

# 近藤好夫 論文内容の要旨

## 主 論 文

Tetratricopeptide repeat protein-associated proteins contribute to virulence of  
*Porphyromonas gingivalis*.

(*Porphyromonas gingivalis* の TprA 結合蛋白の病原性について)

近藤好夫、大原直也、佐藤啓子、吉村満美子、  
雪竹英治、内藤真理子、藤原卓、中山浩次

(Infection and Immunity 2010年)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻  
(主任指導教員：藤原卓教授)

## 緒 言

偏性嫌気性菌 *Porphyromonas gingivalis* は慢性歯周疾患罹患部からの検出が多いこと、動物モデルで歯周疾患を誘発することなどから、もっとも有力な歯周疾患の原因菌であると考えられている。本菌の主要な病原因子としてはすでに線毛、各種プロテアーゼ、莢膜、内毒素 (LPS) などが知られている。しかし、未知の病原因子の存在を含め、病原因子全体については不明な点が多いと考えられる。そこで宿主内での本菌の病原因子を明らかにすることを目的に、*P. gingivalis* W83 株を用いてマウスに接種した菌と培地で培養した菌の菌体蛋白質のプロテオーム解析を行ってきた。その結果、PG1385 (TPR domain protein, TprA) は宿主内で発現の上昇する蛋白質であること、また *tprA* 変異株の病変形成率が低下することから、病原性に強く関与していることをこれまでに報告した。本研究では TprA と結合する蛋白を複数同定し、それらの病原性について検討を行った。

## 対象と方法

Genco らによるマウス皮下埋入コイルを用いた菌の接種法を応用して、一定時間マウス体内に感染させた *P. gingivalis* の菌体の回収を行った。得られた菌体より mRNA を調製しマイクロアレイやリアルタイム RT-PCR によって、野生株と *tprA* 変異株との間で転写量の異なる遺伝子を同定した。

*tprA* をプレイ、*P. gingivalis* のゲノムライブラリーをバイトとして酵母用発現ベクターを構築した。それぞれのベクターを酵母に形質転換しイーストツーハイブリッド法

(Y2H法)を行い、TprAと結合する蛋白のスクリーニングを行った。Y2H法で得られたTprAと結合する候補分子の組換え蛋白を大腸菌を用いて発現し、精製を行った。これらの組換え蛋白を用いて免疫沈降法やBiacoreで分子間相互作用を解析した。またこれらの組換え蛋白をマウスやウサギに免疫して、それぞれに対するポリクローナル抗体を作製した。この抗体を用いてそれぞれの蛋白の局在解析を行った。さらにTprAと結合を示した蛋白の遺伝子変異株を作製し、マウスに接種して病原性について検討を行った。

## 結 果

マイクロアレイやリアルタイム RT-PCRより、マウス体内において *tprA* 変異株の PG2102-2100 の mRNA の発現が著明に減少していた。また、PG2102-2100 の転写単位を検討するため野生株より調製した RNA の RT-PCR を行った結果、遺伝子間を含む領域でも PCR 産物の増加が認められ、PG2102-2100 はオペロンを形成していることが明らかになった。

Y2H法の結果より、TprAと結合可能な候補分子のなかから PG2101 (TprA-associated protein B, TapB) に着目し、分子間相互作用を解析したところ、TprAとTapBに特異的な結合が認められた。また同様にTprAとPG2102 (TprA-associated protein A, TapA)についても両者間に特異的な結合が確認できた。

局在解析の結果より、TprAとTapBはペリプラス蛋白で、TapAは外膜蛋白であることが明らかになった。

*tapA*, *tapB*, *tapC* の遺伝子変異株を作製し、マウスに接種したところ、すべての変異株において死亡率が低下していた。特に *tprA* 変異株と *tapA-tapB-tapC* 三重変異株の死亡率は著しく低下していた。

## 考 察

TprAは *P. gingivalis* の生理および宿主に対する病原性を考えるうえでも重要な蛋白である。TPR蛋白は原核生物から真核生物に至るまで存在し、他の蛋白と結合することにより機能発現するものが数多く存在する。本研究では、TprAはTapAならびにTapBと結合することが示された。さらに *tprA* 変異株では *tapA-tapB-tapC* オペロンの発現が減少していた。これらのことより、TprAはTapA, TapB, TapCと協調して機能発現に関与することが示唆された。

またTapA, TapCはCTD family proteinであることが報告されているが、その機能などについて詳細な報告はない。CTD family proteinは *P. gingivalis* が持つ蛋白分泌機構 (Por secretion system) によって分泌され、糖鎖修飾を介して菌体表面に局在すると考えられている。本研究の結果はこれらのことと一致する。さらに多くの病原因子はCTD family proteinであり、本研究においても *tapA*, *tapC* の変異株の病原性が低下していたことより、TapA, TapCは *P. gingivalis* における新奇病原因子であると考えられる。