

平成 29 年 5 月 18 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462789

研究課題名(和文) 歯周病原細菌プレボテラ・インターメディアのヘム鉄獲得機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism for haem acquisition in periodontal pathogen, *Prevotella intermedia*.

研究代表者

内藤 真理子 (NAITO, Mariko)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・准教授

研究者番号：20244072

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)：歯周病原細菌*Prevotella intermedia*においてヘム鉄の獲得はその生存に欠かせない。これまでの研究からヘム鉄獲得に必要なコンポーネントがType IX 分泌システム(T9SS)により輸送されることが示唆された。本研究ではまず全ゲノム配列を決定、全遺伝子からT9SSにより輸送されると予測される候補遺伝子を6個抽出、変異株の作製を試みた。5つの遺伝子変異株の作製に成功し解析をおこなった。結果1つの遺伝子がヘム鉄獲得に必須であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Haem acquisition is the essential for survival of periodontal pathogen, *Prevotella intermedia*. Our previous study suggested that the Type IX secretion system (T9SS) might translocate the essential component for haem acquisition. Here we determined the whole genome sequence and all genes of *P. intermedia*. Using the conserved amino-acid sequence motifs for the T9SS-translocated protein, six candidate genes were defined. By our establish site-directed mutagenesis, we succeed to generate 5 mutants. One of those mutants showed the defects of pigmentation on blood agar plates. It indicated that this gene has the essential role for haem acquisition in *P. intermedia*.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：口腔細菌学 歯周病原菌 ゲノム 遺伝子操作

1. 研究開始当初の背景

グラム陰性細菌においては内膜外膜を超えて病原因子等のタンパク質を菌体表層、菌体外へ輸送するシステムとしてtype I からtype VI の分泌システムが報告されている。が、代表的な歯周病原細菌ではtype I からtype VI の分泌システムが存在しないことから新たな分泌システムを利用していると考えられた。そこで我々のグループは代表的な歯周病原菌、*Porphyromonas gingivalis* について、その病原因子の解析及び病原因子の輸送システムについて解析を行い*P. gingivalis* に存在する新たな分泌機構、Por 分泌機構を見いだした (Sato K. et.al. PNAS. 2010)。この機構はタンパク質分解酵素などの病原因子を外膜または菌体外へ運ぶ。Por 分泌機構によって運ばれる分泌タンパク質分解酵素gingipain の一つLys 特異的gingipainはヘモグロビン分解によるヘム鉄の遊離に必須の酵素である。また遊離したヘム鉄に結合するタンパク質 Hbp35 も本分泌機構で分泌される。このPor 分泌機構に関わる遺伝子群は近縁の歯周病原菌を含む*Bacteroides phylum* の複数の菌にも存在する。近年のゲノム解析の結果から *Prevotella intermedia* にも*P. gingivalis* でみいだされたPor 分泌機構関連遺伝子群が存在することが確認されている。そこで*P. intermedia* においても*P. gingivalis* と同様にPor 分泌機構により輸送分泌されたタンパク質分解酵素が本菌のヘム鉄獲得に必要だと予測された。これまでに*P. intermedia* の分泌するタンパク質分解酵素のうち interpain A (以下inpA) について大腸菌で発現精製したりコンビナントタンパク質を用いてヘモグロビン分解活性が存在することが報告されている (Byrne DP. et. al. Biochem J. 2010)。また現在では Por 分泌機構は Type IX 分泌機構 (Secretion System) と名付けられているので以下は T9SS と記載する。

2. 研究の目的

口腔内の嫌気性細菌*P. intermedia* は成人慢性歯周炎だけではなく、限局型前思春期性歯周炎との関連が指摘されている歯周病原菌である。他の歯周病原細菌と同様にその生育にはヘム鉄が必要である。*P. gingivalis* においてはヘモグロビン分解によるヘム鉄遊離に必須なタンパク質分解酵素gingipain、ヘム鉄取り込み輸送に関わる分子群の詳細な解析

が行われている。が、*P. intermedia* では部位特異的変異導入法が確立していない為、詳細な解析は行われていない。現在我々のグループは本菌に於ける部位特異的変異導入法を確立するのに成功したところである。そこで本研究では部位特異的変異導入法を利用して*P. intermedia* でのヘム鉄獲得機構の解明を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヘム鉄獲得に必須な遺伝子の候補探索

P. intermedia においても*P. gingivalis* と同様に T9SS により分泌されたタンパク質分解酵素が本菌のヘム鉄獲得に必要だと予測されている。また本菌のタンパク質分解酵素 inpA がヘモグロビン分解活性を有することも報告されている (Byrne DP. et. al. Biochem J. 2010)。そこで本研究期間中では inpA の変異株を作成、すでに作成済みの T9SS の変異株とともに親株と性状、分泌タンパク質、表層タンパク質の比較をおこなう。各株のそれぞれの画分のタンパク質は二次元電気泳動にて展開、個々のタンパク質スポットの有無、量比を比較する。また各株間で差がみられたタンパク質スポットは MALDI/TOF MS にて同定する。同定されたタンパク質の中からヘモグロビン分解酵素の候補を選ぶ。

P. gingivalis 及びタネレ菌などの近縁の菌で同定された T9SS 輸送タンパク質の配列の特長を解析したところ下記の特長が認められた。A) N 末端領域に分泌タンパク質に普遍的にみられる signal 配列が存在する。B) C 末端領域に保存されているアミノ酸配列のモチーフが存在している (CTD domain motif)。これらに加えてタンパク質分解酵素はその種類ごとに特異的なモチーフが報告されている。そこでまず *P. intermedia* OMA14 の全ゲノム配列の決定、全遺伝子の決定を行う。得られた全遺伝子の情報からバイオインフォマティクス的手法を用いることで上記の特長を持つ候補遺伝子の探索を行う。

(2) 候補遺伝子の変異株作成

(1) から候補とされた遺伝子 inpA 遺伝子を含む候補遺伝子の変異株の作成を行う。目的遺伝子と上下流領域を含む断片を PCR にて増幅する。その後目的遺伝子の領域を

Bacteroides 由来の エリスロマイシン耐性遺伝子 *ermF* に置き換えて、目的遺伝子変異株作成用の targeting construct を作成する。このコンストラクトを *Bacteroides*-大腸菌の shuttle plasmid から作成したスクロース存在下で plasmid が脱落する pTCB-sacB に挿入する。このプラスミドを大腸菌株 S17-1 に形質転換後、*P. intermedia* 遺伝子操作可能株に共培養により接合伝達させる。得られた形質転換株から目的遺伝子が *ermF* に置き変わった変異株をスクロース存在下で選択、*inpA* を含む目的遺伝子の変異株を得る。

(3) 変異株の性状解析

変異株の確認

野生株、作成した変異株からゲノムを精製する。制限酵素 *HindIII* で消化後、アガロース電気泳動にて展開後、ニトロセルロース膜に転写する。標的遺伝子上流領域を PCR にて増幅することでプローブ DNA を調整する。これらの膜と DNA プローブを用いてサザンハイブリダイゼーションを行い、標的遺伝子特異的な変異の導入を確認する。

ヘム鉄獲得性の検討

5%羊脱繊維血を添加した血液寒天培地にて野生株、作成した変異株を培養する。5 日間の嫌気培養後、それぞれの株の黒色素産生性を確認する。

inpA 活性測定

タンパク質分解酵素 *inpA* のリコンビナントタンパク質を用いた先行研究で明らかにされた本酵素の基質特異性をもとに活性測定を行う。10mM Boc-Val-Lue-Lys-MCA を基質に用いる。TS 液体培地で培養した菌体を OD600 nm 0.6 に調製、0.01ml を上記の基質液 0.1ml と 10 分間 37 度にて反応させる。基質から分解遊離した蛍光基質を波長 380 nm の励起光下での蛍光（波長 460nm）を測定することで *inpA* 活性を計測する。

赤血球凝集活性の検討

鶏の保存血液を 800g にて遠心分離、血漿、バッフィーコートを取り除く。沈殿した赤血球画分を PBS にて懸濁、洗浄後に再度遠心にて沈殿させる（PBS 洗浄）。この洗浄を 3 回繰り返し、最終的に元の血液の 1%濃度の赤血球懸濁液を調整する。一晚培養した菌液から 800g にて菌体を遠心分離、600 nm にて OD 3.0 の菌の懸濁液を調整する。この菌液を基に連続

