

機関番号：33703

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592165

研究課題名（和文） 歯周病関連細菌の表層蛋白質の糖鎖修飾と病原性との関連性

研究課題名（英文） Relationship between glycosylation and virulence of surface proteins from periodontopathic bacterium

研究代表者

村上 幸孝（MURAKAMI YUKITAKA）

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：60239506

研究成果の概要（和文）：歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* の菌体表層蛋白質から糖鎖修飾された蛋白質を糖特異的染色やレクチンを用いて検索した。その結果、主要外膜蛋白質である RagB や Pgm6/7 が糖蛋白質であることが明らかになり、その他にも3種類の糖蛋白質が同定できた。変異株を作製して親株と比較したところ、これらの糖蛋白質が *P. gingivalis* の定着や生存に関与し、病原性に影響することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Glycosylated proteins from periodontopathic bacterium *Porphyromonas gingivalis* were examined by carbohydrate-specific staining and lectin blotting. Major outer membrane proteins RagB and Pgm6/7 as well as other three proteins were identified as glycoproteins. Since mutant strains showed reduced colonization and survival rates, these glycoproteins may be involved in virulence of *P. gingivalis*.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：口腔細菌学

科研費の分科・細目：医歯薬学・歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：歯周病関連細菌、表層蛋白質、糖鎖修飾、病原性

1. 研究開始当初の背景

歯周病はプラーク中の細菌によって発症し進行する感染症である。そのうち歯周炎は特定の細菌感染によって引き起こされ、炎症が歯周組織の深部にまで波及すると、歯槽骨が破壊され、最終的には歯の喪失を招く。慢性歯周炎が最も一般的にみられる歯周炎であり、通常35歳以上で発症し、罹患率は加齢とともに増加する。高齢化社会を迎えた現在では、歯周病の予防および治療は、口腔の健康維持のための重要な課題である。

慢性歯周炎の有力な関連細菌として、いわゆる”Red complex”を形成する *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia* および *Treponema denticola* のグラム陰性菌3菌種が挙げられる。病原細菌の表層成分は宿主の防御機構の標的となるため、表層成分の構造と機能を解明することは病原性を理解する上で非常に重要である。*P. gingivalis* においては、線毛やプロテアーゼをはじめとする多数の病原因子が調べられてきたが、外膜に関しては比較的注目されていなかった。

われわれは、*P. gingivalis* の外膜蛋白質の分離・精製方法を検討し、主要外膜蛋白質の同定を行った (Murakami et al, Eur J Oral Sci, 2002)。その結果、主要外膜蛋白質としてジンジパイン (Rgp と Kgp) が存在し、その他に RagA、RagB および OmpA 様蛋白質が存在することを報告した。遺伝子欠失株を用いた研究により、OmpA 様蛋白質が2種類の蛋白質で構成されるヘテロ3量体を形成し、外膜の安定性に寄与していることを明らかにした (Nagano et al, J Bacteriol, 2005; Iwami et al, Oral Microbiol Immunol, 2007)。RagA および RagB は物理的に近接して外膜表層に存在し、比較的分子量の大きな蛋白質分解物の菌体内への取り込みと本菌の病原性の発揮に関与することを明らかにした (Nagano et al, J Med Microbiol, 2007)。患者血清を用いた研究により、RagB が、歯周病患者において重要な菌体表層抗原であることも明らかにした (Imai et al, Eur J Oral Sci, 2005)。

多くの蛋白質は翻訳後修飾を受けて多様化すると言われている。翻訳後修飾には、リン酸化、メチル化などがあるが、最も多いのが糖鎖修飾である。糖鎖修飾は糖転移酵素により単糖が1つずつ付加されることにより起こる。この糖鎖による修飾は単にゲノムの情報では推定できない。一般的な糖修飾の意義として、付着への関与、蛋白質分解からの保護、三次構造の安定化、抗原の変異性の付与や免疫機能からの回避などが挙げられる。現在のところ、細菌においては、*Campylobacter* 属の糖蛋白質の研究が最も進展していると考えられる (Szymanski and Wren, Nature Rev, 2005)。一方、歯周病関連細菌においては、糖蛋白質はほとんど研究されていない。

近年、*P. gingivalis* の主要外膜蛋白質のうち、ジンジパインである Rgp が糖鎖修飾を受けていることが明らかになっている。菌体表層の多糖体産生に関わる領域がジンジパインの糖修飾に影響を及ぼすことが報告されている (Shoji et al, Microbiology, 2002)。そのほかに糖に関連した研究では、糖転移酵素が *P. gingivalis* の自己凝集能や細胞への付着能の調節に働いているという論文がある (Narimatsu et al, Infect Immun, 2004)。ごく最近になって、リポ多糖の糖鎖合成に関連する遺伝子の報告 (Nakao et al, Infect Immun, 2006) も見られるようになった。

ところが、*P. gingivalis* の表層蛋白質が糖修飾されているかについてはほとんど知られておらず、その糖修飾に関与する遺伝子も明らかではない。莢膜多糖やリポ多糖の糖鎖

合成に関連する遺伝子が、表層蛋白質の糖修飾に影響を及ぼしているのかも分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では、歯周病関連細菌のうち *P. gingivalis* の表層蛋白質の翻訳後修飾、特に糖鎖修飾に関して検討し、病原性との関連性を明らかにしたいと考えている。すなわち、*P. gingivalis* の表層蛋白質の中から、糖鎖で修飾された蛋白質を網羅的に検索し、同定する。その後、これらの主な糖蛋白質を分離・精製し、糖鎖構造を明らかにする。また、糖鎖修飾に関連した遺伝子をデータベースから検索し、これらの遺伝子の変異株を作製することにより、表層蛋白質の糖鎖修飾への影響を調べる。口腔細菌との共凝集能、バイオフィーム形成能、宿主細胞への付着能や動物に対する病原性を野生株と比較することによって、糖鎖修飾の生物学的意義を明らかにしたい。

蛋白質の翻訳後修飾は、特に真核生物においては高い頻度で生じ、その生物学的意義も徐々に解明されつつある。ところが、歯周病関連細菌 *P. gingivalis* においては、代表的なプロテアーゼの糖修飾の研究が行われているのみで、表層蛋白質がどの程度糖修飾されているのか網羅的に検討した例はまだない。この研究により歯周病関連細菌が菌体表層に持つ糖鎖に関するデータを蓄積することができると考えている。*P. gingivalis* はエネルギーの産生には糖を利用しないが、莢膜、リポ多糖では糖鎖構造を持つことが知られている。糖鎖修飾に関連した遺伝子を調べることにより、*P. gingivalis* において特殊に発達した代謝経路の解明につながるかもしれない。また、糖修飾が *P. gingivalis* の病原性に及ぼす影響を調べることにより、効果的な歯周病の予防や治療に繋がるワクチンの開発に結びつく可能性が考えられる。

3. 研究の方法

歯周病関連細菌のうち、特に *P. gingivalis* に注目した。嫌気培養した *P. gingivalis* 菌体から、表層蛋白質の分離・精製を行った。すなわち、フレンチプレスにより菌体を破碎して全菌体抽出液を得た後、超遠心による沈渣を外膜と内膜の両方を含んだエンベロップ画分として回収した。エンベロップ画分を界面活性剤によって処理し、内膜を選択的に溶解させた後、超遠心によって得られた沈渣を外膜画分として用いた。

まず、外膜画分を通常の SDS-PAGE により展

開した後、蛋白質染色、糖染色およびレクチン染色を行い、これらを比較して、糖修飾蛋白質を大まかに検索した。次に、二次元電気泳動による外膜画分の展開を行い、同様に蛋白質染色、糖染色およびレクチン染色との比較から糖修飾蛋白スポットを検出後、詳細に分析した。

