

令和元年5月28日現在

機関番号：17301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19769

研究課題名(和文) 歯周病細菌プレボテラ・インターメディアのバイオフィーム形成機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism for biofilm formation in periodontal pathogen, *Prevotella intermedia*.

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)・准教授

研究者番号：20244072

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病原細菌*Prevotella intermedia*の病原因子の一つにバイオフィーム形成能があげられる。これまでの研究からこの活性にはType IX 分泌システム(T9SS)が必須であることが示唆された。本研究では本菌の全遺伝子からバイオフィーム形成に関わるT9SS輸送タンパク質と予測される候補遺伝子を6つ抽出し、うち5つの遺伝子の変異株の作成に成功した。解析の結果、これらのうち2つがバイオフィーム形成に必須であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プレボテラ・インターメディアはグラム陰性偏性嫌気性細菌であり、慢性歯周炎の主要病原細菌の一つとしてあげられる。さらに、急性壊死性潰瘍性歯肉炎、妊娠性思春期性歯肉炎などの発症と強い関連が報告されている。本研究の成果は世界に先駆けて本菌の重要な病原因子であるバイオフィーム形成に関わる遺伝子を2つ同定することができたことである。この成果は今後の本菌の病原性機構の詳細な解明に役立つと考える。

研究成果の概要(英文)：Biofilm formation is one of virulence factor of periodontal pathogen, *Prevotella intermedia*. Our previous study suggested that the Type IX secretion system (T9SS) might translocate the essential component for biofilm formation. Here we searched all genes of *P. intermedia* by conserved motif sequence for T9SS-translocated protein, then defined 6 candidate genes. By our established site-directed mutagenesis procedure, we succeed to generate 5 mutants. Two of those mutants showed the significant reduced biofilm formation. It indicated that those 2 genes have the essential role for biofilm formation in *P. intermedia*.

研究分野：口腔病原微生物学

キーワード：口腔細菌学 歯周病原菌 バイオフィーム 遺伝子操作

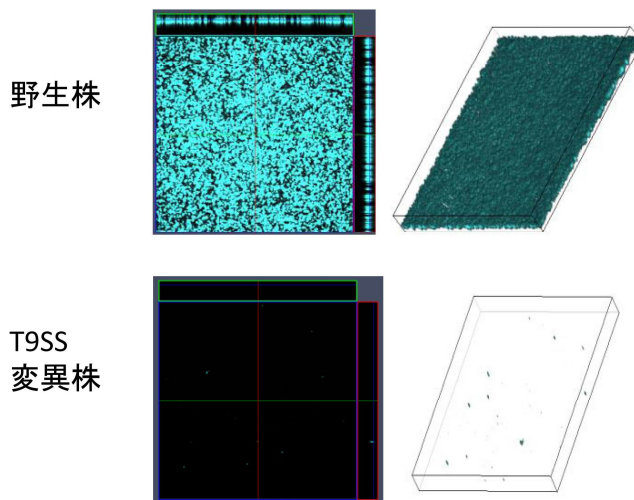
1. 研究開始当初の背景

我々は歯周病原細菌を中心にバクテロイデーテス門細菌の病原性に関する研究を行っている (Xu, Shoji et al., Cell, 2016)。代表的な歯周病原菌であるポルフィロモナス・ジンジバリスの標準株の全ゲノム配列を決定し (Naito et al., DNA Res, 2008)、その遺伝子の網羅的解析から、本菌の主要な病原因子であるプロテアーゼの分泌に関わる新規の分泌機構、Type IX Secretion System (T9SS) を発見した (Sato et al., PNAS, 2010)。この機構はプロテアーゼを含め多くの病原因子を菌体表面または菌体外へ運ぶ。プレボテラ・インターメディアにおいても全ゲノム配列決定を行うことで T9SS に関わる遺伝子群が存在することがわかった (Naito et al., DNA Res, 2016)。我々はプレボテラ・インターメディアにおいても T9SS が病原因子の輸送や分泌に重要な役割を持つと予想した。

