

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：17701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20365

研究課題名(和文) A.actinomycetemcomitans表層タンパクの同定及び病原性解析

研究課題名(英文) Identification and virulence analysis of surface proteins in Aggregatibacter actinomycetemcomitans

研究代表者

大貝 悠一(Oogai, Yuichi)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：40511259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病原菌 Aggregatibacter actinomycetemcomitansの表層タンパクの病原性解析を行った。本研究ではトリプシンを菌体表層に作用させることにより、菌体表層に突出したタンパクの同定を試みた。その結果、既知の病原性外膜タンパクOmp100, EmaAを含む数種の表層タンパクが同定された。しかしながら、同定されたタンパクの多くはリボソームタンパクや酵素などの細胞質タンパクであった。これらの一部は、トリプシン処理により傷害を受けた死菌由来であることが考えられた。今後は、菌体表層に特異的な因子を解析する方法を確立し、本菌の病原性に強く関連する因子を同定する。

研究成果の概要(英文)：In this study, we tried virulence analysis of surface proteins on periodontal pathogen Aggregatibacter actinomycetemcomitans. To analysis the exposed proteins on outer membrane, trypsin shaving was performed. As the results, several surface proteins including previously known virulence factors Omp100 and EmaA were identified. However, many of the identified proteins were intracellular located proteins such as the ribosomal proteins, chaperons and enzymes. These results indicate some of the identified intracellular proteins are derivative from killed bacteria by trypsin treatment. Improved protocol is needed to systematic identification of surface proteins in this microbe.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：歯周病原菌 表層タンパク

1. 研究開始当初の背景

歯周病原菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* は若年性歯周炎、成人慢性歯周炎などの起炎菌の一つである。本菌の病原性因子の解析はロイコトキシン、細胞致死膨化毒素、線毛などについて数多く行われている。これらの病原性因子に加え、菌体表層に局在する外膜タンパクにおいても病原性が知られており、Omp100 や EmaA などが宿主細胞への付着や、宿主免疫力に対する回避因子として機能していることが明らかとなっている。

菌体表層には外膜タンパク以外の因子も存在し、その中では病原性を有する因子も報告されている。歯周病原菌においては *A. actinomycetemcomitans* のロイコトキシンは菌体の表層に核酸を介して結合すること、*Porphyromonas gingivalis* のプロテアーゼであるジンジパインは複数のタンパク、リポ多糖と複合体を形成し表層に局在すること等が報告されている。菌体表層のジンジパインは赤血球凝集能、細胞マトリックスへの付着性が報告されている。また、菌体表層成分の中にはレクチン様タンパクの存在も多数報告されており、宿主細胞への結合性、細菌共凝集因子としても知られている。

以上のことから、歯周病原菌 *A. actinomycetemcomitans* の表層に局在するタンパクにおいて病原性を示す未知のタンパクが存在する可能性は高いと考えられ、その病原性の理解は本菌の病原性、ひいては歯周病発症のメカニズムを解明するにあたって重要であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、歯周病原菌 *A. actinomycetemcomitans* の表層タンパクを網羅的に解析し、本菌の新規病原性因子を同定することを目的とする。

菌体表層のタンパクの同定方法としては、相同性検索や超遠心処理による膜タンパク画分の回収方法などがあり、同定されたものの一部は菌体表層に局在し、病原性や強い抗原性を示すことが報告されてきた。しかしながら、多くの表層タンパクがこれらの方法では見逃されていることが示唆されている。

表層に局在する外膜タンパクにおいても、タンパクの大部分が膜貫通領域もしくはペリプラズムに存在するものに比べ、大部分が外膜上に露出するタンパクは、病原性、抗原性が高くなると考えられる。

よって、本研究では、菌体表層に存在し、大部分が外膜上に露出しているものを特異的に同定するために、Trypsin shaving 法を行った。当解析は菌体表層に露出しているタンパクをプロテアーゼで切断し、LC-MS で網羅的に解析する方法である。近年、複数の細菌種で菌体表層のキャラクタライズに当解析が用いられてきている。また、当解析では、菌体表面に弱く結合するタンパクの同定も

可能となる。よって、元来分泌タンパクとして考えられていた因子の菌体表層における病原性への関与を解明することも、本研究の目的のひとつである。

以上のことから、本研究において *A. actinomycetemcomitans* の表層における新規病原性因子の同定は可能と考えられた。

3. 研究の方法

菌体表層に露出しているタンパクの同定を行うために、ゲノム情報が公開されている *A. actinomycetemcomitans* HK1651 株を使用した。本株は高病原性 JP2 クローンの一つであり、病原性因子同定のためのターゲットとして適していると考えられる。

A. actinomycetemcomitans growth medium を 100 ml 用い、HK1651 株を対数増殖期まで培養した。その後、菌体を PBS にて 3 回洗浄し、MS grade トリプシン (1 mg) 含有 PBS (5ml) で 37、30 分間、表層タンパクの切断を行った。その際、菌液の一部を寒天培地上に播種し、顕著な溶菌が生じていないことを確認した。

得られたトリプシン消化物から 0.2 μM のフィルターにより菌体を除去し、1 mg の MS grade トリプシンにより、37 で一晩、再度消化反応を行った。TFA を 0.1% 添加することで消化反応を停止させた後、脱塩・濃縮を Sep-pak C18 で行った。得られたトリプシン消化物を LC-MS にて解析し、得られたペプチド情報から表層タンパクの同定を行った。

4. 研究成果

(1) *A. actinomycetemcomitans* における Trypsin shaving

A. actinomycetemcomitans HK1651 の Trypsin shaving の結果を表 1 に示す。Low クオリティのペプチドを排除後にアミノ酸配列内にペプチドが Hit したタンパクを表層由来のタンパクとした。Coverage は 5 ~ 60% であった。

同定されたタンパクのうち、EmaA, Omp29, Omp100 は既知の外膜タンパクである。しかしながら、その他、既知の外膜タンパク (Omp64, Omp32, Omp16/18 など) は検出されなかった。これは当解析の解像度の低さに起因する可能性が考えられる。しかし、検出されたもののうち、Omp100 及び EmaA はオートトランスポータータイプの外膜タンパク

図 1. オートトランスポーターの模式図

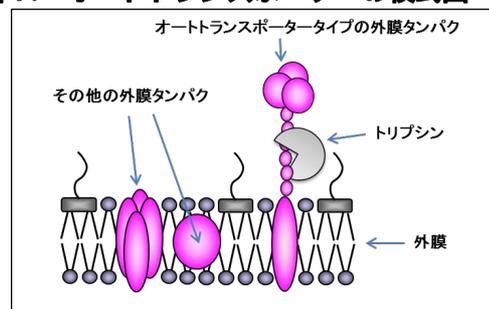


表1 . *A. actinomycetemcomitans* HK1651 の Trypsin shaving

gene	Product
AHN70759.1	Uncharacterized protein
emaA	adhesin
rplK	50S ribosomal protein L11
rplA	50S ribosomal protein L1
rplB	50S ribosomal protein L2
tuf	elongation factor Tu
rpsG	30S ribosomal protein S7
dnaK	Chaperone protein DnaK
htpG	Chaperone protein HtpG
AHN71434.1	DNA-binding protein HU- α , putative
eno	enolase
rplE	50S ribosomal protein L5
rplF	50S ribosomal protein L6
rpsE	30S ribosomal protein S5
rplO	50S ribosomal protein L15
groL	60 kDa chaperonin
rpsP	30S ribosomal protein S16
AHN71918.1	Phosphoenolpyruvate-protein phosphotransferase
AHN71920.1	Oligopeptidase A, putative
ribH	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase
fumC	Fumarate hydratase class II
AHN72207.1	Pyruvate dehydrogenase E1 component
AHN72457.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
xseA	Exodeoxyribonuclease 7 large subunit
omp29	Outer membrane protein, OmpA family
omp100	Adhesin/invasin, putative
AHN72631.1	30S ribosomal protein S1
AHN72850.1	Leukotoxin
rplU	50S ribosomal protein L21
rpsT	30S ribosomal protein S20
AHN72987.1	Formate acetyltransferase I, putative
AHN70705.1	DNA methylase, putative
hslU	ATP-dependent protease ATPase subunit HslU
tmcA	tRNA(Met) cytidine acetyltransferase TmcA
AHN72887.1	Aspartyl-tRNA synthetase, putative
tiq	Trigger factor

である。このタイプの外膜タンパクは菌体表層に大部分が露出している(図1)。そのため、より Trypsin により消化されやすく検出が当解析によりなされた可能性も考えられた。

また、当解析により、*A. actinomycetemcomitans* の代表的な病原性因子であるロイコトキシンが表層タンパクの一つとして同定された。ロイコトキシンは菌体外産生性の白血球殺滅毒素であるが、この結果はロイコトキシンが菌体表層にゆるく結合し、表層の病原性因子としても機能する過去の報告例を裏付けるものとなった。

当解析により、リボソームタンパクなどの細胞質タンパクが表層タンパクとして同定された。これらはトリプシン処理中の溶菌に由来するものが大部分であると考えられる。よって、より表層特異的に解析できる反応系の構築が今後必要になると考えられた。

(2) グラム陽性菌における Trypsin shaving

グラム陰性菌である *A. actinomycetemcomitans* はグラム陽性菌とくらべ、構造上バッファー中などで溶菌しやすいことが知られている。そこで、当解析方法の妥当性を検証するために、グラム陽性菌の一つである *Staphylococcus aureus* MW2 株において Trypsin shaving を行った(表2)。

結果、代表的な *S. aureus* の表層タンパクであり病原性因子でもあるプロテイン A (Spa) やフィブロネクチン結合タンパク(Fnb)が同定された。また、細胞壁結合タンパクの一つで Immunomodulator としての報告がある

SasH が同定された。しかしながら、その他既知の菌体表層タンパクの同定はなされず、当

表2 . *S. aureus* MW2 の Trypsin shaving

Gene	Product
cspA	major cold shock protein CspA
tufA	translational elongation factor TU
fnb	fibronectin-binding protein A
MW1496	competence protein ComGA
MW2294	Ferredoxin--NADP reductase
copA	copper-transporting ATPase copA
MW0023	SasH
spa	immunoglobulin G-binding protein A
fnbB	fibronectin-binding protein B
MW2426	hypothetical protein

解析の解像度は、表層タンパクの網羅的同定のためには不十分である可能性が示唆された。よって、今後は解析の最適化を検討する必要がある。

S. aureus の Trypsin shaving は、*A. actinomycetemcomitans* のものと比べ、細胞質タンパクの同定された数は少なかった。よって、表層構造の強固さの違いが結果に大きく影響されることを示唆している。

過去の報告により、死菌由来の細胞質タンパクが菌体表層に結合し、宿主細胞への付着などの病原性に関わる例が報告されている。このような、菌体表層において副産物的な働きを示す細胞質タンパクの同定においても Trypsin shaving は有効であると考えられる。この度、*S. aureus* において Trypsin shaving により同定された細胞質タンパク CspA や TufA などは、表層における新規病原性因子としての働きも考えられるため、今後の検討課題の一つとなりうる。

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 6 件)

Kawada-Matsuo M, Oogai Y, Komatsuzawa H.

Sugar Allocation to Metabolic Pathways is Tightly Regulated and Affects the Virulence of *Streptococcus mutans*.

Genes, 査読有り, 2016, 8(1). pii: E11.

doi: 10.3390/genes8010011.

Oyama K, Kawada-Matsuo M, Oogai Y, Hayashi T, Nakamura N, Komatsuzawa H.

Antibacterial Effects of Glycyrrhetic Acid and Its Derivatives on *Staphylococcus aureus*.

PLoS One, 査読有り, 2016, 7;11(11):e0165831.

doi: 10.1371/journal.pone.0165831.

Oogai Y, Yamaguchi M, Kawada-Matsuo M, Sumitomo T, Kawabata S, Komatsuzawa H.

Lysine and Threonine Biosynthesis from Aspartate Contributes to *Staphylococcus aureus*

Growth in Calf Serum.

Applied and Environmental Microbiology, 査読有り, 2016, 82(20):6150-6157.
DOI:10.1128/AEM.01399-16

Kawada-Matsuo M, Tatsuno I, Arii K, Zendo T, Oogai Y, Noguchi K, Hasegawa T, Sonomoto K, Komatsuzawa H.

Two-Component Systems Involved in Susceptibility to Nisin A in *Streptococcus pyogenes*.

Appl Environ Microbiol, 査読有り, 2016, 82(19):5930-9.

doi: 10.1128/AEM.01897-16.

Oogai Y, Kawada-Matsuo M, Komatsuzawa H.

Staphylococcus aureus SrrAB Affects Susceptibility to Hydrogen Peroxide and Co-Existence with *Streptococcus sanguinis*.

PLoS One, 査読有り, 2016, 11(7):e0159768.

doi: 10.1371/journal.pone.0159768.

Kawada-Matsuo M, Shammi F, Oogai Y, Nakamura N, Sugai M, Komatsuzawa H.

C55 bacteriocin produced by ETB-plasmid positive *Staphylococcus aureus* strains is a key factor for competition with *S. aureus* strains.

Microbiol Immunol., 査読あり, 2016, 60(3):139-47.

doi: 10.1111/1348-0421.12360.

〔学会発表〕(計 4 件)

大貝悠一、後藤恭宏、小椋義俊、林哲也、

小松澤均

Identification and expression analysis of small RNAs in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*

第 90 回日本細菌学会総会、2017 年 3 月 19 - 21 日、仙台国際センター(宮城県仙台市)

大貝悠一、小松澤均

Aggregatibacter actinomycetemcomitans における small RNA の同定

第 58 回 歯科基礎医学会学術大会、2016 年 8 月 24-26 日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

大貝悠一、小松澤均

黄色ブドウ球菌の Hmp は *Streptococcus sanguinis* の産生する過酸化水素感受性に関与する

第 89 回日本細菌学会総会、2016 年 3 月 23-25 日、大阪国際交流センター(大阪府大阪市)

大貝悠一、小松澤均

黄色ブドウ球菌の牛血清中における病原性因子発現性及び増殖性

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(新潟県新潟市)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

大貝 悠一 (OOGAI, Yuichi)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号: 40511259

(2)研究分担者: なし

研究者番号:

(3)連携研究者: なし

研究者番号:

(4)研究協力者: なし