

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月28日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23792109

研究課題名（和文） 歯周病原細菌の病原タンパク質分泌機構の解明

研究課題名（英文） Protein secretion system in Periodonto-pathic 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・助教

研究者番号：70410579

研究成果の概要（和文）：

グラム陰性菌 *Porphyromonas gingivalis* は様々な病原因子をもつ。特に、システインプロテアーゼであるジンジパインは宿主の組織破壊に関わるとともに *P. gingivalis* の病原因子の成熟化にも関わることから重要な病原因子として考えられる。ジンジパインを分泌する Por 分泌装置が、どのようなタンパク質を分泌するのか明らかにした。Por 分泌装置は *P. gingivalis* の C-terminal domain をコードしているタンパク質、赤血球凝集素、凝集素、病原因子の分泌に関わっていた。

研究成果の概要（英文）：

The gram-negative bacterium *Porphyromonas gingivalis* possesses a number of potential virulence factors for periodontopathogenicity. Particularly, cysteine proteases, named gingipains, are important virulence factors because of degradation of host proteins and responsibility for processing/maturation of *P. gingivalis* virulence factors. The PorSS is involved in the secretion of the proteins containing CTD that are essential for colony pigmentation, hemeagglutination, adherence, and virulence of bacterial pathogen of *P. gingivalis*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	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：歯周病 病原因子

1. 研究開始当初の背景

歯周病は種々の細菌による混合感染であり、これらの菌が産生する病原因子により、歯周組織が破壊される疾患である。これまで、歯周病菌が分泌する病原因子が宿主に与える影響については、宿主側を視点として、

数多くの報告がある。一方、病原因子が菌から分泌される仕組みについては殆ど分かっていなかった。そこで、遺伝学的手法を用いて、菌の病原因子分泌に関わる分子の探索および解析に着手した。

2. 研究の目的

Porphyromonas gingivalis は最も代表的な歯周病関連細菌であり、様々な病原因子を持つ。*P. gingivalis* は多くの病原因子を分泌し、なかでもプロテアーゼであるジンジパインは自身も病原因子となるだけでなく、本菌の病原因子の成熟化にも関わる重要な因子である。ジンジパインにはペプチド切断部位特異性の異なる Arg-gingipain (RgpA, RgpB) と Lys-gingipain (Kgp) があり、いずれの遺伝子上にもシグナルペプチド領域、プロ配列領域、プロテアーゼドメイン、C末端領域がコードされている。これは多くのグラム陰性菌がもつ菌体外プロテアーゼの基本的構造と同じであり、これらのプロテアーゼは細胞質内で前駆体として翻訳されたのち、細胞膜(内膜)を通過し、外膜に移行する段階で何らかのプロセスを受け、菌体表層付近で成熟型になると考えられている。

病原プロテアーゼであるジンジパインを分泌する装置、Por 分泌装置を報告した。この Por 分泌装置がジンジパインだけの分泌に関わるのか、ほかのタンパク質の輸送にも関わるのか、Por 分泌装置によって分泌されるタンパク質を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

P. gingivalis が分泌するジンジパインには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。これらはどれも分泌量が多く、かつ強力で、他のタンパク質に与える影響が大きい。Por 分泌装置により分泌されるタンパク質を同定するにあたり、ジンジパイン完全欠損株 (*Kgp, rgpA, rgpB*) を親株として実験をおこなった。

Por 分泌装置が機能するジンジパイン完全欠損株 (*Kgp, rgpA, rgpB*) と、その親株に、Pot 分泌装置を構成する分子である PorK をさらに欠損させた Por 分泌能欠損株 (*porK Kgp, rgpA, rgpB*) を作製した。

