

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年4月25日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659332

研究課題名（和文）：歯周病原因子分泌機構の新奇二成分制御系とECFシグマ因子による二重制御

研究課題名（英文）：Dual regulation of secretion system of periodontal virulence factors by novel two-component system and ECF sigma factor

研究代表者

中山 浩次（NAKAYAMA KOJI）

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：80150473

研究成果の概要（和文）：

歯周病原性細菌 *P. gingivalis* における病原性プロテアーゼ・アドヘジン（付着因子）の膜輸送・分泌の調節機構の解明を目的として解析を行った。*P. gingivalis* の分泌・膜輸送に障害が起こると、病原性因子であるプロテアーゼや血球凝集素など付着因子が分泌されなくなる。このような表現型を示す遺伝子変異株12個のうち、2個は二成分制御系をコードする遺伝子の変異株と考えられた。二成分制御系は細菌における環境センシングとそれに基づく代謝の制御を行なう機構であり、環境状態を認識するセンサーキナーゼと下流のイベントを調節するレスポンスレギュレーターで構成される。本研究では、遺伝子 *porX* と *porY* について、組換えタンパク質を作製し、機能を調べたところ、PorY は自己リン酸化を起こし、PorY 上のリン酸基は時間依存性に PorX に転移されることがわかった。PorY と PorX の相互作用は BIA-CORE 生体分子相互作用解析装置によっても確認され、両者が二成分制御系を構成することが示された。さらに外界に反応して転写を調節する ECF (Extracytoplasmic function) σ 因子と考えられる PGN0274 遺伝子変異株も、これら分泌装置遺伝子の転写が起らず、プロテアーゼ・アドヘジンの分泌障害を示すことがわかった。しかし、PorX-Y システムと PGN0274 は独立した経路に位置することが示唆された。このことは、本菌の病原性因子分泌機構が、多重制御を受けて、巧みに調節されていることを示している。

研究成果の概要（英文）：

We investigated regulatory mechanism of secretion system of pathogenic proteases/adhesins of the periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis*. Secretion of *P. gingivalis* gingipain proteases/adhesins depends on a protein secretion system, Por secretion system (PorSS). We isolated 12 gingipain secretion-deficient mutants and found that two of them were deficient in a two-component system, which is a prokaryotic signaling system and consists of the sensor histidine kinase PorY and response regulator PorX. In this study, we constructed recombinant PorY and PorX proteins and found that PorY was autophosphorylated and the phosphoryl residue of PorY was transferred to PorX. PorY could bind to PorX as revealed by Surface plasmon resonance (BIACORE) analysis. Gene expression of component proteins of the PorSS was also regulated by one of ECF sigma factors, PGN0274, but the PorY-PorX system and the PGN0274 sigma factor independently regulate gene expression of component proteins of the PorSS, suggesting that the PorSS is regulated by multiple regulatory mechanisms.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| 2010年度 | 2,100,000 | 0 | 2,100,000 |
| 2011年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 2,900,000 | 240,000 | 3,140,000 |

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：遺伝子、発現調節、二成分制御系、シグマ因子、歯周病

1. 研究開始当初の背景

すべての生物はさまざまな環境の変化に曝されながら生きている。それらの環境変化に適応するためのシステムを備え、恒常性を維持しようとしている。二成分制御系は、多くの原核生物・菌類・植物などに広く存在するシグナル伝達経路であり、特に細菌では環境変化に応答するための重要な経路となっている。二成分制御系は、一般に、外界の状態を感知するヒスチジンキナーゼ（HK）と、HK からシグナルを受け取り下流イベントの調節を行なうレスポンスレギュレーター（RR）からなる。*Porphyromonas gingivalis* は、偏性嫌気性グラム陰性細菌であり、慢性歯周炎の最も重要な原因菌のひとつである。*P. gingivalis* の病原性因子としてはLPS、プロテアーゼ、線毛などが知られているが、なかでもプロテアーゼは歯周組織の直接的な破壊と生体防御系の傷害を引き起こし、病態の発症と進行に密接に関与すると考えられている。また、*P. gingivalis* のプロテアーゼ遺伝子は 3' 側に、別の病原性因子であるアドヘジンをコードしており、転写・翻訳された後、それぞれの機能分子へとプロセッシングされる。このアドヘジン自身も血球凝集能、ヘモグロビン結合能を持ち、動脈硬化症などの全身性疾患との関連が指摘されている。したがって、このプロテアーゼ・アドヘジンの膜輸送・分泌機構については学術的にも医学的にも関心が高いにもかかわらず、詳細は解明されていなかった。

