

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2010～2011

課題番号：22890142

研究課題名（和文）ポルフィロモナスジンジバリスの新奇病原因子 Tap が病態形成に及ぼす影響

研究課題名（英文）Effect of the novel virulence factor Tap in virulence of *Porphyromonas gingivalis*

研究代表者

近藤 好夫 (KONDO YOSHIO)

長崎大学・病院・医員

研究者番号:30581954

研究成果の概要（和文）：歯周病細菌であるポルフィロモナスジンジバリスの病原因子は既に幾つかの有力なものがこれまでに報告されているが、まだ多くの病原因子が存在している。私たちはプロテーム解析の結果から *tprA* に着目しその変異株を作製した。*tprA* 変異株をマウスに接種したところ病変形成率が著明に低下していたことから、*tprA* が病原性に関与する蛋白であることが示唆された。また *tprA* は *tapA*, *tapB*, *tapC* と協調して病原性に関わると思われるが、それぞれの蛋白質については詳細な報告がなく、機能は不明である。そこで *TapA*, *TapB*, *TapC* に焦点を置き、これらの機能あるいは発現制御機構について解析を行い、*P. gingivalis* の病態形成における役割について検討した。

研究成果の概要（英文）：*Porphyromonas gingivalis* is one of the most etiologically important microorganisms in periodontal disease. We reported in a previous study that a *tprA* mutant was clearly less virulent in the mouse subcutaneous abscess model and that *tprA* is involved in virulence of *P. gingivalis*. Although *TprA*, *TapA*, *TapB* and *TapC* proteins seem to be cooperatively involved in *P. gingivalis* virulence, functions of these proteins are not certain. Then we investigated the role of *TapA*, *TapB* and *TapC* in *P. gingivalis* virulence through analysis of functions and gene expressions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,090,000	327,000	1,417,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,290,000	687,000	2,977,000

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：歯学、細菌、歯周病、*Porphyromonas gingivalis*

1. 研究開始当初の背景

偏性嫌気性菌 *Porphyromonas gingivalis* は最も有力な歯周疾患の原因菌であると考えられている。本菌の主要な病原因子はすでに線毛、各種プロテアーゼ、莢膜、内毒素 (LPS) などが知られている。しかし未知の病原因子の

存在を含め、病原因子全体については不明な点が多いと考えられる。本菌のなかでも強毒株とされる W83 株の全ゲノム配列が発表され、これにより本菌の性状をゲノムワイドに調べる事が可能になった。そこで *P. gingivalis* の新たな病原因子を明らかにし、さらにそれ

らの病原因子の相互作用を解析する研究を立ち上げた。

まずマウスに接種した菌と培地で培養した菌について、それぞれの菌体蛋白質を2次元ゲル電気泳動法で展開し、プロテオーム解析を行った。その結果、TprAは宿主内で発現が上昇する蛋白質であることを明らかにした。さらにマウス膿瘍試験において *tprA* 変異株の病変形成率は低下しており、TprAは病原性に強く関与していることが示唆された。

(Yoshimura *et al.*, Oral. Microbiol. Immun., 23: 413-418)。

そこで、*tprA* 変異株の遺伝子発現パターンを調べるためにマイクロアレイを行い野生株のパターンと比較した。Genco らの方法に準じて菌体を一定時間感染させたのち、回収した菌体より得られた mRNA を用いて解析を行った。その結果、*tprA* 変異株はマウス体内において、*tapA*, *tapB*, *tapC* の発現が著明に減少していることが分かった。

また TprA には TPR ドメインが3つ存在し、このドメインは他の蛋白質と結合することが知られている。TprA は他に機能的なモチーフをもたないこと、ペリプラズムに局在することから、TprA は他のペリプラズム蛋白あるいは膜蛋白と結合し機能発現すると考えられた。実際にリコンビナント蛋白を用いて免疫沈降法や Biacore で分子間相互作用を解析した結果、TprA とペリプラズム蛋白である TapB に特異的な結合が認められた。同様に TprA と膜蛋白である TapA についても解析し特異的な結合が確認できた。しかし TapC に関してはリコンビナント蛋白を得ることができなかったため、これらの解析を行うことができなかったが、推定アミノ酸配列より TapA と TapC は相同性が高く同様の機能を持つものと考えられる。

さらに TapA, TapB, TapC の病原性への関与を検討するため、それぞれの遺伝子変異株を作製し、マウスに接種した。特に *tprA* 変異株と *tapA-tapB-tapC* 三重変異株の死亡率は著しく低下しており、これまでの結果から TprA は TapA, TapB, TapC と協調して病原性に関与していることが示唆された (Kondo *et al.*, Infect. Immun., 78; 2846-2856)。

また TapA および TapC は CTD family protein であることが報告されている。近年、CTD については数多くの研究がなされ、CTD family protein は *P. gingivalis* の新規蛋白分泌機構

(Por secretion system, Sato *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 107: 276-281) によって分泌され、糖鎖修飾を介して菌体表面に局在すると考えられている。私たちのこれまで研究結

果もこれらの事と一致している。さらに病原性蛋白の多くはこの CTD family protein であることも報告されている。そのため TapA および TapC は直接的に病原性に関わる新規病原因子であると考えられる。しかし、これまでに TapA および TapC に関する詳細な報告はなく、そこで本研究では

1. TapA および TapC が宿主に与える影響について

2. *tapA*, *tapB*, *tapC* の発現制御機構についてこれらのことを中心に解析し、*P. gingivalis* における病態形成について検討を行う。

2. 研究の目的

(1) TapA, TapB, TapCの機能解析

特に TapA, TapC については菌体表層に局在する蛋白で宿主細胞に直接的に作用するものと考えられる。まず、マクロファージ系の細胞を用いて、野生株とこれらの遺伝子変異株の抗食能、抗殺菌能について調べる。また上皮細胞への接着性や侵入性を調べる。これらとともに TapA, TapC の精製蛋白を用いて細胞を刺激する。刺激後の細胞からサイトカインの産生量や接着分子の発現量を測定し、炎症との関与について検討する。

(2) TapA, TapB, TapC発現制御機構の解明

tprA 変異株ではこれらの遺伝子群の発現が減少しているとともに、転写因子であるシグマ因子 ($\sigma 70$) の発現も減少している。 $\sigma 70$ 変異株を作製し、リアルタイム PCR を行ったところ *tapA*, *tapB*, *tapC* の発現量が減少しており、転写調節は $\sigma 70$ によって行われている可能性が示唆された。そこで $\sigma 70$ が *tapA-tapB-tapC* の発現を直接的に制御しているかを検証する。またシグマ因子の調節因子であるアンチシグマの同定を行う。

3. 研究の方法

TapA, TapCの病原性への関与について

TapA あるいは TapC の病原性への関与について調べることを目的に、これらの欠損株が上皮細胞への侵入性あるいは貪食細胞への貪食が変化しているかを検討する。感染実験を行うにあたり菌体が蛍光顕微鏡で観察ができるよう、菌体内で蛍光蛋白を発現させる。具体的には、蛍光蛋白をコードする遺伝子をクローニングし、シャトルベクター内にプロモーター配列とともに挿入する。得られたベクターを *P. gingivalis* に形質転換する。

tapA, *tapB*, *tapC*の転写因子の同定

tprA 変異株では *tapA-tapB-tapC* オペロンの発現が減少しているが、これがどのような経路で調節されているのか検討する。*tprA* 変異株

では *tapA-tapB-tapC* オペロンとともに転写因子であるシグマ因子 ($\sigma 70$) の発現も減少している。このことから *tapA-tapB-tapC* オペロンの転写調節は $\sigma 70$ によって行われている可能性が示唆された。まず、この $\sigma 70$ 変異株を作製し、*tapA*, *tapB*, *tapC* の発現量についてリアルタイム RT-PCR を行い検討する。さらに $\sigma 70$ が *tapA-tapB-tapC* オペロンの発現を直接的に制御しているかを検証する。

4. 研究成果

TapA, TapCの病原性への関与について

pGLOW-Bs1、pGLOW-Bs2、pGLOW-Pp1 (Evocatal) をテンプレートにして、蛍光蛋白をコードする領域(Bs1, Bs2, Pp1)のクローニングをおこなった。また蛍光蛋白のC末端には myc タグを付加した。これをプロモーター配列とともにシャトルベクター内に挿入した。得られたベクターをそれぞれ野生株に形質転換した。得られたそれぞれの形質転換株の全菌体蛋白を用いて抗 myc 抗体でウェスタンブロット法を行い、Bs1 と Pp1 についてはバンドを検出することができた。Bs1 発現株、Pp1 発現株を顕微鏡で観察したところ、蛍光は観察することができたが、蛍光は非常に微弱であった (図1)。そのため感染実験などで他の細胞とともに観察をおこなうと自家蛍光との区別が困難であることが懸念された。

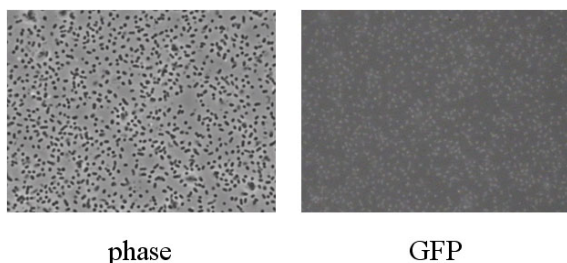


図1 Pp1 発現株を蛍光顕微鏡にて観察を行った。(Bs1 発現株についても同様な結果であった)

そこで、蛍光強度を増すために蛍光蛋白を表面蛋白と融合し、蛍光をより表層で観察できるよう試みた。表面蛋白には、PorSS の構成蛋白(porL, porM, porN)を選び、これらと蛍光蛋白(Bs1, Bs2, Pp1)それぞれとの融合を行った。その結果、porL-Bs1 融合蛋白、porL-Pp1 融合蛋白を発現する株においては、PorSS も野生株と同等の機能を保持していることを確認できた。しかし、これについても蛍光顕微鏡下で観察できる蛍光は非常に微弱であった。そのため、今後は蛍光蛋白の発現量を増すための工夫 (蛍光蛋白の遺伝子改変を行う、より強力なプロモーターを使用するな

ど) が必要かあるいは蛍光試薬で標識した菌体を実験系に使用するかの検討が必要かと思われる。

tapA, *tapB*, *tapC*の転写因子の同定

tprA 変異株ではこれらの遺伝子群の発現が減少しているとともに、転写因子であるシグマ因子 ($\sigma 70$) の発現も減少している。

$\sigma 70$ 変異株を作製し、リアルタイム PCR を行ったところ *tapA*, *tapB*, *tapC* の発現量が減少しており (図2)、転写調節は $\sigma 70$ によって行われている可能性が示唆された。

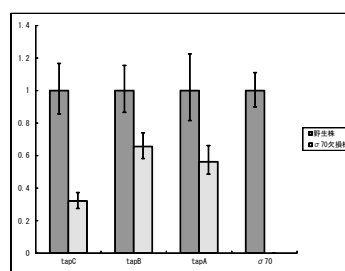


図2 $\sigma 70$ 変異株における *tapA*, *tapB*, *tapC* の発現量の変化

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3件)

1. T. Hoshino, Y. Kondo, K. Saito, Y. Terao, N. Okahashi, S. Kawabata, T. Fujiwara: Novel Epitopic Region of Glucosyltransferase B from *Streptococcus mutans*. *Clinical and Vaccine Immunology*. 18: 1552-1561, (2011) (査読有)

2. M. Shoji, K. Sato, H. Yukitake, Y. Kondo, Y. Narita, T. Kadowaki, M. Naito, K. Nakayama: Por secretion system-dependent secretion and glycosylation of *Porphyromonas gingivalis* hemin-binding protein 35. *PLoS ONE*. 6: DOI: e21372, (2011) (査読有)

3. Y. Kondo, N. Ohara, K. Sato, M. Yoshimura, H. Yukitake, M. Naito, T. Fujiwara, K. Nakayama: Tetratricopeptide repeat protein-associated proteins contribute to virulence of *Porphyromonas gingivalis*. *Infection*

and Immunity. 78; 2846-2856, (2010) (査読有)

〔学会発表〕 (計 1 件)

庄子幹郎、佐藤啓子、雪竹英治、近藤好夫、
成田由香、門脇知子、内藤真理子、中山浩次。

**Porphyromonas gingivalis HBP35 蛋白質の菌体
表面局在化機構の解析。**第 5 3 回歯科基礎医
学会 (岐阜、2011 年 9 月 30 日～10 月 2 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 好夫 (KONDO YOSHIO)

長崎大学 大学病院 医員

研究者番号 : 30581954

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :