

令和元年6月4日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11464

研究課題名(和文) 歯周病関連細菌の外膜蛋白質の糖鎖修飾に関する酵素の探索と機能の解明

研究課題名(英文) Search and characterization of glycosylation-related enzymes of outer membrane proteins from periodontal bacteria

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病関連細菌の外膜にあるOmpA様蛋白質にはN-アセチルグルコサミンやシアル酸による糖鎖修飾がみられる。これらに関わる糖転移酵素を検索すると、N-アセチルグルコサミンについては候補となる酵素蛋白質を見つけることができた。シアル酸については酵素の候補を見つけることができなかったため、別の酵素がその機能を代替していると考えている。糖転移酵素変異株の作製に手間取ったため、阻害剤による影響を検討した。糖蛋白質の発現には明確な違いが見られなかったが、菌体の増殖には影響が認められた。また、糖鎖を有するOmpA様蛋白質は、血清抵抗性や抗菌ペプチドに対する抵抗性にも関与することが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

主要な歯周病関連細菌において外膜蛋白質OmpAの糖鎖修飾に関わる糖転移酵素を絞り込み、糖転移酵素に対する阻害剤が菌体への影響を与えることを示した。また、OmpAが血清抵抗性などの病原性にも関与する実例を見つけることができた。これらのことから、糖鎖修飾をもつOmpAの制御が、歯周病の予防や治療につながる可能性がさらに高まったと考えている。

研究成果の概要(英文)：OmpA-like proteins from periodontal pathogens are glycosylated with GlcNAc and sialic acids. When glycoenzymes related to these glycosylations were searched, possible enzymes for GlcNAc-modification were found, but not for sialic acid-modification, possibly substitute enzymes may exist. Since construction of glycoenzyme-gene mutants was difficult, effects of glycoenzyme inhibitors were examined. Expression of glycoproteins were not clearly different, however, growth of bacterial cells was influenced. It was also found that glycosylated OmpA-like proteins contributed to serum resistance and resistance against anti-bacterial peptides.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：歯周病関連細菌 外膜蛋白質 糖鎖修飾 酵素 OmpA様蛋白質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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する感染症である。そのうち歯周炎では、炎症の波及により歯槽骨が破壊され、最終的には歯の喪失を招く。最も一般的にみられる慢性歯周炎は、通常 35 歳以上で発症し、罹患率は加齢とともに増加する。超高齢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。歯周病は口腔だけでなく、全身へも影響を及ぼすという疫学的調査が数多く報告されている。その結果、ペリオドンタルメディシン、すなわち歯周病と全身疾患との間の双方向性の関係という概念が定着している。糖尿病、心血管疾患（動脈硬化、虚血性心疾患）、低体重児早産および骨粗鬆症などの関連性が明らかにされてきた。

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。その中でも *P. gingivalis* は、常在菌を巻き込んで病原性をもつ細菌叢へと変化させる重要な細菌、"Keystone pathogen" であると考えられている (Darveau et al, J Dent Res, 2012)。

多くの蛋白質は翻訳後修飾を受けて多様化するとされている。翻訳後修飾には、リン酸化、メチル化、リン酸化などがあるが、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ため、単にゲノムの情報では推定できない。一般的な糖鎖修飾の意義として、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。近年、細菌における糖蛋白質の研究が進展しつつある (Nothaft et al, Nature Rev Microbiol, 2010)。ところが、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かった。

そこで、申請者らは、*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に、網羅的に糖鎖修飾蛋白質スポットを質量分析によって解析した。その結果、主要外膜蛋白質の OmpA 様蛋白質を含め、少なくとも数種類の糖蛋白質の存在が明らかになった (Kishi, Murakami et al, Mol Microbiol, 2012)。糖蛋白質の分離を検討したところ、小麦胚芽レクチンカラムにより主要外膜蛋白質の OmpA 様蛋白質が効率的に分離できるという知見を得ている (Murakami et al, Infect Immun, 2014)。

P. gingivalis などの歯周病関連細菌においては、C 末端ドメインを有する蛋白質群の糖鎖修飾の報告がみられる。C 末端ドメインを有する蛋白質がタイプ 分泌装置で菌体外に輸送されると、A-LPS が結合して、蛋白質に糖鎖修飾をもたらしとされている。この機構で糖鎖修飾を受ける蛋白質としては、ジンジパインをはじめとする病原因子が含まれる (Shoji et al, Sci Rep, 2014)。

ところが、申請者らが糖蛋白質として見つけた *P. gingivalis* の主要外膜蛋白質である OmpA 様蛋白質は、C 末端ドメインを有する蛋白質には該当しない。すなわち、菌体外で糖鎖が一括して付加される糖鎖修飾機構は関与しない。そのため、別の機構によって糖鎖修飾が生じるものと考えられる。おそらく、糖転移酵素によって糖鎖が 1 つずつ付加される一般的な糖鎖修飾様式に近いものだと考えている。申請者らは予備的な実験において、OmpA 様蛋白質の修飾糖鎖に含まれる糖として N-アセチルグルコサミン、シアル酸やその他の糖を検出している (未発表)。ところが、現在までに、*P. gingivalis* においては、これらの糖の付加に関わる糖転移酵素の論文は発表されておらず、その実態はまったく明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、歯周病関連細菌の *P. gingivalis* の外膜蛋白質のうち、OmpA 様蛋白質の糖鎖修飾に関わる糖転移酵素の遺伝子領域を探索する。その後、糖転移酵素の変異株を作製して、実際に糖鎖修飾への影響を確かめる。変異株と親株とを比較することにより、糖転移酵素が細菌の性状、増殖やバイオフィルム形成能に及ぼす影響を明らかにする。さらに、宿主に対しては、細胞への付着・侵入能やサイトカイン産生能に及ぼす影響等も検討する予定である。これらを通じて、糖転移酵素による糖鎖修飾の生物学的意義を明らかにしたい。

蛋白質の糖鎖修飾は、特に真核生物においては高い頻度で生じ、糖鎖修飾に関わる酵素およびその生物学的意義も解明されつつある。ところが、歯周病関連細菌 *P. gingivalis* においては、糖鎖修飾に関与する酵素を総合的に検討した例はほとんど見られない。糖転移酵素の理解によって、糖鎖そのものの機能が解明されることになる。糖転移酵素が *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。糖鎖の制御による疾患の治療への可能性も開ける。近年、歯周病と全身疾患との関係が注目されている。*P. gingivalis* の修飾糖鎖が生体の機能を攪乱しているという証拠を導く発端となるかもしれない。

3. 研究の方法

歯周病関連細菌 *P. gingivalis* の外膜蛋白質である OmpA 様蛋白質の糖鎖修飾に着目して、これに関わる糖転移酵素を探索し、機能の解析を行うことを計画した。

糖鎖修飾に関わる糖転移酵素の探索では、データベースや他の細菌の糖転移酵素を参考にして、*P. gingivalis* の遺伝子領域から N-アセチルグルコサミンやシアル酸などの糖鎖修飾に関わると思われる糖転移酵素遺伝子を選定する。必要に応じて、組換え糖転移酵素を作製し、酵素活性を実際に確かめる。

次に、これまでに申請者らが行ってきた方法に従い、選定した糖転移酵素の遺伝子を順次欠失させて変異株の作製を試みる（参考：Nagano, Murakami et al, J Bacteriol, 2005; Nagano, Murakami et al, J Med Microbiol, 2007）。

続いて、野生株と遺伝子欠失変異株とを比較し、OmpA 様蛋白質の糖鎖修飾の変化を調べる。菌体蛋白質全体の糖鎖修飾の変化もあわせて検討する。糖蛋白質特異的染色、レクチン染色、あるいは糖鎖抗体を用いたウェスタンブロットを組み合わせて、多方面から確認する（参考：Murakami et al, Infect Immun, 2014）。

