

令和元年5月24日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11450

研究課題名(和文) 構造から解き明かす歯周病菌の病原因子分泌機構

研究課題名(英文) Structural analysis of Type IX secretion system

研究代表者

佐藤 啓子 (SATO, Keiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：70410579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* は9型分泌装置(T9SS)を介して多くの病原因子を分泌する。T9SS分泌タンパク質は、シグナルペプチド、機能ドメイン、Ig-like domain、C-terminal domainからなる。

Ig-like domainを欠失したT9SS分泌タンパク質は、菌体内品質管理タンパク質の1つであるHtrAによって、菌体内で分解された。さらに、構造から、Ig-like domainは、機能ドメインとIg-like domain間のドメインの疎水性面を覆うことによって、菌体内での凝集を防いでいることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病は心血管疾患、脳梗塞、糖尿病、早産などとの関連性も指摘されている慢性細菌感染症であり、細菌の産生する病原因子により、直接および間接的に歯周組織の破壊が生じる疾患となる。

細菌のタンパク質分泌は、それらの病原性に関わる。主要な歯周病菌が持つ病原因子分泌装置に関する研究を行うことで、歯周病細菌の病原性制御に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* secretes many potent virulence factors using the type IX secretion system (T9SS). T9SS cargo proteins are composed of a signal peptide, functional domain(s), an immunoglobulin (Ig)-like domain, and a C-terminal domain.

T9SS cargo proteins were degraded when their Ig-like domains were lacking or truncated. The degradation was dependent on the activity of a quality control factor, HtrA protease. These results suggest that the Ig-like domain mediates stability of the cargo proteins in the T9SS.

研究分野：形態系基礎歯科学

キーワード：type IX secretion system *Porphyromonas gingivalis*

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌のタンパク質分泌は病原性に直結するため、長年種々の病原菌で研究されてきた。現在、それらの分泌装置は、分泌様式の違いにより Type I~Type IX に分類される。歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* は強力なプロテアーゼであるジンジパインを分泌する。ジンジパイン分泌を解析していく過程で、Type IX secretion system (T9SS) がタンパク質分泌に関与していることが分かってきた。T9SS は *P. gingivalis* をはじめ、バクテロイデーテス門に属する歯周病細菌である *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia*、動物由来感染症の原因菌である *Capnocytophaga canimorsus*、アユ、ニジマスの致死性感染症、冷水病の原因菌である *Flavobacterium psychrophilum* 等の病原細菌にも保存されている。

2. 研究の目的

代表的な歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* において、病原タンパク質分泌に関わる分泌装置 (Type IX secretion system: T9SS) を新たに見つけた(2010)。本分泌装置はバクテロイデーテスフィラム (Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides グループ) に属する他の歯周病細菌にも保存され、菌種によってはタンパク質分泌だけでなく滑走運動にも関与することが明らかとなった。システムを構築する個々の因子について機能解析をおこなうとともに、分泌されるタンパク質がどのような共通性を持ち、分泌機構に認識されて膜を通過するのか、本研究では T9SS を構築する分子の構造を明らかにすること、分泌タンパク質のシグナル認識機構を構造の面から明らかにすることを研究目的とする。

3. 研究の方法

分泌装置がどのような仕組みで分泌タンパク質を認識・識別・分泌するのか、分泌する側およびされる側の両因子から解析を進める。T9SS 構成タンパク質の個々の分子構造を明らかにするとともに分泌装置を構成する上で重要な部位を決定する。ジンジパイン以外の T9SS 分泌タンパク質を同定している。これら分泌タンパク質の共通性から、T9SS 分泌タンパク質の基本構造を明らかにする。

HBP35 とジンジパインの構造比較により、Ig-like domain の構造を共通して持つことが明らかとなったことから、遺伝学的手法を用いて Ig-like domain を欠失した T9SS 分泌タンパク質、また Ig-like domain を他の菌のそれと入れ替えた T9SS 分泌タンパク質を *P. gingivalis* 内で発現し、イムノプロット解析を行った。

Ig-like domain を欠失した T9SS 分泌タンパク質は、イムノプロット解析によって検出されなかった。菌体内で分解されていると仮定し、Ig-like domain を欠失した Gingipain (Kgp Ig) を発現させた株において、菌体内プロテアーゼ遺伝子候補を変異させ、Kgp Ig がレスキューされるプロテアーゼ遺伝子を探索した。