2. 研究の目的

最近、我々は、*P. gingivalis* のプロテアーゼ・アドヘジン分泌に異常を示すいくつかの変異株を得た。これらのうち2つは、それぞ

れ二成分制御系の HK および RR と相同性を示す遺伝子の変異によるものであることを見出した。すなわち、*P. gingivalis* は、二成分制御系によって外界の環境因子を感知し、病原性因子の輸送・分泌を調節していると考えられる。よって、本研究は、HK (PorY) と RR (PorX) を中心に、これらがどのような機構でプロテアーゼ・アドヘジン病原性因子の膜輸送・分泌を調節の解明を目的としている。HK (PorY) あるいは RR (PorX) と協同して作用する因子についても網羅的に検索し、機能解明を試みる。さらに、どのような環境刺激に応答して、*P. gingivalis* が病原性プロテアーゼ・アドヘジンの分泌を上昇させるのかを解析する。この分泌調節に与る PorX は一般的なレスポンスレギュレーターとは全く異なった特異的な構造を有することが示唆されている。すなわち、分泌調節機構も他の生物で報告されているような既存の様式ではなく、新規の経路である可能性が高い。したがって本研究によってもたらされる成果は、口腔細菌領域にとどまらず細菌学全般においても、学術的な意義が大きい。また、トランスレーショナルリサーチとして、病原性因子の分泌を制御する方法について探索し、歯周病や関連全身疾患への予防・治療法への応用へと繋げたい。

3. 研究の方法

1) 二成分制御系構成因子PorXとPorYの解析～in vitro解析系～

① 二成分制御系としての機能の検討

PorX と PorY が二成分制御系を構成する因子なのか、それぞれのリコンビナントタンパク質を大腸菌に発現させて精製し、

a. 両タンパク質の相互作用を BIA-CORE

生体分子間相互作用解析装置を用いて調べた。また、

- b. 実際にリン酸基の授受が行なわれるかどうか、*in vitro*での $[^{32}\text{P}\text{-}\gamma]\text{ATP}$ を用いたリン酸化実験を行なった。

② **PorX—PorY 相互作用の特異性検討** *P. gingivalis* (遺伝子数 2090) においては 6 つのヒスチジキナーゼセンサータンパク遺伝子と 8 つのレスポンスレギュレータータンパク遺伝子の存在が示唆されている。*porY* および *porX* 遺伝子はオペロン構造をとらず、孤立遺伝子あることから、PorY—PorX タンパク質相互作用の特異性を、他の HK あるいは RR と組み合わせて実験することにより解析した。具体的には、線毛タンパク質の発現調節に関わるタンパク質である FimS/FimR リコンビナントタンパク質を用いて、FimS—PorX と PorY—FimR によるリン酸基の授受について調べた。

2) プロテアーゼ・アドヘジンの分泌制御に関わる因子の探索～*in vivo*解析系～

① 第 3、第 4 の因子の同定

先に述べたようにPorXはレスポンスレギュレーターでありながら、DNA結合能はなく、一般的なレギュレーターとは構造的にも機能的にも一線を画している。しかしながら、*porX*変異株ではPorTやプロテアーゼ・アドヘジン輸送分子の転写が変化していることから、PorXが何らかの別の因子を介してそれらの調節を行なっている可能性が高い。そこで、PorXと相互作用する因子を、共沈降法と質量分析を組み合わせた方法によって同定した。共沈は、④抗PorX抗体を用いた免疫沈降法、⑤PorXにタグをつけ、タグに親和性を示す物質による沈降法により行った。

② PorX と σ 因子との相互作用解析

porX の変異株では、病原性プロテアーゼ

の分泌が有意に低下するが、これと同じ表現型を示す ECF (extracellular function) σ 因子の変異株を見出した。そこで、本研究では、PorX とこの ECF σ 因子との関係を調べた。*porX* 変異株と ECF σ 因子変異株の遺伝子発現の違いを網羅的に tiling array によって解析した。そして、PorX と ECF σ 因子の直接作用について、共沈実験を行った。

また、*porX* と ECF σ 因子の二重変異株を作製して、それぞれ単独変異株の性状と比較した。

3) PorYセンサータンパク質の活性化機構の解明

PorYタンパク質はORFのアミノ酸配列より、N末端側に膜貫通ドメインをもち、ペリプラスム領域部分で外界の何らかの因子を感知して、自己リン酸化を起こしていると考えられる。そこで、PorY—PorX システムによって転写調節を受けている遺伝子 *porT* のプロモーター領域に β -galactosidase 遺伝子を融合させた *P. gingivalis* 株を作製し、種々の条件下での galactosidase 活性を測ることによって、本システムの認識因子について、レポーターアッセイを行った。

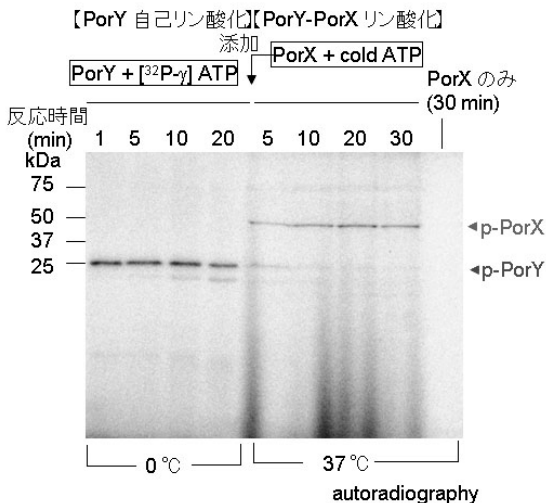
4. 研究成果

我々はこれまでに歯周病原性細菌 *P. gingivalis* の病原性因子分泌にかかわる 12 個のタンパク質を同定し、これらのうち二成分制御システムのタンパク質と考えられる 2 つ (PorX) について解析を行った。*porX* あるいは *porY* の欠損変異株では、定量的PCR解析によりジンジパインの mRNA レベルは上昇するものの成熟タンパク質は菌体外に分泌されず、細胞質に不活性型分子として蓄積していた。これに反して、分泌装置構成タンパク質の mRNA は有意に減少し、転写抑制されていた。組換え型 PorY タンパク質は自己リン酸

化し、そのリン酸基はPorYからPorXに転移された。PorYとPorXの相互作用はBIA-CORE表面プラズモン生体分子相互作用解析装置によっても確認され、両者が相互作用することが示された。

PorY-PorXリン酸化の特異性を調べる目的で、線毛形成にかかわるHKであるFimSとPorXの相互作用を調べた。ATP存在下で自己リン酸化したリコンビナントFimSのリン酸基はPorXには転移しなかった。さらに詳細な検討が必要であるが、PorY-PorXの相互作用は、ある程度、特異性を持ったリン酸化反応であると考えられる。

図4. PorYの自己リン酸化とPorXリン酸化



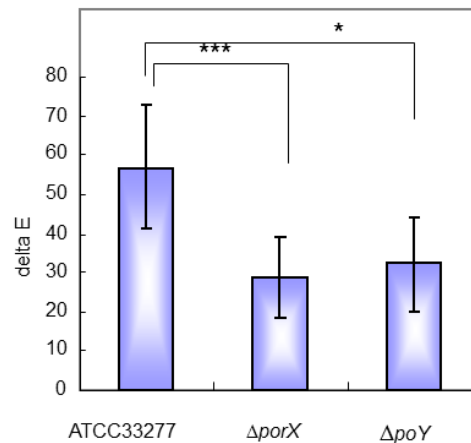
大多数のRRはそのC末端領域にDNA結合ドメインを有し、調節を受ける遺伝子上流に結合して転写を制御する。しかし、PorXにはDNA結合モチーフがなく、実際にリコンビナントPorXは、ゲルシフト法によっても分泌装置タンパク質遺伝子群プロモーター領域に結合しなかった。

PorXはC末端部分にDNA結合モチーフの代わりにPglZドメインを有している。PglZドメインは、アルカリフォスファターゼ族に分類される構造である。PorXについて、アルカリフォスファターゼ活性の有無を調べてみ

ると、基質にpNPPを用いても、CDP starTMを用いても弱い活性を示した。このホスファターゼ活性が直接または間接的に遺伝子調節にかかわるかどうかはいまのところ不明である。

PorXと作用する第3の因子が存在するとすれば、それがアルカリフォスファターゼ様活性の基質となる可能性がある。PorXに対する免疫沈降法およびPorX-Halo tag融合タンパク質との共沈法により、この第3の因子について探索を行い、候補分子がとれているので、現在、解析を進めている。

Phosphatase activity on CDP star



二成分制御系とともに外界に反応して遺伝子転写を調節するECF σ因子の一つであるPGN0274遺伝子変異株においても、Por分泌装置遺伝子の転写が抑制され、ジンジパイン分泌障害を示すことがわかった。しかしながらTiling arrayによって網羅的に遺伝子発現を調べたところ、調節を受ける遺伝子群はporX変異株とは完全には一致しなかった。また、共沈実験によると、タンパク質レベルでのPorXとPGN0274の直接的相互作用も確認できなかった。PorYとPGN0274遺伝子あるいはPorXとPGN0274遺伝子の二重変異株では、相加的にPor分泌装置タンパク質の転写が抑制されたことから、これらは別の経路として存在し、本菌の病原因子分泌を巧みに調

節していることを示唆している。

*porT*プロモーター領域に β -galactosidase 遺伝子を融合させたレポーターアッセイによつては、種々の条件（酸化状態、アミノ酸の存在、ジペプチドの添加など）での活性測定を行っているが、劇的にその活性が変化する外的因子は、今のところ、まだ見つからない。

以上のように、本研究において、PorY-PorX が、二成分制御系として機能すること、その機能は、Por分泌装置の遺伝子転写を制御すること、Por分泌装置の遺伝子転写には、PorY-PorXシステムだけでなく、ECF σ 因子も関与していることが明らかとなった。

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 13 件)

1. Sato K, Naito M, Yukitake H, Hirakawa H, Shoji M, McBride MJ, Rhodes RG, and Nakayama K: A protein secretion system linked to bacteroidete gliding motility and pathogenesis. **Proc Natl Acad Sci USA**, 107:276-281 (2010)
2. Ishii K, Hamamoto H, Imamura K, Adachi T, Shoji M, Nakayama K, and Sekimizu K.: *Porphyromonas gingivalis* peptidoglycans induce excessive activation of the innate immune system in silkworm larvae. **J Biol Chem**, 285:33338-33347 (2010)
3. Yamaguchi M, Sato K, Yukitake H, Noiri Y, Ebisu S, and Nakayama K: *Porphyromonas gingivalis* mutant defective in a putative glycosyltransferase exhibits defective biosynthesis of polysaccharide portions of lipopolysaccharide, decreased gingipain activities, strong autoaggregation and increased biofilm formation. **Infect Immun** 78:3801-3812 (2010)
4. Kondo Y, Ohara N, Sato K, Yoshimura M, Yukitake H, Naito M, Fujiwara T, and Nakayama K: Tetratricopeptide repeat protein-associated proteins contribute to the virulence of *Porphyromonas gingivalis*. **Infect Immun** 78:2846-2856 (2010)
5. Shoji M, Shibata Y, Shiroza T, Yukitake H, Peng B, Chen Y-Y, Sato K, Naito M, Abiko Y, Reynolds EC, and Nakayama K: Characterization of hemin-binding protein 35 (HBP35) in *Porphyromonas gingivalis*: its cellular distribution, thioredoxin activity and role in heme utilization. **BMC Microbiol** 10:152 (online journal) (2010)
6. Nhien NT, Huy NT, Naito M, Oida T, Uyen DT, Huang M, Kikuchi M, Harada S, Nakayama K, Hirayama K, and Kamei K: Neutralization of toxic haem by *Porphyromonas gingivalis* haemoglobin receptor. **J Biochem**. 147:317-325 (2010)
7. Shoji M, Yoshimura A, Yoshioka H, Takade A, Takuma Y, Yukitake H, Naito M, Hara Y, Yoshida S, and Nakayama K: Recombinant *Porphyromonas gingivalis* FimA preproprotein expressed in *Escherichia coli* is lipidated and a mature/processed recombinant FimA protein forms a short filament in vitro. **Can J Microbiol**, 56:959-967 (2010)
8. Ito R, Ishihara K, Shoji M, Nakayama K, and Okuda K.: Hemmagglutinin/adhesion domains of *Porphyromonas gingivalis* play key roles in coaggregation with *Treponema denticola*. **FEMS Immunol Med Microbiol**, 60:251-260 (2010)
9. Nakayama K: *Porphyromonas gingivalis* cell-induced hemagglutination and platelet aggregation. **Periodontol** 2000 54:45-52 (2010)
10. Shoji M, Sato K, Yukitake H, Kondo Y, Narita Y, Kadowaki T, Naito M, and Nakayama K: Por secretion system-dependent secretion and glycosylation of *Porphyromonas gingivalis* hemin-binding protein 35. **PLoS One**, 6: e21372 (2011)
11. Naito M, Sato K, Shoji M, Yukitake H, Ogura Y, Hayashi T and Nakayama K: Characterisation of the *Porphyromonas gingivalis* conjugative transposon CTnPg1: determination of the integration site and the genes essential for conjugal transfer. **Microbiology-SGM**, 157: 2022-2032 (2011)
12. Yukitake H, Naito M, Sato K, Shoji M, Ohara N, Yoshimura M, Sakai E and Nakayama K: Effects of non-iron metalloporphyrins on growth and gene expression of *Porphyromonas gingivalis*. **Microbiol Immunol**, 55: 141-153 (2011)
13. Sakai E, Shimada-Sugawara M, Nishishita K, Fukuma Y, Naito M, Okamoto K, Nakayama K, Tsukuba T: Suppression of RANKL-dependent heme oxygenase-1 is required for high mobility group box 1 release and osteoclastogenesis. **J Cell Biochem**, 113: 486-498 (2012)

[学会発表] (計 3 件)

1. Nakayama K: A novel protein secretion system, Por secretion system in periodontal pathogens. (招待講演) International Union of Microbiological Societies 2011 Congress in Sapporo, 2011
2. Nakayama K: Genome analysis and a novel secretion system of the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*. (招待講演), 日本学術振興会・中国国家自然科学基金委員会主催第3回日中科学フォーラム (武漢, 中国), 2010年

3. 中山浩次:比較ゲノム解析から発見された
グラム陰性細菌の新規タンパク分泌機構
(招待講演), **第4回日本ゲノム微生物学会
年会**(福岡), 2010年

[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1件)

名称:口腔細菌の迅速検出法
発明者:吉村満美子、中山浩次、大原直也、
竹原直道、吉田明弘
権利者:国立大学法人 長崎大学
種類:特許
番号:特許4792585号
取得年月日:23年8月5日
国内外の別:国内

[その他]

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

中山 浩次 (NAKAYAMA KOJI)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号:80150473

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者

筑波(門脇) 知子 (TSUKUBA (KADOWAKI)
TOMOKO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号:70336080

内藤 真理子 (NAITO MARIKO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授
研究者番号:20244072

庄子 幹郎 (SHOJI MIKIO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号:10336175

佐藤 啓子 (SATO KEIKO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号:70410579

雪竹 英治 (YUKITAKE HIDEHARU)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・
技術職員
研究者番号:30380984