2 段階希釈により OD 3 から OD 0.0058 までの菌液を調整する。この懸濁液を調整した洗浄済みの 1%濃度の赤血球懸濁液と等量混和、96 穴の丸底プレートに室温で静置する。1 時間後に凝集形成を判断する。

4. 研究成果

(1) T9SS 変異株、*inpA* 変異株の性状

inpA 遺伝子の特異的な変異株の作成に成功した。作成した変異株からゲノム DNA を調整、サザンハイブリダイゼーションにて遺伝子の特異的な変異を確認した。すでに作成済みの T9SS の変異株(*porK*, *porT*)とともに性状解析を行った。

inpA は T9SS によって輸送されるタンパク質に保存されている CTD domain motif を持つことから T9SS にて菌の表層に輸送されることが予測されている。そこで *inpA* の活性をこれらの株で測定した。

inpA 活性を想定したところ野生株で見られた活性が *inpA*, *porK*, *porT* 変異株のいずれでもほとんど失われた。この結果から *inpA* が T9SS にて菌体の表層に輸送されることを明らかにした。

血液寒天上での集落の観察の結果から T9SS の変異株(*porK*, *porT*)はいずれも黒色素産生性が失われていた (Fig.1)。一方 *inpA* 変異株では黒色素産生性に変化がないことが明らかになった。

Fig. 1 黒色素産生性



この結果から本菌のヘム獲得には *inpA* 以外の T9SS 依存性で輸送されるタンパク質が働いていることが示唆された。そこで当初の計画に沿って電気泳動により膜タンパク質画分から親株に存在、T9SS 変異株で存在しないタンパク質スポットを探索した。結果 *inpA* と同じ C10 family に属するタンパク質分解酵素を 1 個同定した。

(2) 候補遺伝子の探索

使用している野生株の全ゲノム配列を決定、さらに全遺伝子を同定した（論文発表及び Genbank 登録公開）。決定した全遺伝子から他の候補遺伝子を探索する為、各遺伝子のアミノ酸配列をもとに in silico での探索を行った。

モチーフの data base である Pfam から登録されているすべてのモチーフ配列を取得、HMMER プログラムを使用してすべてのタンパク質分解酵素のモチーフの存在を検索した。結果 68 個の遺伝子が検出された。それらの中から N 末端に分泌 signal と C 末端に CTD domain motif を持つものを探索、候補遺伝子として 6 つの遺伝子を選んだ。

これらの中には *inpA* 遺伝子と膜タンパク質画解析から同定した C10 family に属する分解酵素 1 個が含まれていた。残りは C10 family が 1 個、S8 family が 2 個、M6 family が 1 個であった。

(3) 候補遺伝子の変異株作成と解析

(2)で探索した候補遺伝子の中から *inpA* 遺伝子を除いた 5 個の遺伝子の変異株の作成を行った。結果 C10 family 遺伝子 2 個、S8 family 遺伝子 2 個の変異株を得ることができた。作成した変異株を用いて黒色色素産生性を調べた。

Fig.2 候補遺伝子の変異株の黒色色素産生性

<i>inpA</i> 変異株	C10 候補 1 変異株	C10 候補 2 変異株
--------------------	-----------------	-----------------



S8 候補 1 変異株	S8 候補 2 変異株
----------------	----------------

その結果から候補遺伝子の一つの変異株 (S8 family の候補遺伝子 2) において黒色色素産生性が失われていた (Fig.2)。

S8 family の遺伝子 2 の変異株は当初 1 株しか作成できていなかった。その為、標的遺伝子以外のゲノム領域に変異が入った為に黒

色色素産生性が失われた可能性も考えられた。そこで再度この遺伝子の変異株の作成を行った。最終的に新たに 8 株の変異株を得た。得られたすべての株の黒色色素産生性を血液寒天培地上での培養にて確認した。結果、新たに作成した変異株全てで黒色色素産生性が失われていた。この結果から S8 family 候補遺伝子 2 は *P. intermedia* のヘム鉄獲得に必須であることが明らかになった。

歯周病原菌が歯周ポケット内でヘム鉄を獲得する際、ヘム鉄含有タンパク質であるヘモグロビンを豊富に含む赤血球に結合できれば結果的により効率的な獲得が行えると考えられる。本菌と同様に血液寒天培地上で黒色色素産生性を示す *P. gingivalis* に於いてはヘム鉄獲得に働くタンパク質分解酵素の遺伝子内のドメインが赤血球との結合、赤血球凝集に働くことをこれまでに明らかにしている。そこで、今回作成した変異株を用いて赤血球凝集活性を調べた。

Fig.3 赤血球凝集活性

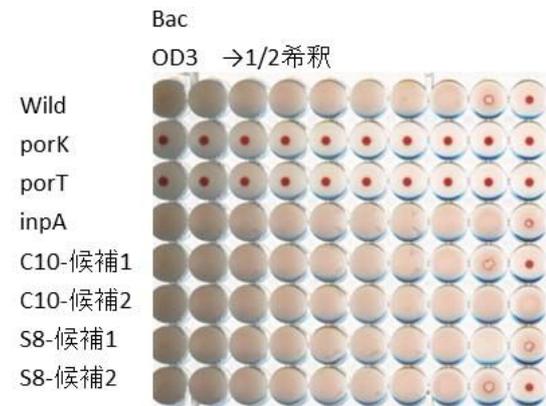


Fig.3 に示すように T9SS の変異株では赤血球凝集活性が完全に失われていた。一方で本研究において作成したタンパク質分解酵素の変異株のいずれでも赤血球凝集活性に影響は見られなかった。この結果から本菌の赤血球凝集活性に働くタンパク質は T9SS 依存性に菌体表面に輸送されることが示唆された。またこの活性には T9SS で輸送されるタンパク質分解酵素遺伝子のうち C10, S8 family のものは関与しないことも明らかになった。

これらの結果から *P. intermedia* の病原性に重要であると考えられるヘム鉄獲得において T9SS が重要であることを明らかにした。またこのヘム鉄獲得に必須な因子として T9SS にて輸送されるタンパク質分解酵素の

一つを同定することができた。またヘム鉄獲得にも深く関与する赤血球凝集活性にも本菌の T9SS 輸送タンパク質が関与することも示唆することができた。本研究の成果は今後の *P. intermedia* の病原性の解析に大きく貢献すると考えている（論文作成中）。

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)

内藤真理子(代表), 歯周病原微生物のゲノム解析に基づく病原因子の解析, 生体の科学, 査読無, vol. 68 (2017) pp114-117

Mariko Naito(代表), Yoshitoshi Ogura, Takehiko Itoh, Mikio Shoji, Masaaki Okamoto, Tetsuya Hayashi, and Koji Nakayama, The complete genome sequencing of *Prevotella intermedia* strain OMA14 and a subsequent finescale, intra-species genomic comparison reveal an unusual amplification of conjugative and mobile transposons and identify a novel *Prevotella*-lineage-specific repeat. DNA Research, 査読有, vol. 23 (2017) pp11-19
doi: 10.1093/dnares/dsv032

〔学会発表〕(計 4 件)

内藤真理子(代表), 小椋義俊, 庄子幹郎, 林哲也, 中山 浩次 Complete genome sequencing of *Prevotella intermedia* and fine-scale genomic analysis. 94th General Session and Exhibition of the IADR, 2016 年 6 月 22 日~6 月 25 日, ソウル(韓国)

内藤真理子(代表), 小椋義俊, 林哲也, 中山浩次 The fine-scale intra-species genomic comparison in *Prevotella intermedia* strains. 第 89 回日本細菌学会総会, 2016 年 3 月 23 日~3 月 25 日, 大阪国際交流センター (大阪府・大阪市)

内藤真理子(代表), 中山 浩次 *Prevotella intermedia* における菌株間のゲノム比較, 第 57 回歯科基礎医学会学術大会, 2015 年 9 月 11 日~9 月 13 日, 朱鷺

メッセ(新潟県・新潟市)

内藤真理子(代表), 庄子幹郎, 成田 由香, 中山 浩次 *Prevotella intermedia* における病原遺伝子特異的変異株作製第 56 回歯科基礎医学会学術大会, 2014 年 9 月 25 日~9 月 27 日, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

Prevotella intermedia OMA14 の完全長ゲノム配列の Database への登録及び公開 (Accession Numbers AP014597 and AP014598)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内藤 真理子 (NAITO, Mariko)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
准教授
研究者番号: 20244072

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

庄子 幹郎 (SHOJI, Mikio)
長崎大学・医歯薬学総合研究科(歯学系)・
助教
研究者番号: 10336175

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