

平成22年 5月19日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19592135

研究課題名（和文） 歯周病原菌で見つかった新規蛋白分泌装置の解明

研究課題名（英文） Study of a novel protein secretion system of *Porphyromonas gingivalis*

研究代表者

才木 桂太郎 (SAIKI KEITAROU)

日本歯科大学・生命歯学部・講師

研究者番号：30297973

研究成果の概要（和文）：歯周病原菌が産生する病原因子ジンジパインの分泌に関わる新規外膜蛋白 Sov と新規膜蛋白 PG27 を同定した。また、Sov の C 末端領域は菌体外に露出しており、ジンジパインの分泌に必須であることを示した。以上の結果から、ジンジパインは新規の蛋白分泌経路で分泌されること、Sov 蛋白や PG27 蛋白が新たな歯周病治療の標的と成り得ることを示唆した。

研究成果の概要（英文）：A novel outer membrane protein Sov and a novel membrane protein PG27 were identified as essential factors for the secretion of gingipain protease virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. The C-terminal portion of Sov is exposed to the extracellular milieu and involved in the modulation of Sov function. These results suggest that gingipains are secreted via a novel protein secretion pathway, and that Sov and PG27 are promising targets for anti-periodontitis drug development.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：口腔細菌学

1. 研究開始当初の背景

成人日本人のおよそ3人に1人が罹患しているといわれている歯周炎は、我が国の公衆衛生上の重要な疾病である。慢性歯周炎は最も一般的にみられる歯周炎であり、その病巣である歯周ポケットから高頻度で分離される偏性嫌気性のグラム陰性桿菌

Porphyromonas gingivalis は本疾患の主たる原因菌であると考えられている。*P. gingivalis* は蛋白質を唯一の C 源 N 源として代謝するが、環境中の蛋白質を菌体内に取り込むには蛋白質を分子量の小さいペプチド断片にまで分解する必要がある。この過程にトリプシン様活性を示す分泌性のプロテ

アーゼであるジンジパイン (Arg-ジンジパインと Lys-ジンジパイン) が重要な役割を演じていることが最近、申請者らによって明らかにされた [Oda *et al.* (2007) *J Periodont Res* **42**:438-442]。更にジンジパインはその強力なプロテアーゼ活性で、感染部位での異常な免疫応答、炎症反応、過敏症反応を引き起こして本疾患の病態を進行させると考えられている。従ってジンジパインは本菌の重要な病原因子である。更に、ジンジパインは分泌性蛋白質であり菌体外で機能することから、ジンジパインの分泌装置も本菌の重要な病原因子である。現在、グラム陰性細菌の代表的な蛋白質分泌経路として、Sec 複合体に依存する II 型、IV 型、V 型と Sec 複合体に依存しない I 型、III 型、VI 型が同定されている。ジンジパインは典型的なシグナル配列を含む前駆体として翻訳されることから、内膜の透過は Sec 複合体を介して行われると考えられている。しかし、ゲノム解析が完了している *P. gingivalis* W83 株には Sec 依存性の蛋白質分泌経路 (II 型、IV 型、V 型) が見出されなかったことから、ジンジパインは既存の分泌装置とは異なる新規の蛋白装置を介して外膜を透過することが示唆されてきた。しかし、ジンジパインの外膜透過機構はほとんど明らかにされていなかった。最近、ジンジパインの活性や分泌に必要な *P. gingivalis* の PorT 蛋白が同定された [Sato *et al.* (2005) *J Biol Chem* **280**:8668-8677]。興味深いことに、PorT は既存の蛋白分泌経路で同定されている蛋白因子と相同性を示さない新規の蛋白質であった。しかし、PorT は内膜に局在することが示されており、ジンジパインの外膜透過における役割は明らかにされなかった。一方、申請者は、ジンジパインの活性や分泌に必須な *P. gingivalis* の Sov 蛋白を同定した [Saiki and Konishi (2007) *Microbiol Immunol* **51**:483-491]。sov 遺伝子の欠失変異はジンジパインの活性や分泌をほとんど消失させるが、*P. gingivalis* の他の分泌性プロテアーゼである DPPIV, DPP-7, PtpA の活性には影響しなかった。更に sov 遺伝子も、既存の蛋白分泌経路で同定されている蛋白因子と相同性を示さない新規の蛋白質をコードしている。以上の結果、ジンジパインの分泌装置は既存の蛋白分泌装置とは異なる新規の機構が存在することが示唆された。しかし、この新規蛋白分泌装置の性状はほとんど解明されていなかった。

