

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：33902

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861752

研究課題名(和文) 歯周病原細菌の線毛構築機序の総合的理解

研究課題名(英文) Overall understanding of biogenesis mechanism of fimbriae in periodontal pathogen

研究代表者

長谷川 義明 (Hasegawa, Yoshiaki)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：70460524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)： 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* のもつ Mfa1 線毛は、Mfa1 が重合した繊維状構造物にアクセサリー分子 Mfa3-Mfa5 が結合していることが明らかになっている。本研究では線毛因子がどのように菌体表面に輸送され、どのように形成されるのか、その構築機序を解明することを目的とした。その結果、以下の知見を得た。(1) アクセサリー成分が線毛発現に関係していること、(2) Mfa3 及び Mfa4 の翻訳後修飾にはジンジパインが必要なこと、(3) Mfa5 の組込みには Type IX 分泌装置が関与していることが分かった。以上の結果から本菌特有の線毛構築機序の存在が示唆された。

研究成果の概要(英文)： Mfa1 fimbriae of *Porphyromonas gingivalis*, a major periodontal pathogen, is composed of five proteins of Mfa1-5, but there is limited information about their biogenesis mechanism. The aim of this study was to elucidate how fimbrial proteins were translocated to cell surface and were assembled on the cell surface. The following findings were obtained. (1) Mfa3-5 were involved in expression of fimbriae on the cell surface. (2) Gingipains were required for post transcriptional modification of Mfa3 and Mfa4. (3) Type IX secretion system was involved in integration of Mfa5 into fimbriae. These findings suggested the presence of a novel biogenesis mechanism of the *P. gingivalis* fimbriae.

研究分野：微生物学

キーワード：慢性歯周炎 歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* 線毛 Mfa1 FimA アクセサリー分子

1. 研究開始当初の背景

Porphyromonas gingivalis は、歯周疾患への関与のみならず、心血管疾患や早産などの様々な全身疾患にも関連することが明らかになっている。本菌は、菌体表層に付着因子である FimA と Mfa1 の2種の線毛をもつ。FimA タンパク質を主要成分とする FimA 線毛には、アクセサリ成分 FimC、FimD、および FimE が、Mfa1 タンパク質を主要成分とする Mfa1 線毛にはアクセサリ成分 Mfa3、Mfa4、および Mfa5 が、それぞれ微量に含まれることが分かっている。しかし、それらの成分がどこに局在するのか、また、どのように線毛に組込まれるのかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、2種の線毛の構成成分の遺伝子の構造・機能およびアクセサリ成分と主要成分とのアミノ酸配列の共通性に注目し、各線毛成分の局在とその輸送・局在化に関わる因子を明らかにし、線毛構築機序を総合的に理解することを目的とした。主な研究項目は、(1) アクセサリ成分変異株における線毛形成に及ぼす影響の検討、(2) 免疫電子顕微鏡法によるアクセサリ成分の局在の検討、(3) ウェスタンブロットによるアクセサリ成分の局在の検討、(4) 線毛成分の輸送・局在化におけるジンジパインの関与の検討、(5) 線毛成分の輸送・局在化における TypeIX 分泌装置の関与の検討である。

3. 研究の方法

(1) アクセサリ成分変異株における線毛形成に及ぼす影響の検討

菌体タンパク質を 60°C で 10 分間加熱すると線毛の重合が部分的に解離し、SDS-PAGE で展開したゲル上でラダーバンドとして検出される。この線毛の性質を利用し、Mfa1 の重合の程度をウェスタンブロットにより評価した。アクセサリ成分変異株の菌体表層における線毛の構造・発現量を透過型電子顕微鏡による形態学的手法により解析した。また、菌体表面での線毛発現量を ELISA にて評価した。

(2) 免疫電子顕微鏡法によるアクセサリ成分の局在の検討

免疫電子顕微鏡法により Mfa3-5 の局在を検討した。菌体を膜に載せ、一次抗体として抗 Mfa3、Mfa4 あるいは Mfa5 抗体、二次抗体として金コロイド標識抗体を用いた。

