

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：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293375

研究課題名(和文)細菌の新しい病原タンパク質分泌システムの超分子構造とメカニズム

研究課題名(英文) Supermolecule structure and mechanism of a novel bacterial protein secretion system, type IX secretion system

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) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：私たちは新しい分泌機構(Por分泌機構、IX型分泌機構(T9SS))を歯周病細菌ポルフィロモナス・ジンジバリスにて発見している。本菌の膜画分にPorKおよびPorNからなるリング状構造物を発見した。また、タネレラ・フォーサイシア、プレボテラ・インターメディアおよびカプトサイトファーガ・オクラーケアにもT9SSが機能していることがわかった。T9SSと関係のある滑走運動についてラセンループトラックモデルを提案した。

研究成果の概要(英文)：We found a novel secretion system, Por secretion system in the periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis, which is now called the type IX secretion system (T9SS). We found a ring-shaped structure consisting of PorK and PorN in the membrane fraction of P. gingivalis. We found with mutant study that Tannerella forsythia, Prevotella intermedia and Capnocytophaga ochracea have functional T9SSs. T9SSs are not limited to the oral bacteria but extend to other bacteria belonging to the phylum Bacteroidetes such as Flavobacterium johnsoniae and Cytophaga hutchinsonii known as gliding bacteria. Gliding motility of the bacteria is tightly associated with T9SS. We propose a helical loop track model for gliding motility of Bacteroidetes phylum bacteria.

研究分野：口腔病原微生物学

キーワード：歯周病 タンパク分泌 細菌

1. 研究開始当初の背景

病原細菌の病原因子のなかで外毒素やエフェクター分子などの分泌性タンパク質因子は生体細胞への直接的作用においてもっとも重要な病原因子の1つである。外毒素の多くはI型またはII型分泌システムを使って、エフェクター分子はIII型またはIV型分泌システムを使って菌体外に分泌される。2011年の欧州における腸管出血性大腸菌(EHEC)集団感染では溶血性尿毒症症候群で30人が死亡したが、本疾患の本体はEHECのIII型分泌システムによって分泌される志賀様毒素である。このことからわかるように病原細菌学において病原タンパク質の分泌システムは多くの研究者が研究対象として取り組んでいる重要な研究分野であるとともに、分泌システムを標的とする化合物が新しいタイプの抗菌薬として注目されつつある。

慢性歯周炎は45歳以上の日本人の半数以上が罹患している慢性感染症であり、歯の喪失の最大の原因である。数多くの研究から偏性嫌気性グラム陰性細菌 *P. gingivalis* が慢性歯周炎のもっとも重要な原因細菌の1つと考えられている。*P. gingivalis* の歯周病原因子としてはLPS、線毛、プロテアーゼ等が知られているが、中でも本菌の分泌性プロテアーゼ活性の大部分を占めるジンジパインプロテアーゼ (Rgp と Kgp プロテアーゼ) は間質破壊や歯周ポケット形成を引き起こす直接的な間質タンパク質分解活性があるばかりか、内在性のマトリックス・メタロプロテアーゼ産生刺激や活性化を引き起こすことによる間接的な間質タンパク質分解性があることが知られている。また、各種のサイトカイン分解活性、好中球レセプターの破壊、補体系の活性化あるいは分解など生体防御反応を不全化する能力がある。さらにはX因子やプロトロンビンの活性化、カリクレイン・キニン系活性化、フィブリン・フィブリノーゲン分解活性があり、血液凝固反応誘導、血管透過性亢進、易出血性などを引き起こす本菌のきわめて重要な病原因子である。

ジンジパイン遺伝子群のコードするタンパク質の機能については多くの知見が得られている一方、ジンジパインタンパク質の菌体外への分泌システムはほとんど解明されていない。私たちはジンジパインの菌体

