

令和 4 年 6 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10091

研究課題名(和文) 歯周病菌の病原因子分泌機構の解明と制御

研究課題名(英文) Control of the Protein secretion system of periodontal bacteria

研究代表者

佐藤 啓子 (Sato, Keiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授

研究者番号：70410579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* のタンパク質分泌装置 (Type IX secretion system: T9SS) はバクテロイデスフィラムに属する細菌に保存され、菌種によっては滑走運動にも関わる。T9SSからは病原因子が分泌され、T9SS構成分子欠損株では病原性が著しく低下する。T9SS分泌装置を構築するPorMについて構造・機能解析をおこなった。PorMは4つのドメインからなり、D1ドメインはモノマー、あとのD2-D4ドメインはダイマーを形成し、D1とD2ドメインの間には折れ曲がり構造があった。T9SSコア構造の1つであるPorMについて構造を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* はタンパク質分泌装置T9SSから、組織障害性プロテアーゼ、凝集素、リウマチに関与するとされるシトルリン化変換酵素等の様々な病原因子を含む、30のタンパク質を分泌する。また、他の主要歯周病関連菌の *Tannerella forsythia* や *Prevotella intermedia* のT9SSからは30-50のタンパク質が分泌される。このT9SSコア構造の1つであるPorMの構造を明らかにしたことにより、T9SS制御することにより歯周病を制御する薬剤の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：The type IX secretion system (T9SS) of the periodontopathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis* is conserved among bacteria belonging to the Bacteroides phylum and is involved in sliding motility in some species. We analyzed the structure and function of PorM, a component of the T9SS secretion apparatus, which consists of four domains: the D1 domain is a monomer, the D2-D4 domains form a dimer, and the D1 and D2 domains are folded between the D1 and D2 domains. We solved the structure of PorM, one of the core structures of T9SS of *P. gingivalis* by X-ray crystallography.

研究分野：細菌学

キーワード：歯周病細菌 タンパク質分泌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

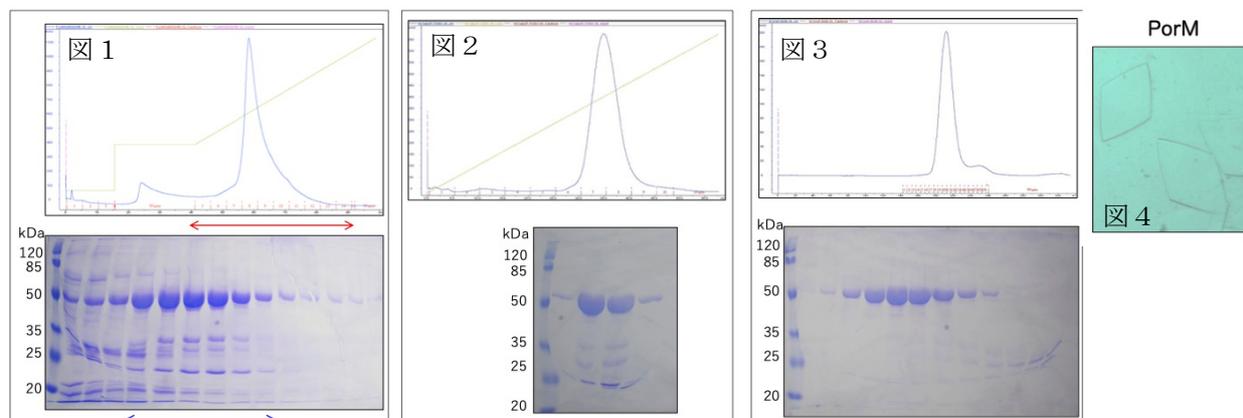
細菌のタンパク質分泌は病原性に直結するため、種々の病原菌で研究されてきた。歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* は強力な組織障害性プロテアーゼであるジンジパインを分泌する。ジンジパインは菌体表層、菌体外に存在する強力なプロテアーゼであり、自身も病原因子であるだけでなく、そのプロテアーゼ活性でもって、本菌の持つ赤血球凝集素、線毛等の他の病原因子の成熟にも深く関わる重要な病原因子である。ジンジパインを含む病原タンパク質分泌に関わる分泌装置 Type IX secretion system (T9SS) は数十のタンパク質で構成される装置で、菌種をまたいでよく保存されている。*P. gingivalis* からは、ジンジパインをはじめ、凝集素、リウマチに関わるとされるシトルリン化変換酵素等の様々な病原因子を含む、30種類のタンパク質が分泌される (Sato et al. 2013)。T9SS は *P. gingivalis* をはじめ、バクテロイデスフィラムに属する歯周病関連菌である *Tannerella forsythia* (Narita et al. 2014)、*Prevotella melaninogenica* (Kondo et al. 2018)、カプノサイトファーガ・カニモルサス感染症の原因菌である *Capnocytophaga canimorsus* 等の病原細菌にも保存され、病原性との関連が報告される。一方、T9SS はタンパク質分泌装置としてだけでなく、*Flavobacterium johnsoniae* では滑走運動装置としても機能している。

2. 研究の目的

T9SS の分泌装置は PorK, PorL, PorM, PorN をコア構造とする、12分子で構成される。12分子のうち、1分子でも変異すると T9SS のタンパク質分泌機能が失われ、分泌タンパク質は菌体内にプロ型タンパク質として蓄積される。PorK と PorN は外膜で複合体を形成していることが報告された (Gorasia et al. 2016)。PorM はコア複合体4分子の中で最も大きい分子であり、ペリプラズム空間を貫通し、外膜と内膜の分子と結合していると考えられている。PorM の結晶構造解析を行い、その構造を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

His タグ融合 *P. gingivalis* PorM リコンビナントタンパク質を大腸菌 BL21(DE3) を用いて発現し、Ni-アフィニティカラム (図1)、イオン交換クロマトグラフィー (図2)、ゲル濾過クロマトグラフィー (図3) を用いて精製した。結晶化条件をスクリーニングし、最適化をおこなった (図4)。Spring8 にて回折データを取得して、構造解析をおこなった。

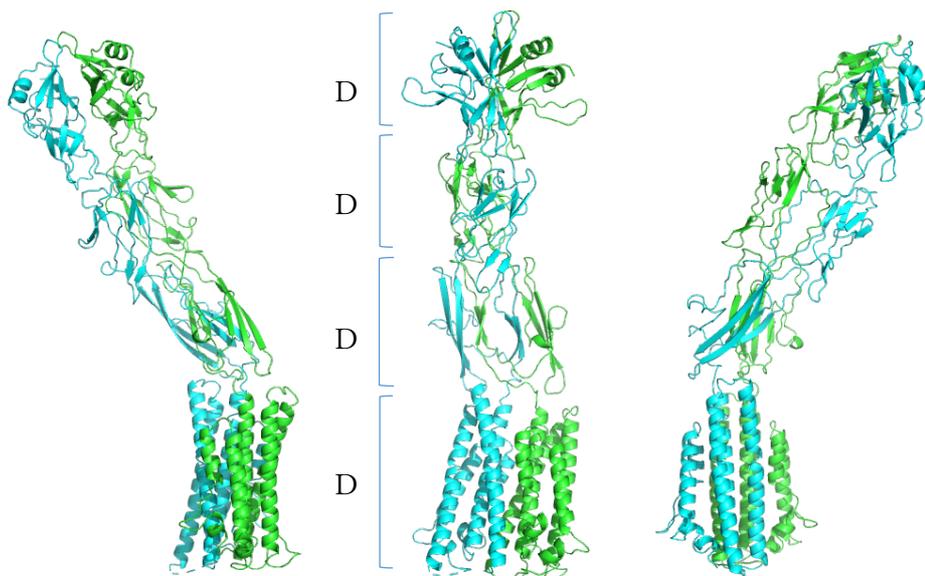


4. 研究成果

精製した PorM タンパク質は、ゲル濾過クロマトグラフィーで2量体に相当する分子量のところに溶出された。*P. gingivalis* の T9SS コア複合体の構成分子である PorM (GldM のオーソロ

グ) の分子構造を X 線結晶構造解析により解像度 3.8Å で解明した。PorM は4つのドメインからなり、D1 ドメインはモノマー、D2-D4 ドメインはダイマーを形成し、D1-D2 ドメインの間には折れ曲がり構造があった(図5)。PorM のオーソログタンパク質である、*F. johnsoniae* の GldM の構造との違いは、GldM は D1-D4 ドメインまで直線的な構造をしているのに対し、PorM には D1 と D2 ドメインの間の折れ曲がり構造が見られるという点にある(図6)。この折れ曲がり構造の安定化に重要とされるアミノ酸を置換すると、タンパク質分泌が低下することから、D1 と D2 ドメインの間の折れ曲がり構造は T9SS のタンパク質分泌機能発現に重要であることを明らかにした。

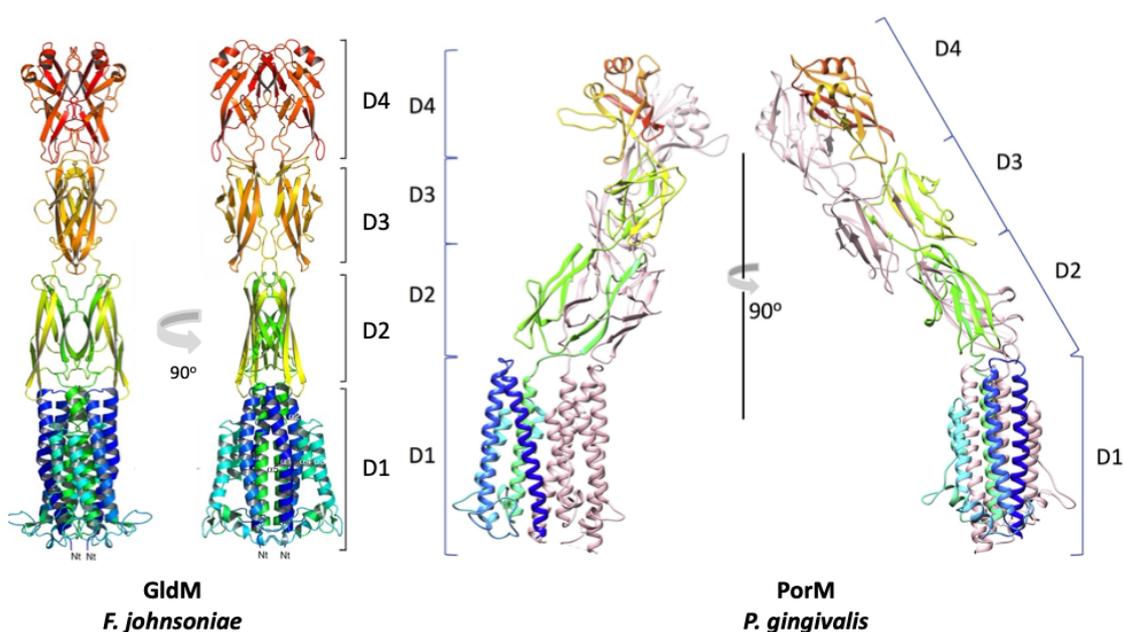
図5 Crystal structure of PorM from *P. gingivalis*



The four domains are labeled D1, D2, D3, and D4.

The domains are arranged vertically with a kink between domain 1 and 2.

図6 GldM と PorM の比較



Leone P et. al., Nat Commun. (2018)

Sato et. al., BBRC. (2020)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sato Keiko, Naya Masami, Hatano Yuri, Kondo Yoshio, Sato Mari, Nagano Keiji, Chen Shicheng, Naito Mariko, Sato Chikara	4. 巻 22
2. 論文標題 Biofilm Spreading by the Adhesin-Dependent Gliding Motility of <i>Flavobacterium johnsoniae</i> . 1. Internal Structure of the Biofilm	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1894 ~ 1894
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22041894	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 該当する
1. 著者名 Sato Keiko, Naya Masami, Hatano Yuri, Kondo Yoshio, Sato Mari, Narita Yuka, Nagano Keiji, Naito Mariko, Nakayama Koji, Sato Chikara	4. 巻 11
2. 論文標題 Colony spreading of the gliding bacterium <i>Flavobacterium johnsoniae</i> in the absence of the motility adhesin SprB	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 697
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-79762-5	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 -
1. 著者名 Sato Keiko, Okada Kodai, Nakayama Koji, Imada Katsumi	4. 巻 532
2. 論文標題 PorM, a core component of bacterial type IX secretion system, forms a dimer with a unique kinked-rod shape	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 114 ~ 119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.08.018	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 Keiko, Naya Masami, Hatano Yuri, Kasahata Naoki, Kondo Yoshio, Sato Mari, Takebe Katsuki, Naito Mariko, Sato Chikara	4. 巻 22
2. 論文標題 Biofilm Spreading by the Adhesin-Dependent Gliding Motility of <i>Flavobacterium johnsoniae</i> : 2. Role of Filamentous Extracellular Network and Cell-to-Cell Connections at the Biofilm Surface	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 6911 ~ 6911
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22136911	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤啓子、納屋昌実、近藤好夫、武部克希、内藤真理子、鈴木守、今田勝巳、石川岳志、佐藤主税、
2. 発表標題 歯周病細菌叢の病原性を抑える試み
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤啓子、大原健一、藤井亮吏、近藤好夫、中井雄大、林田秀明、和田崇之、内藤真理子
2. 発表標題 冷水病罹患アユからの <i>Flavobacterium</i> 属の分離
3. 学会等名 日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 主税，納谷 昌実，佐藤 真理，笠畑 尚喜，加藤 隆一，杉本 真也，佐藤 啓子
2. 発表標題 大気圧走査電子顕微鏡 ASEM と cryo-TEM による細菌のバイオフィルムの観察
3. 学会等名 日本電子顕微鏡学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Keiko Sato	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 11
3. 書名 Periodontal Pathogens	

〔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	佐藤 主税 (Sato Chikara) (00357146)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・上級 主任研究員 (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関