その後、野生株と遺伝子欠失変異株とを比較し、増殖能や本菌のもつ代表的な病原因子への影響を調べることを予定した。さらに、バイオフィーム形成能、宿主細胞への付着・侵入能、宿主細胞のサイトカイン産生能に及ぼす影響などの検討を通じて、糖転移酵素の生物学的意義を明らかにしたいと考えた。

4. 研究成果

研究代表者らは、これまで代表的な歯周病関連細菌の *P. gingivalis* を用いて、外膜蛋白質での糖蛋白質の存在を明らかにし、主要外膜蛋白質である OmpA 様蛋白質の修飾糖鎖として N-アセチルグルコサミン、シアル酸やその他の糖を検出してきた。*P. gingivalis* と並んで歯周病関連細菌として有力な *Tannerella forsythia* においても、OmpA 様蛋白質の修飾糖鎖として N-アセチルグルコサミンやシアル酸が存在することを明らかにして、論文を公表した。

歯周病関連細菌として重要である *P. gingivalis* および *T. forsythia* の糖転移酵素をデータベースから検索を行った。N-アセチルグルコサミン転移酵素については、すでに報告のあるものとの相同性を示す酵素の候補を見つけることができた。ところが、シアル酸転移酵素については、他菌で報告されているものとの相同性が高いものは見つかることができなかった。おそらく、これらの細菌ではシアリダーゼがシアル酸転移機能を併せもっているものと考えている。この内容に関しては論文印刷中である。

検索結果を基にして、当初計画したように変異株の作製を進めてみたものの、理由は不明であるが、満足な変異株は作製できていない。そこで、計画を変更して、N-アセチルグルコサミン転移酵素とシアル酸転移酵素のそれぞれに対する阻害剤を用いて、*P. gingivalis* および *T. forsythia* への影響を調べた。*P. gingivalis* に対しては、いずれの阻害剤も菌体の増殖に影響を及ぼしたが、糖蛋白質の発現パターンには明確な変化はみられなかった。

その他に、糖鎖修飾を有する *P. gingivalis* の OmpA 様蛋白質は、血清抵抗性や抗菌ペプチドに対する抵抗性、さらに Toll 様受容体 4 を介した宿主細胞の抑制にも関与することが明らかになった。また、糖鎖修飾を有する *T. forsythia* の表層蛋白質は、多菌種でのバイオフィーム形成や多形核白血球の食作用に関連することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

村上幸孝. 歯周病関連細菌の糖蛋白質と糖鎖修飾に関わる酵素. 岐歯学誌, 46 巻 2 号, 2019 年 (印刷中). 査読有.
<https://asahi-u.repo.nii.ac.jp>

堀江俊, 猪俣恵, 安部雅世, 引頭毅. 糖鎖修飾関連酵素阻害剤が歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* に及ぼす影響について. 岐歯学誌, 45 巻 3 号, 2019 年, 141-148. 査読有.
<https://asahi-u.repo.nii.ac.jp>

Horie T, Inomata M, Into T. OmpA-like proteins of *Porphyromonas gingivalis* mediate resistance to the antimicrobial peptide LL-37. J Pathog, 2018, 2068435. 査読有.
DOI: 10.1155/2018/2068435.

Inomata M, Horie T, Into T. OmpA-like proteins of *Porphyromonas gingivalis* contribute to serum resistance and prevent Toll-like receptor 4-mediated host cell activation.

PLoS One, Vol.13, No.8, 2018, e0202791. 査読有 .
DOI: 10.1371/journal.pone.0202791.

Bloch S, Thurnheer T, Murakami Y, Belibasakis GN, Schäffer C. Behavior of two *Tannerella forsythia* strains and cell surface mutants in multispecies oral biofilms. Mol Oral Microbiol, Vol.32, No.5, 2017, 404-418. 査読有 .
DOI: 10.1111/omi.12182.

