

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670804

研究課題名(和文) 歯周病細菌の病原性に関わるCTD含有タンパク質結合陰イオン性LPSの生合成の解明

研究課題名(英文) Biogenesis of sugar moiety of anionic lipopolysaccharide associated with CTD proteins

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Wbp経路に含まれるWbpDホモログ(PGN\_0002)の欠損株をポルフィロモナス・ジンジバリスにて作製した。その変異株はA-LPS欠損であったことからUDP-GlcNAc(3NAc)AがA-LPSの糖鎖内に存在することが示唆された。また、グリコシルトランスフェラーゼをコードすると推定される15遺伝子のうち13遺伝子について欠損株を作製したところ、PGN\_1240はO-LPS、A-LPSに必須、PGN\_0361はA-LPSに必須であり、PGN\_0316とPGN\_1239はどちらか一つはO-LPSに必須であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：We constructed a Porphyromonas gingivalis mutant deficient in the WbpD homolog, PGN\_0002, which is involved in the Wbp pathway and found that the mutant is deficient in A-LPS, suggesting that P. gingivalis may synthesize UDP-GlcNAc(3NAc)A, for incorporation into A-LPS. Mutants were successfully constructed in 13 genes among the 15 genes encoding putative glycosyltransferases. Biochemical analysis of the mutants suggested that PGN\_1240 protein is essential for the synthesis of both O-LPS and A-LPS, PGN\_0361 is necessary for A-LPS synthesis, and PGN\_0361 and PGN\_1239 proteins functionally compensate each other in O-LPS synthesis.

研究分野：口腔病原微生物学

キーワード：歯周病 細菌 LPS

## 1. 研究開始当初の背景

嫌気性細菌 *Porphyromonas gingivalis* は慢性歯周炎の keystone pathogen として知られている。*P. gingivalis* は、血液寒天培地上で黒色集落を形成する。我々は黒色集落形成機構を詳細に検討した結果、本菌の最重要病原因子であるジンジパイン プロテアーゼなどの CTD 含有タンパク質の菌体表面局在化における二つの重要なメカニズムを発見した。

(1) C 末端ドメイン (CTD) をもつタンパク質 (CTD 含有タンパク質) は IX 型分泌機構により、菌体表面に分泌される (Sato et al. PNAS 2010)。

(2) CTD 含有タンパク質は IX 型分泌機構にて分泌後、菌体表面の陰イオン性 LPS (anionic LPS; A-LPS) に結合する (Shoji et al. PLoS ONE 2011)。

本菌の LPS には O 抗原鎖の組成が異なる二種の LPS (O-LPS, A-LPS) が存在すると報告されているが、その生合成機構については未だ不明な点が多い。我々は本菌の LPS 生合成機構に関わる一因子として、O 抗原鎖調節因子 (WzzP) を同定した (Shoji et al. MicrobiologyOpen, 2013)。WzzP は *Porphyromonas* 属に特異的な C 末端領域をもつことから、その存在意義について未知の機能を有する可能性がある。さらに、本菌の A-LPS に CTD 含有タンパク質がどのように結合しているかについては未解明であることから、本研究課題を着想した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、歯周病細菌の陰イオン性 LPS (A-LPS) の生合成機構とそれに付着する病原タンパク質との結合機構を明らかにすることである。我々は、歯周病細菌 *P. gingivalis* において、新規分泌機構 (IX 型分泌機構) を発見し、その分泌機構により分泌される強力な病原タンパク質が A-LPS に結合することで菌体表面に局在化することを

発見した。本菌の病原性において、A-LPS の重要度は非常に高いと考えられるものの、その生合成機構や菌体表面に分泌されたタンパク質がどのようにして LPS に結合するかについては未だ不明な点が多い。*P. gingivalis* の A-LPS の生合成機構と病原タンパク質結合機構を明らかにする本研究は歯周病原細菌の制圧法開発の基盤となる挑戦的研究である。

