ポルフィロモナス・ジンジバリスの表面蛋白質の 輸送と局在化に関する研究

庄子幹郎¹

¹ 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
〒852-8588 長崎市坂本 1-7-1

ポルフィロモナス・ジンジバリス (*Porphyromonas gingivalis*) は慢性歯周炎に関わる最重要細菌として知られている。その病原因子として、強力な蛋白分解酵素であるジンジパインや付着分子である線毛が菌体表面上に存在している。それらが、どのように菌体表面に輸送され、局在するのかといった点については未知の部分が多い。本研究では、菌体表面蛋白質の輸送と局在化に関して、蛋白質の C 末端側に保存された C-terminal domain を有する蛋白質は、新奇の分泌装置である Por Secretion System によって、菌体表面に輸送され、陰性荷電を O 抗原鎖に持つ Anionic Lipopolysaccharide に結合することによって菌体表層へ局在することを明らかにした。次に、本菌の線毛について、その主要構成蛋白質は輸送する過程において、リポ蛋白質としての中間体を経た後、菌体表面にあるアルギニン特異的蛋白質分解酵素によって、成熟化して重合が開始することを明らかにした。

はじめに

P. gingivalis はグラム陰性偏性嫌気性桿菌であり、嫌気度の高い歯周ポケット深部に生息している。また、本菌は糖非分解性であるので、蛋白質の分解産物を栄養源としている。その為、本菌の菌体表面には多くの蛋白質分解酵素が存在する。蛋白質分解酵素の中でも特に強力なものが、ジンジパインと呼ばれるものである。ジンジパインは、アルギニン特異的蛋白質分解酵素 Arg-gingipain (*rgpA* 遺伝子と *rgpB* 遺伝子にコードされる) とリジン特異的蛋白質分解酵素 Lys-gingipain (*kpg* 遺伝子にコードされる) に分類される。ジンジパインは、増殖、菌体表面蛋白質の成熟化のみならず、血清抵抗性や歯周組織の破壊に関わることから、その輸送機構や局在化機構の基礎的な理解は興味深いところであり、創薬開発への応用も期待される。

一方、本菌の病原因子として注目されているものに線毛がある。線毛の意義として、付着、バイオフィルム形成、共凝集のみならず、宿主細胞への刺激因子としての報告も蓄積してきている。本菌の線毛には、長い線毛 (Fim 線毛)

と短い線毛 (Mfa 線毛) の二種類があり、それらの構成蛋白質の遺伝子群はそれぞれ Fim locus, Mfa locus と異なる部位に存在する。線毛の病原性についての理解は蓄積しているものの、その輸送機構や重合機構についての理解は、他の細菌の線毛で明らかにされている理解と比べると未だ不明な点が多く、さらなる理解が期待されている。

1. *P. gingivalis* における病原因子の糖鎖を 介した菌体表層への局在化について

P. gingivalis は血液寒天培地上で黒色集落を示す。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 として蓄積している為である (1)。これまでに、ヘモグロビンを分解する酵素である Lys-gingipain について、その遺伝子の変異株では血液寒天培地上で黒色集落化が減弱し白色集落になることが見出されていた (2)。トランスポゾン (Tn4351) を用いた遺伝子変異法により、新たに白色集落を示す変異株を見出した。その結果、*Bacillus stearothermophilus* の *degT* 遺伝子 (3) に相同性のある遺伝子内にトランスポゾンが挿入されており、*porR* (regulation of porphyrin accumulation on the cell surface) 遺伝子と命名した。DegT ホモログ蛋白質は Transaminase 活性を持ち、菌体表面の多糖体に含まれる構成糖の生合成に関わるものと報告されていた (4)。*porR* 変異株は次に示すような多様な性状を示した。(i) 本菌の強力な蛋白質分

Mikio SHOJI
Study of transportation and localization of cell surface proteins in *Porphyromonas gingivalis*
Division of Microbiology and Oral Infection, Department of Molecular Microbiology and Immunology, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences, Sakamoto 1-7-1, Nagasaki 852-8588

解酵素であるジンジパインを菌体表面に保持できず、培養上清中にリークした。こと。(ii) 赤血球凝集活性が減弱したこと。(iii) フェノール抽出後の菌体表面多糖体が短くなったこと。(iv) FimA 蛋白質の成熟化が遅延したこと等である。また、同時期に Curtis らは、*rgpA* 遺伝子産物の中の酵素ドメイン蛋白質を本菌より精製し、それを抗原としてモノクローナル抗体を作製したところ、その中に Cell surface polysaccharide 及び膜結合型 Arg-gingipain を認識する抗体 MAb 1B5 を見出していた (5)。Curtis 博士より恵与された MAb 1B5 は、*porR* 変異株の cell lysate に対して、全く反応しなかった。これらの結果から、*porR* 遺伝子産物は、菌体表面多糖体に含まれる、ある種の構成糖の生合成に関わるものと予想された。また、*porR* 遺伝子産物依存性の菌体表面多糖体がジンジパイン等の病原因子を菌体表面に保持させていることを初めて報告した (6)。その後、Curtis らは、本菌のリポ多糖体 (LPS) は O 抗原鎖の異なる二種類のものがあり、MAb 1B5 は O 抗原鎖が陰性に荷電している Anionic lipopolysaccharide (A-LPS) を認識すること (7)、その最小単位は phosphorylated branched mannan であることを報告している (8)。

2. *P. gingivalis* の HBP35 蛋白質の役割、及び菌体表面への輸送と局在化について

P. gingivalis において、ヘミン結合性を有する Hemin-binding protein 35 (HBP35) 蛋白質は外膜に存在すると報告されていた (9, 10)。興味深いことに、HBP35 蛋白質は N 末端側にチオレドキシンドメインと C 末端側には保存された C-terminal domain (CTD) が存在する (10, 11)。外膜に酸化ストレス防御蛋白質が存在することはユニークなことであり、その意義について明らかにすることにした。初めに、遺伝子の内部に薬剤耐性遺伝子が入るような挿入遺伝子変異株を作製した。その抗体を用いてウェスタン解析を行ったところ、不思議な結果が得られた。野生株では 50–90 kDa 付近にスミアなバンドと 40-, 29-, 27-kDa のバンドが検出された。一方、挿入遺伝子変異株では 29-, 27-kDa のバンドのみ検出された。次に、遺伝子欠失株を作製したところ、それらのバンドは全く検出されなかった。初期遺伝子産物の予想サイズは 35-kDa であるが、SDS-PAGE 上では 40-kDa のバンドとなる。50–90 kDa 付近のスミアなバンドは、初期遺伝子産物である 40-kDa 蛋白質に糖鎖修飾が起きているものと推測された。一方、挿入遺伝子変異株でも産生している 29-, 27-kDa 蛋白質はどのように発現しているのだろうか。まず、ノザン解析により転写産物を調べたところ、野生株にて 1.1 kb のバンドのみが検出された。このことから、複数の転写産物より産生される翻訳産物ではなく、リボソーム結合サイトが複数あることによるものと推測された。HBP35 蛋白質の全アミノ酸は 344 個であり、挿入変異株における薬剤耐性遺伝子の挿入部位は 110 番目であることから、29-, 27-kDa のバンドは HBP35 蛋白質の C 末端側の産物であると予想された。実際にそうであるかを

明らかにする為に、29-kDa 蛋白質の量は少ないことから 27-kDa のバンドの同定を質量分析にて行うことにした。挿入遺伝子変異株より、抗 HBP35 抗体で免疫沈降して部分精製したところ、予想していたように 27-kDa のバンドは HBP35 蛋白質の C 末端側の分子であった。つまり 29-, 27-kDa のバンドは 115 番目もしくは 135 番目のメチオニンから開始される産物であると予想され、それらをアラニンに置換する変異を行うとそれらの分子は産生されなかった。したがって、HBP35 蛋白質は一つの転写産物から、少なくとも 3 つの開始コドン (1, 115 及び 135 番目) による複数の翻訳産物が産生されるという珍しい発現機構を明らかにすることができた。このような発現機構は他にもあり、*Neisseria meningitidis* の PilB 蛋白質でも同様なことが報告されている (12)。

HBP35 蛋白質の局在を調べたところ、29-, 27-kDa 蛋白質は細胞質に、40-kDa は全ての画分に局在し、外膜にはスミア分子が見出された。29-, 27-kDa 蛋白質は細胞質に局在する意義は何故かと考え、それらの分子はチオレドキシンドメインを持たないことから、ヘミン結合性があるのではないかと予想した。大腸菌を用いて 40-kDa 及び 27-kDa の組換え蛋白質を精製し、*in vitro* のヘミン結合能を調べた結果、どちらも結合能が認められた。したがって、27-kDa 蛋白質は細胞質内ヘミン結合蛋白質であるバクテリオフェリチン様の機能を有するのかもしれない。*In vivo* においても、*hbp35* 遺伝子変異株のヘミン欠乏下における増殖の減弱が認められた。また *in vitro* において、組換え蛋白質のチオレドキシン活性を調べたところ、野生型の 40-kDa 蛋白質は強いチオレドキシン活性を認めたが、アクティブサイトである 48 番目と 51 番目のシステインをセリンに置換した変異型のものではその活性はなかった。そこで *in vivo* において、野生株と *hbp35* 遺伝子変異株の間で、酸化ストレスに対する防御能に差があるか否かを調べたが、ポジティブな結果は得られなかった。したがって、本菌における HBP35 蛋白質はヘミンの獲得には関与しているが、酸化ストレスに対する防御能としての機能については明瞭な結論は得られていない。もしかすると、他の酸化ストレス防御因子の関連変異株下で調べると、ポジティブな結果が得られるかもしれない。

Reynolds らは、本菌には約 30 個の C 末端側に保存された C-terminal domain (CTD) をもつ CTD 含有蛋白質が存在し、CTD はジンジパインの菌体表面の輸送と局在に重要であることを報告した (11)。ジンジパインの中でも RgpB 蛋白質は SDS-PAGE 上でスミアな分子として検出される。Nguyen らは、RgpB 蛋白質の C 末端側 2 アミノ酸を欠失するとスミアな分子は検出されなくなったことを報告している (13)。CTD 含有蛋白質において特に最後の C 末端側 5 アミノ酸は高度に保存されていることから、HBP35 蛋白質の C 末端側 5 アミノ酸を欠失した分子を発現する株を作製したところ、輸送の途中で分解されるような産物が検出された。したがって、輸送における CTD の重要性が確認された。さ

らに、免疫沈降法により精製した HBP35 蛋白質のスミアバンドは MAb 1B5 にも認識されることから、MAb 1B5 のエピトープを含む Lipopolysaccharide (A-LPS) に結合していることが示唆された (14)。

3. CTD 含有蛋白質の菌体表面への輸送と局在化機構について—HBP35 蛋白質を中心に—

前述したように HBP35 蛋白質は、少なくとも 3 つの開始コドンにより翻訳産物が産生される。全ての CTD 含有蛋白質は、N 末端側にシグナルペプチダーゼ 1 型の膜透過配列を有している。HBP35 蛋白質のスミアバンドは 40-kDa 蛋白質が A-LPS に結合していると示唆されていたので、HBP35 蛋白質の 1 番目のメチオニンアラニンに置換した変異蛋白質を発現した場合、29-, 27-kDa 蛋白質は発現するもののスミアバンドと 40-kDa 蛋白質は発現しなくなると予想した。その結果、29-, 27-kDa 蛋白質は発現していたので、リボソーム結合部位が複数あるという前述の仮説は支持された。他方、スミアバンドは発現しなくなるのだが、意外なことに 40-kDa 蛋白質は発現していた (図 1)。1 番目の開始コドンを変異させるとスミアバンドがないということは、HBP35 蛋白質のスミアバンドは内膜にある Sec 輸送装置により輸送される分子であることを示唆している。しかしながら、40-kDa 蛋白質が依然として発現しているのは何故だろうか。おそらく N 末端側にさらなる開始コドンがあると推測しているが未だ不明である。