糖修飾蛋白質のそれぞれについてゲル内トリプシン消化後に質量分析を行い、ゲノムプロジェクト等の結果から得られたデータベースを利用して、網羅的に蛋白質の同定を行った。

その後、特定の糖修飾蛋白質に絞って解析を進めた。まず、レクチンプロットによるレクチンの反応性を調べて、蛋白質に結合した糖鎖構造についての予備的な情報を得た。その情報を基にして、アフィニティーカラムクロマトグラフィあるいは電気泳動による分離・精製を行った。

糖鎖自体の構造を解明したとしても、それだけでは機能は明らかにならない。糖蛋白質の生物学的意義を追究するためには、各々の糖蛋白質が本来持っている機能を明らかにする必要があると考えられる。前述の方法により分離・同定した糖修飾蛋白質の性質をホモロジー検索等から推定し、機能を明らかにするための手掛かりを得た。その後、糖修飾蛋白質の分子間相互作用について検討を行った。

さらに、主な糖修飾蛋白質について、糖修飾蛋白質関連遺伝子変異株の作製を行った。変異株と親株との比較から、糖修飾蛋白質の有無が本菌の病原性の発現に及ぼす影響を調べた。

4. 研究成果

まず、*P. gingivalis* の外膜画分を調製し、糖蛋白質染色を行ったところ、約 50 kDa のバンドが強く染色された。このバンドが主要外膜蛋白質 RagB と同定できたため、同蛋白質を電気泳動により精製した。次いで、RagB を修飾している糖鎖の特異性をレクチン染色により検討した結果、RagB は ConA、WGA、LCA および PHA-E4 と反応したことから、マンノースや N-アセチルグルコサミンなどを含む糖鎖が結合していると考えられた。

主要外膜蛋白質 RagB はレセプター蛋白質 RagA とともに、発育増殖に必須な成分を能動輸送により菌体内に取り込むと考えられている。そこで、内膜から外膜レセプターへエネルギーを伝達する TonB に注目し、RagAB との

関連性を調べた。免疫沈降法により、TonB と RagAB の分子間相互作用が明らかになった。TonB 変異株では RagAB の発現量が減少していた。以上から、TonB は RagAB との相互作用によりエネルギーを伝達し、RagAB の発現調節にも関与している可能性が示唆された。

次に、*P. gingivalis* の全菌体抽出液を調製し、種々のレクチンアフィニティーカラムを用いて糖蛋白質の分離を試みたところ、WGA カラムにより効率的に糖蛋白質が濃縮できることが分かった。質量分析により同定を行った結果、OmpA 様蛋白質に属する主要外膜蛋白質 Pgm6/7 が主に含まれていた。

主要外膜蛋白質 Pgm6/7 の性質の一端を明らかにするために、菌体表層に存在する短線毛との関わりを検討した。ところが、この線毛を構成する Mfa1 および Mfa2 蛋白質との物理的な分子の接触は認められなかった。

主要外膜蛋白質 Pgm6/7 のその他の性質を明らかにするために、親株および OmpA 変異株から、ヘテロ三量体の Pgm6/7 とホモ三量体の Pgm6 および Pgm7 を WGA カラムによって分離・精製した。細胞外マトリックス分子との結合性を調べると、Pgm6/7 はフィブロネクチンやラミニンに強く結合したが、Pgm6 および Pgm7 では結合能が顕著に低下していた。OmpA 様蛋白質のヘテロ三量体構造が機能の発揮に重要であると考えられた。

さらに、*P. gingivalis* の菌体成分を二次元電気泳動によって展開し、糖鎖特異的染色を行った後、網羅的に糖修飾蛋白質スポットを解析した。その結果、主要外膜蛋白質 Pgm6/7 のほかに 3 種類の糖蛋白質が同定できた。これらの糖蛋白質の変異株を作製して、親株と比較したところ、自己凝集能、バイオフィーム形成能および酸化ストレス抵抗性が有意に低下していた。そのため、*P. gingivalis* の定着や生存に関与することが示唆された。