## 3. 研究の方法

*P. gingivalis* における未だ解明されていない A-LPS の生合成機構と糖タンパク質結合機構を総合的に解析する。A-LPS の生合成機構を明らかにする方法として、(1) 予備的知見に基づいた A-LPS 特異的な構成糖を同定する。(2) A-LPS および O-LPS の O 抗原鎖の高次構造の解明に取り組む。(3) O 抗原鎖調節因子 (WzzP) の C 末端領域の機能解析を行う。一方、糖タンパク質結合機構を明らかにする方法として、(4) A-LPS 結合型 CTD 含有タンパク質の精製法を確立し、糖ペプチド分取後、糖鎖が結合するアミノ酸分子の同定を試みる。(5) CTD 含有タンパク質を A-LPS に結合させる未知の糖転移酵素を生化学的、遺伝学的手法により同定する。(6) 既知以外の A-LPS 結合型 CTD 含有タンパク質の同定を行う。

## 4. 研究成果

(1) A-LPS 特異的な構成糖の存在について：緑膿菌は、O 抗原鎖の組成が異なる二種の LPS (A-band LPS および B-band LPS) を持つことが知られている。緑膿菌においてはジアセチルマンノuron酸は UDP-GlcNAc から WbpA, WbpB, WbpE, WbpD, WbpI という酵素の連続的な反応により合成されることが知られている。我々は本菌における A-LPS 生合成機構に関わる既知の複数の遺伝子が緑膿菌の B-band LPS に含まれる構成糖 (レアシュガー) の生合成遺伝子の一部相同であることを見出した (WbpE=PorR など) (図 1)。

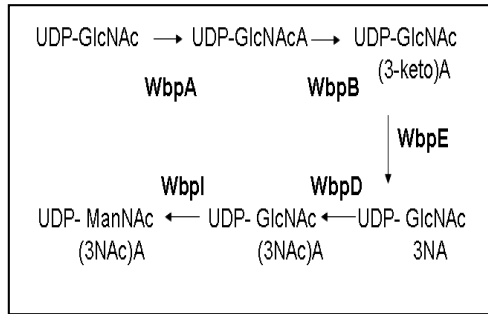


図 1

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、ということが分かった。これまでに UgdA、WbpB、PorR については変異株があり、すべて A-LPS の合成に異常を示した。一方、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。各変異株の解析から現在図 2 の LPS 糖鎖合成モデルを提案している。

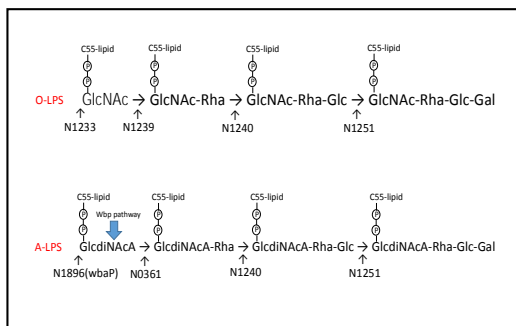


図 2

## 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 2 件)

Shoji M, Nakayama K. Glycobiology of the oral pathogen *Porphyromonas gingivalis* and related species.

*Microb Pathog.* 2016 May;94:35-41. doi: 10.1016/j.micpath.2015.09.012. 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

〔学会発表〕(計 7 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)

中山浩次: 細菌の新しい分泌システムと滑走運動、第 98 回日本細菌学会関東支部総会、2015 年 10 月 29 日～30 日、東京歯科大学(東京都・千代田区)

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 のリボ多糖合成に関わる 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)

Nakayama K: The type IX secretion system of *Porphyromonas gingivalis*, PgLONDON2015, London (UK), June 23-25, 2015

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, London (UK), June 23-25, 2015

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)

〔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

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

(2)研究分担者

橋本 雅仁 (HASHIMOTO, Masahito)

鹿児島大学・理工学研究科・准教授

研究者番号 : 30333537

(3)連携研究者

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