

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 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：25462925

研究課題名(和文) 歯周病細菌における病原性因子分泌調節メカニズムの解明

研究課題名(英文) Regulation of the gene expression of the type IX secretion component proteins in *Porphyromonas gingivalis*

研究代表者

雪竹 英治 (YUKITAKE, Hideharu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・技術職員

研究者番号：30380984

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)：Porphyromonas gingivalisはIX型分泌システム(T9SS)を用いて病原プロテアーゼであるジンジバインを分泌する。PorYとPorXが二成分制御系として働いていることを証明した。ECFシグマ因子SigP欠損株ではporX株と同様にT9SS成分タンパク質の遺伝子の発現抑制がみられた。SigPがこれらの遺伝子のプロモータ領域に結合した。SigPはporX株では検出されなかった。SigPとPorXは直接結合した。PorY-PorX-SigPカスケードがT9SSの調節に関与していることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Porphyromonas gingivalis secretes potent pathogenic proteases, gingipains, via the type IX secretion system (T9SS). We found that the PorY-PorX-SigP cascade is involved in the regulation of T9SS. Surface plasmon resonance (SPR) analysis revealed a direct interaction between PorY and PorX. PorY autophosphorylated and transferred a phosphoryl group to PorX in the presence of Mn<sup>2+</sup>, demonstrating that PorX and PorY act as a response regulator and a histidine kinase, respectively, of a two component system (TCS). T9SS component-encoding genes were down-regulated in a mutant deficient in a putative extracytoplasmic function (ECF) sigma factor, SigP, similar to the porX mutant. SigP could bind to the putative promoter regions of T9SS component-encoding genes. SigP was lacking in the porX mutant. PorX could bind to SigP. Together, these results indicate that the PorXY TCS regulates T9SS-mediated protein secretion via the SigP ECF sigma factor.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：歯周病細菌 分泌調節メカニズム 9型分泌機構 二成分制御系 ECFシグマ因子 ゲルシフトアッセイ

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は、わが国でも最も高い罹患率を示す感染症のひとつである。平成 22 年度の国民医療費統計によると、歯科診療医療費は 2 兆 6020 億円で、国民医療費全体の 7.0% を占め、年齢階級別には、全年齢層に患者が分布する。近年では、歯周病が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になっていることが示され、歯周病の治療と予防は、わが国の医療において喫緊の要事と言っても過言ではない。

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と考えられている。*P. gingivalis* の病原性因子としては LPS や線毛、プロテアーゼ、夾膜などが知られているが、強力な分解活性を示すプロテアーゼは病原性の中心的役割を果たす。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」と呼ばれるプロテアーゼである。ジンジパインは *P. gingivalis* の産生するシステインプロテアーゼであるが、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、生体内在性 MMP を活性化して組織の直接的破壊を引き起こす。これに加えて、サイトカイン分解、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全化して、宿主防御機構を傷害する。さらには血液凝固因子第 X 因子やプロトロンビンの活性化、カリクレイン・キニン系活性化、フィブリン・フィブリノーゲンを分解し、血液凝固誘導、血管透過性亢進、易出血性を引き起こすなど多彩な方面から病原性を発揮する。

ジンジパイン遺伝子は、プロテアーゼドメインの 3' 側に、別の病原性因子である付着因子をコードしており、転写・翻訳後、それぞれの機能分子へとプロセッシングされる。この付着因子自身も血球凝集能、ヘモグロビン結合能を持ち、血管病変との関連が指摘されている。すなわち、このプロテアーゼ・付着因子の輸送・分泌機構については学術的にも医学的にも関心が高いにもかかわらず、詳細は解明されていなかった。

これまでに、グラム陰性細菌の分泌システムは、これまで 8 タイプが知られているが、

*P. gingivalis* はこれらのいずれも利用せず、独自の Por システム(PorSS; Por secretion system)によって、病原性因子を分泌していることが、最近の我々の研究から明らかになってきた(現在、この分泌システムは IX 型分泌機構 type IX secretion system と呼ばれている)。

## 2. 研究の目的

歯周病原性細菌 *P. gingivalis* の病原性プロテアーゼ・付着因子の分泌調節機構を解明する。これまでの実験から、この調節には、*P. gingivalis* 特有の二成分制御系が関わっていると考えられるため、その構成因子を同定し、それらの構造と機能を明らかにする。さらに、それが感知する環境因子を同定し、*P. gingivalis* の病原性を規定する環境要因を明らかにする。最終的には、この病原性プロテアーゼ・付着因子の分泌機構の制御を標的として、歯周病と関連全身疾患の新規の予防法や治療法を探索する。

## 3. 研究の方法

分子遺伝学的手法によって、*P. gingivalis* の膜輸送・分泌機構に障害を示す変異株の作製や遺伝子の解析をおこない、これと同時に、個々の遺伝子産物を分離精製、あるいは組換えタンパク質として単離し、生化学的手法によって、タンパク質レベルでの機能解析や相互作用解析を行なうなど多面的なアプローチを通じて解析を行う。そして、調節系が感知する因子(環境)を解明し、病原性因子の分泌調節を介する病原性の制御法を探索する。

