H, Naito M, Nakayama K, Analysis of a Lys-specific serine endopeptidase secreted via the type IX secretion system in *Porphyromonas gingivalis*, FEMS Microbiology Letters, 査読有、354 巻 1 号、2014、60-68

DOI: 10.1111/1574-6968.12426

(6) Shoji M, Sato K, Yukitake H, Naito M, Nakayama K, Involvement of the Wbp pathway in the biosynthesis of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide with anionic polysaccharide, Scientific reports, 査読有、4 巻、2014、5056

DOI: 10.1038/srep05056

(7) Shoji M, Yukitake H, Sato K, Shibata Y, Naito M, Aduse-Opoku J, Abiko Y, Curtis MA, Nakayama K, Identification of an O-antigen

chain length regulator, WzzP, in *Porphyromonas gingivalis*, Microbiologyopen, 査読有、2 巻 3 号、2013、383-401

DOI: 10.1002/mbo3.84

〔学会発表〕(計 8 件)

庄子幹郎、佐藤啓子、雪竹英治、鎌口有秀、内藤真理子、中山浩次、*Porphyromonas gingivalis* における LPS 合成に関わる遺伝子の同定 (ポスター)、第 89 回日本細菌学会総会、2016 年 3 月 23 日~25 日、大阪国際交流センター (大阪府・大阪市)

庄子幹郎、佐藤啓子、雪竹英治、鎌口有秀、内藤真理子、中山浩次、*Porphyromonas gingivalis* のリポ多糖合成に関わる 3 つの糖転移酵素遺伝子の発見 (ポスター)、第 57 回歯科基礎医学会学術大会、2015 年 9 月 11 日~13 日、朱鷺メッセ：新潟コンベンションセンター (新潟県・新潟市)

Mikio Shoji, Keiko Sato, Hideharu Yukitake, Arihide Kamaguchi, Mariko Naito, Koji Nakayama, Identification of three genes encoding glycosyltransferases involved in *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide synthesis (Poster), PgLONDON2015, 2015 年 6 月 23 日~25 日、ロンドン (英国)

庄子幹郎、佐藤啓子、雪竹英治、内藤真理子、中山浩次、歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* の黒色集落形成機構 (口頭発表)、第 46 回九州微生物研究会、2014 年 12 月 22 日、ホテルセントラザ博多 (福岡県・福岡市)

庄子幹郎、佐藤啓子、雪竹英治、内藤真理子、中山浩次、*Porphyromonas gingivalis* における糖転移酵素の遺伝子変異株作製 (口頭発表)、第 67 回日本細菌学会九州支部総会、2014 年 9 月 5 日~6 日、城山観光ホテル (鹿児島県・鹿児島市)

庄子幹郎、佐藤啓子、雪竹英治、内藤真理子、中山浩次、*Porphyromonas gingivalis* における病原タンパク質の菌体表面局在化機構 (口頭発表)、第 87 回日本細菌学会総会、2014 年 3 月 26 日~28 日、タワーホール船堀 (東京都・江戸川区)

庄子幹郎、佐藤啓子、雪竹英治、内藤真理子、中山浩次、*Porphyromonas gingivalis* における黒色集落形成関連遺伝子の同定 第 66 回日本細菌学会九州支部総会 (口頭発表)、2013 年 9 月 6 日~7 日、長崎大学 (長崎県・長崎市)

庄子幹郎、佐藤啓子、雪竹英治、内藤真理子、中山浩次、*Porphyromonas gingivalis* O 抗原多糖体生合成機構とそれに結合するタンパク質分子群 (招待講演)、第 22 回内毒素・LPS 研究会、2013 年 6 月 22 日、東京大学 (東京都・文京区)

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

長崎大学歯学部歯周病基盤研究センター

<http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/perio/>

長崎大学歯学部 口腔病原微生物学

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

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

庄子 幹郎 (SHOJI, Mikio)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・  
助教

研究者番号：10336175