上記2株の培養上清から、超遠心機をもちいて、ベジクル画分を除いた、Particle free 画分を調整後、TCA 沈殿にて上清タンパク質を回収した。

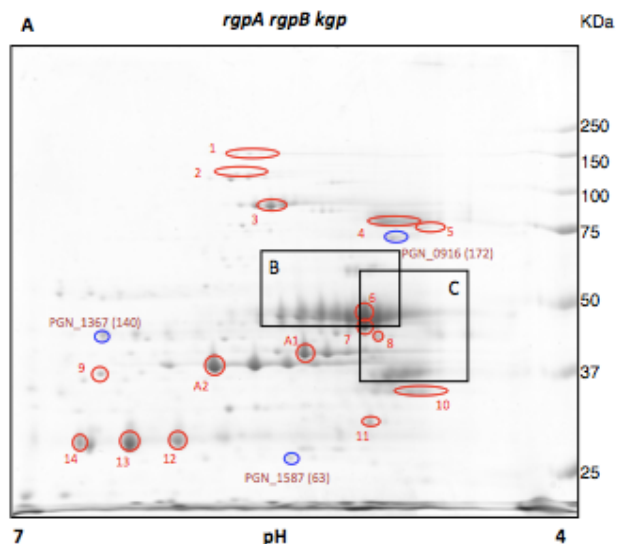
2株から得られた上清タンパク質を二次元ゲル電気泳動に展開したところ、Por 分泌装置機能株で存在するが、Por 分泌装置タンパク分泌能欠損株では消失する13のタンパク質スポットが存在した (Fig. 1)。

13のタンパク質スポットを切り出し、質量分析器をもちいてタンパク質同定をおこなったところ、10タンパク質に集約された。これらのタンパク質が Por 分泌装置タンパク分泌能欠損株において、Por 分泌装置の機能欠損によるものなのか、あるいは、タンパク質の転写発現の低下によりタンパク質スポットがみられなくなったのか、リアルタイム PCR をもちいて、転写量の比較をおこなった (Fig. 2)。

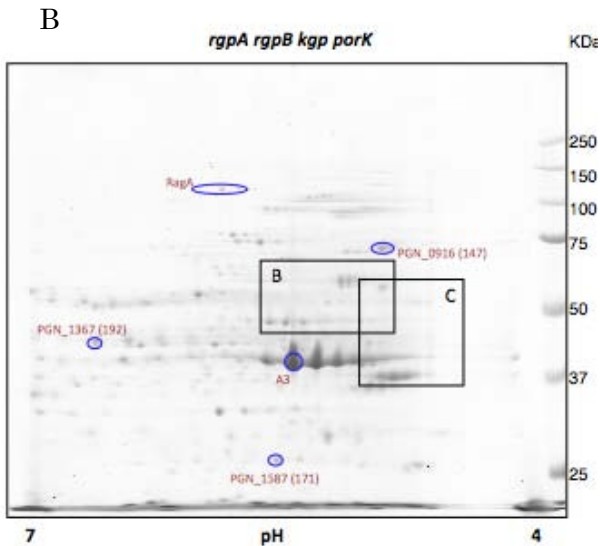
上記の方法にて同定された、Por 分泌装置によって分泌される10タンパク質が、どのような共通配列をもっているのか、アミノ酸配列比較をおこなったところ、分泌タンパク質のC末端約80アミノ酸に共通性がみられた (Fig. 3)。この配列は、*P. gingivalis* 菌体表層タンパク質が共通してもつ配列 C-terminal domain (CTD) として報告されているものであり、この配列が Por 分泌装置で分泌タンパク質として認識されるのに関わる可能性が示唆された。

4. 研究成果

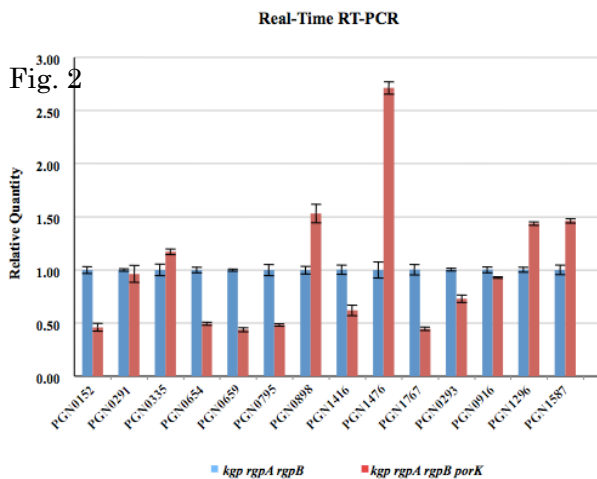
Por 分泌装置機能株と Por 分泌装置タンパク分泌能欠損株の Particle free 画分(培養上清からベジクルを除いたもの)から回収したタンパク質を二次元ゲル電気泳動に展開した (Fig. 1)。Por 分泌装置機能株 (Fig. 1A)、Por 分泌装置タンパク分泌能欠損株 (Fig.



1B). 赤丸が Por 分泌装置タンパク分泌能欠損株で消失するタンパク質スポット。

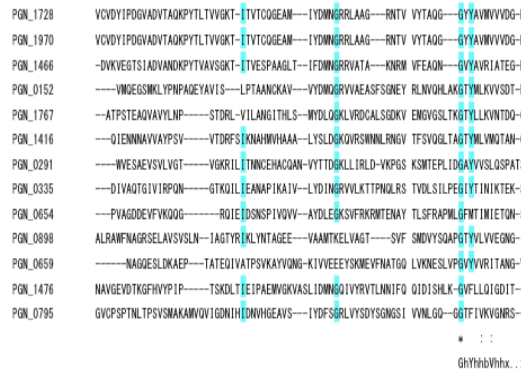


Por 分泌装置タンパク分泌能欠損株において、タンパク質スポットがみられなくなったのは、Por 分泌装置の機能欠損によるものなのか、あるいは、タンパク質の転写発現の低下によりなのか、リアルタイム PCR をもちいて、転写量の比較をおこなった (Fig. 2). Por 分泌装置の機能欠損で転写発現量が下がっている分子もみられるが、転写量が検出できないほど低下しているものはみられない。Por 分泌装置の機能欠損で上清にみられなくなるタンパク質は、Por 分泌装置による分泌が抑えられたために検出されなくなったと考えられる。



Por 分泌装置によって分泌される 10 タンパク質が、どのような共通配列をもっているのか、アミノ酸配列比較をおこなったところ、分泌タンパク質の C 末端約 80 アミノ酸に

Fig. 3



共通性がみられた (Fig. 3).

Por 分泌装置によって分泌される分泌タンパク質のリスト (Table 4)

Table 4

spot	PGN	Score	protein name
1	PGN_0291	31	hypothetical protein
2	PGN_0291	162	hypothetical protein
3	PGN_1416	321	probable lysyl endopeptidase precursor
4	PGN_0335	158	conserved hypothetical protein with zinc carboxypeptidase domain
5	PGN_0795	167	hypothetical protein
6	PGN_0152	210	immunoreactive 61 kDa antigen
7	PGN_0152	194	immunoreactive 61 kDa antigen
8	PGN_1767	165	immunoreactive 46 kDa antigen
9	PGN_0659	125	35 kDa hemin binding protein
10	PGN_1767	55	immunoreactive 46 kDa antigen
11	PGN_0654	90	hypothetical protein (putative lipoprotein)
12	PGN_0659	105	35 kDa hemin binding protein
13	PGN_0659	97	35 kDa hemin binding protein
14	PGN_0659	88	35 kDa hemin binding protein
B	PGN_0898	134	probable peptidylarginine deiminase
C	PGN_1476	130	hypothetical protein

Porphyromonas gingivalis の Por 分泌装置によって分泌される分泌タンパク質は、病原因子とされるプロテアーゼや凝集素が含まれ、それらにの C 末端には共通性のみられる、約 80 アミノ酸残基のドメイン (CTD) が存在することが分かった。CTD は Por 分泌装置が分泌タンパク質を認識するシグナルとして働く可能性が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 1 件)

Sato K, Yukitake H, Narita Y, Shoji M, Naito M, Nakayama K.

Identification of *Porphyromonas gingivalis* proteins secreted by the Por secretion system. *FEMS Microbiol Lett.* 2013, 査読有, 338(1):68-76.

DOI: 10.1111/1574-6968.

[学会発表] (計 2 件)

①第 50 回生物物理学会、名古屋、9 月 シンポジウム招待講演 (2012)

Sato K, Nakane D, Wada H, Imada K, M. McBride, Nakayama K

②第 85 回細菌学会、千葉、3 月 (2013)

Sato K, Nakane D, Yukitake H, McBride, Nakayama K

[図書] (計 0 件)

該当なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

該当なし

○取得状況 (計 0 件)

該当なし

[その他]

ホームページ等

該当なし

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

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし