

機関番号：17301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791793

研究課題名（和文）バクテロデスフィラムに位置する細菌の菌体外蛋白質分泌機構の解明

研究課題名（英文）

研究代表者

佐藤 啓子 (SATO KEIKO)

長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：70410579

研究成果の概要（和文）：細菌の病原因子の多くは、細菌のもつ分泌機構により分泌される分泌タンパク質である。従って、細菌の分泌装置の制御は病原性の制御につながることから、様々な病原細菌において分泌装置の解析が行われてきた。本研究では、これまで未知であった、ポルフィロモナスジンジバリスを代表とする歯周病原細菌の分泌装置関連分子を明らかにするとともに、その分泌装置の発現調節に関わる分子をも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：*Porphyromonas gingivalis* is an oral anaerobic Gram-negative bacterium, which is implicated in periodontal pathogenesis. Most of proteolytic activity of extracellular and cell-surface proteinase are derived from cysteine proteinase named gingipains. We found a novel protein secretion system in bacteria of the phylum *Bacteroidetes*, which is responsible for secretion of virulence factors such as gingipain proteinases produced from the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis* and is linked to bacteroidete gliding motility that is distinct from other well-studied forms of bacterial movement.

交付決定額

（金額単位：1000 円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
平成 22 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

慢性歯周炎は感染性疾患であり、原因微生物は偏性嫌気性グラム陰性細菌とみなされている。バクテロイデスフィラムに位置するグラム陰性偏性嫌気性細菌 *Porphyromonas gingivalis* は最も代表的な歯周病細菌であり、様々な病原因子を持つ。なかでも、菌体表面、菌体外に存在する強力なプロテアーゼ

であるジンジパイン（ペプチド切断部位特異性の異なる Arg-gingipain (RgpA, RgpB) と Lys-gingipain (Kgp) がある）は自身も病原因子となるだけでなく、そのプロテアーゼ活性でもって、本菌の持つ凝集素、線毛などの他の病原因子の成熟にも深く関わる。*Porphyromonas gingivalis* は既知の分泌装置をゲノム上にコードしておらず、ジンジパ

インの分泌機構はこれまでに報告されているものとは異なることが予測された。他菌種とのベン図解析および遺伝学的手法から、新規の Por 分泌機構(PorSS)を用いていることが明らかとなった。この分泌機構はバクテロイデスフィラム (*Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroides* グループ)の *Flavobacterium johsoniae* 細菌の滑走運動に関わる装置と類似性があり、病原性への関与という点だけでなく、生物学的にも大変興味深い分泌機構と思われる。

2. 研究の目的

(1) 歯周病菌 *P. gingivalis* の PorSS について
本研究の目的はジンジパインが輸送経路で、どのようなプロセスを受け、どの段階で活性を獲得するのかを明らかにしていくとともに、PorSS をバクテロイデスフィラムの代表的分泌機構として、輸送システムの構成因子、基本的構造を明らかにすることを研究目的とする。

(2) 滑走運動菌 *F. johsoniae* について

PorSS のオーソログ遺伝子は *F. johsoniae* にも存在し、それらは滑走運動に関わることが分かっていた。これらの滑走能欠損株ではキチナーゼ活性の低下もみられるが、これはキチナーゼの分泌低下によるものか解析をおこなう。バクテロイデスフィラムに保存される PorSS の基本的構造・機能を明らかにするため、タンパク質分泌と滑走運動の関係性についても解析をおこなう。

3. 研究の方法

(1) 歯周病菌 *P. gingivalis* の PorSS について
トランスポゾン・ミュータジェネシスを用いて、ジンジパイン分泌に関わる分子として *PorT* を同定した。*P. gingivalis* が属するバクテロイデスフィラム内での他菌種とのベン図解析および遺伝学的解析から新たに 10 分子がジンジパイン輸送に関わる分子が明らかとなった。このうち、two component system の response regulator および sensor histidin kinase に相同性のある 2 分子 PorX, および PorY について変異株を作製し、野生株とのマイクロアレイ解析を比較することにより、どの遺伝子発現の発現に関与しているのか明らかにした。それ以外の PorP, PorK, PorL, PorM, PorN, PorQ, PorU, PorW を含め、各々変異株についてジンジパインを測定するとともに、PorP, PorK, PorL, PorM, PorN 分子については抗体を作製し、菌体内局在解析をおこなった。

(2) 滑走菌 *F. johsoniae* の PorSS について
porT 遺伝子のオーソログ遺伝子 *sprT* について、*F. johsoniae* で変異株を作製し、滑走

運動能、キチナーゼ分泌に影響を与えるかどうかを検討した。野生株と *gldT* 変異株の培養上清タンパク質を SDS-PAGE に泳動、クマシーブリリアントブルー (CBB) 染色し、野生株にあり、*gldT* 変異株ではみられないタンパク質バンドについて質量分析を用いてタンパク質を同定した。

4. 研究成果

(1) 歯周病菌 *P. gingivalis* の PorSS について
以前、血液寒天培地上で白色集落を形成する *porT* 変異株の解析をおこなった。*porT* 変異株は Rgp および Kgp 活性ともほとんど検出されず、菌体内にシグナル領域を除く、高分子量 (180 Kda) のジンジパイン前駆体が蓄積していることから、PorT タンパクはジンジパインのメンブレントラフィッキングに関与することが示唆された。この遺伝子のオーソログは近縁の *Bacteroides* 属には存在せず、*Cytophaga hutchinsonii*, *Flavobacterium johsoniae* には存在する。そこで、*P. gingivalis*, *Cytophaga hutchinsonii*, *Bacteroides thetaiotaomicron* の 3 菌種の全 ORF についてベン図解析を行った (図 1)。

図 1

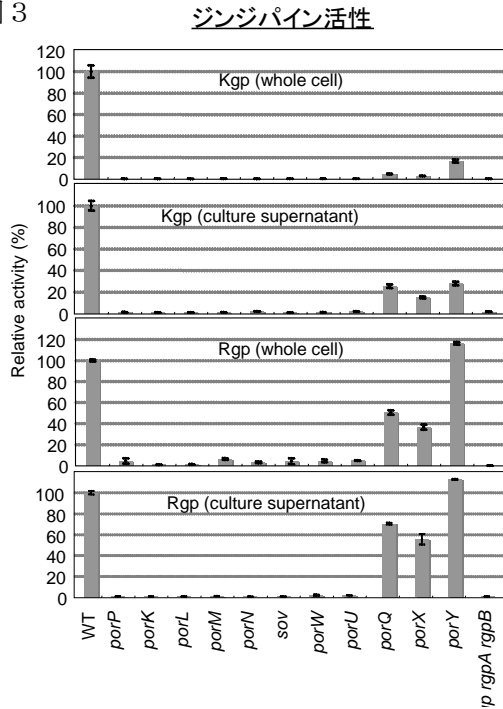
PorT 遺伝子が含まれる領域の 56 ORF について変異株作成を試み、血液寒天培地上で白色集落を形成する変異株を 10 株得た (図 2)。
図 2

PGN	Putative function	<i>F. johsoniae</i>
0022	Conserved hypothetical protein	Fjoh1556
0645	Conserved hypothetical protein	Fjoh2755
0832	Gliding motility protein SprA	CFjoh1653 <i>sprA</i>
1019	Response regulator	Fjoh2906
1674	Gliding motility protein GldM	Fjoh1855 <i>gldM</i>
1675	Gliding motility protein GldL	Fjoh1854 <i>gldL</i>
1676	Gliding motility protein GldK	Fjoh1853 <i>gldK</i>
1677	Conserved hypothetical protein	Fjoh3477
1877	Gliding motility protein SprE	Fjoh1051 <i>sprE</i>
2001	Sensor histidine kinase	Fjoh1592

これらには (a) two-component system 関連遺伝子、(b) *C. hutchinsonii* の滑走運動関連遺伝子オーソログ遺伝子群が含まれており、いずれの変異株においてもジンジパイン活性

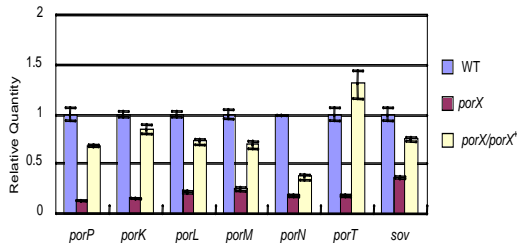
が低下していた(図3)。特に *C. hutchinsonii* の滑走運動関連遺伝子オーソログ遺伝子変異株においては *P. gingivalis* *porT* 遺伝子変異株と同様にジンジパイン活性が殆ど検出されず、高分子量ジンジパイン前駆体の蓄積がみられ、ジンジパインの輸送分泌に関わることが示唆された。

(a) two-component system 関連遺伝子
タイリングマイクロアレイを用いて、野生株およびレスポンスレギュレーター *porX* 変異株の遺伝子発現を比較したところ、*porX* 変異株で野生株と比較して、2倍以上発現が低下しているものの中には、*porT* を含め、*C. hutchinsonii* の滑走運動関連遺伝子オーソログ遺伝子が含まれていた。リアルタイム



PCR においてもこのことが確認された(図4)。*porX* を含めた調節系により、ジンジパイン分泌機構の発現調節がおこなわれていることが示唆された。

図4 リアルタイム PCR



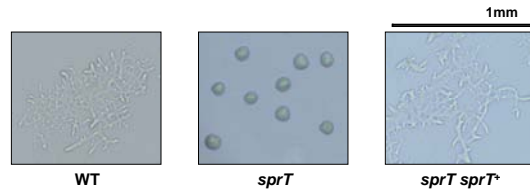
(b) *C. hutchinsonii* の滑走運動関連遺伝子オーソログ遺伝子群
これらは全て膜タンパク質であった。とくに、

porK, *porL*, *porM*, *porN* 遺伝子はクラスターを形成していることから、お互い何らかの関わりを持って機能していることが示唆された。BN-PAGE 解析および LC-MSMS 解析から、PorK, PorL, PorM, PorN は界面活性剤(1% DDM)に抵抗性の高分子複合体を形成することが示された。

(2) 滑走菌 *F. johnsoniae* の PorSS について

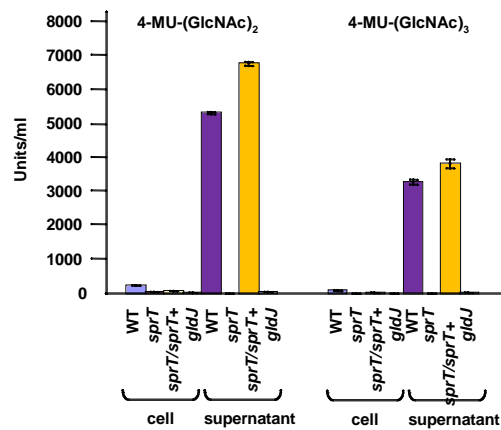
C. hutchinsonii にみられる滑走運動関連遺伝子群は *F. johnsoniae* にも存在し、*F. johnsoniae* ではこれら遺伝子群の変異株についての解析が多数報告されている。そこで、逆に *F. johnsoniae* において *porT* オーソログ遺伝子 (*sprT*) 変異株を作製し、*F. johnsoniae* の滑走運動能を観察したところ、*F. johnsoniae* *sprT* 変異株では滑走運動能が失われ、この変異株に *sprT* 遺伝子を相補させた株では滑走運動能が回復した(図5)。

図5 栄養飢餓培地上での滑走運動



また、*F. johnsoniae* の滑走能欠損株および *sprT* 変異株のキチナーゼ活性を比較したところ、*sprT* 変異株ではキチナーゼ活性が低下していた(図6)。

図6 キチナーゼ活性

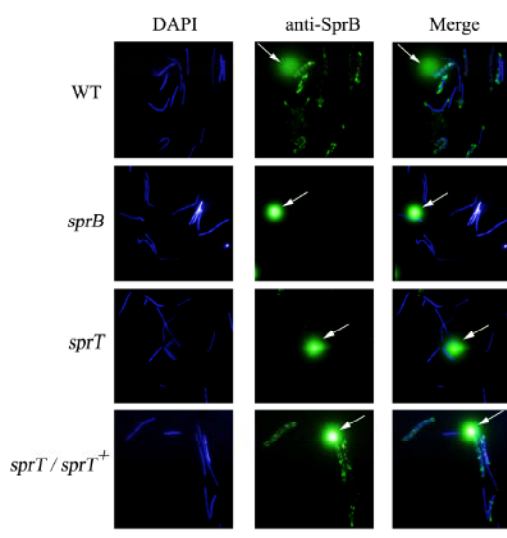


また、上記2株において培養上清中のタンパク質を SDS-PAGE および質量分析により比較したところ *sprT* 変異株ではキチナーゼをはじめ、滑走運動に関わる SprB のタンパク質が検出されなかった(図7)。キチナーゼ活性の低下はキチナーゼタンパク質の分泌の低下によるものであることが分かった。SprB は菌体表層に局在し、滑走運動に関わること

が分かっている分子である。 *sprT* 変異株において、SprB が菌体表層に局在しているか、抗体を蛍光色素で標識し、蛍光顕微鏡下で観察した (図 8)。

また、PorK, PorL, PorM, PorN のオーソログをもち、これらの分子は *F. johnsoniae* においてもキチナーゼタンパク質および滑走運動関連分子のタンパク質分泌に関わっていることが示唆された。PorSS は *Bacteroides phylum* に属する菌に見られるシステムであり、この分泌装置の制御は *Bacteroides phylum* に属する他の病原細菌の制御にも応用できるものと考えられる。

図 8



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 6 件)

Yukitake H, Naito M, Sato K, Shoji M, Ohara N, Yoshimura M, Sakai E and Nakayama K. : Effects of non-iron metalloporphyrins on growth and gene expression of *Porphyromonas gingivalis*. (共著) ~ *Microbiology and Immunology* ~ 55 巻 3 号 141 頁 ~ 153 頁 ~ 2011 年 03 月

Yamaguchi M, Sato K, Yukitake H, Noiri Y, Ebisu S, and Nakayama K: *Porphyromonas gingivalis* mutant defective in a putative glycosyltransferase exhibits defective biosynthesis of polysaccharide portions of lipopolysaccharide, decreased gingipain activities, strong autoaggregation and

increased biofilm formation. (共著) ~ *Infection and Immunity* ~ 78 巻 9 号 3801 頁 ~ 3812 頁 ~ 2010 年 09 月

Kondo Y, Ohara N, Sato K, Yoshimura M, Yukitake H, Naito M, Fujiwara T, and Nakayama K : Tetratricopeptide repeat protein-associated proteins contribute to the virulence of *Porphyromonas gingivalis*. (共著) ~ *Infection and Immunity* ~ 78 巻 6 号 2846 頁 ~ 2856 頁 ~ 2010 年 06 月

Shoji M, Shibata Y, Shiroza T, Yukitake H, Peng B, Chen Y-Y, Sato K, Naito M, Abiko Y, Reynolds EC, and Nakayama K : Characterization of hemin-binding protein 35 (HBP35) in *Porphyromonas gingivalis*: its cellular distribution, thioredoxin activity and role in heme utilization (共著) ~ *BMC Microbiology* ~ 10 巻 152 頁 ~ 2010 年 05 月

Sato K, Naito M, Yukitake H, Hirakawa H, Shoji M, McBride MJ, Rhodes RG, and Nakayama K : A protein secretion system linked to bacteroidete gliding motility and pathogenesis. (共著) ~ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* ~ 107 巻 276 頁 ~ 281 頁 ~ 2010 年 01 月

Hasegawa Y, Iwami J, Sato K, Park Y, Nishikawa K, Atsumi T, Moriguchi K, Murakami Y, Yoshimura F : Anchoring and length regulation of *Porphyromonas gingivalis* Mfa1 fimbriae by the downstream gene product Mfa2. (共著) ~ *Microbiology* ~ 155 巻 10 号 3333 頁 ~ 3347 頁 ~ 2009 年 10 月

[学会発表] (計 1 件)

佐藤啓子、雪竹英治、内藤真理子、庄子幹郎、中山浩次 *Gliding and Secretion of Flavobacterium johnsoniae*. 第 83 回日本細菌学会総会 2010 年 3 月

佐藤啓子、内藤真理子、雪竹英治、庄子幹郎、中山浩次 *バクテロイデーテス細菌におけるタンパク分泌、滑走運動および病原性* 第 52 回歯科基礎医学会 (学術大会ならびに総会) 2010 年 9 月

[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

佐藤 啓子 (SATO KEIKO)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号：70410579

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：