2. 研究の目的

歯周病原菌 *P. gingivalis* が産生するジンジパインの分泌機構を解明するために、ジンジパインの分泌装置を構成するタンパク因子の同定とその役割を検証することを目的

とする。本研究の成果は、グラム陰性細菌の蛋白分泌経路の現在のモデルに重要な知見を提供すると共に、慢性歯周炎の治療法の開発戦略に新たな突破口を提示することが期待される。

3. 研究の方法

(1) **ジンジパインを分泌する新規蛋白分泌装置を構成する膜蛋白因子のスクリーニング**: *P. gingivalis* W83 株のゲノム情報を用いて、以下の条件に全て該当する遺伝子を網羅的にスクリーニングする。①推定のシグナル配列を有する [Bendtsen JD *et al.* (2004) *J Mol Biol* **340**:783-795]。②プロテオミクスでタンパク質の発現が確認されている [Zhang *et al.* (2005) *Proteomics* **5**:198-211]。③100 残基以上のアミノ酸から成る。④PorT と Sov と同様に、蛋白ホモログが *Cytophaga* や *Flavobacterium* 等の限られた細菌種にしか見られない。このような特徴を示す蛋白をコードする遺伝子をエリスロマイシン耐性カセット *ermF-ermAM* を挿入して破壊する。そして得られたノックアウト株のジンジパインの活性や分泌の低下を検定して、新規蛋白分泌装置を構成する蛋白因子をコードしていると考えられる遺伝子をスクリーニングする。

(2) **ジンジパインを分泌する新規蛋白分泌装置を構成する膜蛋白因子の同定**: 得られた候補遺伝子のエリスロマイシン (EM) 耐性カセットの挿入変異株は、極性効果等の様々な影響が起きている可能性がある。そこで、候補遺伝子の 3' 末端の直ぐ下流に EM 耐性カセットが挿入された挿入対照株を構築し、ジンジパインの活性に影響が無いことを確認する。次に、挿入対照株の EM 耐性カセットの上流にある候補遺伝子領域の一部分あるいは全領域を欠失する欠失変異株を構築し、ジンジパインの活性が著しく低下することを確認する。この際、他の分泌性プロテアーゼである DPPIV, DPP-7, PTP-A の活性には何れの株も影響が無いことを確認して、プロテアーゼの分泌欠損がジンジパインに特異的であることを示す。この挿入対照株と欠失変異株を用いて、ジンジパインの分泌を抗 Arg-ジンジパイン抗血清と抗 Lys-ジンジパイン抗血清を用いたイムノブロット法で検出した。

(3) **細胞内局在の同定**: 候補遺伝子の一部をサブクローニングして、ヒスチジン・タグ遺伝子を導入し、大腸菌で大量に発現させて封入体を生成させる。不溶性蛋白を分画後、組換え蛋白を変性剤で可溶化してニッケル・カラムで精製し、ウサギを免疫して抗血清を調製する。次に、*P. gingivalis* から細胞画分を調製し、この抗血清を用いたイムノブロット法で目的蛋白質の細胞内局在を決

定した。Sov 蛋白の細胞内局在は、C 末端にヒスチジン・タグを導入した Sov 蛋白を発現する *P. gingivalis* 83K5 株から調製した細胞画分を、ニッケル・カラムで濃縮してから、イムノブロット法による解析を行った。Sov 蛋白の細胞外領域は、抗 Sov 抗血清存在下での *P. gingivalis* の生菌体によるジンジパインの分泌阻害効果で検索した。

(4) ジンジパインの分泌に関わる Sov の C 末端領域における機能必須領域の検索 : Sov 蛋白の C 末端 (Gln2499) から 1 残基ずつ欠失させた *P. gingivalis* W83 の変異体を構築して、ジンジパインの分泌に及ぼす効果を解析して検証した。

4. 研究成果

(1) ジンジパインの分泌に必須な新規膜蛋白質 PG27 の同定 : *P. gingivalis* W83 株のゲノムデータベースを用いたポストゲノム解析から、ジンジパインの分泌に必須である遺伝子候補として PG0027 遺伝子を得た。そこで PG0027 遺伝子を欠失させた *P. gingivalis* の変異体を構築し、その効果を詳細に検証した。PG27 遺伝子の欠失変異はジンジパインの活性をほぼ完全に消失させたが、本菌の他の分泌性プロテアーゼであるジペプチジルペプチダーゼ (DPPIV, DPP-7) やトリペプチジルペプチダーゼ (PTP-A) の活性にはほとんど影響が無かった。PG0027 遺伝子の 3' 末端の直ぐ下流に EM 耐性カセットが挿入された挿入対照株は、ジンジパインや他のプロテアーゼの活性に影響が無かった。次に、ジンジパインに対する抗血清 (抗 RgpB 抗血清) を調製して、Arg-ジンジパインの細胞内局在をウエスタンブロット法で解析した。欠失変異体は異常な分子量の Arg-ジンジパインが細胞内に蓄積しており菌体外への分泌が著しく減少していることが明らかとなった。PG27 の一次構造解析の結果、PG27 蛋白はシグナル配列を有する新規の膜蛋白質であると推定された。そこで、抗 PG27 抗血清を調製して、*P. gingivalis* の細胞画分をウエスタンブロット法で解析した結果、PG27 蛋白は内膜と外膜の両方に局在することが明らかとなった。以上の結果、PG27 蛋白は本菌の新規蛋白分泌に関わる新規の蛋白因子であることを示した。

(2) Sov 蛋白質の細胞内局在と機能必須領域の同定 : Sov 蛋白の N 末と C 末に対する抗 Sov 抗血清 32-177:2408-2499 と、Sov 蛋白の N 末領域に対する 2 種の抗 Sov 抗血清 (178-625 と 626-1073) を調製した。しかし、Sov 蛋白は発現量が低いため、野生型 *P. gingivalis* で発現している Sov の蛋白バンドをイムノブロット法で検出できなかった。そこで、C 末端にヒスチジ

ン・タグを導入した Sov 蛋白を発現する *P. gingivalis* 83K5 株を構築して細胞画分を調製し、ニッケル・カラムで濃縮してから、イムノブロット法による解析を行った。すると Sov 蛋白バンドは外膜画分に特異的に検出された。従って、Sov 蛋白は外膜蛋白であることを示した。また、抗 Sov 抗血清存在下での *P. gingivalis* の生菌体によるジンジパインの分泌を調べた結果、3 種の抗 Sov 抗血清の中で、Sov 蛋白の N 末と C 末に対する抗 Sov 抗血清 32-177:2408-2499 のみがジンジパインの分泌阻害を示すことを明らかにした。これは Sov 蛋白の末端領域が菌体外に露出しており、ジンジパインの分泌にも重要であることを示唆する。そこで、Sov 蛋白の C 末領域における機能必須領域の検索を行った。Sov 蛋白の C 末端 (Gln2499) から 1 残基ずつ欠失させた *P. gingivalis* W83 の変異体を解析して検証した結果、Sov 蛋白の C 末端の Gln2499 から Asn2496 までの欠失変異はジンジパインの分泌を示したが、Phe2495 以降の残基までの欠失変異ではジンジパインの分泌を著しく低下させた。以上の結果、Sov の N 末端あるいは C 末端領域は細胞外に露出しておりジンジパインの分泌に寄与していること、Sov の C 末端からの 5 残基から成る領域 Phe2495-Gln2499 は Sov の活性に必須であることを示唆した。

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 2 件)

- ① Keitarou Saiki & Kiyoshi Konishi (2010) The role of Sov protein in the secretion of gingipain protease virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett* **302**: 166-174. (査読有)
- ② Ikumi Ishiguro, Keitarou Saiki & Kiyoshi Konishi (2009) PG27 is a novel membrane protein essential for a *Porphyromonas gingivalis* protease secretion system. *FEMS Microbiol Lett* **292**: 261-267. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 才木桂太郎、古西清司；歯周病原因菌の病原因子分泌における Sov 蛋白の役割；第 83 回日本細菌学会総会；平成 22 年 3 月 27 日；横浜
- ② 才木桂太郎、古西清司；細菌の新規蛋白質分泌系に関わる新規外膜蛋白質 Sov の解析；第 82 回日本生化学会；平成 21 年

- 10月22日；神戸
- ③ 才木桂太郎、古西清司；新規の蛋白質分泌系に関わる巨大蛋白Sovの機能必須領域の検索；平成21年3月21日；名古屋
 - ④ 石黒生美、才木桂太郎、古西清司；*Porphyromonas gingivalis*の新規蛋白質分泌系に関与する蛋白質PG27の同定；第82回日本細菌学会総会；平成21年3月21日；名古屋
 - ⑤ 才木桂太郎、古西清司；歯周病原菌で見つかった新規蛋白質分泌系に関わる巨大蛋白Sovの同定；第81回日本細菌学会総会；平成20年3月26日；京都

〔その他〕

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

才木桂太郎 (SAIKI KEITAROU)
日本歯科大学・生命歯学部・講師
研究者番号：30297973

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：