

**研究者：今村 圭吾**（所属：長崎大学 医歯薬学総合研究科 小児歯科学分野）

**研究題目：***Porphyromonas gingivalis* における HtrA の構造的・機能的解析

**目的：**

*Porphyromonas gingivalis* は最も代表的な歯周病細菌であり、様々な病原因子を持つことが知られている。本菌を含めた多くの歯周病細菌（*Prevotella intermedia*, *Tannerella forsythia* など）では菌体表面、菌体外に存在する多くの病原タンパク質が9型分泌機構（T9SS）を介して輸送・分泌されている。これらの病原タンパク質を含め、多くのタンパク質はHtrAによって管理されており、細胞が環境ストレス下にさらされた状態において、HtrAは重要な役割を担っていると考えられている。しかしながら、本菌におけるストレス応答機構についての詳細な研究はない。

このストレス応答を解析することにより、口腔環境で、様々な物理的・化学的・生物的ストレスを受けた際の、歯周病菌の環境適応・生存戦略を明らかにすることができると考えている。そのため、タンパク質レベル・遺伝子発現レベルにおいて解析し、さらにHtrAの構造解析を行っていく。

**対象および方法：**

*Porphyromonas gingivalis*（ATCC 33277）株を用いて以下の実験を行う。

1. T9SS欠損株を作成して、HtrAの発現量を検討する
2. HtrAのアミノ酸配列より protease 活性中心を考えられるアミノ酸を置換し、protease 機能について検討する
3. 野生株と HtrA 欠損株でのタンパク質発現の相違を検討する。

**結果および考察：**

1. 左から野生株、HtrA欠損株、T9SSを構成するメジャーなタンパク質を欠損させた株で、HtrA抗体にてimmunoblotを行ったところ、HtrAの発現量は、野生株と比較し、T9SS欠損株においては、1.3~2.6倍上昇した。さらに、mRNAレベルでのHtrAの発現量の変化を調べたところ、先ほどと同様にT9SS欠損株においてHtrAの発現量は優位に上昇した。これらの結果より、*porphyromonas gingivalis*においても大腸菌と同様に、HtrAは、periplasmにおいて不要なタンパク質を処理していることが示唆される（図1）。

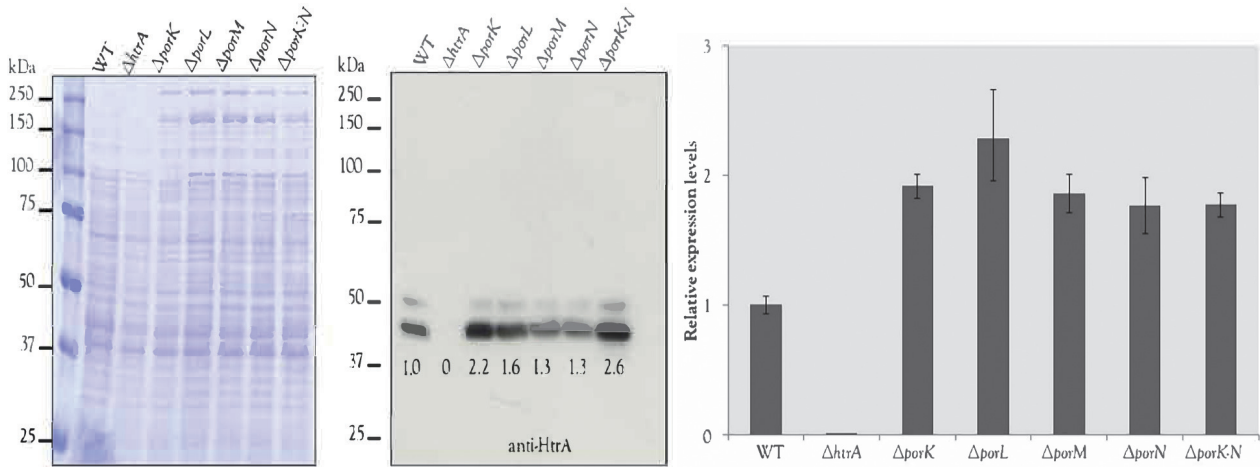


図1 T9SS 欠失株における HtrA 発現量

2. HtrA のアミノ酸配列より protease 活性中心と考えられる部位を特定し、その活性中心と考えられるアミノ酸を置換した株を作成した。左から野生株、HtrA 変異株、HtrA を戻した株、1 アミノ酸置換を行った株である。野生株・HtrA 戻し株においては、HtrA の分子量が 44kDa だったのに対し、1 アミノ酸置換した株においては、48kDa と、分子量が大きくなった。次に、野生型のリコンビナント HtrA と 1 アミノ酸置換したリコンビナント HtrA をのタンパク質分解能を検討した。タンパク質分解能を調べるにあたり、基質として  $\beta$ -casein を用いた。左側が野生型の HtrA で、時間経過とともに、 $\beta$ -casein が分解するのに対し、右側の 1 アミノ酸置換を行った HtrA では、 $\beta$ -casein の分解がみられなかった。これらの結果より、置換を行ったアミノ酸が protease の活性中心であると考えられ、置換したことにより、タンパク質分解能が消失し、また自己分解せず、分子量がおおきくなったと考えられる (図 2)。

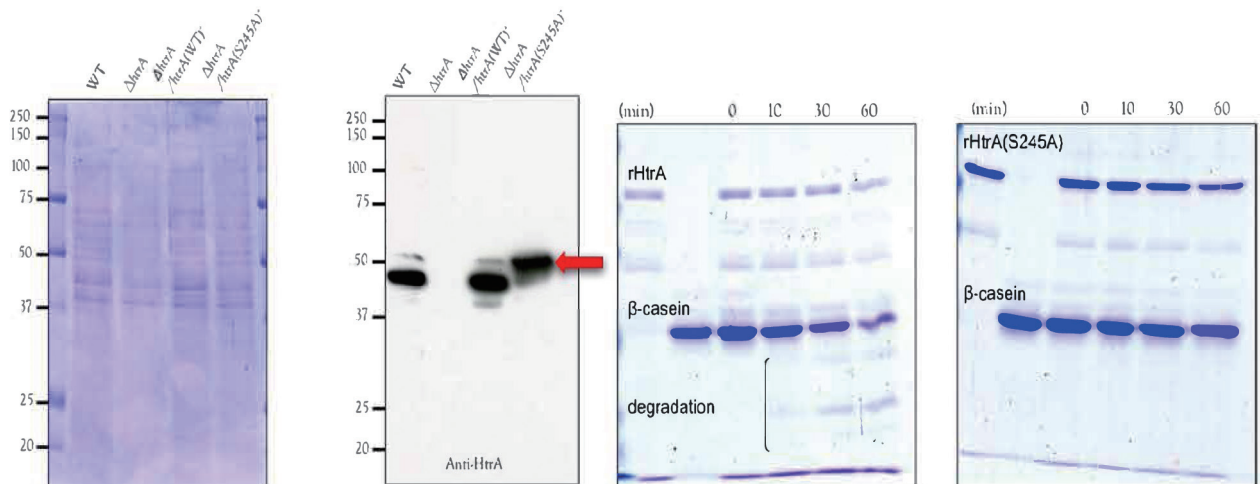


図2 rHtrA/rHtrA (S245A) の protease 活性

3. HtrA と関わるタンパク質を SDS-PAGE にて確認し、質量分析にてタンパク質の同定を行った。今回の結果では、可溶性画分においては、野生株と HtrA 欠損株においてバンドの発現パターンに違いを認めなかった (図 3, 4)。しかしながら、外膜タンパク質においてはかなりの違いがあり、赤丸が異なる発現を認めた箇所である。そのうち、質量分析にて特定できたタンパク質が右の表である (図 5)。

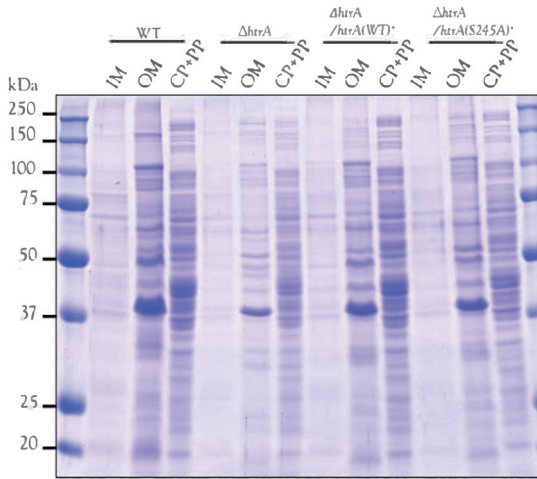


図3 質量分析によるタンパク質の同定

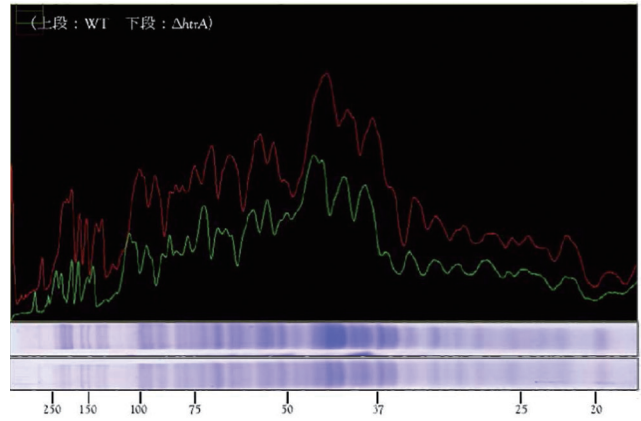


図4 質最分析によるタンパク質の同定 (Periplasm/Cytoplasm)

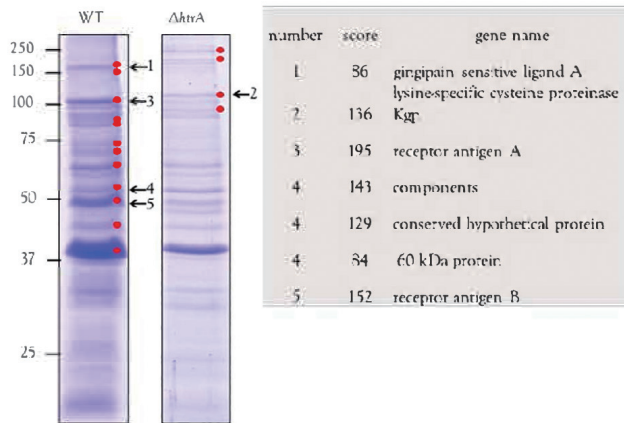


図5 質最分析によるタンパク質の同定 (Outer membrane)

これらの結果より、T9SS 欠損株では、periplasm に本来分泌されるべきタンパク質が蓄積しており、それらのタンパク質を分解するために HtrA の発現が上昇していると考えられた。

野生株の HtrA の分子量は 44kDa に対して、アミノ酸置換した HtrA の分子量は 48kDa であった。これは、アミノ酸置換した HtrA は、タンパク分解能が欠失し、HtrA は自己分解をしなかったためであると示唆された。

HtrA は様々なタンパク質と関連しており、特に外膜に関わるタンパク質との関連性があることが示唆された。

**成果発表：**(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

今後、上記内容を含めて学術雑誌に投稿予定