

成田由香 論文内容の要旨

主 論 文

Lack of a surface layer in *Tannerella forsythia* mutants deficient
in the type IX secretion system

(*Tannerella forsythia* における 9 型分泌機構関連遺伝子変異株は
surface layer が欠失する)

(成田 由香、佐藤 啓子、雪竹 英治、庄子 幹郎、中根 大介、
永野 恵司、吉村 文信、内藤 真理子、中山 浩次)

(Microbiology in press)

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科新興感染症病態制御学系専攻
(主任指導教員：中山浩次教授)

緒 言

Tannerella forsythia はグラム陰性偏性嫌気性細菌で、*Porphyromonas gingivalis* および *Treponema denticola* と共に慢性歯周炎の発症、進行に重要な細菌の 1 つである。*P. gingivalis* において強力な病原プロテアーゼであるジンジパインなどの CTD ドメイン含有タンパク質の分泌機構として PorSS が報告された。近年、PorSS 関連分子は phylum *Bacteroidetes* に含まれる多くの細菌で保有されていることが報告され、type IX secretion system (T9SS) と命名された。*T. forsythia* においても T9SS 関連遺伝子のホモログが存在している。本菌の病原因子として菌体表層の糖タンパク質である Surface layer (S-layer) やロイシンリッチリピートを有する BspA が報告されており、これらも CTD タンパク質と思われる。本研究では、T9SS 関連遺伝子変異株を作製し、変異株の性状解析を行い、本菌において T9SS がどのように機能しているかについて明らかにした。

対象と方法

T. forsythia ATCC 43037 株(野生株)から T9SS 関連遺伝子変異株 *porK*、*porT* および *sov* を薬剤耐性カセットを用いた相同組み換えにより作製した。S-layer の性状解析のため、電子顕微鏡による菌体のネガティブ染色像、超薄切片像の比較観察、SDS-PAGE による全菌体パターンの比較、抗 TfsA 抗体および抗 TfsB 抗体を用いたイムノブロッ

ト解析、糖鎖染色による S-layer タンパク質 TfsA および TfsB の糖鎖修飾の解析を行った。これまでに、S-layer の関与が報告されている赤血球凝集活性とバイオフィルム形成能、また、*T. forsythia* において活性の報告のある BAPNA 分解活性についても解析した。

さらに、T9SS 依存性に分泌されるタンパク質の同定のため、培養上清タンパク質の二次元ゲル電気泳動によるタンパク質スポットの比較とそれらの質量分析による同定を行った。

結 果

野生株において特徴的に観察される菌体表層の規則的格子構造である S-layer は TfsA (230 kDa) および TfsB (270 kDa) のタンパク質から構成される。T9SS 関連遺伝子変異株においては共通して S-layer 構造の欠失、TfsA および TfsB の分子量の低下、糖鎖修飾の減弱を認めた。赤血球凝集活性は野生株と比較し、T9SS 関連遺伝子変異株では 12.5%、*tfsA* および *tfsB* 単独変異株では 50%、*tfsA tfsB* 二重変異株では 25% に減弱した。バイオフィルム形成能はクリスタルバイオレット染色、共焦点顕微鏡観察いずれも T9SS 関連遺伝子変異株において増強していた。BAPNA 分解活性では野生株との差を認めなかった。二次元ゲル電気泳動による培養上清タンパク質の解析から、*porK* 遺伝子依存性に複数の CTD タンパク質の分泌を認めた。

考 察

T. forsythia の T9SS 関連遺伝子変異株 3 株はどれも S-layer の欠失、S-layer 構成タンパク質の分子量の低下、糖鎖修飾の減弱などの共通した性状の変化を示すこと、CTD タンパク質の分泌が *porK* 遺伝子依存性に分泌されていることから、*T. forsythia* においても T9SS は機能し、CTD タンパク質の菌体表層への輸送や菌体外への分泌に寄与することが明らかとなった。すなわち、本菌の TfsA、TfsB をはじめとする CTD タンパク質は、N 末端のシグナルペプチド領域を利用し Sec 輸送装置を介して内膜を通過後、T9SS により外膜を通過し菌体表層へ輸送されると思われる。

また、S-layer を構成する TfsA および TfsB タンパク質は、内膜もしくはペリプラズムでの O-glycosylation 修飾の後、菌体表層でさらに糖鎖修飾を受けることが示唆された。