ジンジパイン等の CTD 含有蛋白質の分泌 (Por secretion system; PorSS) に関わる蛋白質として 11 個の蛋白質 (*porK*, *porL*, *porM*, *porN*, *porP*, *porQ*, *porT*, *porU*, *porV*, *porW*, *sov*) が報告されている (15–18)。HBP35 蛋白質は CTD を有することから、PorSS 関連変異株の cell lysate を用いて、抗 HBP35

図 1. 変異 HBP35 蛋白質の発現解析 (Shoji *et al.*, (2011) PLoS ONE 6, e21372. PLoS journals 社より承諾を得て転載)

図 2. PorSS 関連変異株を用いたウェスタン解析 (Shoji *et al.*, (2011) PLoS ONE 6, e21372. PLoS journals 社より承諾を得て転載)

抗体でウェスタン解析を行ったところ、スミアバンドが検出されなかった (図 2)。さらに HBP35 蛋白質の菌体表面の存在をドットブロット法や免疫電顕法を用いて調べたところ、PorSS 関連変異株では菌体表面の HBP35 蛋白質の存在が検出されなかった (図 3)。一方、ペリプラスム画分を調製したところ、PorSS 関連変異株では野生株に比べ、HBP35 蛋白質の量が増加していた。このことは、PorSS が機能不全になると HBP35 蛋白質がペリプラスムに蓄積することを意味する。同様な知見がジンジパインについても見出されている (15)。これらの結果より、HBP35 蛋白質は PorSS により菌体表面に輸送されることが示唆された。興味深いことに、PorSS 関連変異株の cell lysate を MAb 1B5 にてウェスタン解析をすると、抗体認識分子は野生株の場合に比べて下方にシフトしていた (図 2)。このことは、野生株において CTD 含有蛋白質が PorSS により菌体表面に輸送された後に A-LPS に結合した為に、MAb 1B5 の抗体認識分子は PorSS 関連変異株よりも野生株では上方にシフトしていると考えられる。それを支持する知見として、A-LPS の生合成に関わる複数の変異株 (前述の *porR* 変異株も含む) を用いて HBP35 蛋白質のスミアバンドの有無を検討した結果、A-LPS に関わる変異株では HBP35 蛋白質のスミアバンドは検出されなかった (図 4)。したがって、HBP35 蛋白質は菌体表面で A-LPS と結合していると示唆される。

前述にもあるように、HBP35 蛋白質の C 末端側 5 アミノ酸を欠失すると正常に輸送ができなくなる。CTD 含有蛋白質の菌体表面の輸送に関して、CTD の重要性が指摘されて

図 3. HBP35 蛋白質の菌体表面の存在

A: ドットプロット解析. B: イムノゴールドラベリング. (Shoji *et al.*, (2011) PLoS ONE 6, e21372. PLoS journals 社より承諾を得て転載)

図 4. A-LPS 生合成関連変異株を用いたウェスタン解析 (Shoji *et al.*, (2011) PLoS ONE 6, e21372. PLoS journals 社より承諾を得て転載)

いるものの、その最小領域については不明であった。そこで、CTD 領域の最小領域を明らかにする目的で、GFP と CTD の融合蛋白質発現系の確立を試みた。HBP35 蛋白質のプロモーターと HBP35 蛋白質の N 末端側 32 アミノ酸領域、GFP 蛋白質、以下に HBP35 蛋白質の CTD の 85 アミノ酸を融合した蛋白質を発現するプラスミドを作製し、*P. gingivalis* に導入して融合蛋白質を発現させ抗 GFP 抗体で検出する方法である。野生株では抗 GFP 抗体により GFP 融合蛋白質のスメアバンドが検出されるが、*porT* 変異株ではそのスメアバンドが検出されなかったことから、PorSS に依存した輸送系の検出を可能にすることができた。そこで、HBP35 蛋白質の CTD だけでなく、他の 4 つの CTD 含有蛋白質の CTD 約 80 アミノ酸を融合した場合でも、同様に抗 GFP 抗体により野生株ではスメアバンドが検出され、*porT* 変異株ではスメアバンドが検出されなかった。次に、スメアバンドを指標にして HBP35 蛋白質の CTD 領域を短くしていった結果、C 末端側 22 アミノ酸までがスメアバンドに必要な最小領域であった (図 5)。また、ドットプロット法で GFP 融合蛋白質の菌体表面の存在を調べてみても、C 末端側 22 アミノ酸領域が必要であった。CTD 含有蛋白質は *Bacteroidetes* 属のうち、*Bacteroides fragilis* や *Bacteroides thetaiotaomicron* といった腸内細菌には存在しないが、*P. gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Prevotella intermedia* と

図5. GFP-HBP35[CTD] 蛋白質のウェスタン解析 (Shoji *et al.*, (2011) PLoS ONE 6, e21372. PLoS journals 社より承諾を得て転載)

いった口腔内細菌や *Cytophaga hutchinsonii*, *Flavobacterium johnsoniae* といった運動能を有する好気性菌にも存在する (18)。興味深いことに、CTD の C 末端側 22 アミノ酸は、真核生物において Polycystic kidney diseases の関連分子である PKD1 蛋白質の C 末端領域と類似性があつた (19)。PKD1 蛋白質の C 末端領域は anti-parallel β -sheet structure を作ることから、CTD 含有蛋白質も同様な構造をとり、PorSS に認識されているのかもしれない。

B. fragilis においては、セリンやスレオニンの水酸基に糖鎖が結合する O 結合型の糖蛋白質が存在すると報告されている (20)。本菌においても、BamA ホモログ蛋白質や Mfa1 蛋白質が糖蛋白質であるとの報告 (21, 22) がされているが、これらは RgpB, TapA, HBP35, CPG70 といった CTD 含有蛋白質 (13, 14, 23, 24) でみられるようなスメアバンドではなく単一のバンドとなる。前述にあるように、A-LPS の生合成関連変異株において HBP35 蛋白質のスメアバンドが見えないことから、蛋白質と多糖体との何らかの結合があるものの、その様式は未だ不明である。その一端を明らかにする目的で、HBP35 蛋白質の CTD 領域のうち特に高度に保存されている 7 つのアミノ酸をアラニンに置換した変異 HBP35 蛋白質を発現したもののスメアバンドに変化はなかった。また、部分精製した HBP35 蛋白質に N 結合型の糖鎖分解酵素である PNGase F や O 結合型の糖鎖分解酵素 2 種を作用させてみても、スメアバンドに変化はなかった。そこで、HBP35 蛋白質のスメアバンドを切り出して、質量分析にて糖ペプチドの分取および同定を試みたが未だ成功しておらず、糖鎖修飾機構の詳細は今後取り組むべき課題である。

これまでに、Reynolds らは本菌の外膜画分蛋白質を質量分析で蛋白質同定を行うと、CTD 含有蛋白質の CTD 領域が同定できないと報告していた (25, 26)。このことについては、i) 何らかの蛋白質分解酵素が CTD 領域を切除していること、ii) CTD 領域が糖鎖修飾を起こしている為に糖ペプチド断片は質量分析では同定できないこと、の可能性がある。そこで、HBP35 蛋白質を免疫沈降法により精製し、スメアバンドと 40-kDa 蛋白質を切り出して、トリプシン消化によるペプチドマッピングを行った。その結果、40-kDa 蛋白質は CTD 領域のペプチド断片が検出されたものの、スメアバンドからは CTD 領域のペプチド断片は検出されなかった (図 6)。次に、HBP35 蛋白質の CTD 領域内で 3 つのペプチドを合成し、それらを抗原として抗体を作製した。免疫沈降法により精製した HBP35 蛋白質のうち、いずれのペプチド抗体も 40-kDa 蛋白質は認識するもののスメアバンドは認識しなかった。これらの結果から、上記の i) の可能性が高いと考えられるが、ii) の可能性も完全には否定できない。最近、CTD 領域を切る新奇のシグナルペプチダーゼとして、Reynolds らは PG0026 蛋白質 (PorU 蛋白質) を報告している (27)。しかしながら、精製した PG0026 蛋白質が本当に CTD 領域を切断したという *in vitro* の証明がないことから、未だ完全には解決しておらず今後明らかにすべき課題である。以上の知見をもとに、CTD 含有蛋白質の輸送機構および局在化のモデルを提示した (28) (図 7)。

4. *P. gingivalis* の線毛主要構成蛋白質の菌体表面への輸送について

P. gingivalis の菌体周囲には多くの線毛の存在が電子顕微鏡にて観察される。本菌の Fim 線毛 (メジャー線毛と呼ばれている) は吉村らにより 381 株より精製され (29)、Fim 線毛をコードする遺伝子群が同定された (30)。ATCC33277 株や 381 株 (Type I に分類される (31)) より精製された Fim 線毛は直線状で 1 μ m 以上もの長さである。精製された Fim 線毛は主要構成蛋白質として FimA 蛋白質がほぼ全体を占め、残りのマイナーコンポーネント蛋白質として FimC, FimD, FimE 蛋白質が存在する。最近、ATCC 33277 株の線毛が直線状であるのは、*fimA* 遺伝子直下の *fimB* 遺伝子内に終止コドンの変異が入っている為であると報告されている (32)。また、FimC, FimD, FimE 蛋白質は複合体をとっており、線毛の先端に局在すると推測されている (33, 34)。*fimA* 遺伝子以下に *fimB*, *fimC*, *fimD*, *fimE* 遺伝子があるのだが、興味深いことにそれらの遺伝子発現は FimRS の二成分制御系と FimX および FimA 蛋白質らにより多段階に調節されている (35, 36)。

一方、浜田らは、*fimA* 遺伝子変異株の菌体表面上に短い Mfa 線毛 (マイナー線毛と呼ばれている) が存在していることを見出した (37)。その後、その主要構成蛋白質は Mfa1 蛋白質であることが確認され、Mfa 線毛をコードする遺伝子群が同定された (38, 39)。この遺伝子領域も *mfa1* 遺伝

B スメアバンド サンプル 1 から 11

MKRLLLSAAI LSSMALFNVN AQELKTSADM KGSFKKNVVL EVFTAECWGY CPGGKERIAK AIEMLDDEYK
 ERVFQTFVHY NDGISKKWPR VGQLFIALDQ TLGIPGFPTF SVCRMEKKGE NLSIGAPIAI KNKIMKGF
 GTAPAEVNLK LTKGATPEDV CTATFTGKVD ADLIGKPLML TAYVLKNNMK PINPONGAGD GYLHQHTVLM
 ILSTDVKGDA LNIAADGSFT IKKEFKLDGF EIKDQDVLA VHHPMNAEN HSIINAGQES LDKAEPATE
 QIVATPSVKA YVQNGKIVVE EEYSKMEVFN ATGQLVKNES LVPGVYVRI TANGVMHFLK VLVP

40-kDa バンド サンプル 12 と 13

MKRLLLSAAI LSSMALFNVN AQELKTSADM KGSFKKNVVL EVFTAECWGY CPGGKERIAK AIEMLDDEYK
 ERVFQTFVHY NDGISKKWPR VGQLFIALDQ TLGIPGFPTF SVCRMEKKGE NLSIGAPIAI KNKIMKGF
 GTAPAEVNLK LTKGATPEDV CTATFTGKVD ADLIGKPLML TAYVLKNNMK PINPONGAGD GYLHQHTVLM
 ILSTDVKGDA LNIAADGSFT IKKEFKLDGF EIKDQDVLA VHHPMNAEN HSIINAGQES LDKAEPATE
 QIVATPSVKA YVQNGKIVVE EEYSKMEVFN ATGQLVKNES LVPGVYVRI TANGVMHFLK VLVP

図 6. HBP35 蛋白質のペプチドマッピング
下線で示したペプチド断片が検出された。(Shoji *et al.*, (2011) PLoS ONE 6, e21372. PLoS journals 社より承諾を得て転載)

図 7. HBP35 蛋白質の輸送と局在化機構

HBP35 蛋白質は、1.1 kb の単一の mRNA より 40-kDa と 27-kDa (細胞質内に局在) の蛋白質が産生される。40-kDa 蛋白質は、N 末端側の膜透過配列により Sec 輸送装置により内膜を通過後、シグナルペプチダーゼ 1 (Sp1) により膜透過配列が切断される。その後、PorSS により菌体表面に分泌された後、A-LPS と結合することによって菌体表面に局在する。

子直下に *mfa2*, *PGN_0289*, *PGN_0290*, *PGN_0291* 遺伝子があり, *Mfa2* 蛋白質は *FimB* 蛋白質と類似の機能があり, 主要構成蛋白質と強固に結合することによって, 線毛が長く直鎖上に伸びるのを防いでいると報告されている (40)。

Arg-gingipain を欠失した変異株では, 菌体表面の線毛形成が減弱することから, *Arg-gingipain* が *FimA* 蛋白質の 46 番目のアルギニンを切断することで, その成熟化および重合が開始されるということが報告されていた (41)。その後, *fimA* 遺伝子のプロモーターアッセイによる解析により, 開始コドンが GTG から始まり, シグナル領域は 10 アミノ酸であるという論文が発表された (42)。相反する見解を解決するために, *rgpA rgpB kgp* 三重変異株でみられる *FimA* 蛋白質の N 末端アミノ酸配列を同定することにした。三重変異株の菌体より二次元ゲル電気泳動を行い, N 末端アミノ酸配列を調べたところ, 21 番目のリジンの後のアスパラギン酸から開始していた。さらにプライマー伸長法を用いて転写開始点を同定したところ, 当初我々が提唱していた開始コドンを支持する結果が得られた。つまり, *FimA* 蛋白質は 46 番目のアルギニンで成熟化されるというこれまでの説を確認することができた。次に, *FimA*, *FimB*, *FimC*, *FimD*, *FimE*, *Mfa1*, *Mfa2*, *PGN_0289*, *PGN_0290*, *PGN_0291* 蛋白質の N 末端側膜透過配列を調べてみると全てに大腸菌でよく解析されているリボ蛋白質のシグナル配列に類似した配列があることから, 輸送の途中過程でリボ蛋白質として輸送されるのではないかと仮説を立てた。そこで, リボ蛋白質特異的プロテアーゼ (シグナルペプチダーゼ 2 型) の阻害剤として使用されているグロボマイシンを *P. gingivalis* に添加すると *FimA* 蛋白質および *Mfa1* 蛋白質ともに, immature 型の分子が検出されるようになった (図 8)。また, *rgpA*

rgpB kgp 三重変異株の培養液に放射ラベルされたパルミチン酸を添加したところ, *FimA* 蛋白質や *Mfa1* 蛋白質にパルミチン酸の取り込みを確認することができた (図 8)。つまり, 外膜へ至る過程にリボ蛋白質の中間体が存在するという新たな知見を得ることができた。これまでに, 線毛の主要構成蛋白質がリボ蛋白質を中間体として輸送されるという報告はないことから, 新奇の輸送機構であると提唱した (43)。

大腸菌におけるリボ蛋白質の輸送機構については, 徳田らにより詳細に研究されている (44)。大腸菌のリボ蛋白質は *LolA*, *LolB*, *LolC*, *LolD*, *LolE* らにより外膜, 内膜への局在の選別化機構が存在する。特に *LolA*, *LolB* がリボ蛋白質の輸送に重要であることから, *P. gingivalis* ゲノムでそれらのホモログを調べてみたものの存在は確認できなかったと論文に記載した (43)。しかしながら, 最近の BLAST で検索すると, *LolB* ホモログ蛋白質は無いようであるが *Bacteroidetes* 属に *LolA* 様ホモログ蛋白質が普遍的に存在し, *P. gingivalis* では *PGN_0486* 蛋白質が相当する。大腸菌では, *lolA* 遺伝子は必須遺伝子であるが, *PGN_0486* 遺伝子の変異株は作製でき線毛の産生も確認できた (未発表データ)。また *LolA* 蛋白質の機能に必須なアミノ酸残基が *PGN_0486* 蛋白質ではかなり異なっている。したがって, *PGN_0486* 蛋白質は *LolA* の機能的ホモログではなく他の機能を有しているのかもしれない。*P. gingivalis* において, リボ蛋白質の輸送に関わる *Lol* 様システムの存在の有無は未だ不明である。

また, *FimA* 蛋白質についてさらなる解析を行った。大腸菌において, 全長の組換え *FimA* 蛋白質を産生させた場合においても, 19 番目のシステイン依存性のリボ蛋白質で

図 8. 主要線毛構成蛋白質におけるリボ蛋白質中間体の証明

A: グロボマイシン添加後の immature 分子の増加が検出された。B: 主要線毛構成蛋白質の immature 分子はパルミチン酸修飾が起きている。(Shoji *et al.*, (2004) *Mol. Microbiol.* 52, 1513–1525. John Wiley and Sons 社より承諾を得て転載)

図9. 組換え FimA 蛋白質の脂肪酸修飾の証明

A:組換え FimA 蛋白質は 19 番目のシステイン依存性にパルミチン酸修飾が起きていた。B:組換え FimA 蛋白質は 19 番目のシステイン依存性に TLR2 による NF- κ B の活性化が起きていた。NF- κ B 活性化のレポーターとして, CD25 の細胞表面発現を FACS で検出した。(Shoji *et al.*, (2010) Can. J. Microbiol. 56, 959-967. Canadian Science Publishing 社より承諾を得て転載)

図10. 主要線毛構成蛋白質の輸送機構

主要線毛構成蛋白質は, N 末端側の膜透過配列により Sec 輸送装置により内膜を通過後, シグナル配列内のシステイン残基にリポ蛋白質ジアシル転移酵素 (Lgt) により二本の脂肪酸が付与される。その後, リポ蛋白質特異的のプロテアーゼ (Lsp) により膜透過配列が切断される。その後, 菌体表面までの輸送機構については不明である。菌体表面に輸送された主要線毛構成蛋白質は Arg-gingipain により N 末端側が成熟化したのち重合が開始される。

文 献

あることを放射ラベルされたパルミチン酸の取込みにより明らかにすることができた (図9)。また、全長の野生型組換え FimA 蛋白質と19番目のシステインをアラニンに置換した変異型組換え FimA 蛋白質を精製し、リポ蛋白質の受容体として働く Toll-like receptor 2 (TLR2) 依存性の炎症応答を調べたところ、野生型組換え FimA 蛋白質は TLR2 依存性の活性が認められたが、変異型のそれは活性が認められなかった (図9)。TLR2 はリポ蛋白質を認識することから、全長の野生型組換え FimA 蛋白質はリポ蛋白質であることが示唆された。また、いくつかの成熟型 FimA 蛋白質を精製し、GST 蛋白質由来の成熟型組換え FimA 蛋白質は *in vitro* にて短い線維状のフィラメントを形成することを見出した (45)。

以上の結果から FimA 蛋白質はリポ蛋白質輸送機構によって菌体表面へ輸送された後、Arg-gingipain によるプロセッシングを受けて成熟化し、さらに自己重合化がおこることで Fim 線毛が形成されるという作業仮説を提示した (図10)。

おわりに

歯周病細菌の中で *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *Treponema denticola* の3菌種が特に病態の増悪に関連していると報告されている (46)。また最近、無菌マウスと SPF マウスを用いて歯周病病態モデル実験を行った研究から、病態形成には常在細菌の存在が必要で、特に *P. gingivalis* が存在すると細菌叢の変化が起こり、さらなる病態の悪化が起こるようになると報告されている (47)。これらのことから、*P. gingivalis* を標的にした創薬の開発ということが重要視されている。

P. gingivalis においては、これまでに W83 株 (48), ATCC 33277 株 (49), TDC60 株 (50) のゲノムが解読されている。ポストゲノム時代となり、これからの研究において翻訳後修飾機構については未解明な部分が多く、今後の研究対象としてさらなる理解を深めていきたい。また私たちも歯周病細菌の研究に従事していることから、私たちが見つけた発見から何かお役にたつようなものへの応用ができればと考えている。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、これまで親身になってご指導いただ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教授 中山 浩次先生に深く感謝いたします。本賞をご推薦いただ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教授 大原 直也先生に心より御礼申し上げます。また、本研究の遂行にご協力いただいた教室員の方々、国内外の共同研究者の方々ならびにこれまでご指導いただきました様々な先生方にも深く感謝申し上げます。

- 1) Smalley, J.W., Silver, J., Marsh, P.D., Birss, A.J. (1998): The periodontopathogen *Porphyromonas gingivalis* binds iron protoporphyrin IX in the μ -oxo dimeric form: an oxidative buffer and possible pathogenic mechanism. *Biochem. J.* **331**, 681–685.
- 2) Okamoto, K., Nakayama, K., Kadowaki, T., Abe, N., Ratnayake, D.B., Yamamoto, K. (1998): Involvement of a lysine-specific cysteine proteinase in hemoglobin adsorption and heme accumulation by *Porphyromonas gingivalis*. *J. Biol. Chem.* **273**, 21225–21231.
- 3) Takagi, M., Takada, H., Imanaka, T. (1990): Nucleotide sequence and cloning in *Bacillus subtilis* of the *Bacillus stearothermophilus* pleiotropic regulatory gene *degT*. *J. Bacteriol.* **172**, 411–418.
- 4) Liu, H.W., Thorson, J.S. (1994): Pathways and mechanisms in the biogenesis of novel deoxysugars by bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **48**, 223–256.
- 5) Curtis, M.A., Thickett, A., Slaney, J.M., Rangarajan, M., Aduse-Opoku, J., Shepherd, P., Paramonov, N., Hounsell, E.F. (1999): Variable carbohydrate modifications to the catalytic chains of the RgpA and RgpB proteases of *Porphyromonas gingivalis* W50. *Infect. Immun.* **67**, 3816–3823.
- 6) Shoji, M., Ratnayake, D.B., Shi, Y., Kadowaki, T., Yamamoto, K., Yoshimura, F., Akamine, A., Curtis, M.A., Nakayama, K. (2002): Construction and characterization of a nonpigmented mutant of *Porphyromonas gingivalis*: cell surface polysaccharide as an anchorage for gingipains. *Microbiology* **148**, 1183–1191.
- 7) Rangarajan, M., Aduse-Opoku, J., Paramonov, N., Hashim, A., Bostanci, N., Fraser, O.P., Tarelli, E., Curtis, M.A. (2008): Identification of a second lipopolysaccharide in *Porphyromonas gingivalis* W50. *J. Bacteriol.* **190**, 2920–2932.
- 8) Paramonov, N., Rangarajan, M., Hashim, A., Gallagher, A., Aduse-Opoku, J., Slaney, J.M., Hounsell, E., Curtis, M.A. (2005): Structural analysis of a novel anionic polysaccharide from *Porphyromonas gingivalis* strain W50 related to Arg-gingipain glycans. *Mol. Microbiol.* **58**, 847–863.
- 9) Abiko, Y., Hayakawa, M., Aoki, H., Kikuchi, T., Shimatake, H., Takiguchi, H. (1990): Cloning of a *Bacteroides gingivalis* outer membrane protein gene in *Escherichia coli*. *Arch. Oral Biol.* **35**, 689–695.
- 10) Shibata, Y., Hayakawa, M., Takiguchi, H., Shiroza, T., Abiko, Y. (2003): A 35-kDa co-aggregation factor is a hemin binding protein in *Porphyromonas gingivalis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 351–356.
- 11) Seers, C.A., Slakeski, N., Veith, P.D., Nikolof, T., Chen, Y.Y., Dashper, S.G., Reynolds, E.C. (2006): 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**, 6376–6386.
- 12) Wu, J., Neiers, F., Boschi-Muller, S., Branlant, G. (2005): The N-terminal domain of PILB from *Neisseria meningitidis* is a disulfide reductase that can recycle methionine sulfoxide reductases. *J. Biol. Chem.* **280**, 12344–12350.
- 13) Nguyen, K.A., Travis, J., Potempa, J. (2007): Does the importance of the C-terminal residues in the maturation of RgpB from *Porphyromonas gingivalis* reveal a novel mechanism for protein export in a subgroup of Gram-Negative bacteria? *J. Bacteriol.* **189**, 833–843.
- 14) Shoji, M., Shibata, Y., Shiroza, T., Yukitake, H., Peng, B., Chen, Y.Y., Sato, K., Naito, M., Abiko, Y., Reynolds, E.C., Nakayama, K. (2010): Characterization of hemin-binding protein 35 (HBP35) in *Porphyromonas gingivalis*: its cellular distribution, thioredoxin activity and role in heme utilization. *BMC Microbiol.* **10**, e152.

- 15) Sato, K., Sakai, E., Veith, P.D., Shoji, M., Kikuchi, Y., Yukitake, H., Ohara, N., Naito, M., Okamoto, K., Reynolds, E.C., Nakayama, K. (2005): Identification of a new membrane-associated protein that influences transport/maturation of gingipains and adhesins of *Porphyromonas gingivalis*. J. Biol. Chem. **280**, 8668–8677.
- 16) Saiki, K., Konishi, K. (2007): Identification of *Porphyromonas gingivalis* novel protein Sov required for the secretion of gingipains. Microbiol. Immunol. **51**, 483–491.
- 17) Ishiguro, I., Saiki, K., Konishi, K. (2009): PG27 is a novel membrane protein essential for a *Porphyromonas gingivalis* protease secretion system. FEMS Microbiol. Lett. **292**, 261–267.
- 18) Sato, K., Naito, M., Yukitake, H., Hirakawa, H., Shoji, M., McBride, M.J., Rhodes, R.G., Nakayama, K. (2010): A protein secretion system linked to bacteroidete gliding motility and pathogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **107**, 276–281.
- 19) The International Polycystic Kidney Disease Consortium (1995): Polycystic Kidney Disease: The complete structure of *PKD1* gene and its protein. Cell **81**, 289–298.
- 20) Fletcher, C.M., Coyne, M.J., Villa, O.F., Chatzidaki-Livanis, M., Comstock, L.E. (2009): A general O-glycosylation system important to the physiology of a major human intestinal symbiont. Cell **137**, 321–331.
- 21) Nakao, R., Tashiro, Y., Nomura, N., Kosono, S., Ochiai, K., Yonezawa, H., Watanabe, H., Senpuku, H. (2008): Glycosylation of the OMP85 homolog of *Porphyromonas gingivalis* and its involvement in biofilm formation. Biochem. Biophys. Res. Commun. **365**, 784–789.
- 22) Zeituni, A.E., McCaig, W., Scisci, E., Thanassi, D.G., Cutler, C.W. (2010): The native 67-kilodalton minor fimbria of *Porphyromonas gingivalis* is a novel glycoprotein with DC-SIGN-targeting motifs. J. Bacteriol. **192**, 4103–4110.
- 23) Kondo, Y., Ohara, N., Sato, K., Yoshimura, M., Yukitake, H., Naito, M., Fujiwara, T., Nakayama, K. (2010): Tetratricopeptide repeat protein-associated proteins contribute to the virulence of *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun. **78**, 2846–2856.
- 24) Chen, Y.Y., Peng, B., Yang, Q., Glew, M.D., Veith, P.D., Cross, K.J., Goldie, K.N., Chen, D., O'Brien-Simpson, N., Dashper, S.D., Reynolds, E.C. (2011): The outer membrane protein LptO is essential for the O-deacylation of LPS and the coordinated secretion and attachment of A-LPS and CTD proteins in *Porphyromonas gingivalis*. Mol. Microbiol. **79**, 1380–1401.
- 25) Veith, P.D., Talbo, G.H., Slakeski, N., Dashper, S.G., Moore, C., Paolini, R.A., Reynolds, E.C. (2002): Major outer membrane proteins and proteolytic processing of RgpA and Kgp of *Porphyromonas gingivalis* W50. Biochem. J. **363**, 105–115.
- 26) Veith, P.D., O'Brien-Simpson, N.M., Tan, Y., Djatmiko, D.C., Dashper, S.G., Reynolds, E.C. (2009): Outer membrane proteome and antigens of *Tannerella forsythia*. J. Proteome Res. **8**, 4279–4292.
- 27) Glew, M.D., Veith, P.D., Peng, B., Chen, Y.Y., Gorasia, D.G., Yang, Q., Slakeski, N., Chen, D., Moore, C., Crawford, S., Reynolds, E.C. (2012): PG0026 is the C-terminal signal peptidase of a novel secretion system of *Porphyromonas gingivalis*. J. Biol. Chem. **287**, 24605–24617.
- 28) Shoji, M., Sato, K., Yukitake, H., Kondo, Y., Narita, Y., Kadowaki, T., Naito, M., Nakayama, K. (2011): Por secretion system-dependent secretion and glycosylation of *Porphyromonas gingivalis* hemin-binding protein 35. PLoS ONE **6**, e21372.
- 29) Yoshimura, F., Takahashi, K., Nodasaka, Y., Suzuki, T. (1984): Purification and characterization of a novel type of fimbriae from the oral anaerobe *Bacteroides gingivalis*. J. Bacteriol. **160**, 949–957.
- 30) Dickinson, D.P., Kubiniec, M.A., Yoshimura, F., Genco, R.J. (1988): Molecular cloning and sequencing of the gene encoding the fimbrial subunit protein of *Bacteroides gingivalis*. J. Bacteriol. **170**, 1658–1665.
- 31) Amano, A., Nakagawa, I., Kataoka, K., Morisaki, I., Hamada, S. (1999): Distribution of *Porphyromonas gingivalis* strains with fimA genotypes in periodontitis patients. J. Clin. Microbiol. **37**, 1426–1430.
- 32) Nagano, K., Hasegawa, Y., Murakami, Y., Nishiyama, S., Yoshimura, F. (2010): FimB regulates FimA fimbriation in *Porphyromonas gingivalis*. J. Dent. Res. **89**, 903–908.
- 33) Nishiyama, S., Murakami, Y., Nagata, H., Shizukuishi, S., Kawagishi, I., Yoshimura, F. (2007): Involvement of minor components associated with the FimA fimbriae of *Porphyromonas gingivalis* in adhesive functions. Microbiology **153**, 1916–1925.
- 34) Yoshimura, F., Murakami, Y., Nishikawa, K., Hasegawa, Y., Kawaminami, S. (2009): Surface components of *Porphyromonas gingivalis*. J. Periodontal. Res. **44**, 1–12.
- 35) Hayashi, J., Nishikawa, K., Hirano, R., Noguchi, T., Yoshimura, F. (2000): Identification of a two-component signal transduction system involved in fimbriation of *Porphyromonas gingivalis*. Microbiol. Immunol. **44**, 279–282.
- 36) Nishikawa, K., Yoshimura, F., Duncan, M.J. (2004): A regulation cascade controls expression of *Porphyromonas gingivalis* fimbriae via the FimR response regulator. Mol. Microbiol. **54**, 546–560.
- 37) Hamada, N., Sojar, H.T., Cho, M.I., Genco, R.J. (1996): Isolation and characterization of a minor fimbria from *Porphyromonas gingivalis*. Infect. Immun. **64**, 4788–4794.
- 38) Arai, M., Hamada, N., Umamoto, T. (2000): Purification and characterization of a novel secondary fimbrial protein from *Porphyromonas gingivalis* strain 381. FEMS Microbiol. Lett. **193**, 75–81.
- 39) Lamont, R.J., El-Sabaeny, A., Park, Y., Cook, G.S., Costerton, J.W., Demuth, D.R. (2002): Role of the *Streptococcus gordonii* SspB protein in the development of *Porphyromonas gingivalis* biofilms on streptococcal substrates. Microbiology **148**, 1627–1636.
- 40) Hasegawa, Y., Iwami, J., Sato, K., Park, Y., Nishikawa, K., Atsumi, T., Moriguchi, K., Murakami, Y., Lamont, R.J., Nakamura, H., Ohno, N., Yoshimura, F. (2009): Anchoring and length regulation of *Porphyromonas gingivalis* Mfa1 fimbriae by the downstream gene product Mfa2. Microbiology **155**, 3333–3347.
- 41) Nakayama, K., Yoshimura, F., Kadowaki, T., Yamamoto, K. (1996): Involvement of arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain) in fimbriation of *Porphyromonas gingivalis*. J. Bacteriol. **178**, 2818–2824.
- 42) Xie, H., Lamont, R.J. (1999): Promoter architecture of the *Porphyromonas gingivalis* fimbrillin gene. Infect. Immun. **67**, 3227–3235.
- 43) Shoji, M., Naito, M., Yukitake, H., Sato, K., Sakai, E., Ohara, N., Nakayama, K. (2004): The major structural components of two cell surface filaments of *Porphyromonas gingivalis* are matured through lipoprotein precursors. Mol. Microbiol. **52**, 1513–1525.
- 44) Okuda, S., Tokuda, H. (2011): Lipoprotein sorting in bacteria. Annu. Rev. Microbiol. **65**, 239–259.
- 45) Shoji, M., Yoshimura, A., Yoshioka, H., Takade, A., Takuma, Y., Yukitake, H., Naito, M., Hara, Y., Yoshida, S., Nakayama, K. (2010): Recombinant *Porphyromonas gingivalis* FimA preprotein expressed in *Escherichia coli* is lipidated and the mature

- or processed recombinant FimA protein forms a short filament *in vitro*. Can. J. Microbiol. **56**, 959–967.
- 46) Socransky, S.S., Haffajee, A.D., Cugini, M.A., Smith, C., Kent, R.L.Jr. (1998): Microbial complexes in subgingival plaque. J. Clin. Periodontol. **25**, 134–144.
 - 47) Hajishengallis, G., Liang, S., Payne, M.A., Hashim, A., Jotwani, R., Eskin, M.A., McIntosh, M.L., Alsam, A., Kirkwood, K.L., Lambris, J.D., Darveau, R.P., Curtis, M.A. (2011): Low-abundance biofilm species orchestrates inflammatory periodontal disease through the commensal microbiota and complement. Cell Host Microbe. **10**, 497–506.
 - 48) Nelson, K.E., Fleischmann, R.D., DeBoy, R.T., Paulsen, I.T., Fouts, D.E., Eisen, J.A., Daugherty, S.C., Dodson, R.J., Durkin, A.S., Gwinn, M., Haft, D.H., Kolonay, J.F., Nelson, W.C., Mason, T., Tallon, L., Gray, J., Granger, D., Tettelin, H., Dong, H., Galvin, J.L., Duncan, M.J., Dewhirst, F.E., Fraser, C.M. (2003): Complete genome sequence of the oral pathogenic Bacterium *Porphyromonas gingivalis* strain W83. J. Bacteriol. **185**, 5591–5601.
 - 49) Naito, M., Hirakawa, H., Yamashita, A., Ohara, N., Shoji, M., Yukitake, H., Nakayama, K., Toh, H., Yoshimura, F., Kuhara, S., Hattori, M., Hayashi, T., Nakayama, K. (2008): Determination of the genome sequence of *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 and genomic comparison with strain W83 revealed extensive genome rearrangements in *P. gingivalis*. DNA Res. **15**, 215–225.
 - 50) Watanabe, T., Maruyama, F., Nozawa, T., Aoki, A., Okano, S., Shibata, Y., Oshima, K., Kurokawa, K., Hattori, M., Nakagawa, I., Abiko, Y. (2011): Complete genome sequence of the bacterium *Porphyromonas gingivalis* TDC60, which causes periodontal disease. J. Bacteriol. **193**, 4259–4260.