今後は、糖蛋白質の修飾糖鎖の構造や結合様式を検討するだけでなく、糖鎖修飾に関与する遺伝子群の解明も目指す予定である。申請時に目的の一つとしていた糖鎖修飾の生物学的意義を明らかにするためには、宿主細胞への付着・侵入能や動物に対する病原性を野生株と変異株で比較することも必要である。

ごく最近になって、*P. gingivalis* の菌体成分の Mfa1 短線毛が糖鎖修飾されていることが発表された (Zeituni et al, J Bacteriol, 2010)。これからさらに糖鎖修飾を含めた翻訳後修飾の研究が国内外で進展するものと

考えている。

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3件)

- ① 岸美和子, 長谷川義明, 村上幸孝, 中村洋, 吉村文信. *Porphyromonas gingivalis* の糖蛋白質の同定とそれらの欠失による自己凝集能の検討. *Bacterial Adherence & Biofilm*, 24巻, 2010, 57-63. 査読無.
- ② Hasegawa Y, Iwami J, Sato K, Park Y, Nishikawa K, Atsumi T, Moriguchi K, Murakami Y, Lamont RJ, Nakamura H, Ohno N, Yoshimura F. Anchoring and length regulation of *Porphyromonas gingivalis* Mfa1 fimbriae by the downstream gene product Mfa2. *Microbiology*. Vol. 155, 2009, 3333-3347. 査読有.
- ③ Yoshimura F, Murakami Y, Nishikawa K, Hasegawa Y, Kawaminami S. Surface components of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodont Res*, Vol. 44, 2009, 1-12. 査読有.

[学会発表] (計7件)

- ① 村上幸孝, 引頭毅, 長谷川義明, 猪俣恵. 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* の菌体に存在する OmpA 様糖蛋白質の分離と細胞外マトリックス分子との結合性. 第40回東海乳酸菌研究会研究報告会. 2011年2月5日. 中日パレス (名古屋市).
- ② 岸美和子, 長谷川義明, 村上幸孝, 中村洋, 吉村文信. *Porphyromonas gingivalis* の糖蛋白質の同定 一欠失株を用いたバイオフィルム形成能および酸化ストレス抵抗性の検討一. 愛知学院大学歯学会第77回学術大会. 2010年12月5日. 愛知学院大学 (名古屋市).
- ③ 村上幸孝, 吉村文信. 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* の OmpA 様糖蛋白質と菌体外マトリックス分子との結合性. 第52回歯科基礎医学会学術大会. 2010年9月22日. タワーホール船堀 (東京都).
- ④ 村上幸孝, 吉村文信. 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* の菌体に存在

する糖蛋白質の分離と同定. 第83回日本細菌学会総会. 2010年3月27日. パシフィコ横浜 (横浜市).

- ⑤ 村上幸孝, 吉村文信. *Porphyromonas gingivalis* 菌体に存在する糖蛋白質の分離. 第51回歯科基礎医学会学術大会. 2009年9月10日. 朱鷺メッセ (新潟市).
- ⑥ 村上幸孝, 吉村文信. 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* の外膜に存在する糖蛋白質の検出. 第82回日本細菌学会総会. 2009年3月12日. 国立京都国際会館 (京都市).
- ⑦ 村上幸孝, 佐藤啓子, 吉村文信. *Porphyromonas gingivalis* の主要外膜蛋白質 RagAB とエネルギー伝達を担う TonB との相互作用. 第50回歯科基礎医学会学術大会. 2008年9月25日. TOC 有明 (東京都).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 幸孝 (MURAKAMI YUKITAKA)
朝日大学・歯学部・教授
研究者番号: 60239506

(2) 研究分担者

吉村 文信 (YOSHIMURA FUMINOBU)
愛知学院大学・歯学部・教授
研究者番号: 50001962
(H22: 連携研究者)

長谷川 義明 (HASEGAWA YOSHIAKI)
朝日大学・歯学部・講師
研究者番号: 70460524
(H22: 連携研究者)