

学位申請論文

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

病態制御科学・病態機構学講座 歯周病態学分野

田口 裕子

(平成26年12月8日受付)

*Porphyromonas gingivalis*における菌体外のジンジパインの
酵素活性に関わる新規遺伝子について

田口 裕子

Yuko Taguchi

緒言

歯周病は細菌の混合感染により引き起こされる慢性炎症性疾患であり、歯肉の炎症と歯槽骨の破壊を引き起こす¹⁾。グラム陰性偏性嫌気性細菌 *Porphyromonas gingivalis* は歯周病の主たる原因菌として考えられており、莢膜、線毛、lipopolysaccharide (LPS)、そして強力なプロテアーゼを主な病原因子として有する²⁾。*P. gingivalis* は複数のプロテアーゼを持つが、なかでもジンジパインは強力なプロテアーゼであり、直接または間接的に歯周組織を破壊する^{3,4)}。ジンジパインには、2種類のア르기ニンジンジパイン (RgpA, RgpB) とリジンジンジパイン (Kgp) の3種類がある^{5,6)}。Kgp および RgpA は、シグナルペプチド、プロペプチド、Lys プロテアーゼドメインまたは Arg プロテアーゼドメイン、付着ドメイン、および C 末端ドメイン (C-terminal domain : CTD) からなる。一方、RgpB は、シグナルペプチド、プロペプチド、Arg プロテアーゼドメイン、および CTD からなる。Kgp と Rgp は C 末端に CTD を持つことから、CTD 蛋白質に位置づけられる。CTD とは、菌体表層に局在する一部の蛋白質の C 末端に存在する約80アミノ酸からなるドメインで、CTD 蛋白質の分泌や、菌体表層への局在に関与する。*P. gingivalis* では、約34個の CTD 蛋白質が存在する⁷⁾。CTD 蛋白質は近年その存在が明らかとなった Type IX (Por) 分泌装置 (T9SS) から分泌されることが明らかになっている⁸⁾。

CTD 蛋白質は、細胞質で合成された後、まず内膜にある Sec 分泌装置を通過してペリプラズムへと移行する。その後、T9SS を通過して菌体表層でプロセッシングされ、菌体外へ分泌されるか、もしくは、菌体表層で外膜へ固定される。T9SS は複数の蛋白質によって構築されている装置であり、PorK, PorL, PorM, PorN, PorP, PorQ, PorT, PorU, PorV (PG27, LptO), PorW, そして Sov から構成される^{9,10)}。CTD は CTD 蛋白質が T9SS を通過した後に切断されるドメインであり、T9SS を通過するために必要なペプチド配列と考えられている。そして、T9SS を通過した CTD 蛋白質には陰性に荷電

したりポ多糖である anionic lipopolysaccharide (A-LPS) が修飾される¹¹⁾。

ところで, *Escherichia coli* をはじめとする複数のグラム陰性細菌において, 外膜蛋白質は, 内膜から外膜にまで輸送される際に, SurA (peptidyl-prolyl isomerase), Skp {OmpH (Outer membrane protein H)}, そして DegP {high temperature requirement A (HtrA)} をはじめとするシャペロンの助けを必要とすることが報告されている¹²⁾。*P. gingivalis* においては HtrA についての報告はあるが, SurA と Skp (OmpH) に関する報告はこれまでなされていない。

P. gingivalis のゲノム配列上には *htrA* に加え, *surA* と *ompH* のホモログも存在する。*P. gingivalis* ATCC33277株のゲノム上に存在する *ompH* のホモログである PGN_0300の遺伝子産物である PGN_0300蛋白質が, *P. gingivalis* の CTD 蛋白質の成熟と修飾に関与している可能性を考え, 研究を行った。

材料および方法

1. 使用菌株, 使用プラスミド, および培養条件

本研究に使用した菌株とプラスミドは, 表1と表2にそれぞれ記した。プラスミドの作製には *E. coli* DH5 α 株を使用した。*E. coli* の培養にはアンピシリン100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含有 Luria-Bertain (LB) 培地 (ナカライテスク, 京都) を使用し, 37°C の好気条件下で培養した。

P. gingivalis の培養には, 変法 BHI 培地 {Brain Heart Infusion (BHI) (Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, NJ, USA), Yeast Extract (BD), ヘミン (和光純薬工業, 大阪), メナジオン(和光純薬工業), およびL-システイン塩酸塩 1 水和物(Sigma) を含む} ⁵⁾, 変法 Tryptic soy (TS) 寒天培地 {Tryptic soy agar (BD), BHI, ヘミン, メナジオン, およびL-システイン塩酸塩 1 水和物を含む} ⁵⁾, および血液寒天培地 {綿羊脱繊維血液 (日本バイオテスト研究所, 東京), ヘミン, メナジオン, およびL-システイン塩酸塩 1 水和物を含む} を用いた。なお, PGN_0300を欠損させた株 (PGN_0300 欠損株) の培養には, エリスロマイシン (Em) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を, PGN_0300欠損株に PGN_0300 を再度保有させた株 (PGN_0300相補株) の培養には Em 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ およびテトラサイクリン (Tc) 0.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を培地に添加して使用した。培養には, 嫌気ボックス (Whitley Workstation DG250, Microbiology International, Frederick, MD, USA) を用い, 37°C の嫌気条件下 (10% CO₂, 10% H₂, 80% N₂) で培養した。

2. 遺伝子操作

制限酵素はタカラバイオ (滋賀) で購入した。核酸の泳動用緩衝液には1× Tris-acetate-ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (TAE, 1mM EDTA を含む40 mM トリス酢酸緩衝液 ; pH 8.0) を使用し, 1%または2%アガロースゲルを用いた。分離し

た核酸断片は臭化エチジウム (0.5 mg/mL) で染色し、ゲル撮影装置 Dopphin-View (クラボウ, 東京) を使用して、紫外線 (波長: 320nm) 照射下にて撮影した。

