

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861750

研究課題名(和文) 歯周病原細菌の鉄獲得メカニズムの解明

研究課題名(英文) Characterization of heme acquisition system of periodontal bacteria

研究代表者

深町 はるか (Fukamachi, Haruka)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：10433799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細菌における赤血球からの鉄獲得機構は、溶血(ヘモグロビンの遊離)、グロビタンパク質の分解(ヘムの遊離)、ヘムの菌体内取り込みの3過程からなる。加えて、環境中の鉄源の枯渇に備え、菌体内鉄貯蔵機構を持つ。本研究では、歯周病原細菌の一つである *Prevotella intermedia* の増殖に必須であるヘム鉄獲得機構を明らかにするために、新規の cysteine proteases の酵素学的性質の解析およびヘモグロビン分解への関与、heme-acquisition pathway (hmu) によるヘムの菌体内取り込みへの関与、鉄貯蔵タンパク質の酵素学的性質の解析および菌体内鉄貯蔵への関与を調べた。

研究成果の概要(英文)： *Prevotella intermedia*, an oral bacterium associated with periodontal disease, requires heme for growth. Since *P. intermedia* does not have the complete heme biosynthetic pathway, this pathogen must have some means of acquiring the iron from red blood cells it needs to survive in its relevant host. Heme acquisition from red blood cells by *P. intermedia* usually involves hemolysis, hemoglobin binding, and the degradation of hemoglobin with the subsequent release of heme. In order to clarify the involvement of heme acquisition system, we firstly have investigated the ability of haemoglobin degradation by *P. intermedia* cysteine proteases. Next, to investigate the effect of iron availability on the expression of the cysteine protease genes and heme acquisition pathway genes, real-time RT-PCR analysis was performed on cDNA prepared from RNA extracted from *P. intermedia* grown to mid-exponential phase under iron-repleted and iron-depleted conditions.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：歯周病原細菌 *P. intermedia* 鉄獲得機構

## 1. 研究開始当初の背景

*Prevotella intermedia* は、増殖にヘムを必須とする歯周病関連細菌である。このヘムは、鉄(II)とポルフィリン環のキレート化合物であり、生体内では、ヘモグロビン(Hb)、ミオグロビンとして存在している。*P. intermedia* はプロポルフィリン IX 合成系をもたないことから、*P. intermedia* の増殖には、外環境から鉄イオンおよびポルフィリン環の両者を直接獲得することが必須である。

細菌の鉄獲得手段は2つの機構が知られている。ひとつは、細胞外に存在する鉄結合性タンパク質からの鉄獲得手段であり、鉄キレーターシデロフォアを介する機構である。もうひとつは、赤血球を溶血させ、Hbから鉄を獲得する溶血素産生による機構である。*P. intermedia* は、シデロフォアを産生しないことが報告されていることから (Infect.Immun. 67: 576-580, 1999)、溶血素を産生してHbから増殖に必要な鉄を獲得すると考えられる。よって、*P. intermedia* にとって赤血球から鉄源を獲得する能力は、自身の増殖に必須であり、ひいては病原性の発揮に関わる重要な因子であると推測される。

細菌における赤血球からの鉄獲得機構は、赤血球の溶血(Hbの遊離)、Hbを構成するグロビンタンパク質の分解(ヘムの遊離)、ヘムの菌体内取り込みの3過程からなる。加えて、環境中の鉄源の枯渇に備え、菌体内に鉄を貯蔵する過程からなる。

我々は本研究遂行以前に *P. intermedia* における赤血球の溶血に関して研究を行っていた。*Prevotella* 属と同じ *Bacteroides* 科に属する *Bacteroides fragilis* が、染色体上に10個の溶血素遺伝子を持つという Robertson らの報告 (Infect.Immun. 74: 2304-2316, 2006) から、*Prevotella* 属の溶血素遺伝子が複数あると推測し、*B. fragilis* の溶血素遺伝子 (*hlyA*, *hlyB*, *hlyC*, *hlyD*, *hlyE*, *hlyF*, *hlyG*, *hlyH*, *hlyI*, *hlyIII*) の配列を基に、*P. intermedia* のゲノムデータベースの ORF と相同性解析を行ったところ、*hlyA-E*, *hlyI* の6個の溶血素遺伝子群ホモログの存在を明らかにした。我々は、これらの遺伝子をクローニングし解析を行った結果、*P. intermedia* では *hlyA* および *hlyI* が溶血活性をもつことを明らかにし (Anaerobe 18:350-6, 2012)、*hlyI* については、システイン分解活性を持つ溶血素として報告した (Oral Microb. Immun. 24:485-92, 2009)。

