

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4月3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：23792110

研究課題名（和文） 歯周病細菌における新規の糖蛋白質生成機構の解明

研究課題名（英文） Analysis of a novel glycoprotein biosynthesis in the periodontal pathogen

研究代表者

庄子 幹郎（SHOJI MIKIO）

長崎大学・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CTD含有タンパク質は、CTD依存性にPor secretion systemにより菌体表面に輸送され、その過程またはその後にCTDがプロセッシングされ、A-LPSと結合することを見出した。さらに、LPS生合成に関与するWzz, Wzx, WbaPタンパク質を同定した。

研究成果の概要（英文）：We found that CTD proteins in *Porphyromonas gingivalis* are secreted onto the cell surface via the Por secretion system and the CTD region are processed when the proteins are bound to A-LPS. In addition, we identified the Wzz, Wzx, and WbaP proteins that are involved in the LPS biosynthesis in *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	3,200,000	960,000	4,160,000

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：歯周病細菌

1. 研究開始当初の背景

(1) *Porphyromonas gingivalis*は、歯周病に関与する最重要細菌として知られている。豪州メルボルン大学のReynoldsグループは本菌の主要病原因子であるGingipain (RgpA, RgpBおよびKgp)を含めた多数の外膜タンパク質のC末端側には高度に保存されたC-terminal domain (CTD)を有していることを報告している(Seers et al. 2006)。さらに、ポーランドのPotempaグループはRgpBタンパク質においてCTD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 et al. 2007)ことから、CTD含有タンパク質は一つのオーセンティックな輸送機構で輸送され

ると推測されていた。

(2) CTD含有タンパク質の輸送機構の解析としては、既に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Western解析すると、高分子にスミアバンドが検出される(Nguyen et al. 2007)。現在、そのスミアバンドは、RgpBタンパク質に糖鎖修飾が起きているものと考えられている(Rangarajan et al. 2005)。また、CTDを欠失するとRgpBのスミアバンドは認められなくなることから、CTD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た。

(3) 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、その一つである MA6 1B5 は菌体表面上にある Anionic Polysaccharide 中の Phosphorylated branched mannan を認識することを報告している (Paramonov et al. 2005)。その後、同グループは、Anionic Polysaccharide の末端に Lipid A が結合していることを見出し、conventional な O-LPS とは異なる A-LPS があると報告している (Rangarajan et al. 2008)。

(4) 我々はCTD 含有タンパク質の輸送に関わる 11 個のタンパク質よりなる新規の外膜タンパク質分泌装置(Por secretion system:PorSS)を報告した (Sato et al. 2010)。

(5) 研究代表者は、CTD 含有タンパク質の一つであるヘミン結合性外膜タンパク質(HBP35)の解析を行っていた。HBP35 は full length 型の翻訳産物と truncated 型の翻訳産物が産生される。truncated 型は細胞質内に局在するのに対し、full length 型はSec 依存性で内膜を通過後、最終的に外膜に局在し、Western 解析ではRgpB 同様スメアバンドを形成した (Shoji et al. 2010)。

(6) LPS における O 抗原の生合成に関わる分子として、Wzy と WaaL が同定されている (Rangarajan et al. 2008; Paramonov et al. 2009)。しかしながら、それ以外の分子については、不明である。

2. 研究の目的

(1) 本菌の HBP35 タンパク質を通して、その輸送機構と菌体表面局在化機構を明らかにする。

(2) CTD 含有タンパク質のアクセプターである LPS の生合成機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) HBP35 タンパク質の解析

① PorSS 関連変異株と A-LPS 関連変異株を用いて、Western 解析を行い、HBP35 タンパク質のスメアバンドの形成が見られるか否かを明らかにする。

② HBP35 タンパク質の菌体表面局在の有無をドット

ブロット解析ならびに免疫電顕にて確認する。

③ HBP35 タンパク質の C 末端領域について、その輸送に必要な最小領域を同定する。

④ C 末端領域における高度に保存されたアミノ酸をアラニン置換した場合、スメアバンドに影響が起きるか否かを検討する。

⑤ HBP35 タンパク質のスメアバンドを切り出し、トリプシン消化によるペプチドマッピングを行う。また、CTD に対するマウスペプチド抗体を作製し、HBP35 タンパク質をウサギポリクローナル抗体で免疫沈降した場合、ペプチド抗体はスメアバンドを認識するか否かを検討する。

(2) LPS の生合成機構の解析

① トランスポゾン変異導入法により、血液寒天培地上で、黒色素形成弱株の分離を試みる。

② O 抗原生合成に関与する他菌で報告されている既知の遺伝子より、相同性のある遺伝子を絞り込み、それらの遺伝子の変異株作製を行い、LPS に対するモノクローナル抗体に対する検出および HBP35 や Rgp タンパク質について、Western 解析を行いスメアバンドの有無を確認する。

4. 研究成果

(1) HBP35 タンパク質の解析

① PorSS 関連変異株ならびに A-LPS 欠損変異株において、HBP35 タンパク質のスメアバンドが認められなかったことから、HBP35 タンパク質は PorSS 依存性に菌体表面に輸送され、A-LPS に結合していることが示唆された。

② HBP35 タンパク質は、PorSS 依存性に菌体表面に局在することをドットブロット解析ならびに免疫電顕にて確認した。

③ CTD 領域の最小領域を明らかにする目的で、GFP 融合蛋白質による C 末端側輸送シグナルの最小領域を同定する系を確立した。その結果、C 末端側 22 アミノ酸が最小領域であることを見出した。さらに、HBP35 以外の 4 つの CTD 含有タンパク質由来の GFP-CTD 融合蛋白質を作製し試したところ、それらは PorSS に

よって菌体表面に輸送され、A-LPS に結合することを見出した。

④ C 末端領域における高度に保存された7つのアミノ酸をアラニン置換した場合においても、スメアバンドに変化は起きなかった。

⑤ HBP35 タンパク質の SDS-PAGE 上でのスメアバンド (A-LPS bound form) をトリプシン消化によるペプチドマッピング解析を行った結果、CTD 領域は検出されなかった。また、CTD 領域に対するペプチド抗体は HBP35 タンパク質のスメアバンドを認識しなかった。以上の結果から、HBP35 タンパク質をはじめとする CTD 含有タンパク質は、CTD 依存性に PorSS により菌体表面に輸送され、その過程またはその後に CTD がプロセッシングされ、A-LPS と結合するというモデルを提唱した (Shoji et al. 2011)。

(2) LPS の生合成機構の解析

① トランスポゾン変異導入法により、血液寒天培地上で、黒色色素形成減弱株を分離した。トランスポゾンは、機能未知である PGN_2005 遺伝子の内部に挿入されていた。Western 解析により、PGN_2005 変異株では、HBP35 や Rgp タンパク質のスメアバンドが検出されなかった。また、O-LPS 及び A-LPS に対するモノクローナル抗体は、PGN_2005 変異株において、野生株に比べ低分子産物を認識した。さらに、LPS を精製したところ、PGN_2005 変異株では野生株に比べ、O 抗原の長さが著明に減少していた。一方、PGN_2005 タンパク質について、二次構造を予測したところ、二つの膜貫通領域を認めた。これらの結果から、PGN_2005 タンパク質は内膜に存在する O 抗原 chain length regulator (Wzz) であると予想された。

PGN_2005 タンパク質の局在を明らかにする為にその特異抗体を作製した結果、PGN_2005 タンパク質は内膜に存在することを確認した。

PGN_2005 タンパク質が Wzz 活性を示すか否かを明らかにする為に、大腸菌の *wzz* 変異株を用いて、PGN_2005 タンパク質を発現したところ、野生株と同程度の O 抗原の長さになったことから、PGN_2005 タンパク質は Wzz タンパク質の機能的ホモログであると示唆された。

PGN_2005 タンパク質は、これまでの Wzz タンパク質に比べ、C 末端側が著明に長く、そのホモログは、*Porphyromonas asaccharolytica*, *Porphyromonas endodontalis*, *Porphyromonas uenosis* といった *Porphyromonas* 属にのみ存在していることから、PGN_2005 タンパク質を WzzP と命名した。