3. PGN_0300欠損株と PGN_0300相補株の作製

PGN_0300欠損株の作製は、PGN_0300遺伝子座に Em 耐性遺伝子カセットを挿入することによって作製した。

P. gingivalis ATCC33277株のゲノム DNA を鋳型とし、PGN_0300の上流および下流領域各1,000 bp をプライマーセット PGN_0300U-F と PGN_0300U-R, および PGN_0300D-F と PGN_0300D-R を使用し、PrimeSTAR GXL DNA polymerase (タカラバイオ) を用いて polymerase chain reaction (PCR) 法により増幅した。アガロースゲル電気泳動法によって目的の大きさの DNA 断片が増幅されていることを確認後、PCR 産物を QIA quick PCR Purification Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて精製した。上流および下流領域の PCR 産物をそれぞれ EcoRI と BamHI あるいは XbaI と BamHI を用いて37°C で3時間消化し、Mini Elute Reaction Cleanup Kit (Qiagen) で精製した。精製した2種類の DNA 断片と、EcoRI と XbaI で制限酵素処理した pUC19を、DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (タカラバイオ) を用いて16°C で1時間反応させることにより結合させ、その後 *E. coli* DH5α 株に形質転換した。pUC19に2つの断片が正しく挿入されたプラスミドを選択し、その BamHI サイトに Em 耐性遺伝子カセットを挿入した。Em 耐性遺伝子カセットは、Em 耐性遺伝子カセットが挿入されたプラスミド pKD355¹³⁾ を鋳型として、プライマーセット Em-F と Em-R を用いて PCR 法によって増幅した。得られた PCR 産物を、QIA quick PCR Purification Kit を用いて精製した後に BamHI で消化し、PGN_0300領域が挿入された上記のプラスミドに組み込んだ。*E. coli* DH5α株に形質転換後、Em 耐性遺伝子カセットが正方向に挿入されたプラスミド pUC-PGN_0300を精製し、PuvII で線形化した後、*P. gingivalis* ATCC33277株に電気穿孔法 (1.25 kV/mm) によって導入した。Em を含む血

液寒天培地で集落を形成した菌について、ゲノム上の PGN_0300 遺伝子と Em 耐性遺伝子カセットが正しく置換されたことを PGN_0300 遺伝子座と Em 耐性遺伝子カセットの配列特異的プライマーを用いた PCR 法で確認した。

PGN_0300 相補株は、PGN_1045 遺伝子座に PGN_0300 遺伝子を挿入することによって作製した。PGN_1045 は β -ガラクトシダーゼをコードしており、*P. gingivalis* はラクトースを利用しないため、この遺伝子を欠損させても生存に影響しないと考えられるため選択した。

PGN_0300 相補株作製のために、*P. gingivalis* ATCC33277 株のゲノム DNA を鋳型とし、PGN_1045 の上流および下流領域の各 1,000 bp をプライマーセット PGN_1045U-F と PGN_1045U-R、および PGN_1045D-F と PGN_1045D-R を使用し、PrimeSTAR GXL DNA polymerase を用いて PCR 法によって増幅した。精製した上流および下流領域の PCR 産物をそれぞれ XhoI と HindIII, BamHI と NotI により 37°C で 3 時間消化したのち、Mini Elute Reaction Cleanup Kit で精製した。上流領域を pBluescript II SK(-) (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) の XhoI-HindIII サイトに挿入して、プラスミド pB-1045A を得た。そして、pB-1045A を BamHI と NotI で消化し、制限酵素処理した PGN_1045 下流領域 DNA 断片を挿入してプラスミド pB-1045AB を得た。次に、pB-1045AB を BamHI で消化し、BamHI と BglII を用いてプラスミド pKD375¹⁴⁾ を切断して得た Tc 耐性遺伝子カセットを挿入して pK-1045TET を得た。pK-1045TET に *fimA* プロモーターを挿入してプラスミド pCPG を作製した。このために、*P. gingivalis* ATCC33277 株のゲノム DNA を鋳型とし、*fimA* プロモーター領域をプライマーセット FimA-PRO-F と FimA-PRO-R を用いて PCR 法で増幅し、StuI と BamHI で消化した後、p1045TET の SmaI-BamHI 切断サイトに挿入した。最後に *P. gingivalis* ATCC33277 株のゲノム DNA を鋳型とし、プライマーセット PGN_0300ORF-F と PGN_0300ORF-R で増幅した PGN_0300 の Open Reading Frame を BamHI で消化した後、pCPG の *fimA* プロモーター直下の BamHI サイトに挿入

して、プラスミド pCPG-PGN_0300 を構築した。BssHIII を用いて pCPG-PGN_0300 を線形化したのち、PGN_0300 欠損株へ電気穿孔法にて導入した。Em および Tc を含む血液寒天培地上に集落を形成した菌を用いて、ゲノム上の PGN_1045 遺伝子座と、導入した pCPG-PGN_0300 の DNA 断片との間で正しく相同組換えが行われていることを PGN_1045 遺伝子座の配列特異的プライマーを用いた PCR 法で確認した。

4. 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)

全 RNA の抽出は TRIzol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて行った。精製した RNA サンプルは、DNaseI (タカラバイオ) を用いて 37°C で 1 時間処理した後、ゲノム DNA の混入がないことを、プライマーセット PGN_0299-F と PGN_0299-R を用いた PCR 法で増幅産物が生じないことで確認した。2 μ g の RNA を SuperscriptIII First Strand Synthesis Supermix (Invitrogen) とランダムヘキサマープライマー (Invitrogen) を用いて cDNA に逆転写した。得られた cDNA を鋳型として、PrimeSTAR GXL DNA Polymerase, プライマーセット PGN_0299-F と PGN_0299-R, PGN_0300-F と PGN_0300-R, および PGN_0301-F と PGN_0301-R を使用した PCR 法を行うことで、PGN_0299, PGN_0300, および PGN_0301 の各遺伝子の発現を確認した。

