

Porphyromonas gingivalis が有する
Mfa1 線毛の付随成分に関する研究

いかい りょうた

井貝 亮太

本論文の要旨は，第149回朝日大学大学院歯学研究科発表会（平成25年11月5日，岐阜）において発表した．本論文の一部は，第48回日本細菌学会中部支部総会（平成23年10月22日，名古屋），第85回日本細菌学会総会（平成24年3月29日，長崎）および第55回歯科基礎医学会学術大会・総会（平成25年9月22日，岡山）において発表した．

緒言

歯周病は成人が歯を喪失する最大の原因となっている。また、近年では心血管疾患、糖尿病、肺炎、低体重児出産、骨粗鬆症およびリウマチ性関節炎等の全身疾患との関連を示す報告がなされ^{1~7)}、本疾患の重要性が一層認識されるようになってきている。歯周病は歯周組織に沈着したデンタルプラークが起因となる感染症であるが、「red complex」と称される *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Tannerella forsythia* および *Treponema denticola* が慢性歯周炎患者から高頻度に分離されることから、最も有力な関連細菌と理解されている⁸⁾。近年では、*P. gingivalis* が宿主の免疫応答に影響を与えデンタルプラークを構成する共生細菌を歯周病誘発性細菌叢に変遷させる「keystone organism」として位置づけられ、歯周病進行における新たな病因論が提唱されている^{9~11)}。

P. gingivalis は *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes* phylum に分類されるグラム陰性偏性嫌気性桿菌であり、血液寒天培地上で黒色の集落を形成することを特徴としている。本菌はジンジパイン (Rgp と Kgp) とよばれるトリプシン様プロテアーゼ、赤血球凝集素、線毛などの種々の歯周病原因子を持つことが知られており¹²⁾、その中でも線毛は感染成立の第一

段階である歯周組織への定着に必要な因子であることから、疾患の発症、進行および予防を考える上で最も重要な病原因子と目されている。

線毛は細菌の細胞外構造物で、複数のタンパク質が重合して連なった線維状をしており、様々な病原性細菌においてその存在が明らかにされている。線毛は宿主細胞への付着、バイオフィーム形成および宿主組織への感染成立の過程において重要な働きを演じていることが明らかになっており¹³⁾、線毛を標的とした感染症予防法の確立や創薬の開発を目指した研究が行われている¹⁴⁾。

歯周病関連細菌 *P. gingivalis* は FimA および MfaI 線毛の2種類の線毛を有し^{15,16)}、それらを構成するタンパク質の遺伝子群は Fim 遺伝子座、Mfa 遺伝子座として、それぞれ異なる位置に存在する¹⁷⁾。

FimA 線毛は Yoshimura らにより初めて精製され¹⁵⁾、FimA 線毛の主要成分である分子量 43 kDa の FimA タンパク質をコードする *fimA* 遺伝子が同定された¹⁸⁾。*P. gingivalis* ATCC 33277 (33277) 株において FimA 線毛は、直鎖状で 1 μm 以上もの長さであり¹⁵⁾、宿主細胞への付着、バイオフィーム形成、共凝集に関与するだけでなく、宿主細胞への刺激因子として機能することが明らかになっている^{13,19)}。

fim 遺伝子群の構造は、*fimA* 遺伝子の下流に4つの open reading frame (ORF)、すなわち *fimB*、*fimC*、*fimD*

および *fimE* 遺伝子が存在する^{20, 21)}。近年, *fimA* 遺伝子の直下に位置する *fimB* 遺伝子からの転写産物である FimB タンパク質は, 外膜に局在し, FimA 線毛の長さの制御および菌体への固定化に関与することが報告された²²⁾。さらに, 下流に位置する *fimC*, *fimD* および *fimE* 遺伝子からの転写産物である FimC, FimD および FimE タンパク質が, 付随成分として FimA 線毛に存在することが明らかになった²³⁾。そして, FimC, FimD および FimE タンパク質が, グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼを介した FimA 線毛による宿主細胞への付着の補助因子として機能すること²³⁾や自然免疫応答に影響を与えることが明らかにされている²⁴⁾。また, FimC, FimD および FimE タンパク質は複合体を形成し, 線毛の先端に局在すると推測されている^{17, 23)}。

一方, Hamada らは *fimA* 変異株の菌体表面上に短い Mfa1 線毛が存在していることを見出した¹⁶⁾。その後, Mfa1 線毛の主要成分である分子量 75 kDa の Mfa1 タンパク質をコードする *mfa1* 遺伝子が同定された²⁵⁾。Mfa1 線毛は, 口腔共生細菌である *Streptococcus gordonii* との相互作用に関与すること^{25, 26)}や自己凝集およびバイオフィルム形成を抑制することが明らかになっている²⁷⁾。

mfa 遺伝子群の構造は *fim* 遺伝子群と類似しており, *mfa1* 遺伝子の下流に 4 つの ORF, すなわち *mfa2*, *mfa3*,

PGN0290 (*mfa4*) および *PGN0291* (*mfa5*) 遺伝子が存在する²¹⁾。近年、*mfa1* 遺伝子の直下に位置する *mfa2* 遺伝子からの転写産物である Mfa2 タンパク質は、外膜に局在し、Mfa1 線毛の長さの制御および菌体への固定化に関与することが報告された²⁸⁾。さらに、下流に位置する *mfa3*, *mfa4* および *mfa5* 遺伝子からの転写産物である 40 kDa の Mfa3 タンパク質、30 kDa の Mfa4 タンパク質および 150 kDa と 130 kDa の Mfa5 タンパク質が、付随成分として Mfa1 線毛に存在することが明らかになった²⁸⁾。そして、Mfa3 タンパク質が、線毛の先端に局在すること、Mfa4 および Mfa5 タンパク質の線毛へのアセンブリに必要であること、および自己凝集とバイオフィーム形成を抑制することが明らかにされている²⁹⁾。

これらのことから、本菌が有する 2 種類の線毛のどちらにおいても、付随成分が重要な役割を担っていることが推察される。

P. gingivalis において最も重要な病原因子である線毛の構造、構築機序および機能に関する理解は、研究が進んでいる他の病原性細菌^{30, 31)}と比べると未だ不十分であり、線毛の付随成分に関する研究は、その解明の一助になると考えられる。