しかし、本菌種のみならず、プレボテラ属に含まれる細菌では現在までに遺伝子操作技術が導入されていなかったため、詳細な解析を行うことができなかった。そこで世界に先駆けてプレボテラ・インターメディアにおける遺伝子特異的変異株作製を試み、T9SS の欠損株を作製することに成功した (未発表)。作製した T9SS の欠損株はバイオフィーム形成能を消失していることがわかった (図 1)。この結果から T9SS で分泌される因子を網羅的に解析することで、プレボテラ・インターメディアのバイオフィーム形成機構を解明できると考えた。

またバイオフィーム形成能が本菌の実際の病原性に果たす役割について、本研究で作製したバイオフィーム欠損株を用いた動物感染実験にて明らかにできると考えている。

図1. 共焦点レーザー顕微鏡によるプレボテラ・インターメディアバイオフィームの観察(未発表)



左: XY, XZ, YZ 断面表示 右: 3D 表示

2. 研究の目的

プレボテラ・インターメディアはグラム陰性偏性嫌気性細菌であり、慢性歯周炎の主要病原細菌の一つとしてあげられる。我々がポルフィロモナス・ジンジバリスにて発見した新規の病原タンパク質分泌機構: T9SS は本菌にも存在する。この分泌機構は本菌の病原性の発揮に重要であることが予測された。しかし本菌は他の歯周病原細菌と異なり遺伝子特異的変異株作成技術が確立されていないため病原性の詳細な解析が著しく遅れている。

これまでに我々は本菌への遺伝子操作技術の導入に挑戦し、遺伝子の変異株の作製に世界で初めて成功した。得られた変異株から T9SS がバイオフィーム形成に必須であることを明らかにした (図 1)。本研究では本菌の T9SS 変異株を野生株と詳細に比較解析することにより、バイオフィーム形成機構に関与する因子の網羅的な探索を目指す。さらにバイオフィーム形成に関わる因子の同定とその機能を検討する。

3. 研究の方法

T9SS にて輸送される分泌タンパク質とバイオフィーム形成時に発現が変化する遺伝子について網羅的に検討する。

- (1) プロテオミクスの手法により、野生株と T9SS 変異株のバイオフィーム画分と通常液体培養時の菌体を用いて発現タンパク質の種類とその量の変化を比較する。また菌体表層のバイオフィーム (菌体外重合マトリックス: ECMs) を他の病原細菌、口腔内細菌での手法を参考に抽出する。抽出に用いる溶液の NaCl 濃度についても最適化を行う。最適化した NaCl 濃度の溶液で ECMs を調整する。調整した画分を SDS-PAGE に展開、CBB 染色する。個々のタンパク質すばとバンドについて画像解析により野生株と T9SS 変異株で比較をする。変化が認められたタンパク質は質量分析 (MALDI/TOF-MS 解析) にて同定する。
- (2) T9SS を発見した *Porphyromonas gingivalis* においてはバイオフィーム形成には T9SS によって輸送されるタンパク質分解酵素遺伝子が必須である。そこで本菌のバイオフィーム形成に関与する遺伝子候補として全ゲノム配列情報から T9SS にて輸送されるタンパク質分解酵素を検索する
- (3) (1)(2) 上記の解析から、プレボテラ・インターメディアのバイオフィーム形成機構に関わる因子の候補を絞り込む。個々の遺伝子について遺伝子特異的変異株を作製する。

