

## 第 35 回 (平成 19 年度) 研究奨励金受領者研究報告

### 歯周病原性細菌のゲノム再編と高病原化に関する研究

山口大学農学部 阿座上弘行

#### 【目的】

*Eikenella corrodens* は歯周病患者の病変部から頻繁に分離され、無菌ラットへの単一感染でも重度の歯周病を惹起する歯周病関連細菌の一つである。近年、本菌がアテロームや髄膜炎などの全身疾患に関わる感染症の一因となっていることも報告されている。本菌は *N*-アセチルガラクトサミン (GalNAc) に特異的なレクチン様物質を菌体表層に有している。このレクチンを介して口腔内上皮細胞への付着、赤血球の凝集、プラーク構成細菌との共凝集、マウス B 細胞の活性化、細胞接着分子である ICAM の誘導を行うことなどが報告されている。したがって、このレクチンが本菌の病原性に大きく寄与すると考えられている。

一般に *E. corrodens* はその名の由来のとおり、固体培地上で食い込むような corroding 状のコロニーを形成し、菌体局部に線毛を所有する。一方、重度歯周病患者からの臨床分離株である 1073 株は、23834 株など他の株とは異なり、固体培地上で盛り上がった Non-corroding 状のコロニーを形成し、線毛を所有しない。我々は、この 1073 株から 8.7 kb のプラスミド DNA を発見し、pMU1 と名付けた。解析の結果、pMU1 上にコードされたリコンビナーゼが本菌のタイプ 4 線毛遺伝子領域に組み換えを起こすことが明らかになった<sup>1)</sup>。さらに、この組換えによって、本菌の GalNAc 特異的なレクチン活性やバイオフィーム形成能などが上昇した<sup>2)</sup>。これらの結果より、pMU1 上にコードされたリコンビナーゼにより、本菌の病原性が大きく増大することが示唆された。そこで、本研究では、リコンビナーゼの導入によって本菌のゲノムにどのような変化が起こっているのか、また導入により本菌の上皮細胞への付着・侵入能力へ与える影響を調べた。

#### 【結果と考察】

##### 1. 線毛遺伝子領域の解析

リコンビナーゼ遺伝子の導入により組換えが起こった株から線毛遺伝子領域をクローニングし、その塩基配列を決定した。その結果、タイプ 4 線毛をコードする *ecpA* の内部から赤血球凝集素をコードする *hagI* の上流の間の配列が本来の配列と大きく異なっていた。また、この変化した領域の配列は他の *E. corrodens* 株で報告されている線毛

遺伝子領域の配列<sup>3)</sup>と相同性が見られた。このことから、このようなプラスミドによるゲノムの再編が口腔内で水平伝播により頻繁に起こっている可能性が示唆された。

##### 2. 上皮細胞への付着

Fig. 1 に示すように、23834 株の上皮細胞への付着菌数は、1073 株に比べ少なく 20% 程度であった。しかし、23834 株にリコンビナーゼを導入した株では、1073 株と同程度の付着能力を示した。上皮細胞への *E. corrodens* の付着には GalNAc 特異的なレクチンが関与することが報告されている<sup>4)</sup>ので、リコンビナーゼによるレクチン活性の増加が上皮細胞への付着能力も増加させたのかもしれない。

##### 3. 上皮細胞への侵入

Fig. 2 に示すように、上皮細胞内へ侵入した菌数は、付着した菌数に比べかなり少なかった。リコンビナーゼ導入株では、導入前の 23834 株より上皮細胞への侵入能力は低下していた。また、1073 株においてもリコンビナーゼ導入株と同様に上皮細胞へ侵入した菌数が少なかった。このことより、菌体表層にタイプ 4 線毛を持たない株は侵入能力が低い可能性が示唆された。*E. corrodens* の上皮細胞への侵入においては、レクチンよりもむしろタイプ 4 線毛

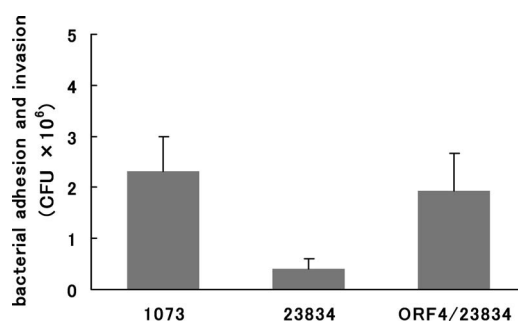


Fig 1. Adhesion to epithelial cells by *E. corrodens* strains 1073, 23834 and ORF4/23834.

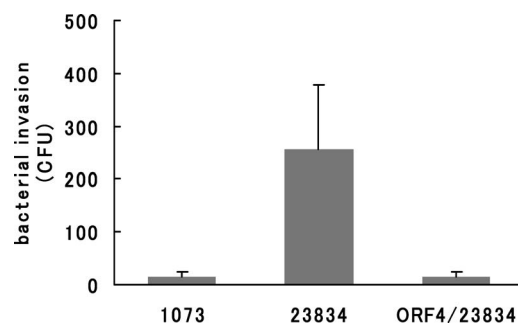


Fig 2. Invasion into epithelial cells by *E. corrodens* strains 1073, 23834 and ORF4/23834.

が重要な働きをしているのかもしれない。

以上の結果をまとめると、プラスミド上にコードされたリコンビナーゼによってゲノムの再編を引き起こし、上皮細胞への付着能が増すなど *E. corrodens* が高病原化する可能性が示唆された。

最後に本研究の遂行にあたりご援助を頂きました(財)農

芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。

## 参考文献

- 1) H. Azakami et al. *Gene*, **351**: 143-148, 2005.
- 2) H. Azakami et al. *Microbiology*, **152**: 815-821, 2006.
- 3) M. Villar et al. *J Bacteriol*, **183**: 55-62, 2001.
- 4) H. Yumoto et al. *Infect Immun*, **67**: 384-394, 1999.

## エキソサイトーシスにおける分子スイッチ機構の解明と新規 ATP 結合モチーフの同定

青山学院大学理工学部化学・生命科学科 有井康博  
(現 武庫川女子大学生活環境学部食物栄養学科)

**【目的】** 膵臓細胞の消化酵素は、チモーゲン顆粒によって運搬され、エキソサイトーシスにより細胞外に放出される。エキソサイトーシスには、チモーゲン顆粒膜と細胞膜の融合が不可欠であるが、その分子機構は明らかになっていない。本研究では、チモーゲン顆粒膜の細胞質側に結合するタンパク質である ZAP36 に注目し、エキソサイトーシスにおける分子の役割を明らかにする。

ZAP36 はチモーゲン顆粒膜に結合する分子量が約 36 kDa のタンパク質として、ラット膵臓から単離された<sup>1)</sup>。そのアミノ酸配列はアネキシン IV (Anx4) と高い相同性を持ち、一次配列上は同一のタンパク質と考えられる。また、Anx4 はカルシウム濃度依存的に膜と結合し、ナトリウム濃度依存的に解離することが知られている。さらに、所属する研究室では、ZAP36 が ATP と結合することを酵素反応論的に明らかにしている。しかしながら、既存の ATP 結合モチーフを分子内に持ち合わせていない。そこで、ATP 結合型 ZAP36 の X 線結晶構造を決定し、新規モチーフの同定とエキソサイトーシスにおける役割を構造生物学的に明らかにすることを目指した。

**【方法】** グルタチオン-S-トランスフェラーゼの C 末端側に ZAP36 を連結させた融合タンパク質 (GST-ZAP36) を大腸菌体内で発現させた。GST アフィニティークロマトグラフィー後に、GST を Factor Xa で除去し、陰イオン交換カラムで ZAP36 を精製した。精製タンパク質を約 20 mg/ml まで濃縮し、タンパク質母液とした。結晶化は、ハンギングドロップ蒸気拡散法で行った。得られた結晶について高エネルギー加速器研究機構の Photon Factory BL6 を用いて、回折データを得た。回折データをもとに、分子置換法を用いて電子密度マップとモデル分子を算出した。この電子密度マップと分子モデルを用いて精密化を繰り返

し、native 結晶構造を決定した。また、同じ結晶に  $\gamma$ -S-ATP をソーキングし、回折データの測定と結晶構造の決定を試みた。

**【結果】** 現在までのところ、ATP 類似体との複合体結晶構造を決定できていない。しかしながら、その解析に必要な native 結晶構造 (図 1) を 1.58Å の解像度で明らかにし<sup>2)</sup>、ZAP36 の膜結合能に関する興味深い洞察を得ることができた。この構造は Protein Data Bank に 2zhi および 2zhj として登録した。

Anx4 は分子内に 4 つのカルシウム結合部位を持ち合わせている (図 1)。差電子密度マップの結果 (Data not shown) から、今回、決定した構造には、ドメイン I のカルシウム結合部位にナトリウムイオンが結合している可能性が示された。また、ナトリウムの結合を確かなものとする為に、原子吸光分析を行った結果、一分子当たり約 2.3 個のナトリウムが存在することが明らかになった<sup>3)</sup>。結晶化、精製過程で結合する可能性のある金属イオン、カルシウムおよびマグネシウムは検出されなかった。また、価数スクリーニング法で結合距離 (図 2) から、結合している金属イオンの推定を行った結果、結合金属イオンがナトリウムイオンであることが示された。以上の分析結果から、Anx4 のカルシウム結合部位にはナトリウムイオンも結合することが明らかになった。ナトリウム結合型のアネキシンプ

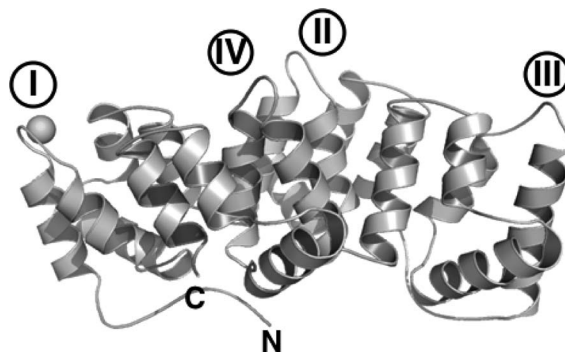


図 1 ラット ZAP36 の native 結晶構造。球はナトリウムイオンを示す。ローマ数字は 4 つのドメインにあるカルシウム結合部位を示している。N, C は N 末端, C 末端を意味する。