そこで、本研究では Mfa1 線毛の付随成分である Mfa4 タンパク質の成熟化過程および Mfa4 タンパク質が他の付随成分に与える影響を検討した。

材料および方法

1 使用菌株および培養条件

使用菌株を表 1 に示した．2 種類の線毛を有している 33277 株およびその変異株^{28, 32)}を 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ヘミン，5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ メナジオンおよび 0.01% ジチオスレイトールを添加したトリプチケースソイブロス (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) を用いて，37°C，嫌気条件下 (N_2 : 80% ; CO_2 : 10% ; H_2 : 10%) にて 24 時間培養した．必要に応じて 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ クロラムフェニコール，20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ エリスロマイシンあるいは 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ テトラサイクリンを添加した．

Escherichia coli の培養には，必要に応じて 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ エリスロマイシンを加えた Luria-Bertani (LB) 寒天培地あるいは LB 液体培地を用い，37°C にて好氣的に培養した．

表 1 使用菌株およびプラスミド

菌株およびプラスミド	関連する性状 ¹	入手先・文献
<i>Porphyromonas gingivalis</i>		
ATCC 33277 株	野生株	ATCC ²
JI-1 株	33277 株由来の <i>fimA</i> 遺伝子欠損株, Cm ^r	28)
<i>mfa4</i> 変異株	JI-1 株由来の <i>mfa4</i> 遺伝子欠損株, Cm ^r , Em ^r	本研究で作製
KDP112 株	33277 株由来の <i>rgpA</i> および <i>rgpB</i> 遺伝子欠損株, Tc ^r , Em ^r	32)
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	コンピテントセル	タカラバイオ
プラスミド		
pCR-Blunt II-TOPO	クローニング用ベクター, Km ^r	Invitrogen
pVA2198	Em ^r カセットを含むプラスミド, Em ^r	33)
pCR-TOPO <i>mfa4</i>	<i>mfa4</i> 遺伝子領域を含む 2.0 kbp を pCR-Blunt II-TOPO に組み込んだプラスミド, Km ^r	本研究で作製

¹ Cm^r : クロラムフェニコール耐性, Em^r : エリスロマイシン耐性, Tc^r : テトラサイクリン耐性, Km^r : カナマイシン耐性

² ATCC : American Type Culture Collection

表 2 使用したプライマー

プライマー	配列 (5' → 3')
<i>mfa4</i> F	G G C G A G T A <u>G G T A C C A C G A A C C A A T G G C T T G G</u>
<i>mfa4</i> R	T G A A T T A A <u>G G T A C C C T T A T T T G C A G G C A C C</u>

下線部は *Kpn* I の制限酵素サイトを示す.

2 *mfa4* 変異株の作製

プラスミド DNA の抽出は QIAprep Miniprep Kit (Qiagen, 東京) を使用し, 染色体 DNA の抽出は Master Pure Genomic DNA Purification Kit (Epicentre Technologies, Madison, WI, USA) を用いて行った. 使用したプラスミドを表 1 に示した. PCR には, Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用い, DNA ポリメラーゼとして, Takara Ex Taq および Pyrobest (タカラバイオ, 大津) を使用した. 使用したプライマーを表 2 に示した.

33277 株の染色体 DNA を鋳型として, Mfa4F および Mfa4R プライマーを用いた PCR で, *mfa4* の遺伝子領域を含む 2.0 kbp の断片を増幅した. 得られた *mfa4* 断片を pCR-Blunt II -TOPO (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) に組み込み, pCR-TOPO *mfa4* を作製し, 制限酵素 *Bal*I にて *mfa4* 領域中央部を 1 か所切断した. 次に pVA2198³³⁾ を *Kpn*I および *Bam*HI で消化し, Em^r カセットを切り出した. *Bal*I 切断部に平滑末端ライゲーションにて Em^r カセットを挿入し, *E. coli* DH5 α に導入した. 得られた形質転換体からプラスミド DNA を抽出し, *Kpn*I で消化した. インサート DNA を切り出した後, JI-1 株にエレクトロポレーションにより導入した. エリスロマイシン耐性を獲得した形質転換株を分離し, 目的の部位に挿入変異が起こっていることを PCR により確認した.

3 菌体分画によるタンパク質試料の調製

菌体培養液を $5,000\times g$, 20 分間遠心し菌体と培養上清に分離した。菌体を 10 mM リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) で洗浄後, プロテアーゼ阻害剤 (0.1 mM $N\alpha$ -トシル-L-リジンクロロメチルケトン, 0.2 mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド, 0.1 mM ロイペプチン) 含有 10 mM 4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジンエタンサルホン酸 (HEPES) 緩衝液 (pH 7.4) で懸濁した。Bioruptor UCD-300 (コスモバイオ, 東京) を用いて菌体を 30 分間超音波破碎した後, $1,000\times g$, 10 分間の遠心により未破碎菌体を除去し, 上清を全菌体抽出液とした。全菌体抽出液を $100,000\times g$, 60 分間超遠心して得られた上清を可溶性画分, 沈渣をプロテアーゼ阻害剤含有 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) にて懸濁したものを膜画分とした。さらに, プロテアーゼ阻害剤, 1% Triton X-100 および 20 mM $MgCl_2$ 含有 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) にて沈渣を $20^\circ C$ で 30 分間処理し, 内膜成分を可溶化した。 $100,000\times g$, 60 分間超遠心して得られた上清を内膜画分, 沈渣をプロテアーゼ阻害剤含有 10 mM HEPES 緩衝液 (pH 7.4) にて懸濁したものを外膜画分とした。内膜成分の可溶化を除いて, 操作は全て $4^\circ C$ で行った。

4 Mfa1 線毛の精製

Mfa1 線毛の精製は, Parkら²⁵⁾の方法に従い行った。陰イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル濾過を用いて, 可溶性画分から Mfa1 線毛を精製した。

5 培養上清に存在するタンパク質の濃縮

培養上清に存在するタンパク質の濃縮は, Hasegawaら³⁴⁾の方法に従い行った。培養上清を 70% 飽和硫酸アンモニウムで沈殿させた後, 5,000×g, 90 分間遠心し, 沈渣を 10 mM トリス緩衝生理食塩水 (TBS, pH 7.4) にて懸濁した。透析により懸濁液から硫酸アンモニウムを除去した後, Ficoll PM400 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) を用いて濃縮した。

