

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 24 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870735

研究課題名(和文) P. intermedia の溶血活性抑制における歯周炎進行への影響を解析

研究課題名(英文) Influence on the progression of periodontal disease in the suppression of hemolytic activity in P. intermedia

研究代表者

鈴木 奈緒子 (Suzuki, Naoko)

昭和大学・歯学部・兼任講師

研究者番号：60634855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：これまでに同定したPrevotella intermediaの溶血素遺伝子の本菌の溶血活性への関与および、その病原性への関与を明らかにするために、P. intermediaの溶血素遺伝子欠損株の作製を試みたが、欠損株は得られなかった。次に溶血素HlyAの酵素学的な性質を解析するとともに、本酵素の活性阻害剤の開発に向けて、本酵素の活性発現に必須のアミノ酸がT28, K30, R52, R59, R141, R184, R196, R250, T287, R303であることを同定した。

研究成果の概要(英文)：In order to clarify the involvement of hemolysins pathogenicity, firstly we tried to construct P. intermedia hemolysin deficient mutant. However, we could not construct hemolysin deficient mutant. Next, to identify the essential amino acids in the hemolytic activity of HlyA, we tried to construct point mutant enzyme. Replacement of T28, K30, R52, R59, R141, R184, R196, R250, T287, R303, with Gly resulted in complete disappearance of hemolytic activity, implying that these amino acids are essential for this enzyme activity.

研究分野：医歯薬学

キーワード：Prevotella intermedia 溶血素遺伝子 部位特異的変異酵素 溶血活性

1. 研究開始当初の背景

近年、歯周病と早産・低体重児出産との間に有意な相関が報告されている。

妊娠期(特に妊娠中期以降)や思春期にはホルモンの変化が起こり、エストロゲンやプロゲステロンの分泌が活発になり、これらのホルモンが歯肉溝滲出液中に移行する。*Prevotella intermedia* は、ビタミン K と鉄を必須の栄養源とするが、妊娠時に歯肉溝内に滲出してくるエストロゲンやプロゲステロンをビタミン K の代わりに利用できることから、妊娠時に歯肉溝内で増殖し、妊娠関連歯肉炎を発症すると考えられる。加えて、鉄も同様に必須の栄養源として増殖に必須である。本菌はプロトポルフィリン IX 合成経路を持たないため、*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、ヘモグロビン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、溶血素を産生してヘモグロビン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。

そこで、我々は、本菌の溶血素を同定し、その病原性を特定し、加えて溶血素の溶血活性を阻害することで増殖を抑制し、歯周病の進行を抑制するという発想に至った。

2. 研究の目的

申請者らは、*P. intermedia* と同じ *Bacteroides* 科に属する *Bacteroides fragilis* が、染色体上に溶血素遺伝子 10 ORF をもつという報告から、*P. intermedia* のゲノムデータベースの ORF と相同解析を行ったところ、*hlyA-E*、*hlyI* の6つの溶血素遺伝子ホモログの存在を明らかにしてきた。本研究では、これら *P. intermedia* の6つの溶血素に着目し、溶血活性が本菌の病原性に果たす役割を解明し、加えて溶血素の阻害から歯周病進行抑制剤を開発することを最終目標とし、本研究期間では、以下を明らかにすることを目的とした。

(1) これまでに同定した溶血素遺伝子の本菌の溶血活性への関与および、その病原性への関与を明らかにするために、*P. intermedia* の溶血素遺伝子欠損株を作製する。

(2) 溶血素の酵素学的な性質を解析するとともに、本酵素の活性阻害剤の開発を目指す。

3. 研究の方法

(1) *P. intermedia* の溶血素遺伝子 *hlyA* 欠損株の作製

P. intermedia の遺伝子欠損株の作製方法は未だ確立されていない。そこで、*P. intermedia* の近縁種である *Porphyromonas gingivalis* のエリスロマイシンカセットを用いた方法を応用し、欠損株の作製を試みる。溶血素遺伝子 *hlyA* の5'側および3'側の約600 bp の遺伝子断片を PCR で増幅する。次に、pVA2198 上の *ermF-ermB* カセットを PCR で増幅する。5'側および3'側の断片にはそれぞれ *ermF-ermB* 遺伝子 15 bp を含むように設計する。得られた3つの増幅断片を In-Fusion 酵素によって DNA 断片を融合し、pT7 ベクターにクローニングする。標的遺伝子の一部を両端に持つエリスロマイシン耐性遺伝子断片を得る。次に、エレクトロポレーション法を用いて、この増幅断片で *P. intermedia* を形質転換する。*P. intermedia* コンピテント細胞の準備は、550 nm の吸光度が約 0.3 となったところで集菌した後、エレクトロポレーション溶液で菌体を洗滌後、再懸濁する。コンピテント細胞および DNA を混和し、エレクトロポレーションをおこない、その後、エリスロマイシン添加寒天培地に塗抹し、培養する。

(2) 溶血素の酵素学的な性質を解析および本酵素の活性阻害剤の開発

溶血素遺伝子 *hlyA*、*hlyI* を発現ベクター pGEX6P-1 にクローニングし、GST 融合組換え HlyA、HlyI タンパク質精製

hlyA、および *hlyI* の ORF 全長を発現ベクター pGEX6p-1 にクローニングし、GST 融合タンパク質として発現させる。グルタチオンセファロースビーズで融合タンパクを精製後、PreScission Protease で GST タグを切断する。

溶血素遺伝子 *hlyAhlyB* をベクター pUC18 に tandem にクローニングし His タグ融合 HlyA タンパク質精製

hlyA から上流に位置する *hlyB* を *hlyAB* tandem(全長 1868 bp)に PCR 増幅し、pUC18 にクローニングする。その際、HlyB と共発現させた HlyA の精製の為に、C 末端にプライマーにて 6×His タグを付加しておく。His タグ融合タンパク質の精製には、Ni アガロースビーズを用いて精製する。

部位特異的変異酵素の作製

pGEX6p-1 に *hlyA* をクローニングしたプラスミド pGEX-*hlyA* を QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit を用いて部位特異的変異を導入する。

活性測定方法

Plate assay: 5% 羊血液寒天平板に菌を穿刺し、嫌気および好気条件下で培養

Liquid assay: 赤血球と組換えタンパク質を混合し、一定時間反応後に溶血していない赤血球を除去し、上清中に放出されたヘモグ

ロピンを Drabkin's Reagent で処理後に測定し、溶血活性を定量する。

4. 研究成果

(1) *P. intermedia* の溶血素遺伝子欠損株の作製

P. intermedia に対するエリスロマイシンの最小発育阻止濃度を測定し、変異株の選択培地には終濃度 0.5 $\mu\text{g/ml}$ の添加と決定した。標的遺伝子の一部を両端に持つ *ermF-ermB* 断片をエレクトロポレーション法で *P. intermedia* に導入後、エリスロマイシン耐性株を選択した。得られたコロニーから DNA を抽出後、エリスロマイシン耐性遺伝子と *P. intermedia* の DNA に設計したプライマーで PCR を行い耐性が挿入されたか確認したが、得られたすべてのコロニーで *ermF-ermB* の挿入が見られなかった。また、エレクトロポレーションの条件を 1.7~2.5kV, 5ms で検討したが、欠損株は得られなかった。

(2) 溶血素の酵素学的性質の解析および本酵素の活性阻害剤の開発に向けた基礎的研究

溶血素遺伝子 *hlyA*, *hlyI* を発現ベクター pGEX6P-1 にクローニングし、GST 融合組換え HlyA, HlyI タンパク質精製

溶血素の酵素学的性質を解析および活性阻害剤の検索に使用する目的で GST 融合組換え HlyA, HlyI タンパク質を精製した (図 1)。推定分子量は HlyA が 37.8 kDa、HlyI が 44.4 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。

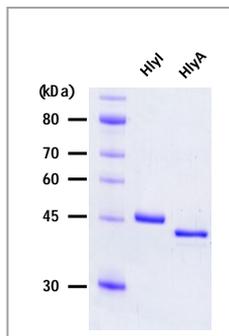


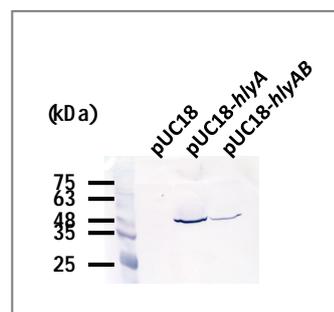
図 1 組換え HlyA, HlyI タンパク質の SDS-PAGE

次に、精製した酵素を用いて溶血活性を調べた。Liquid assay を用いて、赤血球と組換えタンパク質を混合し、一定時間反応後に上清中のヘモグロビン量を測定したが、組換えタンパク質で溶血活性が見られなかった。また、HlyA は 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。

溶血素遺伝子 *hlyA* *hlyB* をベクター pUC18 に tandem にクローニングし His タグ融合 HlyA タンパク質精製

B. fragilis, *P. intermedia*, *Por. gingivalis*, *Tannerella forsythia* *hlyA* の上流に保存されて位置する *hlyB* があり、加えて *Vibrio* 属の hemolysin 5 (VAH5) は、*hlyA* と *hlyB* が一つの ORF として存在していた。機能未知の *hlyB* は、アミノ酸配列中に phospholipid/glycerol acyltransferase superfamily motif をもち、また相同性検索より、アシル基転移酵素と推測された。そこで、HlyA は、HlyB と共役して活性化する

Two component cytolysin と推測され、HlyA は上流に位置する HlyB によって活性を発現していると推測された。そこで、次に、HlyA を HlyB と共発現させた上で、HlyA を精製することにした。*hlyA* から 59 bp 上流に位置する *hlyB* (816 bp) およびその推定プロモーター領域を PCR 増幅し、プロモーター + *hlyAB* tandem (全長 2223 bp) を pUC18 にクローニングする。その際、HlyB と共発現させた HlyA の精製の為に、C 末端にプライマーにて 6 \times His タグを付加した。pUC18 に *hlyA* のみ (pUC-*hlyA*)、および *hlyAB* (pUC-*hlyAB*) をクローニングしたプラスミドを維持する大腸菌を SDS-PAGE 後、Western blot 法で抗 His タグ抗体で HlyA を検出した。*hlyA* 単独およびプロモーター + *hlyAB* tandem でクローニングいずれも 40 kDa 付近にバンドが得られ (図 2)、発現が



確認できたので、Ni-NTA カラムを用いて His タグタンパク質を精製した。

Liquid assay を

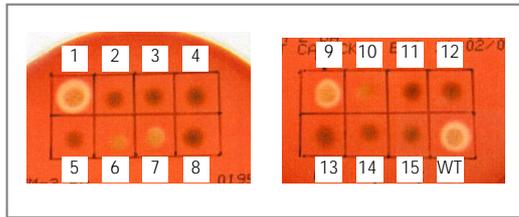
用いて、HlyA および HlyB と共発現させた HlyA の溶血活性を観察したが、組換えタンパクの活性は得られなかった。

の実験で得られた *hlyA*, *hlyI* をクローニングしたプラスミドを維持した大腸菌には、Plate assay にて溶血がみられることから、これらの溶血素は菌体表層に HlyA, HlyI が維持されることで活性を示すか、あるいは、組換えタンパク質では二次構造あるいは三次構造を回復できないためと考えられた。当初の予定では、SELEX 法で溶血素阻害剤となるアプタマーを選択し、阻害剤開発を目指していたが、活性のない組換えタンパク質は活性の発現に必須な立体構造を維持できていないと考えられ、アプタマーの選択ができないと判断した。

そこで、溶血活性に必須の活性部位を検索し、活性部位の阻害薬を創薬のターゲットにすることとした。

部位特異的変異酵素の作製

活性部位を検索には、*B. fragilis*, *P. intermedia*, *Por. gingivalis*, *T. forsythia* HlyA および *Vibrio anguillarum* VAH5 のアラインメントを行った。そこで、高度に保存されているアルギニン(R)、トレオニン(T)、リジン(K)をグリシンに置換した部位特異的変異酵素を作製し、plate assay にて溶血活性を調べた。部位特異的変異をいれた pGEX-*hlyA* はすべてシーケンスを行い、目的の遺伝子の変異を確認した。



No	アミノ酸	溶血活性
1	R 2 6	+
2	T 2 8	-
3	K 3 0	-
4	R 5 2	-
5	R 5 9	-
6	T 6 5	+
7	T 1 1 8	+
8	R 1 4 1	-
9	K 1 5 6	+
1 0	T 1 7 2	+
1 1	K 1 8 4	-
1 2	R 1 9 6	-
1 3	R 2 5 0	-
1 4	T 2 8 7	-
1 5	R 3 0 3	-

HlyAの溶血活性には、T28, K30, R52, R59, R141, R184, R196, R250, T287, R303 が必須であることが明らかとなった。

今後は、これらの活性部位を特異的に阻害できる阻害剤の開発につなげていく予定である。また、溶血素 HlyA は、*P. intermedia* のみならず、*Por. gingivalis*, *T. forsythia* といった多くの歯周病原性細菌がもつ酵素であり、加えてアミノ酸配列は高い相同性をもつことから、歯周病原細菌の生存に必須である溶血素の溶血活性を阻害することで増殖を抑制し、歯周病の進行を抑制することが可能になると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 奈緒子 (Suzuki Naoko)

昭和大学 歯学部 兼任講師

研究者番号 : 60634855