外への分泌システムに異常を示す変異株をトランスポゾン変異導入を用いて分離し、その変異遺伝子 *porT* を同定した。一般的に *P. gingivalis* 遺伝子に類似性のある homolog は近縁種である *Bacteroides* 属菌に見つかるが、*porT* 遺伝子については *Bacteroides* 属菌にはその homolog が存在せず、Phylum *Bacteroidetes* 中の少し離れた菌種である *Cytophaga hutchinsonii* や *Flavobacterium johnsoniae* に見つかる。そこで *P. gingivalis* の遺伝子で *C. hutchinsonii* には homolog が存在するが、*Bacteroides thetaiotaomicron* には homolog が無いものとして56遺伝子を同定した。それらの遺伝子の変異株を作製したところ、12遺伝子の変異株がジンジパインの分泌システムに異常を示した。

そのなかに *C. hutchinsonii* や *F. johnsoniae* の滑走運動に関する遺伝子群のホモログが含まれていた。*F. johnsoniae* の *porT* homolog の変異株を作製したところ、その変異株は滑走運動に異常を示した。同定されたジンジパイン分泌システムに関与するタンパク質はいままで報告のある分泌システムの構成タンパク質とは類似性がなく、新規のタンパク質分泌システムを構成するものであり、Por分泌システムと命名した。その後、Por分泌システムはIX型分泌システム(T9SS)と改名された。

このT9SSに関与する遺伝子群は他の歯周病原細菌の *Tannerella forsythia* や *Prevotella intermedia*、犬・猫の咬傷から感染する高死亡率の感染症の病原菌 *Capnocytophaga canimorsus* などにも存在することがゲノム情報から明らかであり、*P. gingivalis* を始めこれらの病原細菌の制圧にこの新規のタンパク質分泌システムを標的とする戦略が考えられた。

P. gingivalis の外膜にはジンジパインプロタンパク質のC末端側の80アミノ酸とアミノ酸配列上で類似性がみられるC末端側を有するタンパク質群があり、CTD family とよばれる。Seersらは34個のCTD含有タンパク質をゲノム情報より予想し、そのうち18個については外膜タンパク質画分に存在することを明らかにした。私たちはCTD含有のいくつかのタンパク質(HBP35, TapA)が実際にT9SSを使って外膜へ輸送されることを明らかにした。シグナル配

列下に GFP を融合し、さらにその下流に様々な CTD を融合したタンパク質を本菌内で発現させ、菌体表面への輸送を調べたところ CTD 融合 GFP 全てで PorT 依存性の輸送がみとめられた。これらの結果より、CTD は T9SS にて外膜へ輸送される際の輸送シグナルであることが示唆された。

2. 研究の目的

- (1) *P. gingivalis* の T9SS の構成タンパク質 (PorK, PorL, PorM, PorN, PorP, PorQ, Sov, PorT, PorU, PorV および PorW) の存在位置をスクロース密度勾配遠心法にて明らかにする。また、T9SS 超分子を菌体より分離して電子顕微鏡を用いてその超分子構造を明らかにするとともにそれぞれの構成タンパク質分子の構造を X 線結晶構造解析にて決定する。
- (2) GST 融合タンパク質や抗体を用いた共沈降実験を行い、すでに同定した T9SS 構成タンパク質と結合性のあるタンパク質を明らかにする。
- (3) *P. gingivalis* の新たな T9SS 依存性分泌タンパク質を同定し、病原性を明らかにする。
- (4) *F. johnsoniae* の T9SS と滑走運動との関連を分子遺伝学的研究にて明らかにする。さらに菌体表面から精製したタンパク質複合体の形態を電子顕微鏡を用いた解析により明らかにする。
- (5) PorU タンパク質を精製し、プロテアーゼ活性を調べ、その阻害剤を発見する。
- (6) 他の歯周病原細菌である *T. forsythia* や *P. intermedia* の T9SS 依存性分泌タンパク質を同定し、これらの細菌の病原性への T9SS の関与を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) *P. gingivalis* の T9SS 構成タンパク質 (PorK, PorL, PorM, PorN, PorP, Sov, PorV, PorQ, PorT および PorU) の存在位置を明らかにするためスクロース密度勾配超遠心を行う。また、それぞれの構成タンパク質を精製し、X 線結晶構造解析を行う。
- (2) *P. gingivalis* の T9SS 構成タンパク質間の相互作用を解析する。
- (3) *P. gingivalis* T9SS を利用して分泌されるタンパク質の網羅的な同定と個々の分泌タンパク質の解析を行う。

(4) *F. johnsoniae* の T9SS と滑走運動との関連についてタンパク質複合体の精製標品の電子顕微鏡を用いた解析や野生株および変異株の蛍光タイムラプス顕微鏡を用いた解析を行う。

(5) PorU タンパク質の精製、プロテアーゼ活性測定および阻害剤の検討を行う。

(6) 他の歯周病原細菌である *T. forsythia* や *P. intermedia* での T9SS ホモログタンパク質欠損株の作製と T9SS 依存性分泌タンパク質の同定を行う。

4. 研究成果

(1) メルボルン大学の Eric Reynolds 教授との共同研究にて porK/N のリング状構造を明らかにした (投稿中)。

(2) *P. gingivalis* T9SS によって分泌されるタンパク質のうち PGN_0123 について 1.4 Å の分解能で構造を解析した。興味深いことに PGN_0123 の欠損株は PorT などの T9SS 成分タンパク質の欠損株と同様な形質を示した。また、PGN_0123 欠損株からは抑制変異株を分離することができた。この抑制変異株のゲノム配列を決定したところ、porY 遺伝子にアミノ酸置換を伴う塩基置換が生じていた。新たに複数の抑制変異株を分離し、porY 領域の塩基配列を決定したところ、部位は異なるもののすべてアミノ酸置換を伴う塩基置換が生じていた。このことから PGN_0123 分泌タンパク質は調節に関係したタンパク質であることが示唆された。

(3) *T. forsythia*、*P. intermedia* および *Capnocytophaga ochracea* の PorK ホモログなどの変異株を作製したところ、黒色集落形成や滑走運動が不能であった。このことから他の bacteroidetes 門細菌においても T9SS が機能していることがわかった。

(4) T9SS 成分タンパク質の多くが遺伝子発現において二成分制御系と ECF シグマ因子 (PorY-PorX-SigP) が直列して制御していることがわかった。

(5) Bacteroidetes 門細菌の滑走運動について表面タンパク質 SprB に対する蛍光標識ラベルした抗体で生細菌を染めることで SprB が菌体表面をラセン状に移動していることがわかった。また、菌体表面タンパクをラベルすることで本菌が回転しながら前進することがわかった。詳細に SprB の運動を検討

した結果、SprB が固体表面に結合しながら菌体表面をラセン状に移動することで菌体が回転しながら前進運動を行うことが示唆された。

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9件)

Xu Q, Shoji M, Shibata S, Naito M, Sato K, Elsliger MA, Grant JC, Axelrod HL, Chiu HJ, Farr CL, Jaroszewski L, Knuth MW, Deacon AM, Godzik A, Lesley SA, Curtis MA, Nakayama K, Wilson IA. A Distinct Type of Pilus from the Human Microbiome. *Cell*. 2016 Apr

21;165(3):690-703. doi:

10.1016/j.cell.2016.03.016. 査読有

Kadowaki T, Yukitake H, Naito M, Sato K, Kikuchi Y, Kondo Y, Shoji M,

Nakayama K. A two-component system regulates gene expression of the type IX secretion component proteins via an ECF sigma factor. *Sci Rep*. 2016 Mar 21;6:23288. doi: 10.1038/srep23288.

査読有

Naito M, Ogura Y, Itoh T, Shoji M, Okamoto M, Hayashi T, Nakayama K. The complete genome sequencing of *Prevotella intermedia* strain OMA14 and a subsequent fine-scale, intra-species genomic comparison reveal an unusual amplification of conjugative and mobile transposons and identify a novel

Prevotella-lineage-specific repeat. *DNA Res*. 2016 Feb;23(1):11-9. doi:

10.1093/dnares/dsv032. 査読有

Kita D, Shibata S, Kikuchi Y, Kokubu E, Nakayama K, Saito A, Ishihara K.

Involvement of the Type IX Secretion System in *Capnocytophaga ochracea* Gliding Motility and Biofilm Formation.

Appl Environ Microbiol. 2016 Jan 4;82(6):1756-66. doi:

10.1128/AEM.03452-15. 査読有

Taguchi Y, Sato K, Yukitake H, Inoue T, Nakayama M, Naito M, Kondo Y, Kano K,

Hoshino T, Nakayama K, Takashiba S, Ohara N. Involvement of an Skp-Like Protein, PGN_0300, in the Type IX Secretion System of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 2015 Oct 26;84(1):230-40. doi:

10.1128/IAI.01308-15. 査読有

Nakayama K. *Porphyromonas gingivalis* and related bacteria: from colonial pigmentation to the type IX secretion system and gliding motility. *J Periodontol Res*. 2015 Feb;50(1):1-8.

doi: 10.1111/jre.12255. Review. 査読有

Narita Y, Sato K, Yukitake H, Shoji M, Nakane D, Nagano K, Yoshimura F, Naito M, Nakayama K. Lack of a surface layer in *Tannerella forsythia* mutants deficient in the type IX secretion system. *Microbiology-SGM*. 2014

Oct;160(Pt 10):2295-303. doi:

10.1099/mic.0.080192-0. 査読有

Nonaka M, Shoji M, Kadowaki T, Sato K, Yukitake H, Naito M, Nakayama K.

Analysis of a Lys-specific serine endopeptidase secreted via the type IX secretion system in *Porphyromonas gingivalis*. *FEMS Microbiol Lett*.

2014 May;354(1):60-8. doi:

10.1111/1574-6968.12426. 査読有

Nakane D, Sato K, Wada H, McBride MJ, Nakayama K. Helical flow of surface protein required for bacterial gliding motility. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

2013 Jul 2;110(27):11145-50. doi:

10.1073/pnas.1219753110. 査読有

[学会発表](計8件)

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

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29-30日, 東京歯科大学(千代田区)

佐藤啓子, 雪竹英治, 庄子幹郎, 内藤真理子, 中山浩次: バクテロイデーテス細

菌の IX 型分泌装置, 第 88 回日本細菌学会総会, 2015 年 3 月 26-28 日, 長良川国際会議場 (岐阜市)

雪竹英治, 佐藤啓子, 近藤好夫, 庄子幹郎, 内藤真理子, 中山浩次: *Porphyromonas gingivalis* 9 型分泌機構の輸送に關与する CTD タンパク質の解析, 第 88 回日本細菌学会総会, 2015 年 3 月 26-28 日, , 長良川国際会議場 (岐阜市) 柴田敏史, 中山浩次: 滑走細菌 *Flavobacterium johnsoniae* のレール状滑走装置, 第 88 回日本細菌学会総会, 2015 年 3 月 26-28 日, 長良川国際会議場 (岐阜市)

喜田大智, 柴田敏史, 菊池有一郎, 国分栄仁, 柴山和子, 藤瀬和隆, 中山浩次, 齋藤淳, 石原和幸: *Capnocytophaga ochracea* のバイオフィルム形成への IX 型分泌機構の關与, 第 88 回日本細菌学会総会, 2015 年 3 月 26-28 日, 長良川国際会議場 (岐阜市)

内藤真理子, 中山浩次: *Prevotella intermedia* における菌株間のゲノム比較, 第 57 回歯科基礎医学会学術大会, 2015 年 9 月 11-13 日, 朱鷺メッセ (新潟市) 門脇知子, 雪竹英治, 佐藤啓子, 庄子幹郎, 内藤真理子, 中山浩次: 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* における病原性プロテアーゼ分泌の調節メカニズム, 第 38 回日本分子生物学会・第 88 回日本生化学会合同大会, 2015 年 12 月 1-4 日, 神戸ポートアイランド (神戸市)

〔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

今田 勝巳 (IMADA, Katsumi)

大阪大学・理学研究科・教授

研究者番号: 40346143

(3) 連携研究者

内藤 真理子 (NAITO, Mariko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・
准教授

研究者番号: 20244072

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

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

雪竹 英治 (YUKITAKE, Hideharu)

長崎大学・医歯薬学総合研究科 (歯学系)・
技術職員

研究者番号: 30380984