5. プロテアーゼ活性の測定

P. gingivalis は、BHI 培地で 37°C, 嫌気下で一晩培養した。菌体と培養上清は 4°C, 10,000 \times g で 20 分間遠心して分離した。集菌した菌体はリン酸緩衝液 (Invitrogen) で懸濁した。

Kgp と Rgp の活性測定は Sato らの方法に準じて行い⁹⁾, それぞれに特異的な蛍光基質である Benzyloxycarbonyl-L-phenylalanyl-L-arginine 4-methyl-coumaryl-7-amide (Z-Phe-Arg-MCA) と Benzyloxycarbonyl-L-histidyl-L-glutamyl-L-lysine 4-Methyl-coumaryl-7-amide

(Z-His-Glu-Lys-MCA) (ペプチド研究所, 大阪) を用いた。培養上清および菌体に5 mM システインを含有する20 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) と蛍光基質を加え, 40°C で10分間 反応させ, 460 nm の蛍光波長 (励起波長 380 nm) で測定した。Kgp と Rgp の活性は, 1分間に1 nmol のアミノメチルクマリンを遊離する活性を1ユニットと定義した。

6. 細胞分画

P. gingivalis の菌体成分は, Sato らの方法¹⁵⁾ に準じて分画した。すなわち, 200 mL の *P. gingivalis* 培養物を4°C で, 10,000×g, 10分間遠心して, 菌体と培養上清に分けた。菌体を100 mL のリン酸緩衝液(0.1mM *N*^α-*p*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone および0.1 mM leupeptin を含有する) で懸濁し, フレンチプレスを用いて100 MPa の加圧下で2回処理して菌体を破碎した。破碎されなかった菌体は, 4°C で2,400×g, 10分間遠心して取り除いた。その上清を4°C で, 100,000×g, 1時間遠心した後, その上清画分を細胞質とペリプラズム画分として回収した。沈澱物は, 1% Triton X-100と20 mM MgCl₂を含有するリン酸緩衝液で懸濁し, 30°C で20分間静置した。その後, 4°C で100,000×g, 1時間遠心した後, 上清画分を内膜画分として回収し, 沈澱物を外膜画分として回収した。

ベジクル非含有の培養上清を得るためには, 140 mL の *P. gingivalis* 培養物を4°C で, 6,000×g, 10分間遠心した。次に得られた上清をさらに4°C で100,000×g, 1時間遠心分離して, この上清をベジクル非含有培養上清とした。ベジクル非含有培養上清中の蛋白質は, 最終濃度20%になるようにトリクロロ酢酸を加え, 氷上で1時間静置することによって沈殿させ, 沈澱物をアセトンで2回洗浄した。洗浄した沈澱物を乾燥させた後, 0.1 mM *N*^α-*p*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone (TLCK) と0.1 mM ロイペプチン含有の滅菌蒸留水に溶解した。

7. 抗体

PGN_0300蛋白質に対する抗体の作製には、PGN_0300蛋白質の部分ペプチドを使用した。すなわち、N末端にシステイン残基を付与した PGN_0300の膜貫通ドメイン以外の領域中の93番目のイソロイシンから106番目のリジンまでに相当するペプチド CIVKKEQQASELKRK を合成し、ヘモシアニン (KLH) を共有結合させた (オペロンバイオテクノロジーへ委託, 東京)。モルモットへの免疫と採血はイブバイオサイエンス (和歌山) へ委託した。抗 PGN_0300ペプチドモルモット抗血清は、1/500希釈で使用した。抗 Kgp ウサギポリクローナル抗体¹⁶⁾と抗 Rgp マウスポリクローナル抗体¹⁶⁾は、1/5,000希釈で使用した。A-LPS を認識するマウスモノクローナル抗体1B5¹⁷⁾ は、Curtis 博士より恵与していただいた。

8. ウェスタンブロット法

ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) は Laemmli¹⁸⁾ らの方法に従って行った。

泳動に用いる試料は、2 mM オルトバナジウム酸塩および1 mM フッ化ナトリウムを含有する SDS サンプルバッファーに溶解した。還元状態で95°C、10分間の加熱により変性させた後、ポリアクリルアミドを含むゲルと泳動用緩衝液(25 mM Tris-HCl, 200 mM グリシン, 35 mM SDS) を用いて泳動して蛋白質を分離した。分離した蛋白質を湿式転写装置 (Mini Trans-Blot Cell; Bio-Rad) を用い、転写用緩衝液 (25 mM Tris · HCl, 192 mM グリシン, 20% メタノール) 中で polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜へ転写した (100 V 定電圧下)。転写後の PVDF 膜を5% スキムミルク (BD) 含有 Tris-Tween 緩衝食塩水 (TBST 緩衝液 ; 20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 150 mM NaCl, および0.05% Tween20) に1時間浸してブロッキング操作を行った。その後、1次抗体を5% スキムミルク含有 TBST 緩衝液で前述の濃度に希釈した溶液中に PVDF 膜を浸漬し、4 °C で12時間反応させた。反応後、1% スキムミルク含有 TBST 緩衝液で1時間洗浄し、次いで2次抗体を5% スキムミルク含

有 TBST 緩衝液で希釈した溶液中に PVDF 膜を浸漬し、常温で1時間反応させた。2次抗体として horseradish peroxidase (HRP) で標識した抗ウサギ IgG 抗体 (Dako, Glostrup, Denmark), 抗マウス IgG 抗体 (Dako), あるいは抗モルモット IgG 抗体 (Millipore Co., Temecula, CA, USA) を用いた。1% スキムミルク含有 TBST 緩衝液で1時間洗浄後, ECL Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) および ChemiDoc MP (Bio Lad) を用いて検出を行った。

9. 統計処理

各実験系における統計解析には, 対応のない群間の Student's *t* test を用いた。なお, *p* 値が0.05以下をもって有意差ありと判定した。

結果

1. PGN_0300の菌体内局在

P. gingivalis ATCC33277株のゲノム上には、National Center for Biotechnology Information (NCBI) データベースによると、2つの *ompH* ホモログである PGN_0300 と PGN_0301が存在する。PGN_0300と PGN_0301のアミノ酸の相同性は24.9%であった (図1)。PGN_0300と PGN_0301のアミノ酸配列を TMHMM Server v. 2.0 software (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) で解析することによって、両蛋白質が膜蛋白質である可能性を検討した。その結果、PGN_0300蛋白質は、N末端 (Arg⁷から Leu²⁹) に膜貫通ドメインを1つ有することが予測され、膜蛋白質である可能性が高いことが示唆された。一方、PGN_0301蛋白質には膜貫通ドメインの存在は予測されなかった。PGN_0300蛋白質の局在を確認するために、*P. gingivalis* ATCC33277株の菌体成分を分離し、ウエスタンブロット法で抗 PGN_0300ペプチド抗体と反応させた。その結果、外膜画分に約17 kDa のバンドが強く検出された (図2)。以上のことから PGN_0300蛋白質も外膜蛋白質であることが推測された。

2. PGN_0300欠損株の作製

P. gingivalis ATCC33277株のゲノム上の PGN_0300遺伝子を Em 耐性遺伝子カセットに置換した PGN_0300欠損株は、血液寒天培地上で白色コロニーを形成した。また、PGN_0300相補株は、親株と同様に黒色コロニーを形成した (図3)。PGN_0300欠損株における PGN_0300遺伝子の発現の消失および、PGN_0300遺伝子を欠失したことによる前後の PGN_0299遺伝子と PGN_0301遺伝子の発現への影響を、RT-PCR 法で調べた。親株、PGN_0300欠損株、および PGN_0300相補株から抽出した全 RNA から調整した cDNA を鋳型とし、PGN_0300遺伝子特異的プライマーセットを用いて PCR を行ったところ、

親株および PGN_0300相補株の cDNA では約360 bp の増幅産物が得られた (図4)。これに対して PGN_0300欠損株の cDNA を用いた場合には増幅産物は全くなかった。このことから、PGN_0300欠損株では PGN_0300遺伝子は発現されていないことが確認された。

PGN_0299遺伝子あるいは PGN_0301遺伝子それぞれに特異的なプライマーを用いた場合には、親株、PGN_0300欠損株、および PGN_0300相補株のいずれの cDNA においても約450 bp あるいは約350 bp の増幅産物がそれぞれ検出された (図4)。このことから PGN_0300欠損株において、PGN_0300遺伝子の破壊は PGN_0299遺伝子および PGN_0301遺伝子の発現に影響を及ぼしていないことが確認された。以上のことから、PGN_0300欠損株における白色コロニーの形成は、PGN_0300遺伝子の欠損が原因であることが示された。

3. PGN_0300欠損株におけるジンジパインの活性

PGN_0300欠損株におけるジンジパインの活性を検討した。PGN_0300欠損株の菌体と培養上清中における Kgp と Rgp の活性を調べたところ、菌体と培養上清中のいずれにおいても Kgp と Rgp の活性はともに顕著に低下していた。一方、PGN_0300相補株の Kgp と Rgp の活性は、菌体および培養上清中のいずれにおいても、ともに部分的に回復していた (図5)。

4. 菌体および培養上清における Kgp と Rgp 存在様式の解析

PGN_0300欠損株では、菌体および培養上清中における Kgp と Rgp の活性が低下していたことから、菌体および培養上清中の Kgp と Rgp の存在様式を、抗 Kgp 抗体と抗 Rgp 抗体を用いたウェスタンブロット法で解析した。菌体の全蛋白質を用いたところ、Kgp および Rgp の蛋白質量は親株に対し、PGN_0300欠損株では顕著に少なかった (図6)。PGN_0300欠損株では特に成熟型の Kgp と推測される約50 kDa の蛋白質の量が顕著に低

下しており、逆にプロ型と推測される約190 kDa の蛋白質の比率が増加していた。また、Rgp では糖鎖修飾されたと考えられる約60-80 kDa のスメアな蛋白質の量および、成熟型の Rgp と推測される43 kDa の蛋白質の量が PGN_0300欠損株では顕著に低下していた。培養上清中の蛋白質に対して抗 Kgp 抗体を反応させたところ、親株の培養上清では成熟型の Kgp と推測される約50 kDa の蛋白質が検出された。一方、PGN_0300欠損株の培養上清では成熟型 Kgp は検出されず、未成熟型の約140 kDa の蛋白質の比率が増加していた。また、抗 Rgp 抗体との反応においても、親株の培養上清では成熟型 Rgp と推定される約43 kDa の蛋白質が検出されたのに対して、欠損株の培養上清では未成熟型 Rgp と推定される75 kDa 以上の蛋白質が顕著に検出されたが、成熟型 Rgp はわずかに検出されたのみであった。PGN_0300相補株における反応はいずれの場合においても親株に対する反応に類似していた。

5. 菌体内における Kgp と Rgp の局在

親株と PGN_0300欠損株における Kgp と Rgp の局在を比較した。親株と PGN_0300欠損株の菌体を、菌体全抽出物、細胞質・ペリプラズム画分、内膜・外膜画分、内膜画分、外膜画分にそれぞれ分画し、抗 Kgp 抗体と抗 Rgp 抗体を用いたウエスタンブロット法で解析した (図7)。

親株では、成熟型 Kgp と推定される約50 kDa の蛋白質が外膜画分に検出された。しかし、PGN_0300欠損株では、外膜画分を含めたいずれの画分においても成熟型 Kgp は検出されず、未成熟型の Kgp と推定される約190 kDa の蛋白質が菌体全抽出物とともに細胞質・ペリプラズム画分に検出された。

また、親株では、成熟型 RgpA と推定される約43 kDa の蛋白質とともに、糖鎖修飾された成熟型 RgpB と推定される蛋白質が60-80 kDa にスメアなバンドとして外膜画分に検出された。これに対し、PGN_0300欠損株では、成熟型 RgpB は外膜画分を含めたい

ずれの画分においても検出されず, 未成熟型 RgpA と推定される約120 kDa の蛋白質と, 未成熟型 RgpB と推定される約70 kDa の蛋白質が菌体全抽出物とともに細胞質・ペリプラズム画分に検出された。

6. A-LPS の検出

親株, PGN_0300欠損株, および PGN_0300相補株における A-LPS の存在を, A-LPS に反応するモノクローナル抗体1B5を用いたウエスタンブロット法で検討した。図8に示すように, いずれの株においても1B5と反応するスメアなバンドが検出された。しかし, 親株と PGN_0300相補株ではスメアなバンドが約200 kDa の高分子にまでおよんでいたのに対し, PGN_0300欠損株では約70 kDa までにとどまっていた。

考察

本研究では、*P. gingivalis* ATCC33277株を親株として作製した PGN_0300欠損株が、血液寒天培地上で白色コロニーを形成したことから、PGN_0300蛋白質はジンジパインである Kgp と Rgp の活性に関与していることが強く示唆された。*P. gingivalis* は血液寒天培地上で黒色コロニーを形成する。これは、ヘモグロビンが分解された際に遊離されるヘムが菌体表面上で μ -oxo heme dimer として蓄積することによる¹⁹⁾。ヘモグロビンの分解にはジンジパインが関与し、*kgp* の遺伝子変異株では血液寒天培地上でコロニーの黒色化が減弱し、白色コロニーとなる²⁰⁾。

kgp に変異が無いにも関わらず白色コロニーを形成する変異株が複数報告されている^{15, 21-34)}。これらの欠損株はその表現型から、*porT* 型¹⁵⁾ と *porR* 型²³⁾ に分けられる。*porT* 型の欠損株では、菌体と上清のいずれにおいてもジンジパイン活性がなく、Kgp と Rgp を含む CTD 蛋白質が菌体外へ分泌されず、ペリプラズムに蓄積する。一方、*porR* 型の欠損株では、CTD 蛋白質は分泌されるが、菌体のジンジパイン活性は消失する。しかし、上清中のジンジパイン活性は維持される。*porR* 型の欠損株では A-LPS が合成されないため^{24-26, 28-30, 34)} 菌体表面における CTD 蛋白質への A-LPS 修飾が行われず、その結果、CTD 蛋白質は菌体表面へ固定されない。*porT* 型と *porR* 型以外に、LptO³¹⁾ と PorU³²⁾ の変異が報告されている。LptO の欠損株では、A-LPS は合成されるが、ペリプラズムに蓄積し、CTD 蛋白質には結合しない³¹⁾。一方で、PorU は CTD 蛋白質から CTD を切断するペプチダーゼであり³²⁾、PorU 欠損株では CTD が切断されないため、菌体表面へ分泌された CTD 蛋白質は A-LPS は結合しない。その結果、CTD 蛋白質は外膜には固定されず、菌体外へ放出される。PGN_0300欠損株はその外膜画分に抗 Kgp 抗体あるいは抗 Rgp 抗体と反応する蛋白質は全く検出されなかった。そして、未成熟型と考えられる Kgp と Rgp が細胞質あるいはペリプラズムに蓄積していた (図7)。また、培養上清

中にもプロ型と考えられる未成熟の Kgp と Rgp が検出された。1B5抗体を用いたウエスタンブロット法では、 PGN_0300欠損株の全菌体において、 A-LPS のスメアなバンドが検出されたが、低分子側にシフトしており A-LPS は CTD 蛋白質非結合型であることが示された。以上の PGN_0300欠損株の表現型は、 PorU 欠損株の表現型に類似していることが示唆された。 PGN_0300欠損株において CTD 蛋白質における CTD の切断が行われない可能性に加え、 A-LPS の輸送が正常には行われていない可能性も残されている。今後、この点を明らかにする必要がある。

ところで、CTD 蛋白質の多くは外膜蛋白質である。複数のグラム陰性菌において、 SurA, Skp (OmpH) , あるいは DegP (HtrA) をはじめとする分子シャペロンが外膜蛋白質に対して作用することが報告されている^{35,36}。これらは、外膜蛋白質が誤った構造を取ることや凝集することを防ぎ、正しい構造を取るようフォールディングすることを助けている。 *P. gingivalis* ATCC33277株のゲノム上にも *surA*, *degP* (*htrA*) , そして *ompH* ホモログが存在する。しかし、 *P. gingivalis* の SurA や Skp (OmpH) に関する報告はない。 PGN_0300と PGN_0301は OmpH ホモログである。これまでの報告では、 Skp (OmpH) は菌種毎にその局在が異なっている。 *E. coli* では Skp は膜貫通ドメインを有しておらず、ペリプラズムに局在し、外膜蛋白質がペリプラズムを通過する際にシャペロンとして作用し、それらのβバレル構造の形成を助ける機能がある³⁵。 *Flavobacterium psychrophilum*³⁷ , や *Yersinia pseudotuberculosis*³⁸ では OmpH として外膜に局在している。細菌における OmpH の機能は不明であるが、外膜にあることに関連し、抗原性が高いことが示されている^{37,38}。本研究において TMHMM Server v. 2.0 software による解析の結果、 PGN_0300蛋白質は膜貫通ドメインを1つ有する外膜蛋白質であることが予測され、抗 PGN_0300ペプチド抗体を用いたウエスタンブロット法の結果からも外膜に局在することが支持された。

本研究を総括すると、 PGN_0300は外膜蛋白質であり、 T9SS から分泌された Kgp, Rgp

のフォールディングに関与し、それらの形状を正常に保つことに関与している可能性があげられる。CTD は CTD 蛋白質が T9SS によって分泌される時、また、CTD 切断後に CTD 蛋白質に A-LPS が修飾される時にシグナルとして機能することが示唆されている。そして、CTD が機能するためには、その一次構造よりも立体構造が重要であることが報告されている³⁹⁾。この立体構造を維持するために PGN_0300 蛋白質が機能している可能性がある。あるいは CTD を切断する PorU に働き、その機能を正常に保つために作用している可能性がある。PorU は CTD 蛋白質のひとつであるが、他の CTD 蛋白質とは異なり外膜に運ばれたのちにも CTD が切断されない特殊なタイプの CTD 蛋白質である³²⁾。PGN_0300 が PorU に特異的に働いている可能性がある。今後は、PGN_0300 と PGN_0301 がシャペロンとして機能をしている可能性を含め、PGN_0300 がどのようなメカニズムで、ジンジパインの分泌、プロセッシングに関与しているかを明らかにする必要がある。

結論

P. gingivalis の OmpH 様蛋白質である PGN_0300蛋白質は、ジンジパインの分泌、プロセッシング、および糖鎖修飾に関与することが示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、懇篤なる御指導、御高閲を賜りました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔微生物学分野、大原直也教授、そして主任教授であります岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯周病態学分野、高柴正悟教授に謹んで感謝の意を表します。また、実験試料を恵与いただきましたとともに貴重な御助言を頂きました長崎大学大学院医歯薬学総合研究科口腔病原微生物学分野、中山浩次教授、内藤真理子准教授、佐藤啓子助教、雪竹英治技術職員に感謝申し上げます。1B5抗体を恵与いただきましたロンドン大学クイーンメアリー校 Michael A. Curtis 教授に感謝申し上げます。最後に本研究を行うにあたり、貴重な御助言を頂きました岡山大学大学院医歯薬学総合研究科口腔微生物学分野および歯周病態学分野の諸先生方に厚く御礼申し上げます。

文献

- 1) R.C. Page, S. Offenbacher, H.E. Schroeder, G.J. Seymour, K.S. Kornman. Advances in the pathogenesis of periodontitis: summary of developments, clinical implications and future directions, *Periodontol* 2000 14 (1997) 216-248.
- 2) S.C. Holt, J.L. Ebersole. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis, *Periodontol* 2000 38 (2005) 72-122.
- 3) J. Potempa, A. Banbula, J. Travis. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses, *Periodontol* 2000 24 (2000) 153-192.
- 4) E. Andrian, Y. Mostefaoui, M. Rouabhia, D. Grenier. Regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases by *Porphyromonas gingivalis* in an engineered human oral mucosa model, *J Cell Physiol* 211 (2007) 56-62.
- 5) K. Nakayama, T. Kadowaki, K. Okamoto, K. Yamamoto. Construction and characterization of arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain)-deficient mutants of *Porphyromonas gingivalis*. Evidence for significant contribution of Arg-gingipain to virulence, *J Biol Chem* 270 (1995) 23619-23626.
- 6) J. Potempa, R. Pike, J. Travis. The multiple forms of trypsin-like activity present in various strains of *Porphyromonas gingivalis* are due to the presence of either Arg-gingipain or Lys-gingipain, *Infect Immun* 63 (1995) 1176-1182.
- 7) C.A. Seers, N. Slakeski, P.D. Veith, T. Nikolof, Y.Y. Chen, S.G. Dashper, E.C. Reynolds. The RgpB C-terminal domain has a role in attachment of RgpB to the outer membrane and belongs to a novel C-terminal-domain family found in *Porphyromonas gingivalis*, *J Bacteriol* 188 (2006) 6376-6386.
- 8) K. Sato, H. Yukitake, Y. Narita, M. Shoji, M. Naito, K. Nakayama. Identification of *Porphyromonas gingivalis* proteins secreted by the Por secretion system, *FEMS Microbiol Lett* 338 (2013) 68-76.
- 9) K. Sato, M. Naito, H. Yukitake, H. Hirakawa, M. Shoji, M.J. McBride, R.G. Rhodes, K. Nakayama. A protein secretion system linked to bacteroidete gliding motility and pathogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010) 276-281.
- 10) M. Shoji, K. Sato, H. Yukitake, Y. Kondo, Y. Narita, T. Kadowaki, M. Naito, K. Nakayama. Por secretion system-dependent secretion and glycosylation of *Porphyromonas gingivalis* hemin-binding protein 35, *PLoS One* 6 (2011) e21372.

- 11) N. Slakeski, C.A. Seers, K. Ng, C. Moore, S.M. Cleal, P.D. Veith, A.W. Lo, E.C. Reynolds. C-terminal domain residues important for secretion and attachment of RgpB in *Porphyromonas gingivalis*, *J Bacteriol* 193 (2011) 132-142.
- 12) J.G. Sklar, T. Wu, D. Kahne, T.J. Silhavy. Defining the roles of the periplasmic chaperones SurA, Skp, and DegP in *Escherichia coli*, *Genes Dev* 21 (2007) 2473-2484.
- 13) J. Ueshima, M. Shoji, D.B. Ratnayake, K. Abe, S. Yoshida, K. Yamamoto, Nakayama, K. Purification, gene cloning, gene expression, and mutants of Dps from the obligate anaerobe *Porphyromonas gingivalis*, *Infect Immun* 71 (2003) 1170-1178.
- 14) Y. Shi, D.B. Ratnayake, K. Okamoto, N. Abe, K. Yamamoto, K. Nakayama. Genetic analyses of proteolysis, hemoglobin binding, and hemagglutination of *Porphyromonas gingivalis*. Construction of mutants with a combination of *rgpA*, *rgpB*, *kgp*, and *hagA*, *J Biol Chem* 274 (1999) 17955-17960.
- 15) K. Sato, E. Sakai, P.D. Veith, M. Shoji, Y. Kikuchi, H. Yukitake, N. Ohara, M. Naito, K. Okamoto, E.C. Reynolds, K. Nakayama. Identification of a new membrane-associated protein that influences transport/maturation of gingipains and adhesins of *Porphyromonas gingivalis*, *J Biol Chem* 280 (2005) 8668-8677.
- 16) R. Takii, T. Kadowaki, A. Baba, T. Tsukuba, K. Yamamoto. A functional virulence complex composed of gingipains, adhesins, and lipopolysaccharide shows high affinity to host cells and matrix proteins and escapes recognition by host immune systems, *Infect Immun* 73 (2005) 883-893.
- 17) M.A. Curtis, A. Thickett, J.M. Slaney, M. Rangarajan, J. Aduse-Opoku, P. Shepherd, N. Paramonov, E.F. Hounsell. Variable carbohydrate modifications to the catalytic chains of the RgpA and RgpB proteases of *Porphyromonas gingivalis* W50, *Infect Immun* 67 (1999) 3816-3823.
- 18) U.K. Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680-685.
- 19) J.W. Smalley, J. Silver, P.D. Marsh, A.J. Birss. The periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis* binds iron protoporphyrin IX in the μ -oxo dimeric form: an oxidative buffer and possible pathogenic mechanism, *Biochem J* 331 (1998) 681-685.
- 20) K. Okamoto, K. Nakayama, T. Kadowaki, N. Abe, D.B. Ratnayake, K. Yamamoto. Involvement of a lysine-specific cysteine proteinase in hemoglobin adsorption and heme accumulation by *Porphyromonas gingivalis*, *J Biol Chem* 273 (1998) 21225-21231.
- 21) C.I. Hoover, F. Yoshimura. Transposon-induced pigment-deficient mutants of *Porphyromonas gingivalis*, *FEMS Microbiol Lett* 124 (1994) 43-48.

- 22) T. Chen, H. Dong, R. Yong, M.J. Duncan. Pleiotropic pigmentation mutants of *Porphyromonas gingivalis*, *Microb Pathog* 28 (2000) 235-247.
- 23) M. Shoji, D.B. Ratnayake, Y. Shi, T. Kadowaki, K. Yamamoto, F. Yoshimura, A. Akamine, M.A. Curtis, K. Nakayama. Construction and characterization of a nonpigmented mutant of *Porphyromonas gingivalis*: cell surface polysaccharide as an anchorage for gingipains, *Microbiology* 148 (2002) 1183-1191.
- 24) E. Vanterpool, F. Roy, H.M. Fletcher. The *vimE* gene downstream of *vimA* is independently expressed and is involved in modulating proteolytic activity in *Porphyromonas gingivalis* W83, *Infect Immun* 72 (2004) 5555-5564.
- 25) E. Vanterpool, F. Roy, H.M. Fletcher. Inactivation of *vimF*, a putative glycosyltransferase gene downstream of *vimE*, alters glycosylation and activation of the gingipains in *Porphyromonas gingivalis* W83, *Infect Immun* 73 (2005) 3971-3982.
- 26) E. Vanterpool, F. Roy, L. Sandberg, H.M. Fletcher. Altered gingipain maturation in *vimA*- and *vimE*-defective isogenic mutants of *Porphyromonas gingivalis*, *Infect Immun* 73 (2005) 1357-1366.
- 27) E. Vanterpool, F. Roy, W. Zhan, S.M. Sheets, L. Sangberg, H.M. Fletcher. VimA is part of the maturation pathway for the major gingipains of *Porphyromonas gingivalis* W83, *Microbiology* 152 (2006) 3383-3389.
- 28) N.A. Paramonov, J. Aduse-Opoku, A. Hashim, M. Rangarajan, M.A. Curtis. Structural analysis of the core region of O-lipopolysaccharide of *Porphyromonas gingivalis* from mutants defective in O-antigen ligase and O-antigen polymerase, *J Bacteriol* 191 (2009) 5272-5282.
- 29) K. Sato, N. Kido, Y. Murakami, C.I. Hoover, K. Nakayama, F. Yoshimura. Lipopolysaccharide biosynthesis-related genes are required for colony pigmentation of *Porphyromonas gingivalis*, *Microbiology* 155 (2009) 1282-1293.
- 30) M. Yamaguchi, K. Sato, H. Yukitake, Y. Noiri, S. Ebisu, K. Nakayama. A *Porphyromonas gingivalis* mutant defective in a putative glycosyltransferase exhibits defective biosynthesis of the polysaccharide portions of lipopolysaccharide, decreased gingipain activities, strong autoaggregation, and increased biofilm formation, *Infect Immun* 78 (2010) 3801-3812.
- 31) Y.Y. Chen, B. Peng, Q. Yang, M.D. Glew, P.D. Veith, K.J. Cross, K.N. Goldie, D. Chen, N. O'Brien-Simpson, S.G. Dashper, E.C. Reynolds. The outer membrane protein LptO is essential for the O-deacylation of LPS and the co-ordinated secretion and attachment of A-LPS and CTD proteins in *Porphyromonas gingivalis*, *Mol Microbiol* 79 (2011) 1380-1401.
- 32) M.D. Glew, P.D. Veith, B. Peng, Y.Y. Chen, D.G. Gorasia, Q. Yang, N. Slakeski, D. Chen, C.

- Moore, S. Crawford, E.C. Reynolds. PG0026 is the C-terminal signal peptidase of a novel secretion system of *Porphyromonas gingivalis*, *J Biol Chem* 287 (2012) 24605-24617.
- 33) M. Shoji, H. Yukitake, K. Sato, Y. Shibata, M. Naito, J. Aduse-Opoku, Y. Abiko, M.A. Curtis, K. Nakayama. Identification of an O-antigen chain length regulator, WzzP, in *Porphyromonas gingivalis*, *Microbiologyopen* 2 (2013) 383-401.
- 34) M. Shoji, K. Sato, H. Yukitake, M. Naito, K. Nakayama. Involvement of the Wbp pathway in the biosynthesis of *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide with anionic polysaccharide, *Sci Rep* 4 (2014) 5056.
- 35) C. Goemans, K. Denoncin, J.F. Collet. Folding mechanisms of periplasmic proteins, *Biochim Biophys Acta* 1843 (2014) 1517-1528.
- 36) B. Lipinska, M. Zylicz, C. Georgopoulos. The HtrA (DegP) protein, essential for *Escherichia coli* survival at high temperatures, is an endopeptidase, *J Bacteriol* 172 (1990) 1791-1797.
- 37) F. Dumetz, E. Duchaud, S.E. LaPatra, C. Le Marrec, S. Claverol, M.C. Urdaci, M. Le Henaff. A protective immune response is generated in rainbow trout by an OmpH-like surface antigen (P18) of *Flavobacterium psychrophilum*, *Appl Environ Microbiol* 72 (2006) 4845-4852.
- 38) R. Vuorio, L. Hirvas, R.B. Raybourne, D.T. Yu, M. Vaara. The nucleotide and deduced amino acid sequence of the cationic 19 kDa outer membrane protein OmpH of *Yersinia pseudotuberculosis*, *Biochim Biophys Acta* 1129 (1991) 124-126.
- 39) X.Y. Zhou, J.L. Gao, N. Hunter, J. Potempa, K.A. Nguyen. Sequence-independent processing site of the C-terminal domain (CTD) influences maturation of the RgpB protease from *Porphyromonas gingivalis*, *Mol Microbiol* 89 (2013) 903-917.

表題脚注

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座
歯周病態学分野

(指導 高柴正悟教授)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 社会環境生命科学専攻 国際環境科学講座
口腔微生物学分野

(委託 大原直也教授)

本論文の一部は、以下の学会において発表した。

第 56 回歯科基礎医学会学術大会総会 (2014 年 9 月, 福岡)

図の説明

図1. PGN_0300と PGN_0301のアミノ酸配列の比較

P. gingivalis ATCC33277株のゲノムに存在する *ompH* ホモログ PGN_0300と PGN_0301のアミノ酸配列を比較した。

同一のアミノ酸, 保存的アミノ酸置換, 半保存的アミノ酸置換をそれぞれアスタリスク, コロン, およびドットで示す。ダッシュは配列を最大限に一致させたときに生じたギャップを示す。

図2. PGN_0300蛋白質の局在

P. gingivalis ATCC33277株の菌体抽出物を分画し, 抗 PGN_0300蛋白質ペプチド抗体を用いたウエスタンブロット法で PGN_0300蛋白質の局在を調べた。

M, 分子量マーカー ; 1, 全菌体抽出物 ; 2, 細胞質・ペリプラズム画分 ; 3, 内膜・外膜画分 ; 4, 内膜画分 ; 5, 外膜画分 ; CBB 染色, クーマシーブリリアントブルー染色

図3. コロニー性状の比較

血液寒天培地上における *P. gingivalis* ATCC33277株, PGN_0300欠損株, および PGN_0300相補株のコロニー性状を比較した。

1, *P. gingivalis* ATCC 33277株 ; 2, PGN_0300欠損株 ; 3, PGN_0300相補株

図4. PGN_0299, PGN_0300, および PGN_0301の各遺伝子の発現

P. gingivalis ATCC33277株, PGN_0300欠損株, および PGN_0300相補株の cDNA を鋳型とし, PGN_0299, PGN_0300, PGN_0301の発現を確認した。

M, 100 bp ラダー ; 1, *P. gingivalis* ATCC33277株 ; 2, PGN_0300欠損株 ; 3, PGN_0300相補株

図5. ジンジパインの活性

全菌体あるいは培養上清と, Kgp あるいは Rgp に対する蛍光基質を40°C で10分間反

応させたのちに蛍光波長を測定した。縦軸は *P. gingivalis* ATCC33277株における活性を100%とした場合の、PGN_0300欠損株と PGN_0300相補株における Kgp あるいは Rgp の活性を示す。なお、エラーバーは標準偏差を示す。

1, *P. gingivalis* ATCC33277株 ; 2, PGN_0300欠損株 ; 3, PGN_0300相補株

図6. 菌体と培養上清中の Kgp と Rgp 形状の解析

抗 Kgp 抗体と抗 Rgp 抗体を用いたウエスタンブロット法により、菌体および培養上清中の Kgp と Rgp を検出した。

M, 分子量マーカー ; 1, *P. gingivalis* ATCC33277株 ; 2, PGN_0300欠損株 ; 3, PGN_0300相補株

図7. Kgp と Rgp の菌体内局在

P. gingivalis ATCC33277株および PGN_0300欠損株の菌体抽出物を分画し、抗 Kgp 抗体と抗 Rgp 抗体を用いたウエスタンブロット法を行い、Kgp と Rgp の局在を明らかにした。

M, 分子量マーカー ; 1, 全菌体抽出物 ; 2, 細胞質・ペリプラズム画分 ; 3, 内膜・外膜画分 ; 4, 内膜画分 ; 5, 外膜画分 ; CBB 染色, クーマシーブリリアントブルー染色

図8. 菌体中の A-LPS の形状の解析

A-LPS を認識するモノクローナル抗体1B5抗体を菌体抽出物と反応させた。

1, *P. gingivalis* ATCC33277株 ; 2, PGN_0300欠損株 ; 3, PGN_0300相補株