これまでに本菌の鉄獲得機構のうち、赤血球の溶血に関わる溶血素を同定してきたが、溶血に続くヘモグロビンの分解、ヘムの菌体内取り込み、菌体内の鉄の貯蔵のそれぞれの過程でも複数の酵素が存在することから、鉄獲得機構の全容が解明されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、*P. intermedia* の増殖に必須である一連の鉄獲得機構を明らかにすること

を最終目標として、研究期間内に以下のことを明らかにする。

- (1) cysteine protease (PIN17\_A0411, PIN17\_A1283, PIN17\_0033:interpainA) の酵素学的性質の解析および Hb 分解への関与
- (2) heme-acquisition pathway (*hmu*) によるヘムの菌体内取り込みへの関与
- (3) 鉄結合タンパク質の酵素学的性質の解析および菌体内鉄貯蔵への関与
- (4) 一連の鉄獲得機構の環境変化に対する発現応答

## 3. 研究の方法

### cysteine proteases の酵素学的性質の解析および Hb 分解への関与

・cysteine proteases のクローニングと組換えタンパクの精製

ORF 全長あるいはシグナルペプチドを除いた配列を発現ベクター pGEX6P-1 (GST タグ) および pQE80L (6 × His タグ) にクローニングした。GST 融合組換えタンパク質は、グルタチオンセファロースビーズで融合タンパク質を精製後、PreScission Protease で GST タグを切断し、酵素活性の解析に供試した。6 × His 融合組換えタンパク質は、Ni-NTA カラムで精製後、イミダゾールを脱塩後、酵素活性の解析に供試した。

・酵素学的解析

ゼラチンゼイモグラフィ：cysteine proteases 活性の検出には、ゼラチンを添加した SDS-PAGE でタンパク質を分離後、CBB 染色を行った。

Western Blot：基質 (human Hb, human Fibronectin) と cysteine proteases を反応後、一次抗体として抗 Hb 抗体、抗 Fibronectin 抗体、二次抗体として Alkaline Phosphatase (AP) 標識抗体を用いて検出した。基質として Rabbit IgG を用いた場合は、AP 抗 Rabbit 抗体で検出した。

### 鉄結合タンパク質の酵素学的性質の解析

・*dps* のクローニングと組換えタンパクの精製

cysteine proteases のクローニングと同様に行った。ORF 全長の配列を発現ベクター pGEX6P-1 にクローニングし、組換えタンパク質を精製した。

・鉄結合能の評価 (TMBZ 染色)

Heme のペルオキシダーゼ活性を利用して、ヘムと結合しているタンパク質を青色に可視化する TMBZ 染色を用いた。精製したタンパク質と Heme を反応後、Native-PAGE でタンパクを泳動後、TMBZ 染色を行い、鉄結合能を評価した。

### 一連の鉄獲得機構の環境変化に対する発現応答

・培地

鉄源添加培地 (Fe<sup>+</sup>)：3% Todd-Hewitt, 0.5% Yeast, 0.075% Cysteine, 5 μg/ml menadione, 7.7 μM heme

鉄欠乏培地 (Fe<sup>-</sup>)：3% Todd-Hewitt, 0.5% Yeast,

0.075% Cysteine, 5 µg/ml menadione, 7.7 µM protoporphyrin IX, 125 µM 2,2'-dipyridyl  
・発現量解析

Real-time RT PCR は、SYBR Green を用いたインターカーレーター法を用いて行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) cysteine proteases の酵素学的性質の解析および Hb 分解への関与

本菌は interpainA (Streptopain-like cysteine protease の一種) で Hb を分解してヘムを遊離する能力を持つことが報告された(Biochem.J. 425 : 257-264, 2010)。しかしながら、ゲノムデータベース解析の結果、*P. intermedia* は interpainA 以外の 2 つの cysteine protease (PIN17\_A0411, PIN17\_A1283) を有することを見出した。ORF の情報を以下の表に示す。

	塩基数 (bp)	アミノ酸 (Aa)	推定分子量 (kDa)
PIN17_A0411	2364	788	88.1
PIN17_A1283	3153	1051	113.7
PIN17_0033: interpainA	2541	847	91.9

これらの ORF は共に、protease 活性の中心であるシステイン残基と hemagglutinin ドメインを持ち、*P. gingivalis* の IX 型分泌で分泌される Rgp と比較すると高い相同性を持つことが明らかになった。

既知の cysteine protease との相同性の比較は以下の表に示す。(Bold:identity Italic: similarity)

	SpeB	A0411	A1283	InterpainA	PrtT
SpeB		<b>32.4</b>	<b>34.4</b>	<b>26.9</b>	<b>31.0</b>
A0411	<i>77.6</i>		<b>22.9</b>	<b>16.6</b>	<b>71.2</b>
A1283	<i>75.1</i>	<i>74.1</i>		<b>17.5</b>	<b>69.6</b>
interpainA	<i>68.7</i>	<i>59.4</i>	<i>60.2</i>		<b>55.2</b>
PrtT	<i>71.9</i>	<i>23.3</i>	<i>19.9</i>	<i>17.3</i>	

SpeB: *Streptococcus pyogenes* exotoxinB

PrtT: *Porphyromonas gingivalis* protease

proteases の酵素学的性質を解析に使用する目的で、シグナルペプチドを除いた GST 融合組換えタンパク質を精製した。目的のサイズのタンパク質が精製できたが、protease 活性を検出できなかった。そこで、SpeB の組換えタンパクを用いた報告 (JBC 288:15854-64, 2013) を参考に、pQE80L に ORF 全長と N,C 両末端に 6 × His タグを付加し、クローニングした。

これらのプラスミドで大腸菌を形質転換したところ、ゼラチンザイモグラフィーで白色のバンドが観察され、protease 活性を検出できた (図 1)。しかしながら、融合タンパクを精製する段階で、活性が消失し、DTT、システイン、グルタチオン等の還元剤を添加しても活性は得られなかった。

そこで、まずはそれぞれのプラスミドを保持した大腸菌の crude enzyme を用いて

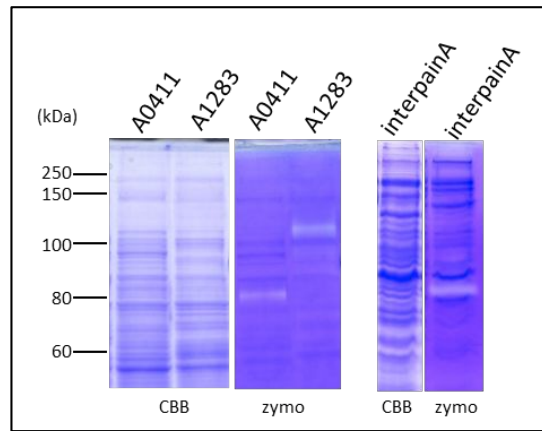


図 1 cysteine proteases の zymography protease 活性を調べた。コントロールには pQE80L (空ベクター) で形質転換した大腸菌を用いた。阻害剤を用いた実験から、この protease 活性は PMSF およびロイペプチンで活性が阻害され、アプロチニン、TLCK では阻害されないことから、cysteine protease であることが明らかになった。

次に、これらの cysteine proteases の基質を調べた。基質 (human Hb, human Fibronectin, RabbitIgG) と cysteine proteases を反応後、western blot 法で分解を検出した。

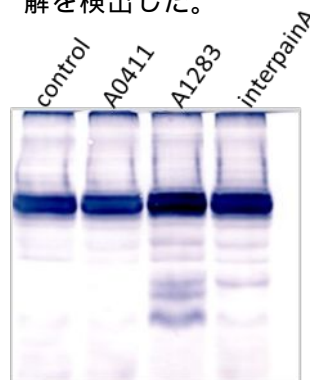


図 2 : 基質 Hb

図 2 の結果より、既知の interpainA だけでなく、新たに得られた 2 つの cysteine protease のうち、PIN17\_A1283 も Hb 分解活性を持つことが明らかとなり、Hb を分解してヘムを遊離する能力を持つことが示唆された。

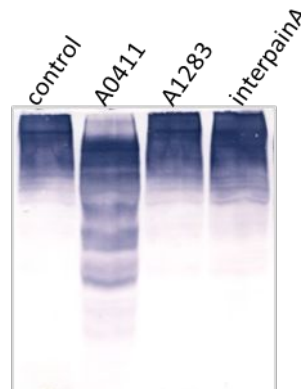


図 3 : 基質 Fibronectin

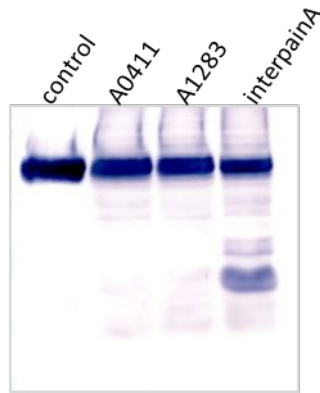


図4：基質 IgG

図3、4の結果より、PIN17\_A0411のcysteine proteaseは、細胞外マトリックスの一つであるFibronectin分解能を持つことが明らかとなり、組織の侵襲性因子の一つであることが示唆された。

続いて、これら新規のcysteine proteasesの鉄獲得機構への関与を調べることにした。*P. intermedia*は、現在までに欠損株の作製方法が確立されていない。そこで、これらの酵素に対するペプチド抗体を作製した。得られた抗血清は、精製した組換えタンパクを検出できたが、*P. intermedia*菌体および培養上清でwestern blotを行った場合、非特異的なバンドが多数検出され、また活性を抑えることができなかったため、抗体を使用して鉄獲得機構への関与は調べることができなかった。

また、これら2つの新規のcysteine proteaseは、Veithらの培養上清のproteome解析(Journal of Proteome, 12:4449, 2013)からC-terminal domainをもち、type IX分泌系を通して分泌される細胞外分泌型タンパク質であることが示された。(PIN17\_A0411: ORALGEN ID:PI1993, PIN17\_A1283: ORALGEN ID:PI0811)

## (2) 鉄結合タンパク質の酵素学的性質の解析

*P. intermedia*の類縁の歯周病原性細菌である*Porphyromonas gingivalis*において、菌体内に取り込まれたhemeは12量体を形成したDNA-protective protein from starved-cells: Dps)の表面のcysteine残基を介して配位して保存され、利用できるhemeが枯渇した際に活用することが報告された(JBC 287:42243-58,2012)。ゲノムデータベース解析の結果、*P. intermedia*のゲノム上にDpsホモログを見出した。Dpsの酵素学的性質の解析を行うために、組換えタンパク質を精製した(図5)。推定分子量は19.2 kDaであり、ほぼ目的のサイズのタンパク質が精製できたことが確認できた。

次に、精製した酵素の鉄結合能を調べるために、組換えDpsとhemeを反応させNative-PAGE後、TMBZ染色を行った。その結果、青色のバンドが検出できたことから、Dpsは鉄結合タンパク質であることが明らかとなった。

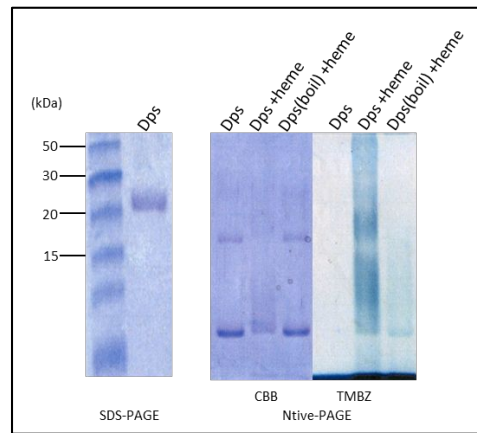


図5 DpsのSDS-PAGE, TMBZ染色

## (3) 一連の鉄獲得機構の環境変化に対する発現応答

鉄獲得機構に關する遺伝子は、鉄欠乏状況で菌を発育させた場合に、発現量が増加することが報告されている(Microbiology 152, 3367, 2006)。そこで、鉄欠乏環境下で*P. intermedia*を発育させたのち、菌体からmRNAを抽出し、real-time RT-PCR法にて、それぞれの鉄獲得機構遺伝子群の発現量を定量し、発現量の変化を解析することで、鉄獲得への関与を解析することとした。我々はこれまでに溶血素遺伝子群では*hlyA*および*hlyI*の遺伝子産物が溶血活性を示し、鉄欠乏環境下で発現が上昇することを明らかにした(Anaerobe 18:350, 2012)。本研究課題では、鉄獲得機構の溶血に続くHbを分解するprotease遺伝子群(PIN17\_A0411, PIN17\_A1283, interpainA)、菌体内取り込みheme acquisition pathway遺伝子群のヘム結合タンパク質ホモログ(PIN17\_A0718, PIN17\_0007)、菌体内鉄貯蔵タンパク質(*dps*)について解析した。

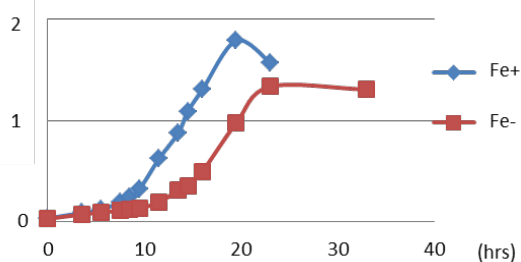


図6 増殖曲線

鉄源添加培地(7.7  $\mu$ M heme: Fe+)および鉄欠乏培地(7.7  $\mu$ M protoporphyrin IX, 125  $\mu$ M 2,2'-dipyridyl: Fe-)で*P. intermedia*を増殖させた際の増殖曲線を図6に示す。対数増殖期中期(OD: 1.0 Fe+:14 h culture, Fe-:20 h culture)の細菌を用いて、real-time RT PCRを行い、発現量を解析した。

その結果、2つの新規のcysteine proteaseのうち、interpainAと同様にHbを基質とするPIN17\_A1283の発現量の増加が認められたが、PIN17\_A0411では有意な差は認められなかった。ヘム結合タンパク質ホモログは、



*PIN17\_A0718*, *PIN17\_0007* とともに Fe-環境下で有意に発現が上昇し鉄獲得に関与することが示唆された。*dps* は鉄が過剰時に菌体内に取り込まれた heme 由来の酸化ストレスからの DNA の保護の役割を果たすため、Fe-環境下で発現量が低下したと考えられた。

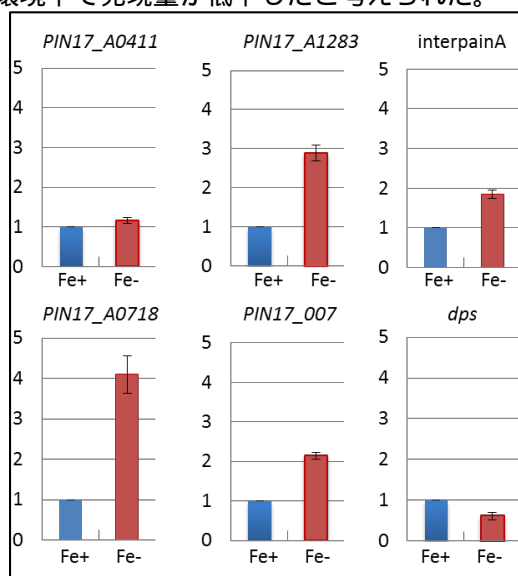


図7 real-time RT PCR

本研究で、*P. intermedia* の鉄の獲得の際に Hb の分解に関与すると推測される cysteine protease、菌体内の鉄の貯蔵に関与する酵素の酵素学的性質と発現量解析を行った。加えて、ヘム結合ドメインを持ち菌体内への鉄の取り込みに関与するタンパクの発現量解析を行った。今後は、*P. intermedia* の溶血素遺伝子欠損株の作製方法を確立させ、これらの遺伝子産物の鉄獲得への関与および、その病原性への関与を明らかにしていく予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Tajima N, Takasaki M, Fukamachi H, Igarashi T, Nakajima Y, Arakawa H.

Determination of reactive oxygen generated from natural medicines and their antibacterial activity.

Journal of Pharmaceutical Analysis, 査読有, in press, 2016

DOI: 10.1016/j.jpha.2016.04.003

Fukamachi H, Matsumoto C, Omiya Y, Arimoto T, Morisaki H, Kataoka H, Kadena M, Funatsu T, Fukutake M, Kase Y, Kuwata H.

Effect of Hangeshashinto on Growth of Oral Microorganisms. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 査読有, 512947, 2015

DOI:10.1155/2015/512947

Arakawa H, Takasaki M, Tajima N, Fukamachi H, Igarashi T.

Antibacterial activities of persimmon

extracts release with their hydrogen peroxide concentration.

Biol Pharm Bull., 査読有, 37:1119-23, 2014

DOI:10.1248/bpb.b13-00952

Kataoka H, Taniguchi M, Fukamachi H, Arimoto T, Morisaki H, Kuwata H.

*Rothia denticariosa* induces TNF-alpha production in TLR2-dependent manner.

Pathog Dis., 査読有, 71:65-8, 2014

DOI:10.1111/2049-632X.1215

Fuse H, Fukamachi H, Inoue M, Igarashi T.

Identification and functional analysis of the gene cluster for fructan utilization in *Prevotella intermedia*.

GENE, 査読有, 515:291-7, 2013

DOI:10.1016/j.gene.2012.12.023

〔学会発表〕(計1件)

Fukamachi H, Doke M, Morisaki H, Arimoto T, Kataoka H, Kuwata H.

*Prevotella intermedia* extracellular nucleases contribute to degradation of neutrophil extracellular traps

Japanese Association for Dental Research, 2014年12月4日, 大阪市

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

深町 はるか (FUKAMACHI HARUKA)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：10433799