

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462866

研究課題名(和文) 歯周病菌を含めたバクテロイデーテス細菌の病原因子分泌機構の解明

研究課題名(英文) Characterization of the type IX secretion system (T9SS)

研究代表者

佐藤 啓子 (SATO, Keiko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・助教

研究者番号：70410579

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病細菌 *P. gingivalis* の病原タンパク質分泌機構について、9型分泌装置システムを構築する個々の因子の機能解析と、分泌されるタンパク質の認識機構の解析をおこない、9型分泌機構の全貌を明らかにすることを目的とする。

9型分泌装置によって輸送されるジンジパインは、ゲノム上に3分子コードされる。この3分子に共通する構造が9型分泌装置に分泌される他の分泌タンパク質にも共通する構造であることがわかった。この共通構造が保たれていないと、分泌タンパク質は菌体内で凝集し、菌体内プロテアーゼによって消化されていた。ことから、共通構造が菌体内でのタンパク質の安定性に関与していることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Porphyromonas gingivalis possesses cysteine proteases named gingipains that act as important virulence factors. Gingipains, which consist of Arg-gingipain A (RgpA), Arg-gingipain B (RgpB) and Lys-gingipain (Kgp), have a characteristic Ig-like domain of the peptidase family C25 that is found at the C-terminal region of the protease domain in almost all family members. When introducing a plasmid encoding either gingipain lacking the common structure or gingipain with an incomplete common structure into a *P. gingivalis* gingipain-null (*rgpA rgpB kgp*) mutant, the mutant gingipains were not detected in the cells, whereas mutant gingipains with high molecular mass accumulated in the membrane fraction after introducing the plasmids into an *rgpA rgpB kgp htrA* mutant, indicating that housekeeping protease degrades the mutant gingipains.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：歯周病菌 分泌 プロテアーゼ

1. 研究開始当初の背景

細菌のタンパク質分泌機構は病原性に直接関与するため、長年種々の菌で研究されてきた。*P.gingivalis* の主要病原因子ジンジパインの分泌を解析していく過程で、これらの菌種で保存される9型分泌機構が大きく関与していることが分かってきた。ジンジパインは *P.gingivalis* の菌体表面、菌体外に存在する強力なプロテアーゼであり、自身も病原因子であるだけでなく、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重要な病原因子である。ジンジパインはシグナル配列、プロ領域、プロテアーゼドメイン、C末端領域がコードされている。これらは、内膜、外膜の2つの膜を輸送されたのち、菌体表層付近でおおのこのドメインに切断され、大部分が膜結合型として、一部が分泌型として菌体外へ分泌される。ジンジパインを含めて、9型分泌機構により分泌されるタンパク質のアミノ酸配列を比較したところ、C末端に共通した約80アミノ酸残基の配列(C terminal domain: CTD)をもつ。

2. 研究の目的

9型分泌装置を構築する個々の因子について機能解析をおこなうとともに、分泌されるタンパク質がどのような共通性もち、分泌機構に認識されて膜を通過するのか、分泌機構の全貌を明らかにすることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

<分泌タンパク質について>

ジンジパインは *P.gingivalis* のゲノム上に *kpg*, *rgpA*, *rgpB* の3つがコードされ、いずれもシグナル配列(sp)、プロ領域(pro)、プロテアーゼドメイン(PD)、C末端領域(CTD)がコードされている。さらに、プロテアーゼドメインのC末端側には Immunoglobulin like domain (Ig-like domain)が存在する。これらは、内膜、外膜の2つの膜を輸送されたのち、菌体表層付近でおおのこのドメインに切断され、大部分が膜結合型として、一部が分泌型として菌体外へ分泌される。ジンジパインの基本構造(sp-pro-PD-CTD)をもつ short type *kpg* を作成した。short type *kpg* を用いて、どのドメインが輸送に関わるのか検討する。また、分泌タンパク質のCTDが輸送に必須なのか、どのような分子により認識されるのか、Halo-tagを融合させた分泌タンパク質を *P.gingivalis* 内で発現し、免疫沈降等を用いて、CTDに親和性のある分子の探索をおこなう。

<分泌装置を構成する分子について>

9型分泌装置関連因子を構成する、PorK, PorL, PorM および PorNのリコンビナントタンパク質を大腸菌で発現させ、抗体作製を試みる。また、結晶化に向けて、それぞれの

タンパク質を可用性で高純度に精製する方法を検討する。

4. 研究成果

<分泌タンパク質について>

CTDの役割

P.gingivalis 内で発現させた short type *Kgp* (s*Kgp*: sp-pro-PD-CTD)は *Kgp* 活性をもつ。CTDの役割をみるため、CTDを欠失した sp-pro-PDタイプの short type *kpg* を *P.gingivalis* 内で発現させたところ、CTDを有する short type *kpg* よりも *Kgp* 活性が低下していた。このことから CTDはジンジパイン輸送において、輸送の効率、または分泌タンパク質の折りたたみへ関与していることが示唆される。

Ig-like domainの役割

ジンジパインのプロテアーゼドメインのC末端側に存在する Ig-like domainは、9型分泌装置によって分泌されるタンパク質に共通した構造であることがわかってきた。s*Kgp*の Ig-like domainの一部を欠失させたところ(s*Kgp* Ig) 菌体内で分解されることがわかった。この s*Kgp* Ig 分解に関わるプロテアーゼを探索したところ、菌体内品質管理プロテアーゼが関与していることがわかった。

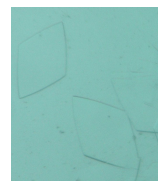
<分泌装置を構成する分子について>

PorK, PorL, PorM および PorNの抗体作成

9型分泌装置関連因子を構成する、PorK, PorL, PorM および PorNの抗体を作成した。非特異なタンパク質にも反応する抗体もあるが、それぞれのタンパク質に特異的に反応するため、イムノプロットなどに用いることが可能である。

PorK, PorL, PorM および PorNの結晶構造解析

結晶化のための PorK, PorL, PorM および PorNのリコンビナントタンパク質の発現をおこなった。PorK, PorNは複数のタグ及び発現系を試したが、可用性リコンビナントタンパク質を得ることができなかった。不溶性タンパク質の巻き戻しを試みたが、高濃度の可用性タンパク質の取得には至っていない。PorL, PorMは可用性で高純度のタンパク質を得ることができ、結晶化のためのスクリーニングをおこなった。PorMは高純度リコンビナントタンパク質から微結晶が得られた。構造解析にもちいることができる結晶を得るための結晶化条件を検討中である。



PorM 微結晶

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 2件)

Taguchi Y, Sato K, Yukitake H, Inoue T, Nakayama M, Naito M, Kondo Y, Kano K, Hoshino T, Nakayama K, Takashiba S, Ohara N: Involvement of an Skp-Like Protein, PGN_0300, in the Type IX Secretion System of *Porphyromonas gingivalis*, *Infect Immun*, 84(1), p.230-40, 2015 Oct 26 査読あり

Shoji M, Sato K, Yukitake H, Naito M, Nakayama K: Involvement of the Wbp pathway in the biosynthesis of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide with anionic polysaccharide. *Sci Rep*. 2014 May 23;4:5056. 査読あり

[学会発表](計 17件)

佐藤啓子, 雪竹英治, 中根大介, 成田由香, 中山浩次, 病原プロテアーゼにおける Ig-like domain の役割, 第 86 回日本生化学会大会、パシフィコ横浜 (神奈川) (2013 年 9 月 11- 13 日)

成田由香, 佐藤啓子, 柴田敏史, 中根大介, 中山浩次, *Flavobacterium johnsoniae* における滑走運動制御因子の探索, 第 86 回日本生化学会大会、パシフィコ横浜 (神奈川) (2013 年 9 月 11- 13 日)

雪竹英治, 佐藤啓子, 中根大介, 成田由香, 柴田敏史, 中山浩次, ジンジパインプロテアーゼにおける Ig-like domain の役割, 第 87 回 日本細菌学会総会、タワーホール船堀 (東京) (2014 年 3 月 26- 28 日)

庄子幹郎, 佐藤啓子, 雪竹英治, 内藤真理子, 中山浩次, *Porphyromonas gingivalis* における病原タンパク質の菌体表面局在化機構, 第 87 回 日本細菌学会総会、タワーホール船堀 (東京) (2014 年 3 月 26- 28 日)

田口裕子, 井上哲圭, 佐藤啓子, 加野小奈美, 中山真彰, 中山浩次, 大原直也, *Porphyromonas gingivalis* PGN1796 変異株の細胞内侵入性および薬剤感受性, 第 87 回 日本細菌学会総会、タワーホール船堀 (東京) (2014 年 3 月 26- 28 日)

中根大介, 佐藤啓子, 中山浩次, 西坂崇之, 戦車のような仕組みで動くバクテリア, 第 87 回 日本細菌学会総会、タワーホール船堀 (東京) (2014 年 3 月 26- 28 日)

田川 淳平, 井上 哲圭, 佐藤啓子, 内藤 真理子, 中山 真彰, 中山 浩次, 桑原 知己, 大原 直也, *Porphyromonas gingivalis* における電気穿孔法に適した新規プラスミドベクターの構築, 第 87 回 日本細菌学会総会、タワーホール船堀 (東京) (2014 年 3 月 26- 28 日)

佐藤啓子, 雪竹英治, 庄子幹郎, 内藤真理子, 中山浩次, バクテロイデーテス細菌の IX 型分泌装置, 第 88 回日本細菌学会総会{日本細菌学雑誌 70(1), p.149, 2015}長良川国際会議場 (岐阜) (2015 年 3 月 26-28 日)

近藤好夫, 佐藤啓子, 中根大介, 成田由香, 内藤真理子, 藤原 卓, 中山浩次: *Flavobacterium johnsoniae* のコロニースプレディングに影響する遺伝子, 第 88 回日本細菌学会総会{日本細菌学雑誌 70(1), p.149, 2015}長良川国際会議場 (岐阜) (2015 年 3 月 26-28 日)

雪竹英治, 佐藤啓子, 近藤好夫, 庄子幹郎, 内藤真理子, 中山浩次: *Porphyromonas gingivalis* 9 型分泌機構の輸送に關与する CTD タンパク質の解析, 第 88 回日本細菌学会総会{日本細菌学雑誌 70(1), p.156, 2015}長良川国際会議場 (岐阜) (2015 年 3 月 26-28 日)

11 近藤好夫, 佐藤啓子, 今村圭吾, 成田由香, 中根大介, 藤原 卓, 中山浩次: *Flavobacterium johnsoniae* における colony spreading factor, 新学術領域「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」第 3 回領域全体会議, 金沢商工会議所会館 (石川) (2015 年 6 月 10- 12 日)

12 今村圭吾, 佐藤啓子, 近藤好夫, 成田由香, 藤原 卓, 中山浩次: *Flavobacterium johnsoniae* における colony spreading, 新学術領域「運動超分子マシナリーが織りなす調和と多様性」第 3 回領域全体会議, 金沢商工会議所会館 (石川), (2015 年 6 月 10- 12 日)

13 今村圭吾, 近藤好夫, 佐藤啓子, 成田由香, 藤原 卓, 中山浩次: *Flavobacterium johnsoniae* における colony spreading に關与する因子について, 第 57 回日本歯科基礎医学会学術大会 {Journal of Biomedical Sciences Supplement 2015, p.206, 2015} 朱鷺メッセ (新潟) (2015 年 9 月 11 日 13 日)

14 近藤好夫, 佐藤啓子, 今村圭吾, 星野倫範, 中山浩次, 藤原 卓: 感染性心内膜炎由来 *Streptococcus oralis* 308 株の細菌学的解析, 第 57 回日本歯科基礎医学会学術大会 {Journal of Biomedical Sciences Supplement 2015, p.486, 2015} 朱鷺メッセ

(新潟)(2015年9月11日13日)

¹⁵ 佐藤啓子, 近藤好夫, 今村圭吾, 内藤真理子, 中山浩次: 病原タンパク質分泌に関わる細胞内品質管理プロテアーゼHtrAについて, 第57回日本歯科基礎医学会学術大会 {Journal of Biomedical Sciences Supplement 2015, p.505, 2015} 朱鷺メッセ (新潟)(2015年9月11日13日)

¹⁶ 田口裕子, 井上哲圭, 佐藤啓子, 加野小奈美, 中山真彰, 内藤麻里子, 中山浩次, 大原直也, *Porphyromonas gingivalis* の菌体外のジンジパイン活性に関わる新規遺伝子について, 第56回歯科基礎医学会学術大会, 福岡, 9月 {Journal of Oral Biosciences, 56, Supplement, p213, 2014} 朱鷺メッセ (新潟) (2015年9月11日13日)

¹⁷ Keigo Imamura, Yoshio Kondo, Keiko Sato, Yuka Narita, Koji Nakayama: The colony spreading of *Flavobacterium johnsoniae*, One Health conference in Nagasaki, Nagasaki, 良順会館(長崎) 2015年11月67日)

〔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(歯学系)・

助教

研究者番号: 70410579

研究者番号:

(2) 研究分担者
()

研究者番号:

(3) 連携研究者
()

研究者番号: