

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04370

研究課題名(和文) 高密度Tn-Seq法を用いた 9型分泌機構に関わる遺伝子群のゲノムワイド解析

研究課題名(英文) Genome-wide search for genes of Type IX secretion system by effective Tn-Seq analysis

研究代表者

内藤 真理子 (NAITO, Mariko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・教授

研究者番号：20244072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：T9SSに関わる遺伝子をPorphyromonas gingivalis の高密度Tn挿入変異体ライブラリーを作製、網羅的に探索した。その結果、PorG遺伝子がT9SSの必須遺伝子であること、これまでに関与が報告されていたGPPX遺伝子が関与しないことを明らかにした。さらにT9SS、輸送タンパク質の脂質修飾に関与する遺伝子群を同定、機能解析を行った。またT9SS輸送タンパク質内部の共通構造(Ig-like domain)の機能を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Porphyromonas gingivalisは現在でもほとんどの日本人の歯牙を失う原因である歯周病の主要な原因菌である。本研究では本菌の多様な病原因子の菌体外への輸送に働く輸送機構(9型分泌機構)の全容を把握するために、網羅的に必須遺伝子の同定を行った。また同定した必須遺伝子を機能でグループ分けを行うことができた。9型分泌機構は他の菌属には見られない特殊な機構である。その為、本研究の成果は歯周病原菌を標的にした新たな創薬開発に役立つ情報基盤として意義深いと考えている。

研究成果の概要(英文)：Genes related to T9SS were comprehensively searched by constructing a high-density Tn insertion mutant library of Porphyromonas gingivalis. As a result, it was revealed that the PorG gene is a new essential gene of T9SS. One of previously reported T9SS related gene, GPPX, showed no relation with T9SS. Furthermore, we identified the genes involved in lipid modification of T9SS cargo proteins and analyzed their functional roles. We also clarified the function of a common structure (Ig-like domain) inside the T9SS transport protein.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：歯周病原菌 9型分泌機構 Tn-Seq

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グラム陰性細菌 *Porphyromonas gingivalis* は歯周病原性のある細菌のなかで最重要細菌の一つである。近年、本菌はごく少ない存在比率であっても存在することで歯周局所のバイオフィルム菌叢全体の菌種の構成比および総菌数に影響を与え、dysbiosis を引き起こす、いわゆる“keystone”病原体であると示唆されている。そのため、本菌の病原因子の解明は、歯周病病態の理解に欠かせないと考えられる。本菌の病原因子であるジンジパインプロテアーゼなどは菌体表面の二つの膜構造（内膜と外膜）を超えて菌体表面や培養上清に分泌されるが、*P. gingivalis* の全ゲノム配列を決定し、全遺伝子を同定したところ、既知の分泌機構が存在しないことが明らかになった (DNA Res., 2008)。そこで近縁の菌種間での全遺伝子の網羅的な存在比較を行ったところ、ジンジパインプロテアーゼなどのタンパク質の分泌に関する新規の病原タンパク質分泌機構（型分泌機構、T9SS）を発見した (PNAS, 2010)。

T9SS は *P. gingivalis* と同じ Bacteroidia 綱に属する他の歯周病原細菌、*Tannerella forsythia* や *Prevotella intermedia* にも存在していることから、歯周病原菌の病原性において重要な働きをしていると考えられている。T9SS で輸送されるタンパク質の多くにみられる脂質修飾に働く遺伝子群、また T9SS 構成遺伝子群の発現調節に関する遺伝子についても解析を進めてきた (PNAS, 2010; Microbiologyopen, 2013; Sci. Rep., 2014; Sci. Rep., 2016)。また、T9SS によって輸送、分泌されるタンパク質の解析から、輸送タンパク質にはその C 末端側にアミノ酸残基のモチーフ (T9SS 分泌テイル) を有することが示された。また本菌の重要な病原因子である線毛の X 線結晶解析と遺伝生化学的解析から、線毛タンパク質の重合化には T9SS によって分泌されるジンジパインプロテアーゼが必須であり、その構造と重合体形成機構は既知の線毛と異なる新型の線毛 (V 型線毛) であることを明らかにした (Cell, 2016)。T9SS には 29 個の遺伝子が関わることが明らかになっているが、すでに報告されている遺伝子群が T9SS のすべての遺伝子であるかどうかは不明である。さらに T9SS を構成する各タンパク質間の相互作用についても詳細には解析されておらず、また、T9SS の高次構造も明らかにされていない。

2. 研究の目的

我々は歯周病原細菌 *P. gingivalis* の全ゲノム配列決定と全遺伝子の近縁菌との網羅的比較から、新規の病原タンパク質分泌機構 (型分泌機構, T9SS) を発見した (PNAS, 2010)。これまでに T9SS に関する遺伝子は調節因子を含めて 29 個報告されている。しかし、すでに報告されている遺伝子群が本分泌機構のすべてであるかどうかは不明である。そこで本研究では本菌において高密度 Tn-Seq 法を用いて、トランスポゾン変異株ライブラリーを作製し、T9SS に関わる遺伝子の探索をゲノムワイドに行う。新たに同定した遺伝子についてそれらがコードするタンパク質の T9SS での機能を解析する。また T9SS により輸送される病原因子に共通の構造についての解析を行う。これらの研究により T9SS に関するすべての遺伝子の同定とその輸送機構の詳細な機能の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) T9SS に関わる遺伝子の網羅的探索

網羅的な遺伝子探索の為にバイアスなく高密度に変異株を作成できる Mariner トランスポゾン (Tn) を用い変異株ライブラリーを作成する。具体的には近縁の *Bacteroides* 用が開発された Tn 導入用プラスミド (pMI07) を用い、電気穿孔法にて *P. gingipain* ATCC33277 から効率よく Tn 挿入変異体ライブラリーを作製する。T9SS で分泌される代表的な病原因子、ジンジパインプロテアーゼは菌体表面のヘモグロビン分解に働き、結果ヘム鉄を菌体表面に蓄積させる。このヘム

鉄蓄積のため、*P. gingivalis* 野生株は血液寒天培地上で黒色の集落を形成する。そこで作成した変異株ライブラリーから血液寒天培地上で無色の集落を選択することで T9SS 変異株を得る。得られた変異株それぞれの Tn 挿入位置を Nested semi Random PCR を用いた Tn-seq 法にて同定、T9SS に関与する遺伝子を探索する。

(2) T9SS 必須遺伝子の解析

1 の研究で同定された遺伝子、これまでに T9SS への関与が報告されていたが今回は検出されなかった遺伝子それぞれについて、T9SS 機能に必須であるかを確認する。解析する遺伝子はそれぞれの遺伝子に特異的な gene deletion 変異株と遺伝子相補株を作成する。遺伝子欠損株での T9SS の不活化と相補株で T9SS 機能の復帰を確認することで T9SS の必須遺伝子であることを確認する。T9SS 機能は血液寒天上での黒色色素の産生性、輸送タンパク質であるジンジパインの活性(タンパク質分解酵素活性、赤血球凝集活性)にて確認する。また、同定した遺伝子のうち、輸送タンパク質の修飾に関与することが想定されたものは T9SS 輸送タンパク質の A-LPS 修飾の有無を検討する。

(3) T9SS 輸送タンパク質の共通構造の機能解析

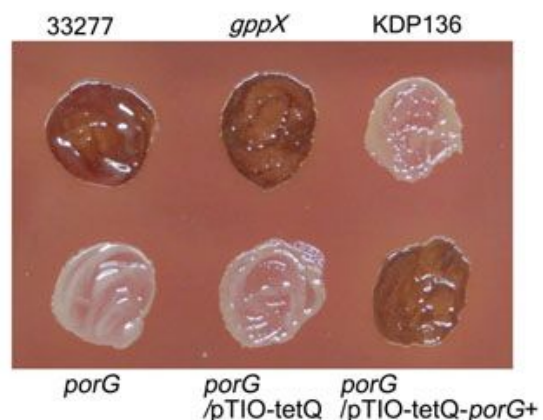
T9SS により輸送されるタンパク質に共通の構造を見出し、その機能を解析する。これまでの研究で T9SS により輸送されるタンパク質を約 30 個同定している。これらの共通構造、配列としては、N 末端の分泌シグナル配列と C 末端のアミノ酸の共通配列モチーフ (CTD:C-terminal domain) についてその機能を明らかにしてきた。そこで今回はこれらとは別の領域についてアミノ酸配列や予測ドメイン構造の共通性を探索する。共通の構造の機能については構造部位の deletion や配列内のアミノ酸の点変異を加えた遺伝子を作成、*P. gingivalis* 内で発現させることで、T9SS 輸送における機能を解析する。