6 ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

調製したタンパク質試料を 2-メルカプトエタノールを含むドデシル硫酸ナトリウム緩衝液に溶解後 100°C で 5 分間加熱し, 12% ポリアクリルアミドゲルに展開した。ゲルの染色にはクマシーブリリアントブルー R250 (CBB) を使用した。

7 ウェスタンブロット

SDS-PAGE により展開したタンパク質試料を Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。5%

スキムミルク含有 20 mM TBS (pH 7.4) を用いて PVDF 膜のブロッキングを行った。一次抗体には、大腸菌由来の組換えタンパク質によって免疫された抗 Mfa3 抗血清、抗 Mfa4 抗血清あるいは抗 Mfa5 抗血清²⁹⁾を 5% スキムミルク含有 20 mM TBS (pH 7.4) で希釈し使用した。二次抗体には、ヤギ抗ウサギ IgG ペルオキシダーゼ標識抗体 (MP Biomedicals, Santa Ana, CA, USA) を 5% スキムミルク含有 20 mM TBS (pH 7.4) で希釈し使用した。その後、ECL Prime (GE Healthcare) にてバンドを検出した。

8 N 末端アミノ酸配列分析

SDS-PAGE により展開したタンパク質試料を PVDF 膜に転写した。PVDF 膜を CBB にて染色し、染め出されたタンパク質バンドを切り出した。切り出したタンパク質の N 末端アミノ酸配列を、北海道大学創成研究機構共用機器管理センターにて ABI 477 A automatic peptide sequence analyzer (Applied Biosystems) を用いてエドマン分解法により決定した。

9 リポタンパク質特異的シグナル配列の検索

リポタンパク質特異的シグナル配列予測プログラム LipopP (www.cbs.dtu.dk/services/LipoP/) を用いて、Mfa3 および Mfa4 タンパク質の推定アミノ酸配列を解析した。

結果

1 Mfa1 線毛の構成成分の比較

Mfa1 線毛の構成成分を比較するために、JI-1 株および *mfa4* 変異株から精製した Mfa1 線毛を SDS-PAGE により展開し CBB 染色を行った。その結果、JI-1 株では成熟型の構成成分を示す何本かのバンドが認められた。Hasegawa らの質量分析による解析結果に従うと²⁸⁾、75~50 kDa の数本のバンドが Mfa1、40 kDa のバンドが Mfa3、30 kDa のバンドが Mfa4、150 kDa および 130 kDa のバンドが Mfa5 タンパク質であると推定された。一方、*mfa4* 変異株では 75~50 kDa の数本のバンドは認められたが、150 kDa、130 kDa、40 kDa および 30 kDa のバンドは認められなかった (図 1)。

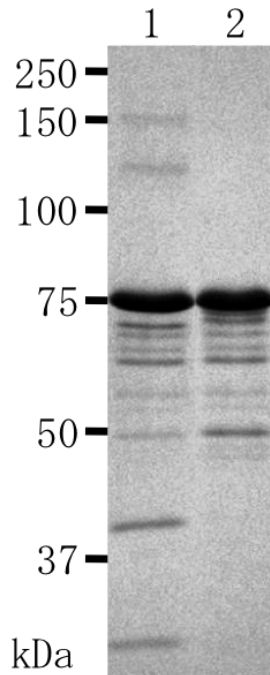


図 1 精製 Mfa1 線毛の SDS-PAGE 像

レーン 1 : JI-1 株, レーン 2 : *mfa4* 変異株.

2 *mfa4* 変異株における Mfa4 タンパク質欠失の確認

作製した *mfa4* 変異株において Mfa4 タンパク質が欠失していることを確認するために、JI-1 株および *mfa4* 変異株の全菌体抽出液と精製 Mfa1 線毛を、抗 Mfa4 抗血清を用いたウェスタンブロットにより解析した。その結果、JI-1 株では 30 kDa のバンドが検出され、*mfa4* 変異株ではバンドが検出されなかった（図 2）。この結果から、*mfa4* 変異株において Mfa4 タンパク質の欠失が確認された。

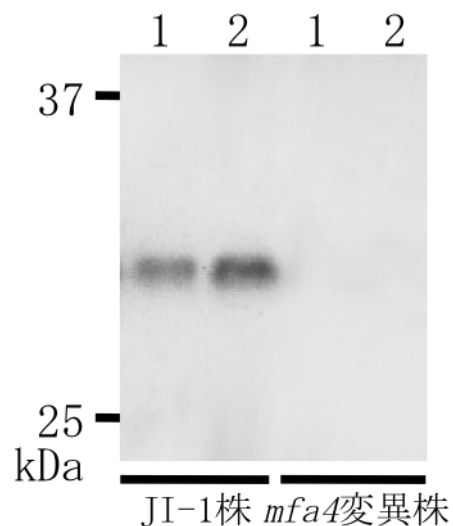


図 2 抗 Mfa4 抗血清を用いたウェスタンブロット像
レーン 1 : 全菌体抽出液，レーン 2 : 精製 Mfa1 線毛。

3 *mfa4* 変異株の Mfa1 線毛における付随成分欠失の確認

mfa4 変異株の Mfa1 線毛において Mfa4 タンパク質以外の付随成分が欠失していることを確認するために、JI-1 株および *mfa4* 変異株から精製した Mfa1 線毛を、抗 Mfa3 あるいは抗 Mfa5 抗血清を用いたウェスタンブロットにより解析した。その結果、抗 Mfa3 抗血清を用いた場合、JI-1 株では 40 kDa のバンドが検出されたが、*mfa4* 変異株ではバンドが検出されなかった（図 3）。抗 Mfa5 抗血清を用いた場合、JI-1 株では 150 および 130 kDa のバンドが検出されたが、*mfa4* 変異株ではバンドが検出されなかった（図 3）。これらの結果から、*mfa4* 変異株の Mfa1 線毛において付随成分の欠失が確認された。