Moriguchi K, Hasegawa Y, Higuchi N, Murakami Y, Yoshimura F, Nakata K, Honda M. Energy dispersive spectroscopy-scanning transmission electron microscope observations of free radical production in human polymorphonuclear leukocytes phagocytosing non-opsonized *Tannerella forsythia*. Microsc Res Tech, Vol.80, No.6, 2017, 555-562. 査読有 .
DOI: 10.1002/jemt.22819.

Horie T, Inomata M, Into T, Hasegawa Y, Kitai Y, Yoshimura F, Murakami Y. Identification of OmpA-like protein of *Tannerella forsythia* as an O-linked glycoprotein and its binding capability to lectins. PLoS One, Vol.11, No.10, 2016, e0163974. 査読有 .
DOI: 10.1371/journal.pone.0163974.

〔学会発表〕(計 9件)

猪俣恵, 安部雅世, 引頭毅. Outer membrane proteins of *Porphyromonas gingivalis* are involved in the resistance to antimicrobial peptides. 第66回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会. 2018年11月17日. 北海道大学(札幌市)

堀江俊, 猪俣恵, 安部雅世, 引頭毅. 糖鎖修飾関連酵素阻害剤が歯周病関連細菌の糖タンパク質合成ならびに増殖に及ぼす影響について. 第60回歯科基礎医学会学術大会. 2018年9月6日. 九州大学(福岡市).

猪俣恵, 引頭毅, 堀江俊, 村上幸孝. *Porphyromonas gingivalis* は OmpA 様蛋白質依存的にヒト血清に抵抗性を示す. 第48回日本嫌気性菌感染症学会. 2018年3月3日. 広島大学(広島市).

村上幸孝, 堀江俊, 引頭毅, 猪俣恵. *Porphyromonas gingivalis* の OmpA 様蛋白質は血清抵抗性に関与し Toll 様受容体4を介した宿主細胞の活性化を抑制する. 第47回東海乳酸菌研究会研究報告会. 2018年2月3日. 中日パレス(名古屋市).

猪俣恵, 引頭毅, 堀江俊, 村上幸孝. *Porphyromonas gingivalis* の OmpA 様蛋白質の血清抵抗性への関与. 第59回歯科基礎医学会学術大会. 2017年9月18日. 松本歯科大学(塩尻市).

堀江俊, 猪俣恵, 引頭毅, 村上幸孝. 糖鎖関連酵素阻害剤が *Tannerella forsythia* の糖蛋白質に及ぼす影響. 第59回歯科基礎医学会学術大会. 2017年9月17日. 松本歯科大学(塩尻市).

猪俣恵, 堀江俊, 引頭毅, 村上幸孝. *Porphyromonas gingivalis* の OmpA 様蛋白質の血清抵抗性への関与について. 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(仙台市).

堀江俊, 猪俣恵, 引頭毅, 村上幸孝. GlcNAc およびシアル酸転移酵素阻害剤が *Tannerella forsythia* に及ぼす影響. 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(仙台市).

村上幸孝, 堀江俊, 引頭毅, 猪俣恵. 歯周病関連細菌 *Tannerella forsythia* に存在する糖蛋白質の性質. 第46回東海乳酸菌研究会研究報告会. 2017年2月4日. 中日パレス(名古屋市).

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：猪俣 恵

ローマ字氏名：INOMATA, Megumi

所属研究機関名：朝日大学

部局名：歯学部

職名：准教授

研究者番号（8桁）：40553798

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：長谷川 義明

ローマ字氏名：HASEGAWA, Yoshiaki

研究協力者氏名：吉村 文信

ローマ字氏名：YOSHIMURA, Fuminobu

研究協力者氏名：引頭 毅

ローマ字氏名：INTO, Takeshi

研究協力者氏名：堀江 俊

ローマ字氏名：HORIE, Toshi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。