4. 研究成果

T9SS 分泌タンパク質の輸送タンパク質の特徴を知るために、*P. gingivalis* の T9SS 分泌タンパク質である、HBP35 全長タンパク質 (プロ型) の X 線結晶構造解析を行なった (図 1)。これまでに報告のある T9SS 分泌タンパク質 Gingipain (Kgp, Rgp) (分泌型) 等の構造と、HBP35 の構造を比較することにより、プロ型 T9SS 分泌タンパク質は、シグナルペプチド、機能ドメイン、Ig-like domain、C-terminal domain を基本構造として持つことが示された。Ig-like domain を欠失した HBP35 (HBP35 Ig) および Gingipain (Kgp Ig, Rgp Ig) を *P. gingivalis* において発現させたところ、HBP35 Ig および RgpB Ig は、各々抗 Hbp35 抗体および抗 Rgp 抗体を用いたイムノプロットで検出されなくなった。これらは、菌体内で品質管理タンパク質の 1 つである HtrA プロテアーゼによって分解されていた。

また、Kgp と RgpB の Ig-like domain を入れ替えた場合も Ig-like domain 欠失型ジンジパインと同様に、細胞内で HtrA によって分解されていた。このことから、各々の機能ドメインに合わせた Ig-like domain が必要となることが示された。

Ig-like domain を欠失した T9SS 分泌タンパク質が HtrA プロテアーゼによって分解されることから、Ig-like domain を欠失するとタンパク質凝集することが示唆された。一方、HBP35 タンパク質の構造から、機能ドメインと Ig-like domain は疎水性相互作用をもって面していた。Ig-like domain は、機能ドメインと Ig-like domain 間のドメインの疎水性面を覆うことによって、菌体内での凝集を防いでいることが示唆された (図 2)。

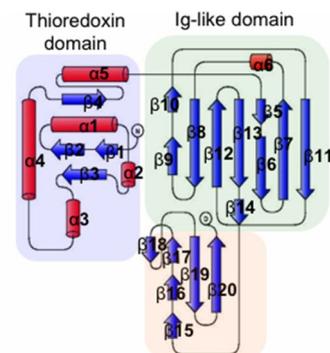
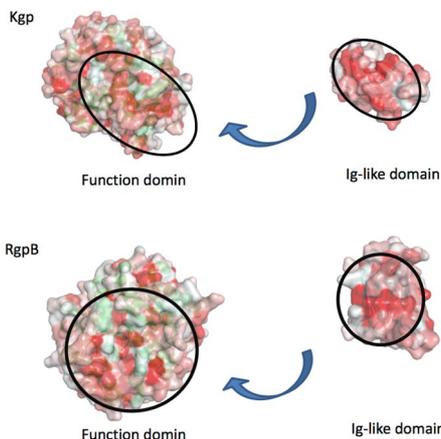
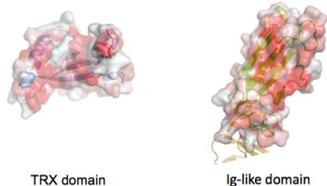


図 1 C-terminal domain
Topology diagram of HBP35
red : α -helix, blue: β -strand

図 2

HBP35



5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Immunoglobulin-like domains of the cargo proteins are essential for protein stability during secretion by the type IX secretion system.

Sato K, Kakuda S, Yukitake H, Kondo Y, Shoji M, Takebe K, Narita Y, Naito M, Nakane D, Abiko Y, Hiratsuka K, Suzuki M, Nakayama K. Mol Microbiol. 2018, 110(1):64-81. 査読あり
doi: 10.1111/mmi.14083.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 佐藤啓子, 岡田広大, 中根大介, 中山浩次, 今田勝己: 細菌 9 型分泌装置のコア構成蛋白質 PorM の構造 . 第 91 回日本生化学会, 京都, 9 月 . { 第 91 回日本生化学会大会抄録集 . 1p380, 2018 }
2. 佐藤啓子, 岡田広大, 中根大介, 中山浩次, 今田勝己: Structure of PorM, a core component of bacterial type IX secretion system . 第 56 回日本生物物理学会年会, 岡山, 9 月 . { 第 56 回日本生物物理学会年会抄録集 . 1pos057, 2018 }

〔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 :
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 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：今田 勝己

ローマ字氏名：IMADA, Katsumi

所属研究機関名：大阪大学

部局名：理学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：40346143

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。