

平成21年 5月 7日現在

研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2007年度～2008年度
 課題番号：19791349
 研究課題名（和文） 細菌リポタンパク質生合成阻害によるグラム陽性細菌の病原性喪失に関する研究
 研究課題名（英文） Relation between virulence and lipoprotein maturation in gram-positive pathogenic bacteria
 研究代表者 有本 隆文（ARIMOTO TAKAFUMI）
 昭和大学・歯学部・助教
 研究者番号：60407393

研究成果の概要：

細菌リポタンパク質はリポタンパク質生合成酵素の働きで細胞膜表層上に局在し、様々な物質の取り込み、あるいは付着、薬剤耐性といった病原性への関与が示唆されている。我々は本研究期間において、グラム陽性齧蝕原性細菌を題材に用い、リポタンパク質生合成酵素による成熟が糖やアミノ酸などの物質の取り込みに及ぼす影響を調べた。その結果、細菌リポタンパク質の機能発揮には生合成酵素による成熟が必須であることを明らかにした。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	0	2,500,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	240,000	3,540,000

研究分野：口腔微生物学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：lipoprotein, prolipoprotein diacylglycerol transferase, *Streptococcus mutans*, binding protein

1. 研究開始当初の背景

現在、病原細菌の感染症の治療・予防対策には抗生物質などの化学療法剤およびワクチンの使用が主流である。ところが、近年、抗生物質の乱用により、薬剤耐性菌の出現が顕著になり、社会的な問題となっている。このような背景から、申請者らの研究室では細菌感染に重要な役割を果たすと考えられている、菌体表層リポタンパク質とその成熟を司

るリポタンパク質修飾酵素の関係に着目し、抗生物質やワクチンとは作用機序の異なる新たな病原細菌感染症の治療と予防法の開発につながる基礎研究を進めている。

2. 研究の目的

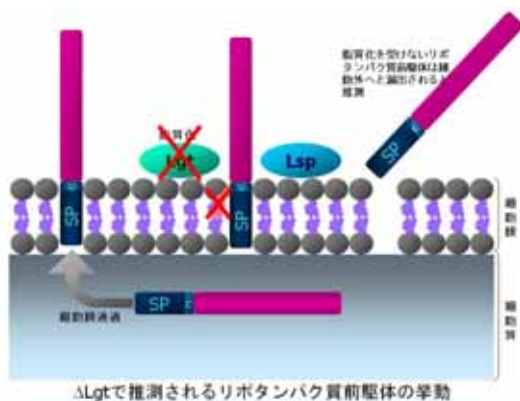
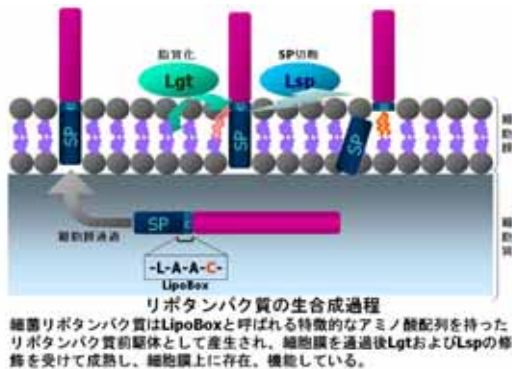
本研究では、最終目標であるワクチンや抗生物質とは作用機序が異なる新たなグラム陽

性病原細菌の感染予防法の開発のために研究期間内に口腔病原細菌を例に取り、1)~4)を明らかにすることを目的とした。

- (1) 口腔病原細菌が有するリポタンパク質の検出・同定
- (2) Lgt 酵素を不活化した口腔病原性細菌変異株を作成
- (3) Lgt 欠損変異株を用いてリポタンパク質の局在性と物質の取り込み等との関係
- (4) リポタンパク質と生体免疫抵抗性との関係

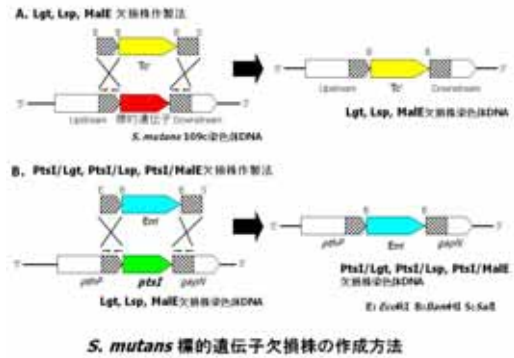
3. 研究の方法

- (1) 齶蝕細菌の *lgt* 遺伝子欠損株の作成
- (2) 二次元ゲル電気泳動法による培養上清画分のプロテオーム解析・・・Lgt 酵素欠損株ではシステイン残基の脂質化が行われなため、リポ蛋白質として細胞膜に維持されず、未修飾の蛋白質が培養上清画分に遊離されることが予想される。Lgt 酵素欠損株における蛋白質の局在性の变化を二次元ゲル電気泳動法により調べた。また蛋白質スポットの同定を TOF-MASS 解析にて行った。



(3) 標的リポ蛋白質欠損株の作成

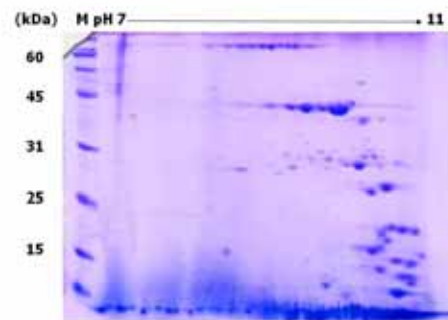
(4) 欠損株の生理学的性質検討



リポタンパク質は様々な物質の取り込みに関与している。その中には種々の糖類、アミノ酸なども含まれる。そこで本研究では各種糖類、アミノ酸の制限培地を作成し、野生株および標的遺伝子欠損株を用いてこれらの物質の取り込みを調べることで標的リポタンパク質の機能の推測を試みた。

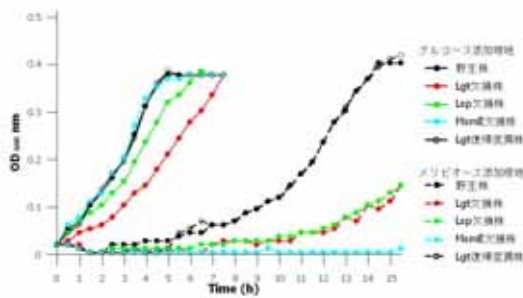
4. 研究成果

- (1) 齶蝕原性細菌の Lgt 欠損変異株および各種標的遺伝子欠損株はダブルクロスオーバー法で作成した。
- (2) 齶蝕原性細菌の Lgt 欠損により、各種リポタンパク質の局在性が細胞表層から培養上清へと変化した。一方、もう一つのリポタンパク質修飾酵素 LspA の欠損では影響が見られなかった。
- (3) ブドウ糖培地での発育は菌株間で

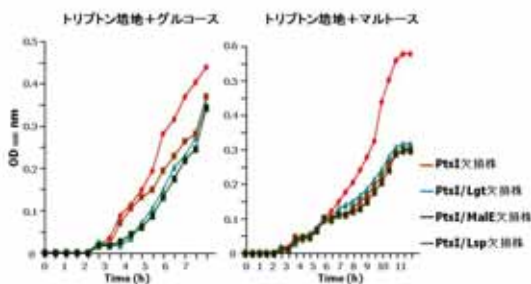


S. mutans Lgt欠損株の培養上清画分の二次元ゲル電気泳動パターン

差が見られなかったが、糖制限培地では Lgt 欠損、LspA 欠損、標的



糖制限培地における *S. mutans* の増殖曲線



maltose 限培地での *S. mutans* の増殖曲線

遺伝子欠損いずれにおいても、発育増殖が抑制されていた。

本研究では、手始めに齲蝕原性細菌において唯一機能が明らかにされている multiple sugar metabolism (Msm) system における糖結合リポタンパク質 MsmE の機能を指標として機能解析を行い、Lgt および LspA のリポタンパク質修飾酵素と MsmE の関係について明らかにした。その手法を基に次は、現在のところ、マルトース結合タンパク質と考えられている MalE の機能解析およびリポタンパク質修飾酵素との関係解明に取り組んだ。

今回の研究結果から、齲蝕原性細菌のメリピオースやマルトースといった糖の取り込みに関与しているそれぞれのリポタンパク質 MsmE および MalE は、その細胞膜局在性が Lgt の、そして機能発現は Lgt および LspA の支配下にあることが示唆された。

本結果は、その他の病原性リポタンパク質の機能もリポタンパク質修飾酵素の支配下にあることを示唆し、本酵素の阻害剤の開発が齲蝕原性細菌をはじめとしたグラム陽性細菌の病原性喪失に多大な貢献を果たすことが想定され、引き続き今後も継続して研究を続けていかなければならない分野であると考え

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1件)

Arimoto Takafumi, Igarashi Takeshi
Role of prolipoprotein diacylglyceryl transferase (Lgt) and lipoprotein-specific signal peptidase II (LspA) in localization and physiological function of lipoprotein MsmE in *Streptococcus mutans*

[学会発表](計6件)

井上朝日, 有本隆文, 五十嵐武
Streptococcus mutans のリポタンパク質 livK の同定
第50回歯科基礎医学会総会, Sep 24 2008, 東京

Arimoto T, Igarashi T
Role of Lgt and Lsp in maltose uptake mediated by *Streptococcus mutans* lipoprotein MalE
General 108th meeting of American Society for Microbiology, May 18 2008, Boston

有本隆文, 五十嵐武
Streptococcus mutans のリポタンパク質 MalE の局在性と機能解析
第81回日本細菌学会総会, Mar 25 2008, 京都

有本隆文, 五十嵐武
Streptococcus mutans の Lgt および Lsp の機能解析
The 55th Annual Meeting of the Japanese Association for Dental Research, Nov 17 2007, 鶴見

有本隆文, 深町はるか, 森崎弘史, 栗原華絵子, 樋場八裕, 五十嵐武
Streptococcus mutans のリポタンパク質修飾酵素 prolipoprotein diacylglyceryl transferase (Lgt) の機能解析
第49回歯科基礎医学会, Aug 30 2007,

札幌

Arimoto T, Igarashi T
Inactivation of prolipoprotein
diacylglycerol transferase (Lgt) gene
affects localization and function of
lipoprotein MsmE in *Streptococcus*
mutans
General 107th meeting of American
Society for Microbiology, May 23 2007,
Toronto

6 . 研究組織

(1)研究代表者

有本 隆文 (ARIMOTO TAKAFUMI)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：6 0 4 0 7 3 9 3

(2)研究分担者

(3)連携研究者