## 4. 研究成果

(1)*P. gingivalis* における PorX および PorY の菌体内局在：菌体を破砕し、外膜膜画分、内膜画分、細胞質ペリプラズム画分に分離し、PorX および PorY に対する抗体を用いたイムノプロット解析を行ったところ、PorX は細胞質ペリプラズム画分に、PorY は内膜画分に存在することがわかった。PorY はアミノ酸配列内に 2 つのトランスメンブレンドメインがあった。

(2)PorX と PorY との結合：PorX および PorY の組換えタンパク質を大腸菌にて産生させ、精製したタンパク質標品を用いて、表面プラズモン共鳴法により PorX と PorY との結合の有無を調べた結果、乖離定数 ( $K_D$ ) が  $1.409 \times 10^{-6}$  M の結合を示した。この PorX と PorY の結合が特異的かどうかを調べるため、他のヒ

スチジン・キナーゼである FimS との結合の有無を表面プラズモン共鳴法にて調べた。PorX は FimS とは結合しなかった。

(3)PorY の自己リン酸化と PorX へのリン酸基転移:  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  を用いて PorY の自己リン酸化と PorX へのリン酸基転移がおこるかどうかを調べた。その結果、1分以内に PorY のリン酸化が生じること、さらに PorX の共存下では時間依存性に PorX へのリン酸基転移が生じることがわかった。これらの結果から PorX と PorY が二成分制御系のリスポンス・レギュレータおよびヒスチジン・キナーゼであることが示唆された。

(4)PorXY 二成分制御系は  $\text{Mn}^{2+}$  依存性: 一般的に二成分制御系の上記の反応には  $\text{Mg}^{2+}$  あるいは  $\text{Mn}^{2+}$  を必要とする。PorXY 二成分制御系では PorY の自己リン酸化は  $\text{Mg}^{2+}$  あるいは  $\text{Mn}^{2+}$  のいずれか PorX へのリン酸基転移には  $\text{Mn}^{2+}$  を必要とするころがわかった。

(5)ECF シグマ因子 SigP の関与: PorX の C 末部には DNA 結合ドメインが存在しない。一方、本菌の ECF シグマ因子の1つである SigP の欠損変異株は PorX 変異株および PorY 変異株と同様に T9SS によるタンパク質分泌が低下していた。そこでマイクロアレイ解析でどのような遺伝子が SigP によって制御されているかを調べたところ、PorX 制御下の遺伝子の多くが SigP によって制御されていること、さらにそのなかに PorT などの T9SS 構成遺伝子が多数含まれていることがわかった。さらに SigP はそれらの T9SS 構成遺伝子のプロモータ領域に結合することがゲルシフトアッセイでわかった。

(6)porX 欠失変異株での SigP タンパク質の消失: イムノプロット解析の結果、porX 欠失変異株では SigP タンパク質が完全に消失していることがわかった。porX 欠失変異株では sigP 遺伝子の転写は野生株と比較して 40% であることがわかった。

(7)PorX と SigP の結合: in vivo での免疫沈降法および in vitro での表面プラズモン共鳴法を用いた解析から PorX は SigP と直接、結合することがわかった。

## 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6件)

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. *Sci Rep*. 2016 Mar 21;6:23288. doi: 10.1038/srep23288. 査読有

Taguchi Y, Sato K, Yukitake H, Inoue T, Nakayama M, Naito M, Kondo Y, Kano K, Hoshino T, Nakayama K, Takashiba S, Ohara N. Involvement of an Skp-Like Protein, PGN\_0300, in the Type IX Secretion System of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 2015 Oct 26;84(1):230-40. doi:

10.1128/IAI.01308-15. 査読有

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. *Sci Rep*. 2014 May 23;4:5056. doi: 10.1038/srep05056. 査読有

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*. 2014 Oct;160(Pt 10):2295-303. doi:

10.1099/mic.0.080192-0. 査読有

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 Microbiol Lett*. 2014 May;354(1):60-8. doi:

10.1111/1574-6968.12426. 査読有

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*. 2013

Jun;2(3):383-401. doi:  
10.1002/mbo3.84. 査読有

〔学会発表〕(計4件)

雪竹英治, 門脇知子, 内藤真理子, 菊池有一郎, 庄子幹郎, 中山浩次: *Porphyromonas gingivalis* における IX 型分泌機構の調節メカニズムの解明, 第 89 回日本細菌学会総会, 2016 年 3 月 23-25 日, 大阪国際交流センター(大阪府・大阪市)

門脇知子, 雪竹英治, 佐藤啓子, 庄子幹郎, 内藤真理子, 中山浩次: 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* における病原性プロテアーゼ分泌の調節メカニズム, 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同大会, 2015 年 12 月 1-4 日, 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

佐藤啓子, 雪竹英治, 庄子幹郎, 内藤真理子, 中山浩次: バクテロイデーテス細菌の IX 型分泌装置, 第 88 回日本細菌学会総会, 2015 年 3 月 26-28 日, 長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)

雪竹英治, 佐藤啓子, 近藤好夫, 庄子幹郎, 内藤真理子, 中山浩次: *Porphyromonas gingivalis* 9 型分泌機構の輸送に関する CTD タンパク質の解析, 第 88 回日本細菌学会総会, 2015 年 3 月 26-28 日, 長良川国際会議場(岐阜県・岐阜市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

雪竹 英治 (YUKITAKE Hideharu)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・  
技術職員  
研究者番号: 30380984

### (2) 連携研究者

中山 浩次 (NAKAYAMA Koji)  
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・  
教授  
研究者番号: 80150473