

Title	口腔内レンサ球菌が産生する線毛タンパク質のX線構造解析
Author(s)	武部, 克希
Citation	平成28年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書
Issue Date	2017-03
Text Version	publisher
URL	http://hdl.handle.net/11094/60326
DOI	
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

平成28年度学部学生による自主研究奨励事業研究成果報告書

ふりがな 氏名	たけべ かつき 武部 克希	学部 学科	歯学部 歯学科	学年	4年
ふりがな 共同 研究者名		学部 学科		学年	年
					年
					年
					年
アドバイザー教員 氏名	中田 匡宣	所属	歯学研究科 口腔細菌学教室		
研究課題名	口腔内レンサ球菌が産生する線毛タンパク質のX線構造解析				
研究成果の概要	研究目的、研究計画、研究方法、研究経過、研究成果等について記述すること。必要に応じて用紙を追加してもよい。				

【研究目的】

レンサ球菌 (*Streptococcus*) は口腔内に常在細菌として優性に棲息する。口腔内レンサ球菌である *Streptococcus sanguinis* は 16S rRNA の塩基配列に基づく分類からミティス群レンサ球菌に属し、口腔外疾患の病巣から頻繁に分離される。他の口腔内レンサ球菌種と比較して、*S. sanguinis* は多様な細胞壁架橋型の表層タンパク質を産生する。感染性心内膜炎の病巣から高頻度に分離されるため、本菌が産生する分泌タンパク質の機能が血流での菌体生存や心臓組織への定着を可能にすると推察されている¹⁾。口腔内において、本菌は歯牙へ早期に定着し、デンタルプラークの形成に寄与する。しかし、口腔内から全身に伝播する際、*S. sanguinis* の潜在的な病原性が病態を惹き起こすと考えられる。

グラム陽性菌の線毛は複数種のサブユニットタンパク質が共有結合で連結される線維状タンパク質重合体である。線毛タンパク質の連結は線毛タンパク質に特異的なトランスペプチダーゼにより担われ、組立てられた線毛は最終的に細胞壁の遊離アミノ基に架橋される。*S. sanguinis* が産生する線毛は3種のサブユニット (PilA, PilB, PilC) から構成されることが推察されている。遺伝子欠失株を用いた解析から、*S. sanguinis* の線毛はバイオフィーム形成と上皮細胞への菌体付着に関与することが明らかになっている^{2,3)}。しかし、詳細な線毛組立て機構や線毛タンパク質の構成は不明である。本研究では、*S. sanguinis* の細胞壁架橋型タンパク質である線毛の構造と組立て機構を明らかにすることを目的とする。

【研究計画】

本研究では、以下の項目について解析することを計画した。

1. *S. sanguinis* が産生する線毛の組立て機構
2. *S. sanguinis* が産生する線毛のサブユニットタンパク質 PilA および PilB の構造

【研究方法】

1. 線毛構成タンパク質の組換え体の作製

S. sanguinis 菌体から抽出した染色体 DNA を鋳型 DNA として、制限酵素認識配列を付与したプライマーを用いた PCR により線毛遺伝子 (PilA, PilB, PilC) を増幅した。増幅した PCR 産物と発現プラスミドを制限酵素で消化した後、T4 DNA ligase (TAKARA) と反応させ、増幅 DNA 断片をプラスミドに挿入した。そして、構築したプラスミドを大腸菌 NiCO21 株 (New England Biolabs) に形質転換し、アミノ基末端側にヒスチジンタグが付与された線毛タンパク質を発現する菌株を作製した。対数増殖期まで培養した培養液に 0.1 mM のイソプロピル-β-チオガラクトピラノシドを添加し、37°C で 3 時間の培養を行った。集菌後、超音波破碎により溶菌し、遠心分離により、組換えタンパク質を含む可溶性画分を得た。Nickel-nitrilotriacetic acid アガロース (Qiagen) と可溶性画分を反応させ、アフィニティークロマトグラフィーにより粗精製を行った。続いて、限外濾過とゲル濾過クロマトグラフィーにより精製した。

2. 抗線毛タンパク質抗血清の作製

1. で得られた組換えタンパク質と完全フロイントアジュバントの懸濁液をマウスの背部皮下に免疫した。その後、組換えタンパク質と不完全フロイントアジュバントの懸濁液を同様に 3 度免疫した。全採血を行い、遠心分離により抗血清を調製した。

3. 組換えタンパク質の結晶化

組換えタンパク質 (15~30 μg/ml) を用いて、結晶化条件のスクリーニングを行った。タンパク質濃度、結晶化条件、温度、およびクライオ条件の検討を行い、単結晶を作製した。得られた単結晶を KEK-PF および SPring 8 のビームラインに持ち込み、X 線回折実験を行い、回折データを収集した。

4. 線毛遺伝子欠失株の作製

線毛遺伝子群 (PilA, PilB, PilC) と近接するトランスペプチダーゼ遺伝子 (SrtB) のそれぞれについて欠失株を作製した。各遺伝子上流および下流領域の DNA 断片を増幅し、オーバーラップ PCR により 2 種の DNA 断片を繋げ、温度感受性プラスミドに挿入した。構築したプラスミドを *S. sanguinis* にコンピテンス刺激ペプチドを用いて形質転換した。培養温度の変化により、染色体 DNA との組換えを誘導し、最終的に欠失株と復帰変異株を得た。欠失の確認は部位特異的 PCR により行った。

5. 菌体表層画分の調製と線毛発現の解析

野生株および 4. で作製した欠失株と復帰変異株を 37°C で一晩培養を行った。培養液を Vortex ミキサーで懸濁後、10,000 ×g で 10 分間の遠心分離を行い、培養上清を調製した。トリクロロ酢酸を最終濃度が 10% になるように添加し、氷上で 1 時間静置した。その後、20,000 ×g で 10 分間の遠心分離を行い、タンパク質を沈殿させた後、氷冷エタノールで洗浄し緩衝液に懸濁した。得られた培養上清画分について、2. で作製した抗血清を用いたウェスタンブロット解析により PilA, PilB, および PilC を検出した。

【研究経過】

1. *S. sanguinis* が産生する線毛の組立て機構の解析

線毛遺伝子群 (PilA, PilB, PilC) と近接するトランスペプチダーゼ遺伝子 (SrtB) のそれぞれについて作製した欠失株と復帰変異株から培養上清画分を調製し、ウェスタンブロット解析に供試した。その結果、SrtB の欠失により、線毛タンパク質の重合を反映する高分子ラダーバンドは検出されなかった (図 1)。したがって、*S. sanguinis* の線毛は SrtB のトランスペプチダーゼ活性により組立てられることが示唆された。

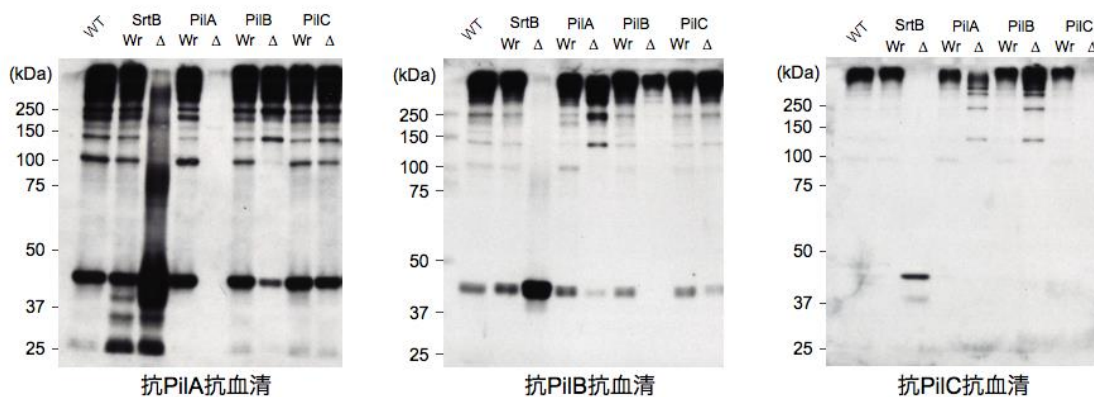


図 1. 線毛関連遺伝子欠失株の線毛産生

野生株 (WT) と各欠失株 (Δ) と復帰変異株 (Wr) の一晚培養液から培養上清画分を抽出し、抗 PilA 抗血清 (左パネル)、抗 PilB 抗血清 (中央パネル)、および抗 PilC 抗血清 (右パネル) を用いてウェスタンブロット解析を行った。

2. 組換えタンパク質 (PilA, PilB, PilC) の構造解析

PilA と PilB の組換えタンパク質の結晶を得た (図 2)。X 線回折実験に供したところ、単結晶性の回折データを得た。しかし、位相の決定に至らなかった。

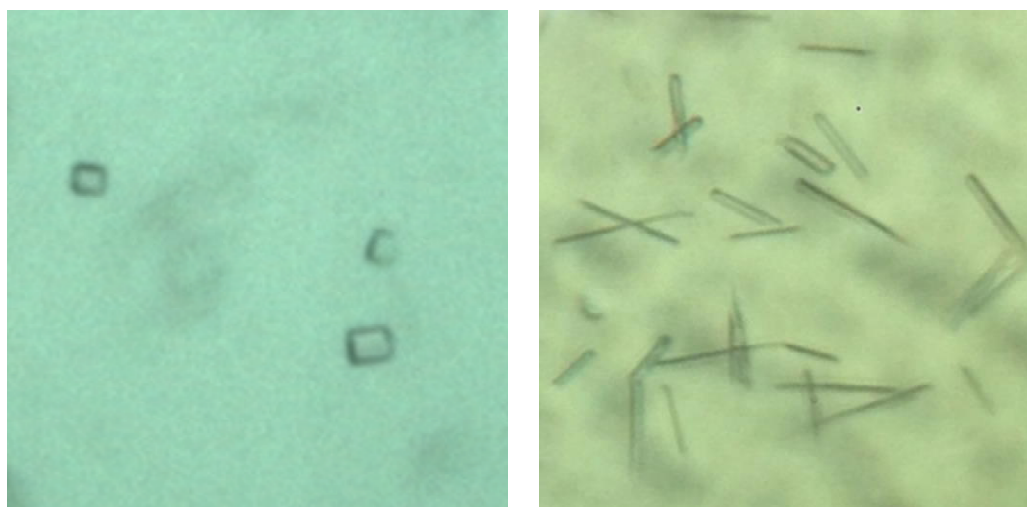


図 2. 異なる条件下での組換え PilB の結晶

以上の結果から、*S. sanguinis* の線毛は SrtB により組立てられることが示唆された。しかし、各サブユニットの線毛線維における配置や構成タンパク質の詳細は不明であり、今後の構造解析と生化学的な解析が必要である。また、PilA と PilB の組み換えタンパク質の結晶から回折データを得たが、既報の類似構造がないため、位相が決定されなかった。今後、セレノメチオニンで標識した組換え体の作製と結晶化を行う一方、重原子溶液やハロゲン溶液を用いたソーキングを行う事で異常分散法による位相決定を行う予定である。

【参考文献】

- 1) Que YA and Moreillon P. (2011) *Nat. Rev. Cardiol.* 8: 322-336.
- 2) Okahashi *et al.* (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 391: 1192-1196.
- 3) Okahashi *et al.* (2011) *Microb. Pathog.* 50: 148-154.