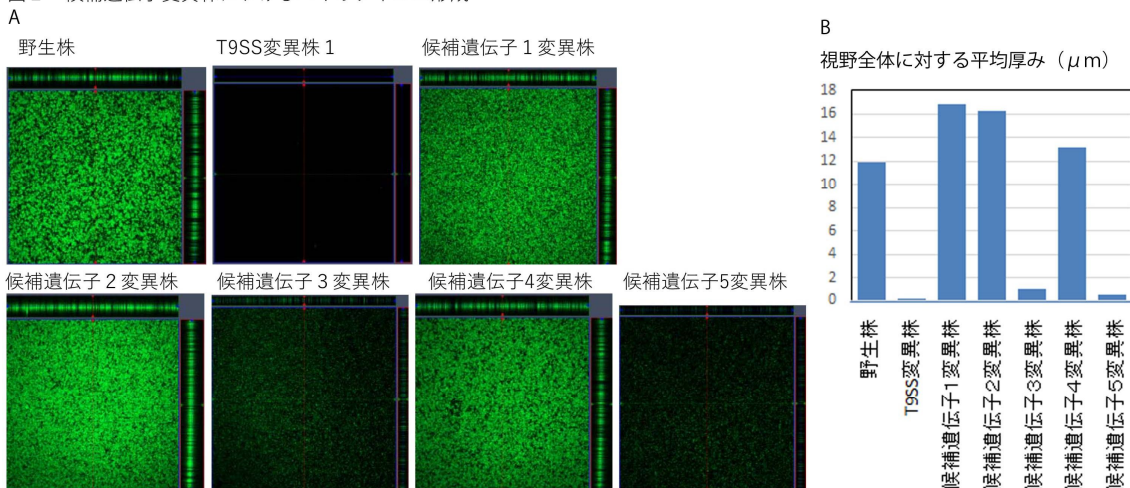
標的遺伝子と上下流領域を含む DNA 断片を PCR にて増幅する。その後標的遺伝子領域をエリスロマイシン耐性遺伝子に置き換えて、遺伝子変異導入用の DNA 断片を作製する。この DNA 断片をプラスミドに挿入し、野生株に導入する。得られた形質転換菌の一部の菌でプラスミド DNA 上の変異導入用 DNA 配列と染色体上の標的遺伝子領域の間で一致する配列間での相同組換えが生じて標的遺伝子がエリスロマイシン耐性遺伝子に置き変わった変異株を得る。

- (4) 得られた変異株における病原性と T9SS 機能の変化を調べる。T9SS 機能は T9SS 依存性にみられる、赤血球凝集活性、インターパイン分泌の変化によって検討する。これにより、同定した遺伝子の機能が T9SS の分泌輸送に関与するのかが確認する。また T9SS の輸送に関与する遺伝子の全容を把握するために、本菌の近縁菌である *P. gingivalis* において高密度 Transposon 挿入変異株ライブラリーを用いた網羅的解析を行う。さらに得られた結果からその個々の遺伝子の進化的保存性を本菌を含む近縁菌種でのゲノム情報から検討する。

4. 研究成果

- (1) 野生株の通常の液体培養時の菌体とバイオフィーム形成時の菌体を用いて全菌体のタンパク質を比較したところ、顕著な違いは認められないことが明らかになった。また菌体表層のバイオフィーム（菌体外重合マトリックス：ECMs）を他の病原細菌、口腔内細菌での手法を参考に抽出条件の検討を行った。結果、0.5M NaCl 濃度により本菌のECMsを得ることができた。調整したECMをSDS-PAGEに展開、バイオフィーム画分に特異的なタンパク質バンドを検出した。検出したタンパク質のバンドを用いて質量分析（MALDI/TOF-MS解析）を行った。が、明瞭なピークを得ることができず目的タンパク質を同定することはできなかった。
- (2) T9SSにて輸送される分泌タンパク質分解酵素を *in silico* の手法で探索した。これまでの *P. gingivalis* における解析から、T9SS輸送タンパク質の特徴としては下記の3つを明らかにした。a) N末端の分泌シグナル、b) タンパク質分解酵素ドメインモチーフ、c) C末端

