

野中美那子 論文内容の要旨

主 論 文

Analysis of a Lys-specific serine endopeptidase secreted via the type IX secretion system in *Porphyromonas gingivalis*

(ポルフィロモナス・ジンジバリスにおける 9 型分泌機構依存性分泌ペプチダーゼ、リシン特異的セリンエンドペプチダーゼの解析)

野中美那子、庄子幹郎、門脇知子、佐藤啓子、雪竹英治、内藤真理子、中山浩次

FEMS Microbiology Letters (掲載時期未定)

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

口腔偏性嫌気性細菌 *Porphyromonas gingivalis* は、慢性歯周炎の発症・増悪に関わる最重要細菌で、高いタンパク質分解活性を有することで知られている。

これまで本教室は、本菌が既知の分泌機構と異なる新規の分泌機構 (9 型分泌機構) を有することを報告した。*P. gingivalis* が産生する強力なプロテアーゼで、本菌の代表的病原因子とされるジンジパイン (RgpA、RgpB 及び Kgp) は、本分泌機構により分泌されることが分かっている。また、9 型分泌機構構成タンパク質欠損変異株と本分泌機構保存株の培養上清を比較した実験から、ジンジパイン以外に 9 型分泌機構により分泌される、いくつかのタンパク質が同定され、その中の一つに PGN_1416 タンパク質が含まれていた。しかし、その詳細は不明であったため、本研究にて PGN_1416 タンパク質の遺伝生化学的性状解析を行った。

対象と方法

Porphyromonas gingivalis の野生株 ATCC33277 と Kgp (リシン特異的ジンジパイン) 欠損株を親株とした、PGN_1416 (PepK と命名) 欠損株をそれぞれ作製するとともに、PepK に対するポリクローナル抗体を作製し以下の解析を行った。Western blot 解析にて、野生株における PepK の発現と局在を解析した。また、親株と *pepK* 変異株から Triton X 不溶性膜画分 (外膜画分) を調製し、プロテアーゼ活性実験を行い、測定された活性の特性を解析した。PepK 抗体及び様々なジンジパイン欠損株を用いた Western blot 解析にて、ジンジパインと PepK の関連性を解析した。Rgp (アルギニン特異的ジンジパイン) の、菌体表面における PepK 活性化に及ぼす影響を調べる目的で、互いに異なる菌株の菌体表面に分泌された PepK と Rgp を相互作用させるため、ジンジパイン完全欠損株 (*kgp rgpA rgpB*) と Kgp 及び PepK の 2 重欠損株 (*kgp pepK*) の 2 株を共培養し、調製した共培養サンプルを用いて Western blot 解析並びにプロテアーゼ活性測定を行った。PepK のアミノ酸配列における生物情報学的解析により、細

菌界における *pepK* 類似タンパク質コーディング配列 (CDS) の分布を分析した。

結 果

PepK は、*P. gingivalis* の様々な野生株に普遍的に発現しており、9 型分泌機構によって分泌された後、菌体外膜表面の A-LPS に局在することが示唆された。酵素活性実験では、*pepK* 遺伝子欠損により、リジルエンドペプチダーゼ活性が著明に減弱する結果が得られた。また、プロテアーゼ阻害剤実験により PepK はセリンプロテアーゼであることが示唆された。このことから、PepK は、外膜に存在しリシン特異的セリンプロテアーゼ活性を有することが強く示唆され、その活性化はジンジパインである Rgp により影響される結果が得られた。アミノ酸配列の解析により、PepK 類似タンパク質 CDS は、主に *Bacteroidetes* 門内の細菌に認められ、それらは 9 型分泌機構依存性分泌タンパク質に特有の C 末端ドメインを有していた。また、PepK の触媒ドメインは、*Bacteroidetes* 門のみならず *Proteobacteria* 門に属する *Acidovorax*、*Pseudomonas*、*Lysobacter*、*Xanthomonas* 属にも PepK 類似タンパク質 CDS が認められた。

考 察

PepK は、*P. gingivalis* の 9 型分泌機構により、菌体表面へ分泌された後、Rgp ジンジパインによりその活性化が促される、リシン特異的セリンエンドペプチダーゼであると考えられる。*Bacteroidetes* 門に認められる PepK 類似タンパク質は、*Bacteroidetes* 門以外にも認められる PepK と類似な触媒ドメインに、9 型分泌機構依存性に分泌されるための C 末端ドメインが付加されたものと推測される。