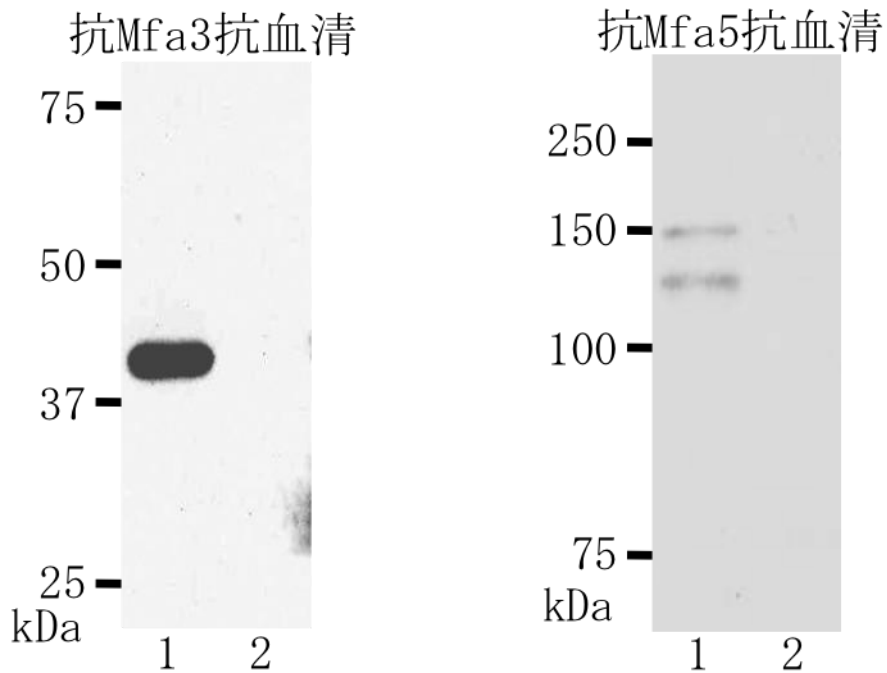


図 3 精製 Mfa1 線毛のウェスタンブロット像

レーン 1 : JI-1 株 , レーン 2 : *mfa4* 変異株

4 Mfa4 および Mfa3 タンパク質の成熟化過程の検討

1) N末端アミノ酸配列分析

Mfa4 および Mfa3 タンパク質の成熟化過程を検討するために、JI-1株から精製したMfa1線毛に存在する30 kDaの成熟型Mfa4および40 kDaの成熟型Mfa3タンパク質のN末端アミノ酸配列分析を行った。その結果、成熟型Mfa4タンパク質のN末端アミノ酸配列はNQGSAERLIと10アミノ酸残基まで同定できた。得られた結果を33277株のアミノ酸配列のデータベースと照合したところ、Mfa4タンパク質の推定アミノ酸配列の第54番目から63番目までの10アミノ酸残基と完全に一致した。直前のアミノ酸残基である第53番目はアルギニンであった(図4)。一方、成熟型Mfa3タンパク質のN末端アミノ酸配列はAAHTNGEEと8アミノ酸残基まで同定できた。得られた結果を33277株のアミノ酸配列のデータベースと照合したところ、Mfa3タンパク質の推定アミノ酸配列の第44番目から51番目までの8アミノ酸残基と完全に一致した。直前のアミノ酸残基である第43番目はアルギニンであった(図4)。

Mfa4タンパク質

1 11 21 31 41 51 61
MKKYL~~LYASL~~ LTSVLLFSCS KNNPSEPVED RSIEISIRVD DFTKTGETVR YERN**QGSAAE** **RL**ITNLYLLL

Mfa3タンパク質

1 11 21 31 41 51
MMQLKKRYFA LILLFLWSG CDRGVDPQPD PLQPDVYLLV NARA**AHTNGE** ESINMDAEDF

図 4 Mfa4 および Mfa3 タンパク質の推定 N 末端アミノ酸配列

精製 Mfa1 線毛に存在する成熟型 Mfa4 および Mfa3 タンパク質の N 末端アミノ酸配列分析において，同定できたアミノ酸残基を太字で示した．また，リポタンパク質特異的シグナル配列と推測されるアミノ酸配列を下線で示した．

2) アルギニン特異的プロテアーゼの関与

J1-1 株および Rgp(アルギニン特異的プロテアーゼ)が欠失している KDP112 株の全菌体抽出液と J1-1 株の精製 Mfa1 線毛 (KDP112 株は線毛が存在しないため除外した^{35, 36}) を，抗 Mfa4 抗血清あるいは抗 Mfa3 抗血清を用いたウェスタンブロットにより解析した．その結果，抗 Mfa4 抗血清を用いた場合，J1-1 株の全菌体抽出液においては 30 kDa のバンドが検出された．一方，KDP112 株の全菌体抽出液においては 34 kDa のバンドが検出され，成熟型 Mfa4 タンパク質である 30 kDa のバンドは検出されなかった (図 5)．抗 Mfa3 抗血清を用いた場合，J1-1 株の全菌体抽出液においては 43 kDa，42 kDa および 40 kDa のバンドが検出された．一方，KDP112 株の全菌体抽出液においては 43 kDa および 42

kDa のバンドは検出されたが，成熟型 Mfa3 タンパク質である 40 kDa のバンドは検出されなかった（図 5）。

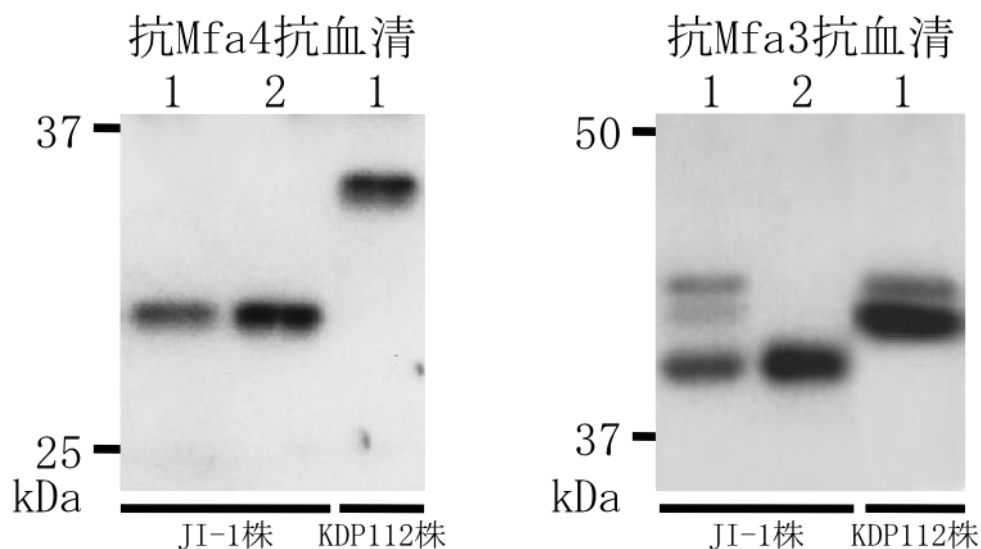


図 5 ウェスタンブロット像

レーン 1 : 全菌体抽出液，レーン 2 : 精製 Mfa1 線毛。

3) リポタンパク質特異的シグナル配列の検索

リポタンパク質特異的シグナル配列予測プログラム LipopP を用いて，Mfa4 および Mfa3 タンパク質の推定アミノ酸配列を解析した。その結果，Mfa4，Mfa3 タンパク質ともに N 末端領域にリポタンパク質特異的シグナル配列と推測されるアミノ酸配列が認められた（図 4）。

5 Mfa4 タンパク質が Mfa3 タンパク質に与える影響

Mfa4 タンパク質が Mfa3 タンパク質の局在に与える影響を検討するために，JI-1 株および *mfa4* 変異株の全菌体抽出液，可溶性画分，膜画分，内膜画分，外膜画分，精製 Mfa1 線毛および培養上清を，抗 Mfa3 抗血清を用いたウェスタンブロットにより解析した．その結果，JI-1 株では全菌体抽出液において 43 kDa，42 kDa および 40 kDa のバンドが，内膜画分においては 43 kDa および 42 kDa のバンドのみが検出された．外膜画分においては 40 kDa のバンドが強く検出され，精製 Mfa1 線毛においては 40 kDa のバンドのみが検出された．一方，*mfa4* 変異株では内膜と外膜画分において 43 kDa および 42 kDa のバンドは検出されたが，精製 Mfa1 線毛を含めたいずれの画分にも成熟型 Mfa3 タンパク質である 40 kDa のバンドは検出されなかった（図 6）．

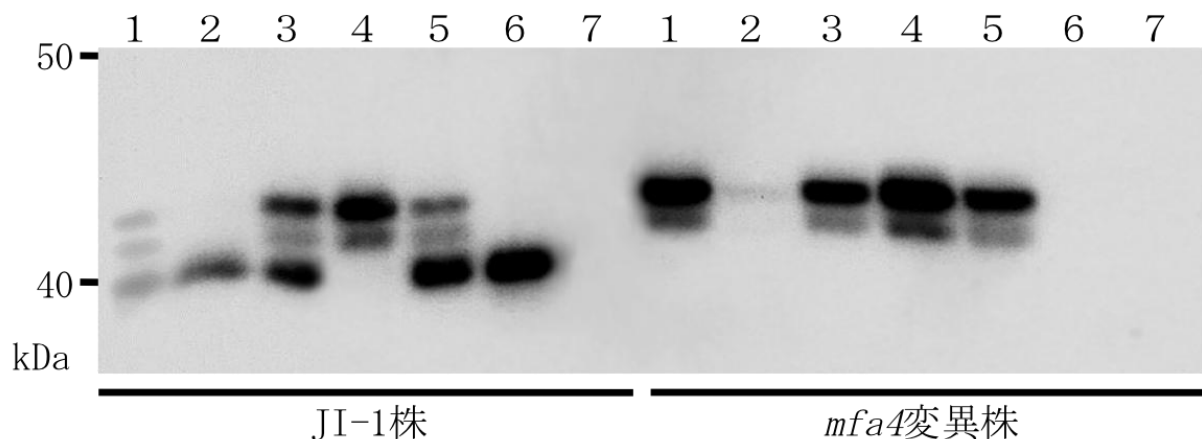


図 6 抗 Mfa3 抗血清を用いたウェスタンブロット像

レーン 1 : 全菌体抽出液，レーン 2 : 可溶性画分，レーン 3 : 膜画分，レーン 4 : 内膜画分，レーン 5 : 外膜画分，レーン 6 : 精製 Mfa1 線毛，レーン 7 : 培養上清．

6 Mfa4 タンパク質が Mfa5 タンパク質に与える影響

Mfa4 タンパク質が Mfa5 タンパク質の局在に与える影響を検討するために，JI-1 株および *mfa4* 変異株の全菌体抽出液，可溶性画分，膜画分，内膜画分，外膜画分，精製 Mfa1 線毛および培養上清を，抗 Mfa5 抗血清を用いたウェスタンブロットにより解析した．その結果，JI-1 株では可溶性画分と外膜画分において 130 kDa のバンドのみが，精製 Mfa1 線毛においては 150 kDa および 130 kDa のバンドが検出された．培養上清においてはバンドが検出されなかった．一方，*mfa4* 変異株では可溶性画分において 130 kDa よりも小さい分子量の数本のバンドが，培養上清において 130 kDa のバンドが検出されただけであった（図 7）．

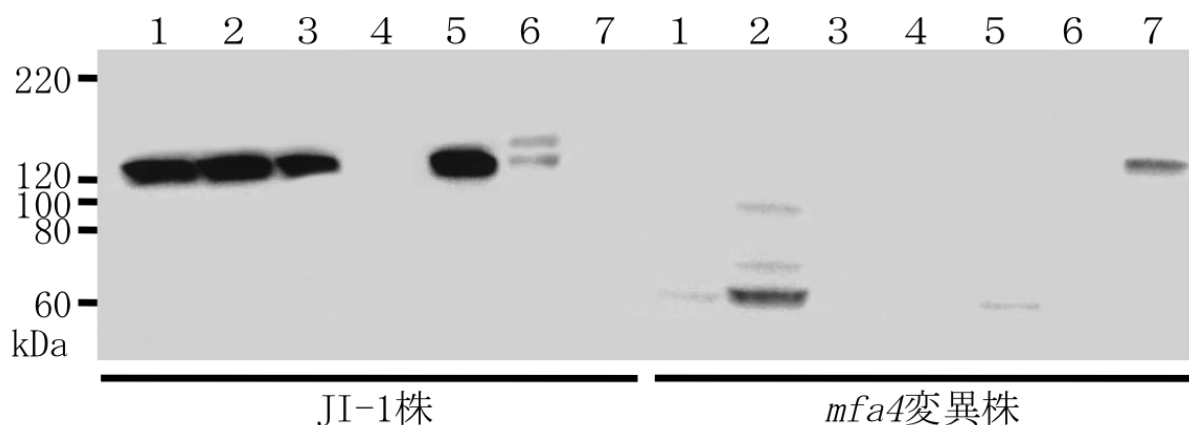


図 7 抗 Mfa5 抗血清を用いたウェスタンブロット像

レーン 1 : 全菌体抽出液，レーン 2 : 可溶性画分，レーン 3 : 膜画分，レーン 4 : 内膜画分，レーン 5 : 外膜画分，レーン 6 : 精製 Mfa1 線毛，レーン 7 : 培養上清．

考 察

P. gingivalis は、長さがおよそ 100 nm である Mfa1 線毛を有している²⁵⁾。Mfa1 線毛の主要成分は Mfa1 タンパク質であり²⁵⁾、付随成分として Mfa3, Mfa4 および Mfa5 タンパク質が存在している²⁸⁾。Mfa3 タンパク質については多くのことが解明され、線毛の先端に局在すること、Mfa4 および Mfa5 タンパク質の線毛へのアセンブリに必要であること、および自己凝集とバイオフィルム形成を抑制することが明らかになっている²⁹⁾。これらのことから、Mfa1 線毛の付随成分は重要な役割を担っていることが推察されるため、未だほとんど解明されていない Mfa4 タンパク質に関する研究は大変興味深いといえる。

Hasegawa らは、質量分析により精製 Mfa1 線毛に存在する 30 kDa のタンパク質が *mfa4* 遺伝子からの転写産物であることを示した²⁸⁾。精製 Mfa1 線毛を、大腸菌由来の組換えタンパク質によって免疫された抗 Mfa4 抗血清を用いたウェスタンブロットにより解析したところ、JI-1 株では 30 kDa のバンドが検出され、*mfa4* 変異株ではバンドが消失したことから (図 2)、精製 Mfa1 線毛に存在する 30 kDa のタンパク質が *mfa4* 遺伝子からの転写産物であることが、さらに強く示された。

精製 Mfa1 線毛に存在する成熟型 Mfa4 タンパク質の

N末端アミノ酸配列分析において同定できた10アミノ酸残基が、Mfa4タンパク質の推定アミノ酸配列の第54番目から63番目までの10アミノ酸残基と完全に一致し、直前のアミノ酸残基である第53番目がアルギニンであった(図4)。この結果から、Mfa4タンパク質はアルギニン特異的プロテアーゼによりプロセシングされることが考えられた。そこで、JI-1株およびRgpが欠失しているKDP112株の全菌体抽出液を、抗Mfa4抗血清を用いたウェスタンブロットにより解析した。その結果、JI-1株では成熟型Mfa4タンパク質である30kDaのバンドが検出されたが、KDP112株では34kDaのバンドが検出された(図5)。また、Rgpは外膜に存在することが知られている^{17,37)}。これらのことから、Mfa4タンパク質は外膜でRgpによりプロセシングされて成熟化することが明らかになった。さらに、Mfa4タンパク質の推定アミノ酸配列のN末端領域にリポタンパク質特異的シグナル配列と推測されるアミノ酸配列が認められたことから(図4)、Mfa4タンパク質は、内膜に局在するリポタンパク質特異的シグナル配列の切断酵素であるシグナルペプチダーゼII³⁷⁾によりプロセシングされる可能性が示唆された。

JI-1株の抗Mfa3抗血清を用いたウェスタンブロット解析において、全菌体抽出液では43kDa、42kDaおよび40kDaのバンドが、内膜画分では43kDaおよび42kDaのバンドのみが検出された。外膜画分では

40 kDa のバンドが強く検出され，精製 Mfa1 線毛では 40 kDa のバンドのみが検出された（図 6）．この結果から，Mfa3 タンパク質は内膜および外膜でプロセシングされて成熟化することが考えられた．また，精製 Mfa1 線毛に存在する成熟型 Mfa3 タンパク質の N 末端アミノ酸配列分析において同定できた 8 アミノ酸残基が，Mfa3 タンパク質の推定アミノ酸配列の第 44 番目から 51 番目までの 8 アミノ酸残基と完全に一致し，直前のアミノ酸残基である第 43 番目がアルギニンであった（図 4）．この結果から，Mfa3 タンパク質もまたアルギニン特異的プロテアーゼによりプロセシングされることが考えられた．そこで，KDP112 株の全菌体抽出液を，抗 Mfa3 抗血清を用いたウェスタンブロットにより解析したところ，43 kDa および 42 kDa のバンドは検出されたが，成熟型 Mfa3 タンパク質である 40 kDa のバンドは検出されなかった（図 5）．さらに，Mfa3 タンパク質の推定アミノ酸配列の N 末端領域に，リポタンパク質特異的シグナル配列と推測されるアミノ酸配列が認められた（図 4）．以上のことから，Mfa3 タンパク質は，内膜でシグナルペプチダーゼ II により，外膜で Rgp によりプロセシングされて成熟化することが示唆された．

これまでに，Mfa1 線毛の主要成分である Mfa1 タンパク質は，内膜でシグナルペプチダーゼ II によりプロセシングされ，外膜で Rgp によりプロセシングされて

成熟化することが報告されている^{35~37)}。Mfa1タンパク質の成熟化過程とMfa3およびMfa4タンパク質の成熟化過程には類似性が見受けられた。

JII-1株の抗Mfa5抗血清を用いたウェスタンブロット解析において、外膜画分では130 kDaのバンドのみが、精製Mfa1線毛では150 kDaおよび130 kDaのバンドが検出された(図7)。この結果から、Mfa5タンパク質の一部は外膜から線毛へ移行する過程において高分子化することが明らかになった。近年、*P. gingivalis*においてC末端側に保存されたC-terminal domain(CTD)を有するタンパク質は、新奇の分泌装置であるPor Secretion Systemによって菌体表層に輸送され、陰性荷電を0抗原鎖に持つリポポリサッカライド(A-LPS)に結合することによって菌体表層へ局在することが明らかにされている³⁸⁾。また、Mfa1線毛の付随成分ではMfa5タンパク質のみがCTDを有している³⁹⁾。したがって、Mfa5タンパク質の高分子化はA-LPSとの結合によるものかもしれない。Mfa5タンパク質は、Mfa1、Mfa3およびMfa4タンパク質とは異なる成熟化過程を有していると思われる。

*mfa4*変異株の抗Mfa3抗血清を用いたウェスタンブロット解析において、Mfa3タンパク質が菌体内で生合成されているにもかかわらず精製Mfa1線毛に存在しないことから(図6)、Mfa4タンパク質はMfa3タンパク質の線毛へのアセンブリに必要であることが明らか

になった。また，外膜画分において 43 kDa および 42 kDa のバンドは検出されたが，成熟型 Mfa3 タンパク質である 40 kDa のバンドは検出されなかったことから（図 6），Mfa4 タンパク質は，Mfa3 タンパク質が外膜で Rgp によりプロセシングされて成熟化するために必要であることが示唆された。したがって，Mfa3 タンパク質は成熟化されてはじめて線毛へのアセンブリが可能になると考えられた。

抗 Mfa5 抗血清を用いたウェスタンブロット解析において，*mfa4* 変異株の菌体内で Mfa5 タンパク質が合成されているにもかかわらず精製 Mfa1 線毛に存在しないことから（図 7），Mfa4 タンパク質は Mfa5 タンパク質の線毛へのアセンブリにも必要であることが明らかになった。また，JI-1 株の可溶性画分では 130 kDa のバンドが検出されたが，*mfa4* 変異株の可溶性画分では 130 kDa よりも小さい分子量に分解産物と考えられる数本のバンドが検出されたことから（図 7），Mfa4 タンパク質は Mfa5 タンパク質の安定化に関与することが明らかになった。*mfa4* 変異株の培養上清において 130 kDa のバンドが検出されたことは（図 7），一部の Mfa3 タンパク質は分解されずに菌体表層まで輸送されるが，線毛へはアセンブリされずに菌体外に放出されてしまうことを意味している。さらに，*mfa4* 変異株の培養上清において 150 kDa のバンドが検出されなかったことから（図 7），Mfa4 タンパク質は Mfa5 タンパ

ク質の高分子化にも関与することが考えられた。

これまでに、Mfa3タンパク質はMfa4およびMfa5タンパク質の線毛へのアセンブリに必要であることが報告されている²⁹⁾。本研究により、Mfa4タンパク質はMfa3およびMfa5タンパク質の線毛へのアセンブリに必要であることが明らかになった。したがって、付随成分は相互に作用し合い、3つの付随成分で1つの構造単位あるいは機能単位を形成していることが考えられた。

線毛は *P. gingivalis* における最も重要な病原因子である。本研究では、Mfa1線毛の付随成分であるMfa4タンパク質の成熟化過程およびMfa4タンパク質が他の付随成分に与える影響を明らかにすることができた。線毛に関する基礎的な研究が進めば、歯周病の発症と進行の解明のみならず、歯周病に対する予防法、治療法および創薬開発への応用が期待できると考えている。

結 論

本研究では、*P. gingivalis*が有する Mfa1 線毛の構造、構築機序および機能を理解するための一助として、Mfa1 線毛の付随成分である Mfa4 タンパク質の成熟化過程および Mfa4 タンパク質が他の付随成分に与える影響を検討した。その結果、以下の結論を得た。

1) Mfa4 タンパク質は Rgp によりプロセッシングされて成熟化する。

2) Mfa4 タンパク質は、Mfa3 タンパク質が Rgp によりプロセッシングされて成熟化するために必要である。

3) Mfa4 タンパク質は Mfa5 タンパク質の安定化および高分子化に関与する。

4) Mfa4 タンパク質は Mfa3 および Mfa5 タンパク質の線毛へのアセンブリに必要なものである。

引用文献

- 1) Pihlstrom BL, Michalowicz BS and Johnson NW. Periodontal diseases. *Lancet*. 2005;366:1809-1820.
- 2) Xiong X, Buekens P, Fraser WD, Beck J and Offenbacher S. Periodontal disease and adverse pregnancy outcomes: a systematic review. *BJOG*. 2006;113:135-143.
- 3) Tonetti MS, D'Aiuto F, Nibali L, Donald A, Storry C, Parkar M, Suvan J, Hingorani AD, Vallance P and Deanfield J. Treatment of periodontitis and endothelial function. *N Engl J Med*. 2007;356:911-920.
- 4) Awano S, Ansai T, Takata Y, Soh I, Akifusa S, Hamasaki T, Yoshida A, Sonoki K, Fujisawa K and Takehara T. Oral health and mortality risk from pneumonia in the elderly. *J Dent Res*. 2008;87:334-339.
- 5) de Pablo P, Chapple IL, Buckley CD and Dietrich T. Periodontitis in systemic rheumatic diseases. *Nat Rev Rheumatol*. 2009;5:218-224.
- 6) Kerschull M, Demmer RT and Papapanou PN. "Gum bug, leave my heart alone!"--epidemiologic and mechanistic evidence linking periodontal infections and atherosclerosis. *J Dent Res*.

2010;89:879-902.

7) Lundberg K, Wegner N, Yucel-Lindberg T and Venables PJ. Periodontitis in RA—the citrullinated enolase connection. *Nat Rev Rheumatol*.

2010;6:727-730.

8) Holt SC and Ebersole JL. *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the “red complex”, a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis.

Periodontol 2000. 2005;38:72-122.

9) Darveau RP. Periodontitis: a polymicrobial disruption of host homeostasis. *Nat Rev Microbiol*.

2010;8:481-490.

10) Curtis MA, Zenobia C and Darveau RP. The relationship of the oral microbiota to periodontal health and disease. *Cell Host Microbe*.

2011;10:302-306.

11) Hajishengallis G and Lamont RJ. Beyond the red complex and into more complexity: the polymicrobial synergy and dysbiosis (PSD) model of periodontal disease etiology. *Mol Oral Microbiol*.

2012;27:409-419.

12) Lamont RJ and Jenkinson HF. Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol*. 2000;15:341-349.

- 13) Amano A. Bacterial adhesins to host components in periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010;52:12-37.
- 14) Lo AW, Moonens K and Remaut H. Chemical attenuation of pilus function and assembly in Gram-negative bacteria. *Curr Opin Microbiol*. 2013;16:85-92.
- 15) Yoshimura F, Takahashi K, Nodasaka Y and Suzuki T. Purification and characterization of a novel type of fimbriae from the oral anaerobe *Bacteroides gingivalis*. *J Bacteriol*. 1984;160:949-957.
- 16) Hamada N, Sojar HT, Cho MI and Genco RJ. Isolation and characterization of a minor fimbria from *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 1996;64:4788-4794.
- 17) Yoshimura F, Murakami Y, Nishikawa K, Hasegawa Y and Kawaminami S. Surface components of *Porphyromonas gingivalis*. *J Periodont Res*. 2009;44:1-12.
- 18) Dickinson DP, Kubinieć MA, Yoshimura F and Genco RJ. Molecular cloning and sequencing of the gene encoding the fimbrial subunit protein of *Bacteroides gingivalis*. *J Bacteriol*. 1988;170:1658-1665.
- 19) Hajishengallis G, Wang M, Liang S, Shakhathreh MA, James D, Nishiyama S, Yoshimura F and Demuth DR.

Subversion of innate immunity by periodontopathic bacteria via exploitation of complement receptor-3. *Adv Exp Med Biol.* 2008;632:203-219.

20) Watanabe K, Onoe T, Ozeki M, Shimizu Y, Sakayori T, Nakamura H and Yoshimura F. Sequence and product analyses of the four genes downstream from the fimbriin gene (*fimA*) of the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Immunol.* 1996;40:725-734.

21) Naito M, Hirakawa H, Yamashita A, Ohara N, Shoji M, Yukitake H, Nakayama K, Toh H, Yoshimura F, Kuhara S, Hattori M and Hayashi T. 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.* 2008;15:215-225.

22) Nagano K, Hasegawa Y, Murakami Y, Nishiyama S and Yoshimura F. FimB regulates FimA fimbriation in *Porphyromonas gingivalis*. *J Dent Res.* 2010;89:903-908.

23) Nishiyama S, Murakami Y, Nagata H, Shizukuishi S, Kawagishi I and Yoshimura F. Involvement of minor components associated with the FimA fimbriae of *Porphyromonas gingivalis* in adhesive functions.

Microbiology. 2007;153:1916-1925.

24) Pierce DL, Nishiyama S, Liang S, Wang M, Triantafilou M, Triantafilou K, Yoshimura F, Demuth DR and Hajishengallis G. Host adhesive activities and virulence of novel fimbrial proteins of *Porphyromonas gingivalis*. *Infect Immun*. 2009;77:3294-3301.

25) Park Y, Simionato MR, Sekiya K, Murakami Y, James D, Chen W, Hackett M, Yoshimura F, Demuth DR and Lamont RJ. Short fimbriae of *Porphyromonas gingivalis* and their role in coadhesion with *Streptococcus gordonii*. *Infect Immun*. 2005;73:3983-3989.

26) Lamont RJ, El-Sabaeny A, Park Y, Cook GS, Costerton JW and Demuth DR. Role of the *Streptococcus gordonii* SspB protein in the development of *Porphyromonas gingivalis* biofilms on streptococcal substrates. *Microbiology*. 2002;148:1627-1636.

27) Kuboniwa M, Amano A, Hashino E, Yamamoto Y, Inaba H, Hamada N, Nakayama K, Tribble GD, Lamont RJ and Shizukuishi S. Distinct roles of long/short fimbriae and gingipains in homotypic biofilm development by *Porphyromonas gingivalis*. *BMC Microbiol*. 2009;9:105.

- 28) Hasegawa Y, Iwami J, Sato K, Park Y, Nishikawa K, Atsumi T, Moriguchi K, Murakami Y, Lamont RJ, Nakamura H, Ohno N and Yoshimura F. Anchoring and length regulation of *Porphyromonas gingivalis* Mfa1 fimbriae by the downstream gene product Mfa2. *Microbiology*. 2009;155:3333-3347.
- 29) Hasegawa Y, Nagano K, Ikai R, Izumigawa M, Yoshida Y, Kitai N, Lamont RJ, Murakami Y and Yoshimura F. Localization and function of the accessory protein Mfa3 in *Porphyromonas gingivalis* Mfa1 fimbriae. *Mol Oral Microbiol*. 2013;28:467-480.
- 30) Fronzes R, Remaut H and Waksman G. Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *EMBO J*. 2008;27:2271-2280.
- 31) Proft T and Baker EN. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66:613-635.
- 32) Nakayama K, Kadowaki T, Okamoto K and Yamamoto K. 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. 1995;270:23619-23626.

33) Fletcher HM, Schenkein HA, Morgan RM, Bailey KA, Berry CR and Macrina FL. Virulence of a *Porphyromonas gingivalis* W83 mutant defective in the *prth* gene. *Infect Immun.* 1995;63:1521-1528.

34) Hasegawa Y, Nishiyama S, Nishikawa K, Kadowaki T, Yamamoto K, Noguchi T and Yoshimura F. A novel type of two-component regulatory system affecting gingipains in *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol Immunol.* 2003;47:849-858.

35) Nakayama K, Yoshimura F, Kadowaki T and Yamamoto K. Involvement of arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain) in fimbriation of *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol.* 1996;178:2818-2824.

36) Kadowaki T, Nakayama K, Yoshimura F, Okamoto K, Abe N and Yamamoto K. Arg-gingipain acts as a major processing enzyme for various cell surface proteins in *Porphyromonas gingivalis*. *J Biol Chem.* 1998;273:29072-29076.

37) Shoji M, Naito M, Yukitake H, Sato K, Sakai E, Ohara N and Nakayama K. The major structural components of two cell surface filaments of *Porphyromonas gingivalis* are matured through lipoprotein precursors. *Mol Microbiol.*

2004;52:1513-1525.

38) Shoji M, Sato K, Yukitake H, Kondo Y, Narita Y, Kadowaki T, Naito M and Nakayama K. Por secretion system-dependent secretion and glycosylation of *Porphyromonas gingivalis* hemin-binding protein 35. *PLoS One*. 2011;6:e21372.

39) Sato K, Yukitake H, Narita Y, Shoji M, Naito M and Nakayama K. Identification of *Porphyromonas gingivalis* proteins secreted by the Por secretion system. *FEMS Microbiol Lett*. 2013;338:68-76.