(3) ウェスタンブロットによるアクセサリ成分の局在の検討

菌体タンパク質を膜タンパク質と細胞質およびペリプラズムタンパク質とに分画した。さらに、膜タンパク質を内膜と外膜とに分画した。そして、抗アクセサリ成分抗体を用いたウェスタンブロットを行った。

(4) 線毛成分の輸送・局在化におけるジンジパインの関与の検討

ジンジパイン変異株から菌体タンパク質を調製し、抗アクセサリ成分抗体を使用したウェスタンブロットにて解析した。

(5) 線毛成分の輸送・局在化における TypeIX 分泌装置の関与の検討

porU 遺伝子 (TypeIX 分泌装置を構成する因子) 変異株を作製し、アクセサリ成分の輸送・局在化に及ぼす影響をウェスタンブロットにより検討した。

4. 研究成果

(1) アクセサリ成分変異株における線毛形成に及ぼす影響の検討

重合した Mfa1 を示すラダーバンドは、アクセサリ成分変異株では、親株と比較して、やや減少する傾向を示した。ELISA によりアクセサリ成分変異株の線毛発現は親株と比較して半分程度に減少していた。以上の結果からアクセサリ成分が Mfa1 重合に関与していることが考えられた。電子顕微鏡解析では菌体表面の線毛構造の観察が難しく、株間での違いを判別できなかった。

(2) 免疫電子顕微鏡法によるアクセサリ成分の局在の検討

抗 Mfa3 抗体および抗 Mfa1 抗体を使用した二重免疫電子顕微鏡法を行った結果、Mfa3 は線毛の先端に、Mfa1 がシャフト部分に局在することが明らかになった (図1)。

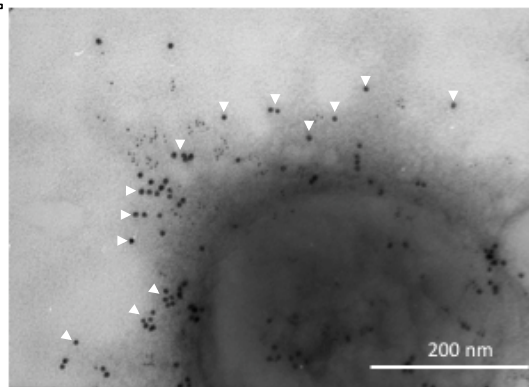


図1. Mfa1およびMfa3の局在の検討。
免疫電顕二重染色法によりMfa1 (6 nm 金コロイド粒子)およびMfa3 (20 nm 金コロイド粒子)を検出した。Mfa3は菌体から離れた位置に検出された(白い矢印)。

(3) ウェスタンブロットによるアクセサリ成分の局在の検討

Mfa3 は、内膜に局在する 43 kDa Mfa3 と外膜および線毛に局在する 40 kDa のタイプが存在することが分かった。以上の結果から、Mfa3 タンパク質は、内膜から外膜に移行する過程において、翻訳後修飾を受けることが考えられた (図2)。

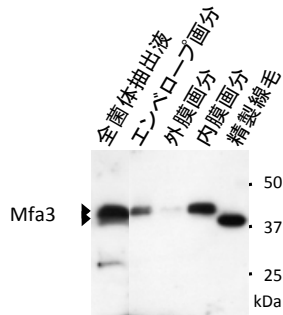


図2. Mfa3の局在の検討。タンパク質試料をSDS-PAGEにより展開後、抗Mfa3抗体によるウェスタンブロットを行った。全菌体抽出液においてMfa3は43 kDaおよび40 kDaのバンドとして検出された。43 kDaのバンドは内膜に、40 kDaのバンドは精製線毛に認められた。

(4) 線毛成分の輸送・局在化におけるジンジパインの関与の検討

ジンジパイン欠損株の Mfa1、Mfa3 および Mfa4 において未成熟型と考えられるバンドが検出された。これらの因子の翻訳後修飾にはジンジパインが関係していることが考えられた。(図3)

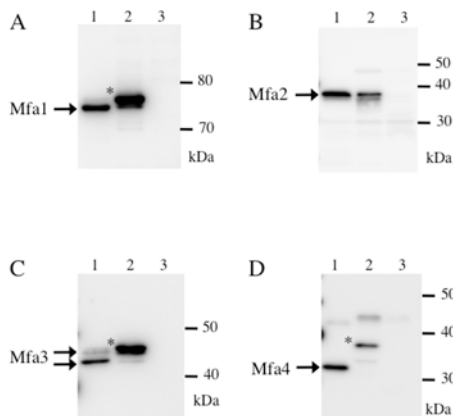


図3. ジンジパイン欠損株のアクセサリー成分の発現。Mfa1 (A)、Mfa3 (C) および Mfa4 (D) では、未成熟型と考えられるバンド (*) が検出された。

(5) 線毛成分の輸送・局在化における Type IX 分泌装置の関与の検討

porU 変異株では、菌体表面での Mfa1 線毛の形成が減少し、Mfa5 が細胞外には分泌されず菌体内で分解されていた。これらの結果から Type IX 分泌装置が Mfa5 の菌体外への分泌に必要であること、Mfa1 線毛の形態形成に関与していることが考えられた。

FimA 線毛の構成成分の構築機序についての新たな知見は得られなかった。

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7件)

① Yasuo Yoshida、Mitsunari Sato、Yuichiro Kezuka、Yoshiaki Hasegawa、Keiji Nagano、Jun Takebe、Fuminobu Yoshimura. Acyl-CoA reductase producing succinate semialdehyde from succinyl-CoA in the butyrate production of *Porphyromonas gingivalis*. Arch Biochem Biophys. 査読有. 2016. 21:596:138-148. doi: 10.1016/j.abb.2016.03.014.

② Patrik Kloppsteck、Michael Hall、Yoshiaki Hasegawa、Karina Persson. Structure of the fimbrial protein Mfa4 from *Porphyromonas gingivalis* in its precursor form: implications for a donor-strand complementation mechanism. Sci Rep. 査読有. 2016. 14:6:22945. doi: 10.1038/srep22945.

③ Ryota Ikai、Yoshiaki Hasegawa、Masashi Izumigawa、Keiji Nagano、Yasuo Yoshida、Noriyuki Kitai、Richard J. Lamont、Fuminobu Yoshimura、Yukitaka Murakami. Mfa4, an accessory protein of Mfa1 fimbriae, modulates fimbrial biogenesis, cell auto-aggregation, and biofilm formation in *Porphyromonas gingivalis*. PLoS One. 査読有. 2015. 5:10(10):e0139454. doi: 10.1371/journal.pone.0139454.

④ Yasuo Yoshida、Mitsunari Sato、Keiji Nagano、Yoshiaki Hasegawa、Takashi Okamoto、Fuminobu Yoshimura. Production of 4-hydroxybutyrate from succinate semialdehyde in butyrate biosynthesis in *Porphyromonas gingivalis*. Biochim Biophys Acta. 査読有. 2015. 1850(12):2582-91. doi: 10.1016/j.bbagen.2015.09.019.

⑤ Keiji Nagano、Yoshiaki Hasegawa、Yasuo Yoshida、Fuminobu Yoshimura. A major fimbriin variant of Mfa1 fimbriae in *Porphyromonas gingivalis*. J Dent Res. 査読有. 2015. 94(8):1143-8. doi: 10.1177/0022034515588275.

⑥ Yukitaka Murakami、Yoshiaki Hasegawa、Keiji Nagano、Fuminobu Yoshimura. Characterization of wheat germ agglutinin lectin-reactive glycosylated OmpA-like proteins derived from *Porphyromonas gingivalis*. Infect Immun. 査読有. 2014. 82(11):4563-71. doi: 10.1128/IAI.02069-14.

⑦ Yoshiaki Hasegawa、Keiji Nagano、Ryota

Ikai, Masashi Izumigawa, Yasuo Yoshida, Noriyuki Kitai, Richard J. Lamont, Yukitaka Murakami, Fuminobu Yoshimura. Localization and function of the accessory protein Mfa3 in *Porphyromonas gingivalis* Mfa1 fimbriae. Mol Oral Microbiol. 査読有. 2013. 28(6):467-80. doi: 10.1111/omi.12040.

[学会発表] (計 10 件)

①長谷川義明、永野恵司、吉田康夫、吉村文信：歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* の Mfa1 線毛構築機序に関する研究-Mfa5 の役割について-。第 87 回愛知学院大学歯学会学術大会、愛知学院大学（愛知県名古屋市中区）。2015 年 12 月 6 日。

②長谷川義明、永野恵司、吉田康夫、村上幸孝、吉村文信：歯周病関連菌 *Porphyromonas gingivalis* における Mfa1 線毛形成における Mfa5 の役割の解析。第 57 回歯科基礎医学会学術集会、朱鷺メッセ（新潟県新潟市）、2015 年 9 月 13 日。

③飯島由羅、長谷川義明、永野恵司、吉田康夫、吉村文信：歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* における Mfa1 線毛の付随成分 Mfa5 の輸送機序に関する研究。第 57 回歯科基礎医学会学術集会、朱鷺メッセ（新潟県新潟市）、2015 年 9 月 12 日。

④長谷川義明、永野恵司、吉田康夫、村上幸孝、吉村文信：歯周病関連細菌 *Porphyromonas gingivalis* の Mfa1 線毛における Mfa4 の役割。第 88 回日本細菌学会総会、長良川国際会議場（岐阜県岐阜市）、2015 年 3 月 26 日。

⑤長谷川義明、井貝亮太、出水川雅司、堀江俊、猪俣恵、北井則行、吉村文信、村上幸孝：*Porphyromonas gingivalis* の Mfa1 線毛構築における Mfa4 の役割の解析。第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会、福岡国際会議場（福岡県福岡市）、2014 年 9 月 27 日。

⑥井貝亮太、長谷川義明、出水川雅司、堀江俊、北井則行、吉村文信、村上幸孝：*Porphyromonas gingivalis* が有する Mfa1 線毛の付随成分 Mfa4 の役割。第 87 回日本細菌学会総会、タワーホール船堀（東京都）、2014 年 3 月 27 日。

⑦長谷川義明、井貝亮太、出水川雅司、堀江俊、永野恵司、吉田康夫、北井則行、村上幸孝、吉村文信：*Porphyromonas gingivalis* における Mfa1 線毛の付随成分 Mfa3 の局在と機能。第 87 回日本細菌学会総会、タワーホール船堀（東京都）、2014 年 3 月 27 日。

⑧井貝亮太、長谷川義明、出水川雅司、堀

江俊、村上幸孝、北井則行：*Porphyromonas gingivalis* が有する Mfa1 線毛の付随成分 Mfa3 タンパク質の成熟化過程。第 178 回岐阜歯科学会例会、朝日大学（岐阜県瑞穂市）、2014 年 2 月 15 日。

⑨長谷川義明、村上幸孝：*Porphyromonas gingivalis* の Mfa1 線毛の構造・構築機序に関する最近の知見—*mfa1* 遺伝子の下流因子の役割—。第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会、岡山コンベンションセンター（岡山県岡山市）、サテライトシンポジウム、2013 年 9 月 20 日。

⑩井貝亮太、長谷川義明、出水川雅司、堀江俊、川端淳司、北井則行、吉村文信、村上幸孝：*Porphyromonas gingivalis* Mfa1 線毛に付随する Mfa3 の局在化に関する研究。第 55 回歯科基礎医学会学術大会・総会、岡山コンベンションセンター（岡山県岡山市）、2013 年 9 月 22 日。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川 義明 (HASEGAWA, Yoshiaki)

愛知学院大学・歯学部

・講師

研究者番号：70460524