

平成22年3月31日現在

研究種目：若手研究（B）
研究期間：2008～2009
課題番号：20791341
研究課題名（和文） <i>Porphyromonas gingivalis</i> におけるヘミン結合性外膜蛋白の役割及びその輸送機構の解明
研究課題名（英文） Characterization of hemin-binding protein 35 (HBP35) in <i>Porphyromonas gingivalis</i> and analysis of its secretion mechanism
研究代表者 庄子 幹郎 (SHOJI MIKIO) 長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教 研究者番号：10336175

研究成果の概要（和文）：*Porphyromonas gingivalis* における HBP35 蛋白の性状解析：局在化、チオレドキシン活性、ヘム利用の役割

研究成果の概要（英文）：Characterization of hemin-binding protein 35 (HBP35) in *Porphyromonas gingivalis* : the cellular distribution, thioredoxin activity and role in hemin utilization

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：形態系基礎歯科学
 科研費の分科・細目：微生物学
 キーワード：歯周病細菌

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えつつある我が国において、生活習慣病としても認知されている疾患として歯周病が挙げられる。歯周病は細菌感染症であり、特に成人慢性歯周炎は冠動脈心疾患への促進作用をもたらすことが疫学的調査や動物実験等から明らかにされてきており、その病原性の重要度は口腔内感染症の中で

も上位に位置付けられている。成人慢性歯周炎の主要原因菌の一つとして、*Porphyromonas gingivalis* が認知されており、国内外多くの研究者により病原性機構の解明および免疫学的治療法の試みに取り組んでいる。

近年、豪州メルボルン大学のReynoldsグループが、本菌のGingipainを含めた多数の外膜蛋白には共通の

C-terminal domain を有していることを報告している (Seers CA *et al.*, J Bacteriol. 2006)。さらに、ポーランドの Potempa グループは RgpB 蛋白において C-terminal domain の最後の 5 個の塩基性アミノ酸を含む領域は正常な局在化に深く関与することを報告している (Nguyen KA *et al.*, J Bacteriol. 2007) ことから、C-terminal domain を含む外膜蛋白は一つのオーセンティックな輸送機構で輸送されると推測されているが、未だその全体像は明らかではない。

C-terminal domain を持つ蛋白の輸送機構の解析としては、これまで Gingipain の一つである RgpB を用いてよく研究されている。抗 RgpB 抗体を用いて、本菌の外膜画分を免疫染色すると、高分子に Diffuse な抗体反応分子が検出される。現在、その高分子抗体反応産物は RgpB 蛋白が糖鎖修飾されているものと考えられている (Rangarajan M *et al.*, Infect Immun. 2005)。また、C-terminal domain を欠失すると RgpB の高分子抗体反応産物認められなくなることから、C-terminal domain は正常な輸送経路に重要なことならびに糖鎖を介した細胞表面へのアタッチメントに関与することが示唆されている。

英国の Curtis グループは、Gingipain の一つである RgpA の酵素ドメインを抗原としてマウスモノクローナル抗体を作製し、その一つ mAB1B5 は細胞表面糖鎖 (Anionic Polysaccharide) 中の Phosphorylated branched mannan を認識することを報告している (Paramanov N *et al.*, Mol Microbiol. 2005)。我々は、血液寒天培地上で本菌の黒色素形成の減弱した変異株を分離し、その原因遺伝子の一つである *porR* は糖鎖合成に関わる酵素に相同性があることを見出し、その変異株は細胞表面上に局在すべき Gingipain 酵素が培養上清中に放出され、また本菌の whole cell lysate に対して mAB1B5 は全く認識されないことを報告した (Shoji M *et al.*, Microbiology 2002)。米国の Fletcher のグループも *porR* 変異株と同様な表現型を示す *vimA* 遺伝子を見出している (Ababou H *et al.*, Infect Immun. 2001)。さらに我々は、Gingipain 酵素が全く活性化しない変異株 (*porT*) を見出し、その変異

株では Gingipain をコードする遺伝子産物がペリプラスム中で未成熟型として蓄積し、正常な外膜への輸送が不全状態になっていることを報告した (Sato K *et al.*, J Biol Chem. 2005)。最近、日本大学歯学部 of 古西博士のグループも *porT* 変異株と同様な表現型を示す *sov* 遺伝子を見出しており、両遺伝子産物がペリプラスム画分にて協調して Gingipain の正常な輸送に関わるのではないかと推測している (Saiki K *et al.*, Microbiol Immunol. 2007)。

C-terminal domain を含む外膜蛋白の一つに HBP35 蛋白がある。HBP35 蛋白をコードする遺伝子は日本大学松戸歯学部の安孫子博士らによりクローニングされ、その抗体は本菌の外膜および vesicle 画分に対し、高分子に Diffuse な抗体反応分子を検出する (Abiko Y *et al.*, Arc Oral Biol. 1990)。HBP35 蛋白は 344 アミノ酸からなる本菌特有の蛋白であり、C 末領域 (80 アミノ酸) に C-terminal domain を有し、興味深いことに N 末領域に Thioredoxin like domain を有している。Thioredoxin like domain は細胞におけるレドックス制御に関わる領域であり、細菌にてそのドメインを持つ蛋白は細胞質もしくはペリプラスム画分にあることが知られている。しかしながら、Thioredoxin like domain を持つ蛋白が外膜画分に存在するのは珍しく、本菌の HBP35 蛋白と本菌に近縁な *Prevotella intermedia* (Yu F *et al.*, Proteomics. 2007) のみ報告されている。したがって、その局在化の生物学的意義については未だ不明である。また HBP35 蛋白の機能として、*Actinomyces viscosus* に対する凝集能、

(Hiratsuka Y *et al.*, Arch Oral Biol. 1992) やヘミン結合能 (Shibata Y *et al.*, BBRC. 2003) が報告されている。さらに近年、HBP35 蛋白に対する Human モノクローナル抗体は、マウスを用いた歯周病感染モデルにおいて歯槽骨の吸収を抑制することが報告され、HBP35 蛋白は細菌表面抗原であることおよび病原性因子である可能性も示唆されている (Hamada N *et al.*, J Periodontol. 2007)。

しかしながら、HBP35 蛋白に対する研究は、組換え蛋白を用いた生化学的な解析は詳細に行われている

ものの、本菌における遺伝学的解析は未だ不十分なことから、HBP35 蛋白をコードする遺伝子変異株作製および性状解析を行うことによりその役割を解明することならびに C-terminal domain 含有蛋白の新規輸送機構の解明にも貢献できることから本研究を着想した。

2. 研究の目的

本菌は血液寒天培地上で黒色素を形成し、それに関わる重要な遺伝子は *kgp* であることから、我々は黒色素形成減弱株の分離により C-terminal domain 含有外膜蛋白が適切に局在化することに関わる分子を見出している。*porR* 遺伝子は糖鎖合成に関わる分子と相同性があり、その変異株では糖鎖修飾型の RgpB が検出されないことならびに本来外膜表面上にあるべき Gingipain 活性が培養上清中に見出されることから Gingipain は糖鎖を介してアンカーされることを報告している。また *porT* 変異株は Gingipain 活性が全くなく、ペリプラスム中に Gingipain 分子が蓄積し、Gingipain の正常な輸送に関わることを示唆した。HBP35 蛋白も C-terminal domain を含有し、高分子に Diffuse な抗体反応分子が検出されることから上記の変異株を用いることにより、Gingipain と同様の外膜輸送機構によるのか否かを検討することができる。これまで C-terminal domain 含有外膜蛋白の輸送機構については Gingipain のみであることから、他の C-terminal domain 含有蛋白である HBP35 蛋白の輸送機構を解析することは、PorT を介した外膜蛋白輸送が Gingipain 特異的なのかもしくは General に輸送されるのかを明らかにすることができると考えている。また、HBP35 蛋白は N 末に Thioredoxin like domain を有すること、*hbp35* 遺伝子は細胞質内で二種の翻訳産物 (Full length product-40 kDa 蛋白、truncated-27 kDa 蛋白) を産生する可能性があること、また、*rgpB* 遺伝子産物の殆どが外膜面に認められるのに対し、HBP35 蛋白の Full length product-40 kDa は細胞質、内膜、外膜面全てに認められることなど、*hbp35* 遺伝子産物は多機能的な役割を果たしている可能性が

ある。したがって、*hbp35* 遺伝子変異株作製により、酸化ストレス防御因子としての役割の有無、ヘミン含有もしくはヘミン非含有培地条件下による増殖能の差異を評価することにより、本菌における遺伝子の役割を明らかにすることができる。

3. 研究の方法

hbp35 遺伝子において、N 末にある Thioredoxin domain 直下の部位に薬剤耐性遺伝子を挿入した *hbp35Ins* 変異株ならびに *hbp35* 遺伝子 ORF 領域を欠失した $\Delta hbp35$ 変異株を既に作製している。抗 HBP35 ポリクローナル抗体 (日本大学松戸歯学部柴田恭子博士より恵与) は、野生株の Cell Lysate に対して 3 つの分子 (Diffuse 50-90 kDa, 40-kDa, 27-kDa) を検出する。一方、 $\Delta hbp35$ 変異株はそれらの分子は全く検出されない。しかしながら、*hbp35Ins* 変異株は、27 kDa 蛋白のみ検出されたことから、*hbp35* 遺伝子は 2 種の翻訳産物を産出する可能性がある。27-kDa 蛋白が *hbp35* 遺伝子産物由来であるか否かを明らかにする為にペプチドマッピングによる分子の同定を試みる。

27-kDa 蛋白が予想通りに *hbp35* 遺伝子産物である場合、内在性開始コドンの同定を部位特異的変異導入法により試みる。さらにその翻訳産物はサイズの異なる 2 つの mRNA より産生されるのか、もしくは 2 つの Ribosome binding site を利用して異なる翻訳分子を産生しているのかを明らかにする為に、Northern 解析にて *hbp35* 遺伝子転写産物の同定を試みる。

27-kDa 蛋白が予想通りに *hbp35* 遺伝子産物である場合、27-kDa 蛋白にもヘミン結合能があるか否かを明らかにする為に、組換え蛋白を用いたヘミン結合能の解析を試みる。

HBP35 蛋白が Thioredoxin としての機能を有するか否かを明らかにする為に、精製 HBP35 蛋白、Insulin、及び DIT を用いて、分光高度計にて還元型 Insulin の増大度により Thioredoxin 活性の有無を判定する。

HBP35 蛋白が酸化ストレス防御因子としての役割を担っているか否かを明らかにする為に、野生株及び変異株を用いて、各種酸化ストレス (Air shake, 過酸

化水素, Diamide, Cumen Hydroperoxide, t-butyl Hydroperoxide) に対する感受性に差があるか否かを検討する。

C-terminal domain の最後の5個の塩基性アミノ酸を含む領域は正常な局在化に深く関与することを報告していることから、同様に HBP35 蛋白においても C-terminal domain の最後の5個のアミノ酸領域を欠失した変異株を作製した場合、正常な局在化に影響するか否かを検討する。

4. 研究成果

抗 HBP35 抗体は、*P. gingivalis* ATCC33277 株にて diffuse 50-90 kDa, 40-kDa, 27-kDa 蛋白を検出した。そのうち、27-kDa 蛋白は、免疫沈降による精製産物の PMF 解析と部位特異的アミノ酸置換発現解析より、135 番目の Methionine から開始される蛋白であった。また、*hbp35* 遺伝子は Northern 解析により、monocistronic な 1.1 kb の転写産物を産生していた。このことは、プロモーターは一つで、リボソーム結合部位が複数あることを示唆している。

組換え蛋白を調製し、40-kDa、27-kDa 蛋白はヘミン染色による解析で、共にヘミンに結合していた。Cell fractionation 解析より、27-kDa 蛋白は細胞質内に局在していたことから、Bacterioferritin に類似のヘミン貯蔵の役割を果たしているかもしれない。

組換え 40-kDa 蛋白は、インシュリン還元反応によるチオレドキシンの活性が陽性であった。また、active site である 48 番目と 51 番目のシステインをそれぞれアラニンに置換した組換え蛋白は全くチオレドキシンの活性が見られなかった。

HBP35 蛋白が酸化ストレス防御因子としての役割を担っているか否かを明らかにする為に、野生株及び変異株を用いて、各種酸化ストレス (Air shake, 過酸化水素, Diamide, Cumen Hydroperoxide, t-butyl

Hydroperoxide) に対する感受性を disk inhibition assay を用いて検討したが、有意な差は得られなかった。また、酸素ストレスによる Colony forming ability を計測したが、積極的に HBP35 蛋白が酸化ストレスとして機能しているという結果は得られなかった。

一方、ヘミン制限培地による増殖能には、相補性試験により、部分的に回復する結果が得られた。このことは、HBP35 蛋白はヘミンの利用、獲得に関与していると示唆された。

Diffuse HBP35 蛋白に関する知見として、

C-terminal domain の最後の5個のアミノ酸領域を欠失する蛋白を発現する変異株作製に成功し、その株では、Diffuse bands は検出されず、輸送の途中で蛋白分解が起こり、およそ 30-kDa の分子が検出された。また、免疫沈降にて精製した産物で、Diffuse bands は anionic polysaccharide を認識する抗体にて検出された。さらに、変異株を用いた解析から、Diffuse bands は PorT 依存性に輸送され、PorR 依存性に糖鎖と結合していることが半明した。これらのことから、Diffuse bands は糖蛋白であることが示唆された。

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 4 件)

1. A protein secretion system linked to bacteroidete gliding motility and pathogenesis.

Sato K, Naito M, Yukitake H, Hirakawa

H, Shoji M, McBride MJ, Rhodes RG,

Nakayama K. **Proc. Natl. Acad. Sci.**

U. S. A. 第 107 巻 276-281 項 2010 年

2. Identification of a Gingipain-Sensitive Surface Ligand of *Porphyromonas gingivalis* that Induces TLR2- and TLR4-Independent NF- κ B Activation in CHO Cells.

Haruyama K, Yoshimura A, Naito M, Kishimoto M, Shoji M, Abiko Y, Hara Y, Nakayama K. **Infection and Immunity** 第77巻 4414-4420項 2009年

3. Proteome analysis of *Porphyromonas gingivalis* cells placed in a subcutaneous chamber of mice.

Yoshimura M, Ohara N, Kondo Y, Shoji M, Okano S, Nakano Y, Abiko Y, Nakayama K.

Oral Microbiology and Immunology 第23巻 413-418項 2008年

4. Determination of the genome sequence of *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 and genomic comparison with strain W83 revealed extensive genome rearrangements in *P. gingivalis*.

Naito M, Hirakawa H, Yamashita A, Ohara N, Shoji M, Yukitake H, Nakayama K, Toh H, Yoshimura F, Kuhara S, Hattori M, Hayashi T, Nakayama K.

DNA Research 査読有 第15巻 215-225項 2008年

[学会発表] (計 6件)

1. *Porphyromonas gingivalis*における外膜蛋白の輸送機構の解析

庄子幹郎, 佐藤啓子, 成田由香, 雪竹英治, 内藤真理子, 中山浩次

日本細菌学会・若手コロセウム (III) 2009年 於 宮崎

2. *Porphyromonas gingivalis* HBP35 protein is transported to the outer membrane by the PorT-dependent system and is involved in hemin utilization

Mikio Shoji, Yasuko Shibata, Teruaki Shiroza, Hideharu Yukitake, Benjamin Peng, Yu-Yen Chen, Keiko Sato, Mariko Naito, Yoshimitsu Abiko, Eric C. Reynolds, Koji Nakayama Gordon research conference 2009年 於 ニューハンプシャー

3. *Porphyromonas gingivalis*のC-terminal domain (CTD) familyにおけるCTDの役割

庄子幹郎、佐藤啓子、成田由香、雪竹英治、内藤真理子、中山浩次

Journal of Oral Biosciences 第51巻 122項 2009年 於 新潟

4. *P. gingivalis*におけるHBP35蛋白の局在化機構

庄子幹郎、佐藤啓子、雪竹英治、内藤真理子、中山浩次

Japanese Journal of Bacteriology 第64巻 158項 2009年 於 愛知

5. Identification of binary proteins produced from *Porphyromonas gingivalis* *hbp35* gene.

Mikio Shoji, Yasuko Shibata, Teruaki Shiroza, Hideharu Yukitake, Keiko Sato, Mariko Naito, Yasumitsu Abiko, Koji Nakayama

Journal of Oral Biosciences 第50巻 211項 2008年 於 東京

6. *Porphyromonas gingivalis*における外膜蛋白HBP35の発現、機能、輸送機構の解析
庄子 幹郎 日本細菌学会・第2回若手コロセウム 2008年 於 湘南

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者

庄子 幹郎 (SHOJI MIKIO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10336175

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：