図2 候補遺伝子変異株におけるバイオフィーム形成



のT9SS輸送シグナルモチーフ（CTD）さらに輸送タンパク質のドメイン検索とそのタンパク質の結晶構造解析から代表的なT9SS輸送タンパク質にはCTDモチーフの直前に Immunoglobulin like (Ig-like) domainが存在していることを明らかにした。このIg-like ドメインを削除した形でT9SS輸送タンパク質を発現させると、輸送そのものではなく、輸送後のタンパク質の安定性に影響がみられることを確認した。またIg-like domainを持たないT9SS輸送タンパク質も存在することを明らかにした。これらの結果からIg-like domainの存在はT9SS輸送タンパク質に必須ではないことを明らかにした。この点を留意し、候補タンパク質の抽出には前述のa)b)c)の3条件を用いるのが妥当であると考えた。そこで本研究で用いる遺伝子操作可能株の全遺伝子、2797遺伝子の配列情報から最初に分泌タンパク質をN末端の分泌シグナルの予測プログラムで抽出した。さらにHidden Markov Modelを用いたHMMERプログラムにより、公共データベースに登録されているすべてのタンパク質分解酵素固有の保存モチーフとCTDの両方を保有する遺伝子を探索した。これにより、6遺伝子を抽出できた。

- (3) (2) で抽出した候補遺伝子6つそれぞれの変異株の作成を試みた。結果うち5つについて遺伝子特異的変異株の作製に成功した。（候補遺伝子1-5変異株：候補遺伝子1は interpain A）
- (4) (3) で得られた変異株のバイオフィーム形成能を検討した。クリスタルバイオレット染色による色素法、蛍光染色による共焦点顕微鏡による三次元構築による測定によりバイオフィームを観察した。結果5つのタンパク質分解酵素の変異株うち2つの遺伝子の変異

株で顕著にバイオフィーム形成が減弱することを明らかにした(図2)。2つのタンパク質分解酵素遺伝子の変異株それぞれで、バイオフィーム形成量が野生株の20%以下に顕著に減弱していることを明らかにした。この結果からこれらの2遺伝子は本菌のバイオフィーム形成能に必須であると推測することができた。

(5) (3) で得られた変異株の性質について解明した。本菌でタンパク質分解酵素活性及び活性測定用の合成基質が解析されている *interpain A (inpA)* の活性については、*inpA* 遺伝子の変異株と T9SS 遺伝子の変異株で失われ、残りの候補遺伝子では活性に変化は見られなかった。T9SS 変異株では赤血球凝集反応が失われるが、今回作成した 5 つの候補遺伝子の変異株では活性に変化は見られなかった。この結果から本菌の赤血球凝集活性には T9SS が必須であるが、今回作成した 5 つの候補遺伝子以外の因子がその活性に必要なことが明らかになった。さらにこれらの結果は今回解析した 5 つの変異株では T9SS による輸送機構が正常に働いていることも示している。作成した 5 つの遺伝子は T9SS の分泌機構自体に働く因子ではなく、T9SS によって輸送される因子であることが推測された。

近縁菌である *P. gingivalis* において高密度 Transposon 挿入変異株ライブラリーを用いた網羅的解析と個々の候補遺伝子の変異株作成とこれまでの我々の研究結果から *P.*

gingivalis においては 38 個の遺伝子が必須であることを明らかにした。またこれらのうち PGN0297 (*porG*) については遺伝子の変異株を作成、本遺伝子が T9SS に必須であることを初めて明らかにした。38 個の必須遺伝子はその機能から下記の 3 つにグループ分けられると考えられた。1) 内膜外膜に存在する分泌装置の構成成分遺伝子 2) T9SS により輸送されるタンパク質の修飾に関与する遺伝子 3) これらの遺伝子の発現調節に関する遺伝子。1) には 15 遺伝子が含まれる。このグループについて個々の遺伝子の進化的保存性について本菌を含む近縁菌種でのゲノム情報から検討した (table)。1) のグループの中では本菌では *porG* 遺伝子が保存されていなかったことが明らかになった。この結果は本菌 *P. intermedia* を含めて近縁菌種の中でも T9SS の構成成分には一部に進化的多様性がみられることを示していた。また

(2) (3) (4) で解析した 5 つの遺伝子は *P. gingivalis* での T9SS 必須遺伝子 38 個に対しての相同性は認められなかった。これは T9SS の機能を赤血球凝集活性、*interpain A* 活性で検討した結果と一致した結果を示していた。

Locus	Gene name	Product	T9SS+ motility -				
			P. a.	T. f.	P. d.	P. i.	P. r.
PGN_1296	<i>porE</i>	T9SS component protein PorE					
PGN_1437	<i>porF</i>	T9SS component protein PorF/putative lipoprotein					
PGN_0297	<i>porG</i>	T9SS component protein PorG					
PGN_1676	<i>porK</i>	T9SS component protein PorK					
PGN_1675	<i>porL</i>	T9SS component protein PorL					
PGN_1674	<i>porM</i>	T9SS component protein PorM					
PGN_1673	<i>porN</i>	T9SS component protein PorN					
PGN_1677	<i>porP</i>	T9SS component protein PorP					
PGN_0645	<i>porQ</i>	T9SS component protein PorQ					
PGN_0778	<i>porT</i>	T9SS component protein PorT					
PGN_0022	<i>porU</i>	T9SS component protein PorU					
PGN_0023	<i>porV/pg27/lpt0</i>	T9SS component protein PorV					
PGN_1877	<i>porW</i>	T9SS component protein PorW					
PGN_0509	<i>porZ</i>	T9SS component protein PorZ					
PGN_0832	<i>sov</i>	T9SS component protein Sov					






	$< e^{-100}$	<i>P. a.</i> , <i>Porphyromonas asaccharolytica</i>
	$e^{-100} < < e^{-50}$	<i>T. f.</i> , <i>Tannerella forsythia</i>
	$e^{-50} < < e^{-10}$	<i>P. d.</i> , <i>Parabacteroides distasonis</i>
	$> e^{-10}$	<i>P. i.</i> , <i>Prevotella intermedia</i>
		<i>P. r.</i> , <i>Prevotella ruminicola</i>

Table 近縁菌種における T9SS 分泌装置遺伝子の保存性

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 3 件)

Naito M, Tominaga T, Shoji M, Nakayama K, PGN_0297 is an essential component of the type IX secretion system (T9SS) in *Porphyromonas gingivalis*: Tn-seq analysis for

exhaustive identification of T9SS-related genes. *Microbiol. Immunol.*, 査読あり, Vol. 63, No. 1, 2019, 11-20. doi: 10.1111/1348-0421.12665

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: Immunoglobulin-like domains of the cargo proteins are essential for protein stability during secretion by the type IX secretion system. *Mol. Microbiol.*, 査読あり, Vol. 110, No. 1, 2018, 64-81. doi: 10.1111/mmi.14083

Shoji M, Sato K, Yukitake H, Kamaguchi A, Sasaki Y, Naito M, Nakayama K: Identification of genes encoding glycosyltransferases involved in lipopolysaccharide synthesis in *Porphyromonas gingivalis*. *Mol. Oral Microbiol.*, 査読あり, Vol. 33, No. 1, 2018, 68-80. doi: 10.1111/omi.12200

〔学会発表〕(計 4件)

内藤真理子, 中山浩次: *Prevotella intermedia* の IX 型分泌シグナル保有タンパク質分解酵素の解析, 第 91 回日本細菌学会総会, 2018

庄子幹郎, 佐藤啓子, 雪竹英治, 内藤真理子, 中山浩次: Glycosyltransferase-encoding genes involved in LPS synthesis in *Porphyromonas gingivalis*, 第 91 回日本細菌学会総会, 2018

庄子幹郎, 佐藤啓子, 雪竹英治, 内藤真理子, 中山浩次, *Porphyromonas gingivalis* LPS の生合成に関わる 4 つの糖転移酵素遺伝子の発見, 第 59 回歯科基礎医学会学術大会, 2017

内藤真理子, 庄子幹郎, 中山浩次, 高密度 Tn-seq 法による IX 型分泌機構関連遺伝子の探索, 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, 2017

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等 該当なし

6. 研究組織

(1)研究分担者 該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 庄子 幹郎

ローマ字氏名: (SHOJI, Mikio)

研究協力者氏名: 佐藤 啓子

ローマ字氏名: (SATO, Keiko)

研究協力者氏名: 雪竹 英治

ローマ字氏名: (YUKITAKE, Hideharu)

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。