4. 研究成果

(1) T9SS に関わる遺伝子の網羅的探索

P. gingivalis ATCC3277 の全遺伝子 (2090 個) を網羅的に解析するには遺伝子数の約 20 倍、約 4 万個の Tn 挿入変異株ライブラリーが必要である。そこで電気穿孔法で効率に変異株が得られる条件設定を探索した。結果、電気穿孔用の菌を 2 日培養した菌を用いることで効率的に約 5.5 万個の変異株を得ることができた。得られた変異株ライブラリーの 1.6% が黒色色素産生性の欠如を示し、これらの変異株を分離、ゲノム DNA から Nested semi Random PCR により Tn 挿入位置のゲノム断片を増幅、塩基配列を決定した。結果 702 株の T9SS 変異株の Tn 挿入位置を決定した。これにより T9SS に関わる遺伝子を 56 個同定した。これらのうち 21 個はこれまでに T9SS との関連が報告されていないものであったが、遺伝子特異的変異株を作成したところ T9SS とは無関係であることを明らかにした。これとは別の 1 遺伝子 (PGN_0297) は T9SS との関連性は報告されていたが、T9SS の機能に必須かは不明のものであった。また今回の解析では T9SS 関連遺伝子として報告があった遺伝子のうち 6 個の遺伝子は同定されなかった。

図1. 黒色色素産生性試験



(2) T9SS 必須遺伝子の解析

PGN_0297 遺伝子の変異株、さらに遺伝子相補株を作成したところ、T9SS の必須遺伝子であることを初めて明らかにした。この遺伝子を porG と名付けた (図 1)。また今回の解析で検出できなかった既報の T9SS 関連遺伝子 6 個のうち 5 個はこれまでに我々のグループの実験で T9SS 必須遺伝子であることを確認済みのものであった。残りの 1 遺伝子、GPPX 遺伝子について変異株を作成、T9SS はとの関連性を検討した。その結果本遺伝子は T9SS 機能に無関係であることを明らかにした (図 1)。この結果により T9SS に必須の遺伝子を網羅的に同定、それらの機能を 3 つのグループに分けて推測することができた (表 1) (Naito M. 2019)。

表 1. T9SS 必須遺伝子

	Locus	Gene name	Number of Tn mutant clones	Product
T9SS components	PGN_1296	porE	22	T9SS component protein PorE
	PGN_1437	porF	7	T9SS component protein PorF
	PGN_0297	porG	2	T9SS component protein PorG
	PGN_1676	porK	11	T9SS component protein PorK
	PGN_1675	porL	5	T9SS component protein PorL
	PGN_1674	porM	12	T9SS component protein PorM
	PGN_1673	porN	4	T9SS component protein PorN
	PGN_1677	porP	5	T9SS component protein PorP
	PGN_0645	porQ	10	T9SS component protein PorQ
	PGN_0778	porT	9	T9SS component protein PorT
	PGN_0022	porU	38	T9SS component protein PorU
	PGN_0023	porV/pg27/ptO	1	T9SS component protein PorV
	PGN_1877	porW	22	T9SS component protein PorW
	PGN_0509	porZ	37	T9SS component protein PorZ
	PGN_0832	sov	84	T9SS component protein Sov
biosynthesis of A-LPS	PGN_1251	gtfB	15	Glycosyltransferase group 1
	PGN_0361	gtfC	12	Glycosyltransferase family 2
	PGN_1239	gtfD	5	Glycosyltransferase family 2
	PGN_1240	gtfE	20	Glycosyltransferase group 1
	PGN_1668	gtfF	13	Glycosyltransferase family 2
	PGN_0242	gtfG	14	Glycosyltransferase group 1
	PGN_1255	rfa	0	Glycosyltransferase family 9
	PGN_1236	porR/wbpE	30	Wbp pathway protein PorR/WbpE
	PGN_0613	ugdA/wbpA	22	Wbp pathway protein WbpA
	PGN_1056	vimA	25	Virulence modulating gene A
	PGN_1055	vimE	17	Virulence modulating gene E
	PGN_1054	vimF	14	Virulence modulating gene F
	PGN_1302	waal	41	O-antigen ligase waal
	PGN_1896	wbaP	26	Phosphoglycosyltransferase
	PGN_0168	wbpB	23	Wbp pathway protein WbpB
	PGN_0002	wbpD	5	Wbp pathway protein WbpD
	PGN_1033	wzx	0	O-antigen flippase Wzx
	PGN_1242	wzy	16	O-antigen polymerase Wzy
	PGN_2005	wzzP	2	O-antigen chain length regulator WzzP
regulation of T9SS component genes	PGN_1019	porX	2	Two-component system response regulator PorX
	PGN_2001	porY	0	Two-component system sensor kinase PorY
	PGN_0274	sigP	0	ECF sigma factor SigP
	PGN_0300	omp17	0	Skp-like protein Omp17

の解析結果から

T9SS 必須遺伝子のうち、T9SS 輸送タンパク質の A-LPS 修飾に参与すると考えられた糖鎖転移酵素ドメインを持つ遺伝子のうち、未解析のもの 4 個についてその機能を検討した。その結果、PGN_0361, PGN_1240, PGN_1668 は A-LPS の合成に必須であった。また PGN_1236 の変異株では A-LPS の合成に異常がみられたことから、A-LPS の正常な合成に必須であることも明らかにした。これらの結果から、これらの遺伝子を、gtfC, gtfD, gtfE, gtfF と名付けた。(Shoji M. 2018)

これまでの実験では Tn ライブラリから T9SS 変異株を検出する際には完全に黒色色素産生性が欠損したものを

を検出したが、T9SS の機能低下のタイプの変異株 (黒色色素産生の遅れが認められる変異株) を別に 60 個選択、それらの Tn 挿入遺伝子を同定した。その結果、これまでに我々のグループが報告した T9SS 遺伝子の調節因子関連遺伝子が認められた。また別に T9SS によって菌体表面に輸送されるタンパク質 (T9SS cargo protein) が 1 個含まれていた。

(3) T9SS 輸送タンパク質の共通構造の機能解析

T9SS の輸送タンパク質の輸送に関わるドメイン構造の機能を検討するために、輸送タンパクの構造予測を行った。その結果、これまでに報告されている共通構造、CTD の前方に immunoglobulin like domain(Ig-like domain)が存在していることが示された。Ig-like domain を含む、含まないタイプのキメラ T9SS 輸送タンパク質を *P. gingivalis* で発現させることで機能を解析した。その結果 T9SS 輸送タンパク質の内部の Ig-like ドメインが T9SS 輸送における輸送タンパクの安定性に重要であることを明らかにした。(Sato K. 2018)

これらの結果からは今後の本菌の T9SS を標的にした新薬開発を推進しうる情報基盤を得ることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shoji M, Sato K, Yukitake H, Kamaguchi A, Sasaki Y, Naito M, Nakayama K	4. 巻 33
2. 論文標題 Identification of genes encoding glycosyltransferases involved in lipopolysaccharide synthesis in <i>Porphyromonas gingivalis</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Oral Microbiol	6. 最初と最後の頁 68-80
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/omi.12200	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sato K, Kakuda S, Yukitake H, Kondo Y, Shoji M, Takebe K, Narita Y, Naito M, Nakane D, Abiko Y, Hiratsuka K, Suzuki M, Nakayama K	4. 巻 110
2. 論文標題 Immunoglobulin-like domains of the cargo proteins are essential for protein stability during secretion by the type IX secretion system.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Mol Microbiol	6. 最初と最後の頁 64-81
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/mmi.14083	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Naito M, Tominaga T, Shoji M, Nakayama K	4. 巻 63
2. 論文標題 PGN_0297 is an essential component of the type IX secretion system (T9SS) in <i>Porphyromonas gingivalis</i> : Tn-seq analysis for exhaustive identification of T9SS-related genes.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiol Immunol.	6. 最初と最後の頁 11-20.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12665	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 庄子幹郎, 佐藤啓子, 雪竹英治, 内藤真理子, 中山浩次
2. 発表標題 Glycosyltransferase-encoding genes involved in LPS synthesis in <i>Porphyromonas gingivalis</i>
3. 学会等名 第91回日本細菌学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 内藤真理子(代表), 庄子幹郎, 中山浩次
2. 発表標題 高密度Tn-seq法によるIX型分泌機構関連遺伝子の探索
3. 学会等名 第70回日本細菌学会九州支部総会・第54回日本ウイルス学会九州支部総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	坂井 詠子 (SAKAI Eiko) (10176612)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教 (17301)	
研究 協力者	中山 浩次 (NAKAYAMA Koji) (80150473)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・客員研究員 (17301)	
研究 協力者	庄子 幹郎 (SHOJI Mikio) (10336175)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授 (17301)	
研究 協力者	佐藤 啓子 (SATO Keiko) (70410579)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教 (17301)	