② 次に、相同性解析から、O 抗原フリッパーゼ (PGN_1033)、O 抗原 initial glycosyltransferase である WbaP (PGN_1896, PGN_1233) について、それらの遺伝子変異株を作製し、Western 解析により、それらの遺伝子産物は LPS の生合成に関与することを明らかにした (Shoji et al. 2013)。

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)

- (1) Shoji M, Yukitake H, Sato K, Shibata Y, Naito M, Aduse-Opoku J, Abiko Y, Curtis M. A., Nakayama K. Identification of an O-antigen chain length regulator, WzzP, in *Porphyromonas gingivalis* Microbiology Open in press, 2013
- (2) Sato K, Yukitake H, Narita Y, Shoji M, Naito M, Nakayama K. Identification of *Porphyromonas gingivalis* proteins secreted by the Por secretion system FEMS microbiology letters 338(1): 68-76, 2013
- (3) 庄子 幹郎 *Porphyromonas gingivalis* における表

面蛋白質の輸送と局在化に関する研究
日本細菌学雑誌 67(3): 245-255, 2012

- (4) Shoji M, Sato K, Yukitake H, Kondo Y, Narita Y, Kadowaki T, Naito M, Nakayama K.
Por secretion system-dependent secretion and glycosylation of *Porphyromonas gingivalis* hemin-binding protein 35. PLoS One 6(6):e21372. 2011
- (5) Naito M, Sato K, Shoji M, Yukitake H, Ogura Y, Hayashi T, Nakayama K.
Characterisation of the *Porphyromonas gingivalis* conjugative transposon CTnPg1: determination of the integration site and the genes essential for conjugal transfer. Microbiology-SGM 157(7): 2022-2032, 2011
- (6) Yukitake H, Naito M, Sato K, Shoji M, Ohara N, Yoshimura M, Sakai E, Nakayama K.
Effects of non-iron metalloporphyrins on growth and gene expression of *Porphyromonas gingivalis*. Microbiol. Immunol. 55(3): 141-153, 2011

[学会発表] (計 7 件)

- (1) Shoji M, Yukitake H, Sato K, Shibata Y, Naito M, Aduse-opoku J, Abiko Y, Curtis M. A., Nakayama K.
Identification of a novel O-antigen chain length regulator, WzzP, in *Porphyromonas gingivalis*. The 60th annual meeting of Japanese Association for Dental Research (2012)
- (2) Shoji M, Yukitake H, Sato K, Shibata Y, Naito M, Aduse-opoku J, Abiko Y, Curtis M. A., Nakayama K.
Identification of a component of LPS biosynthesis in *Porphyromonas gingivalis*. First International Conference on *Porphyromonas gingivalis* and Related Bacterial Species (2012)
- (3) 庄子幹郎, 雪竹英治, 佐藤啓子, 中根大介, 内藤真理子, 柴田恭子, 安孫子宜光, 中山浩次
Porphyromonas gingivalis の LPS 合成に関わる新奇遺伝子の発見
第 85 回日本細菌学会総会 (2012)

- (4) 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, 安孫子宜光, 中山浩次
Porphyromonas gingivalis HBP35 蛋白の菌体表面局在化機構の解析
第 53 回歯科基礎医学会学術大会・総会 (2011)

- (5) Shoji M, Sato K, Yukitake H, Kondo Y, Narita Y, Kadowaki T, Naito M, Nakayama K.
Por secretion system-dependent secretion and glycosylation of *Porphyromonas gingivalis* Hemin-binding protein 35 (HBP35)
XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology (2011)

- (6) Shoji M, Sato K, Yukitake H, Kondo Y, Narita Y, Kadowaki T, Naito M, Nakayama K.
Porphyromonas gingivalis Hemin-Binding Protein 35 (HBP35) is secreted by the Por Secretion System.
The Gordon Research Conference on Microbial Adhesion & Signal Transduction (2011)

- (7) 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, 安孫子宜光, 中山浩次
Porphyromonas gingivalis HBP35 蛋白は、Por Secretion System 依存性に菌体表面に局在化する。
第 25 回 Bacterial Adherence and Biofilm 学術集会 (2011)

[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
長崎大学歯学部 歯周病基盤研究センター
<http://www.de.nagasaki-u.ac.jp/period/>

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

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし