



1

論文内容要旨

題目 歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* の付着因子複合体を構成する蛋白質の分子生物学的解析

著者 湯本浩通




内容要旨

Eikenella corrodens 1073 は、菌体表層に *N*-アセチル-D-ガラクトサミンに特異的なレクチン様付着因子 (EcLS) を有し、これを介して様々な宿主細胞表面に付着する。本研究では、EcLS を構成する2種類の蛋白質をコードする遺伝子をクローニングした。

EcLS は、還元条件下での SDS-PAGE 解析により、約 300kDa と 45kDa の蛋白質に分離した。初めに、この 45kDa 蛋白質をコードする遺伝子 (*porA*) を PCR および サザンハイブリダイゼーションによりクローニングした。これを発現ベクター pET22b(+) にリクローニングし、T7 発現システムを用いて *porA* 遺伝子産物を誘導発現させた。そして、発現した 45kDa 蛋白質を封入体様の不溶性画分から可溶化した後、精製した。このクローン化断片の DNA 塩基配列を決定し、一つのオープンリーディングフレーム (ORF) を発見した。この ORF は、990 塩基対から成り、330 アミノ酸のポリペプチド (分子量: 35,748) をコードしていた。DNA 塩基配列から予想されるアミノ酸配列は、様々な病原活性を示すことが知られている *Neisseria* 属の porin 蛋白質のアミノ酸配列と高い相同性を認めた。また、*porA* 遺伝子はゲノミックサザンハイブリダイゼーションにより、*E. corrodens* 内で 1073 株に特異的に認められた。

次に、*E. coli* JM109 に導入した *E. corrodens* 1073 染色体 DNA ライブラリーから、抗 EcLS モノクローナル抗体に特異的に反応する蛋白質をコードする遺伝子をクローニングした。このクローンは3種類 (約 60kDa, 25kDa, 10kDa) の *Eikenella* 由来の蛋白質を発現していたが、このうち 25kDa 蛋白質のみがイムノプロット解析より抗 EcLS モノクローナル抗体に特異的に反応した。このクローン化断片の欠失解析を行い、25kDa 蛋白質発現に必要な領域を特定し、その領域の DNA 塩基配列を決定した。その結果、一つの ORF が見付き、この ORF は 678 塩基対から成り、226 アミノ酸のポリペプチド (分子量: 24,586) をコードしていることが明らかとなった。DNA 塩基配列から予想されるアミノ酸配列は、データベース中の既知の蛋白質との相同性は認められなかった。発現した 25kDa 蛋白質を封入体様の不溶性画分から可溶化した後、精製した。この精製蛋白質の N 末端のアミノ酸配列およびハイドロパシー解析から、この 25kDa 蛋白質は外膜結合型蛋白質であることが示唆された。

本研究結果より、*E. corrodens* 1073 からクローニングされた 45kDa および 25kDa 蛋白質は、ともに外膜上で EcLS 複合体を構成する蛋白質であり、さらに 1) 45kDa 蛋白質はレクチン様付着因子本体を菌体表層に固定化するほか、主要抗原および歯周病原性因子として機能する可能性があること、2) 25kDa 蛋白質は EcLS 複合体のマイナーサブユニットで、レクチン様付着因子本体に近接して局在する外膜結合型蛋白質であること、が示唆された。

報告番号	① 乙	歯第 98 号	氏名	湯本浩通
審査委員	主査	恵比須 繁之		
	副査	三宅 洋一郎		
	副査	細井 和雄		

題 目

歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* の付着因子複合体を構成する蛋白質の分子生物学的解析

要 旨

歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* 1073 のレクチン様付着因子 (EcLS) は、菌体表層に強固に結合した高分子量の複合体であるため、その性状の詳細な解析は成されていない。本研究では、分子生物学的手法を用いて EcLS を構成する蛋白質をクローニングし、さらにその構造および機能を解析し、次のような結果を得ている。

1) EcLS を還元条件下で SDS-PAGE により約 300kDa と 45kDa の 2 つの蛋白質に分離した後、この 45kDa 蛋白質の N 末端アミノ酸配列を決定した。そして、PCR およびサザンハイブリダイゼーションによりこの 45kDa 蛋白質をコードする遺伝子 (*porA*) をクローニングし、その全塩基配列を決定した。さらに、T7 発現システムによる大腸菌内での *porA* 遺伝子の誘導発現およびその精製により、PorA の蛋白質の翻訳後の修飾が示唆された。また、PorA はホモロジー解析による neisserial porin との高い相同性から、主要抗原および歯周病原性因子として機能する可能性を持つことが示唆された。

2) *E. corrodens* 1073 染色体 DNA ライブラリーから抗 EcLS モノクローナル抗体に反応する 25kDa 蛋白質をコードする遺伝子 (*lecA*) をクローニングし、その全塩基配列を決定した。さらに、この組換え蛋白質の精製および N 末端アミノ酸配列の決定より、LecA は外膜貫通型蛋白質であることが示唆された。LecA は、ホモロジー解析による既知の蛋白質との相同性は認められなかった。

以上の結果より、*E. corrodens* 1073 からクローニングした 25kDa および 45kDa 蛋白質はともに菌体外膜上で EcLS 複合体を構成する蛋白質であり、45kDa 蛋白質はレクチン様付着因子本体を菌体表層に固定化し、主要抗原および歯周病原性因子として機能する可能性があること、また 25kDa 蛋白質は EcLS 複合体中でレクチン様付着因子本体に近接して局在する外膜結合型のマイナーサブユニット蛋白質であることが示唆された。この研究は、歯周病原性細菌の宿主への定着および感染機構を考える上で重要な示唆を与えるものと考えられる。したがって、本研究は歯科医学の発展に寄与するところが極めて大であり、本論文は博士 (歯学) の学位授与に値するものとする。

廣東省立第一中學

姓名	年級	學號	備註
陳炳文	初級中學	101	
李國華	初級中學	102	
張國華	初級中學	103	
王國華	初級中學	104	
劉國華	初級中學	105	
趙國華	初級中學	106	
黃國華	初級中學	107	
周國華	初級中學	108	
吳國華	初級中學	109	
孫國華	初級中學	110	

廣東省立第一中學 學生名錄

初級中學部 第一學期 學生名錄

陳炳文 李國華 張國華 王國華 劉國華 趙國華 黃國華 周國華 吳國華 孫國華

初級中學部 第二學期 學生名錄

陳炳文 李國華 張國華 王國華 劉國華 趙國華 黃國華 周國華 吳國華 孫國華

初級中學部 第三學期 學生名錄

陳炳文 李國華 張國華 王國華 劉國華 趙國華 黃國華 周國華 吳國華 孫國華

初級中學部 第四學期 學生名錄

陳炳文 李國華 張國華 王國華 劉國華 趙國華 黃國華 周國華 吳國華 孫國華

②

論文表題

歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* の付着因子
複合体を構成する蛋白質の分子生物学的解析

著者：湯 本 浩 通

所属：徳島大学歯学部歯科保存学第1講座

(主任：恵比須 繁 之 教授)

論文表題

歯周病原性細菌 *Eikenella corrodens* の
付着因子複合体を構成する蛋白質の分子生物学的解析

著者：湯本浩通

所属：徳島大学歯学部歯科保存学第一講座

(主任：恵比須繁之)

キーワード：*Eikenella corrodens*、

付着因子複合体、クローニング

1. 原著論文
2. 英文抄録 2 枚、本文 46 枚、参考文献 8 枚
図の説明 9 枚、図 19 枚
3. 連絡先：徳島大学歯学部歯科保存学第一講座

緒言

ある種の細菌がその病原性を発揮するためには、まず生体の局所組織に定着する必要がある^{1・3)}。すなわち、病原細菌は細菌感染症の第一段階において宿主細胞と接触するが、その際、宿主の物理的（例えば、口腔内における唾液の流れや咀嚼運動、尿路における尿、腸管内では腸管蠕動運動や内容物の流れ）および生理的（例えば、分泌液中の抗体、抗菌性物質、酵素などの化学的物質）な排除機構に抵抗しながら、長時間滞留、増殖し、局所組織に定着して感染が成立する。この細菌の定着には、一般に細菌表面に存在する付着因子（リガンド）と宿主側のそれに対する受容体（レセプター）が重要な役割を果たしている^{3・5・6)}。また、菌体表層の疎水性分子と上皮細胞の膜構成脂質との間の疎水結合も細菌の定着に関与していると考えられている。このように細菌感染の初期段階において機能する細菌の付着因子が感染発症における主要な病原因子として位置づけられている。

歯周病原性細菌の一つに挙げられている *Eikenella corrodens* は、歯周病患者の歯肉縁上および縁下プラークから分離される^{7・9)}。その臨床分離株の一株である *E. corrodens* 1073 は、無菌ラットに単一感染させると、顕著な歯槽骨破壊を

伴う歯周炎を惹起することが報告されている^{10, 12)}。このようにして歯周炎を惹起したラットは、本菌に対して細胞性および体液性の免疫応答が成立する^{13, 14)}。これらの報告は、*E. corrodens*が口腔内の物理的および生理的排除機構に打ち勝って歯肉溝または歯周ポケットに定着することを示唆している。著者の属する教室では、*E. corrodens*がどのようなメカニズムで歯肉溝あるいは歯周ポケットに定着するのかということが検討されており、現在までに、*E. corrodens* 1073は菌体表層に付着因子として細菌レクチン様物質（以後、EcLSと略す）を保有し、これを介してヒト赤血球¹⁵⁾、ヒト頬粘膜上皮細胞¹⁶⁾あるいはモルモット腹腔マクロファージ¹⁷⁾に付着することなどが明らかにされている。またEcLSは、初期プラークの構成細菌と考えられている*Streptococcus sanguis*や*Actinomyces viscosus*などの異種細菌との*in vitro*における共凝集にも決定的な役割を果たすこと¹⁸⁾、マウスBリンパ球に対するマイトージェン作用を有すること¹⁹⁾、も示されている。

これまでに、*E. corrodens* ATCC 23834より2つの線毛遺伝子を含む4つの赤血球凝集因子遺伝子がクローニングされたが^{20, 21)}、未だレクチン様付着因子遺伝子がクローニングされたという報告はな

い。また、*E. corrodens* 1073 および 1080 の電子顕微鏡による形態学的観察では、線毛様構造は認められず²²⁾、*E. corrodens* 1073 の付着因子は線毛上には存在しないと考えられている。

これまでに分離、精製されている細菌レクチンはすべて分泌型あるいは機械的手法により菌体から容易に解離する菌体結合型レクチンであった^{23・27)}。しかしながら、EcLS は菌体に強固に結合した高分子量複合体として部分精製されており²⁸⁾、その菌体表層での局在および構造は未だ明らかにされていない。したがって、EcLS 複合体の構造と機能を明らかにするためには、この複合体の各構成蛋白質の分子生物学的な解析が必要と考えた。

本研究では、上記の観点から分子生物学的手法を用いて EcLS 複合体を構成する 2 種類の蛋白質をコードする遺伝子をクローニングし、その遺伝子から得られる情報や発現した遺伝子産物の解析などからその構造と機能を検討した。

材料と方法

1. 供試菌株およびプラスミドとその培養

E. corrodens 1073 および 1080 は、S. S. Socransky 博士 (Forsyth Dental Center, Boston, Mass., USA) から恵与された。*E. corrodens* ATCC 23834 は、ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA) より購入した。*E. corrodens* 612L は、ヒト歯肉縁上プラークからの臨床分離株である¹⁵⁾。*E. corrodens* の各株はそれぞれ、2 mg/ml の硝酸カリウム (和光純薬、大阪) と 5 μg/ml のヘミン (和光純薬) を含む Tryptic Soy Broth (Difco Laboratories, Detroit, USA) で 37℃、24 時間、嫌気条件下 (95% N₂, 5% CO₂) にて培養した。

Escherichia coli JM109²⁹⁾ (*recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *hsdR17* *supE44* *relA1* Δ(*lac-proAB*) [F' *traD36* *proAB* + *lacI*^q Z Δ M15]) は、クローニング、サブクローニングおよびシーケンシングの際の組換えプラスミドに対する宿主菌として使用した。また、*E. coli* BL21 (DE3) [F⁻ *ompT* rB⁻ mB⁻ (DE3)] は、クローニングした遺伝子の²⁹⁾大腸菌内での発現の際の宿

主菌として用いた。

プラスミド pT7Blue(R)T-Vector (Novagen, Madison, WI, USA) は、PCRクローニングベクターとして、プラスミド pBluescript II KS(+) phagemid (STRATAGENE, La Jolla, CA, USA) は DNAライブラリー作製とサブクローニングに、プラスミド pUC18 および pUC19^{2,9)} はシーケンスの際のサブクローニングに使用し、プラスミド pET22b(+) (Novagen) はクローン化した遺伝子の誘導発現の際に使用した。

E. coli JM109, プラスミドベクター pBluescript II KS(+), プラスミドベクター pUC18 および 19 は東洋紡(大阪)より、*E. coli* BL21(DE3) とプラスミドベクター pET22b(+) および pT7Blue(R)T-Vector は宝酒造(京都)より、それぞれ購入した。

E. coli JM109 および BL21(DE3) は、1% ポリペプトン、0.5% 酵母エキス、および 0.5% NaCl を含む Luria-Bertani (LB) 培地、あるいは 1.5% 寒天培地にて培養した。プラスミドを保有する菌株は、100 μ g/ml のアンピシリンを含む培地で培養した。

2. SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動および イムノプロット

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) は、Laemmli³⁰⁾ の記載に従って行った。すなわち濃縮用ゲルには4%、分離用ゲルには適当な濃度を用い、0.1% SDS-トリス-グリシン緩衝液 (pH 8.3) を泳動用緩衝液として泳動した^{28, 30)}。泳動終了後、クマシーブリリアントブルー (CBB) により染色し、分子量の測定は分子量マーカー (Amersham, Buckinghamshire, England) を同時に泳動させ算定した。

イムノプロット法は、Towbinら³¹⁾ の方法に従い以下のように行った。まず電気泳動終了後のゲルを 2 mA/cm^2 の定電流で80分間通電することにより、ポリビニリデンジフルオリド (PVDF) 膜 (ATTO, 東京) に転写した。転写後、3% (w/v) 牛血清アルブミン (BSA) を含む pH 7.2 の 10 mM リン酸塩緩衝生理食塩水 (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 4 mM Na_2HPO_4 , 1.8 mM KH_2PO_4 : PBS) で蛋白質が結合していない部位のプロッキングを行った。その後、転写膜は、1次抗体として0.05% Tween 20 を含む PBS で100倍に希釈した抗ECLSモノクローナル抗体³²⁾ を加えて3時間反応させた後、0.05% Tween 20 含有 PBS で洗浄した。洗浄後の膜は、ピ

オチン標識抗マウスおよび抗ウサギ免疫グロブリンを2次抗体として加えて45分間反応させ、その後同様に洗浄を行った。抗体に特異的に反応するバンドを検出するために、さらに西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを反応させた後、ジアミノベンジン(DAB)・過酸化水素混合液に膜を浸漬して酵素反応を行わせた後、バンドが明瞭に発色した時点で水洗して反応を停止させた。

なお、抗E c L Sモノクローナル抗体³²⁾は、中江英明博士(徳島大学)から恵与された。

3. DNA操作

1) 制限酵素消化

制限酵素消化は、購入時のマニュアル(New England Biolabs、宝酒造、ニッポンジーン、東洋紡)に従った。

2) プラスミドDNAの抽出および精製

プラスミドDNAの抽出および精製は、Maniatisら³³⁾の方法を改良して以下のように行った。まず、適当な抗生物質を含む5mlのLB培地でクローン菌株を37℃で一晩振盪培養し、その1.5mlの培養液より集菌後、100 μ lの溶液I(25mMトリス-塩酸pH8.0, 10mMEDTA, 50mMグルコース)に懸濁し、室温で2分間静置した。次に200 μ lの溶液II

(0.2 N NaOH, 1% SDS)を加え穏やかに混合した後、水中に2分間静置した。そして、150 μ lの溶液Ⅲ(3 M 酢酸カリウム, 11.5% 酢酸)を加え、混合した後、水中に2分間静置した。これを12,000 \times gで5分間遠心し、さらに500 μ lのクロロホルム/イソアミルアルコール(24:1)を加え混合した後、12,000 \times gで5分間遠心分離し、上清400 μ lを集め、エタノール沈澱を行った。抽出したプラスミドDNAは、RNase処理、フェノール抽出およびエタノール沈澱により精製した。

3) 染色体DNAの抽出および精製

細菌の染色体DNAの抽出および精製は、Marmur^{3,4)}の方法を改良して以下のように行った。まず、50 mlの培養液を集菌後、0.15 M NaClを含む0.1 M EDTA溶液2 mlにて洗浄した後、菌体を2 mlの同溶液に再懸濁し、終濃度5 mg/mlの割合でリゾチーム(和光純薬)を加え、37℃で30分間処理した。その後、遠心し、菌体を1.5 mlのTE-SDS溶液(10 mM トリス-塩酸 pH 8.0, 1 mM EDTA, 0.1% SDS)に懸濁し、2回凍結融解を行った。その後、1.5 mlのフェノール/クロロホルム(1:1, v/v)でDNA抽出を2回行った。そして、上清800 μ lを集め、エタノール沈澱を行った後、200 μ lのTE緩衝液(10 mM トリス-塩酸 pH 8.0, 1 mM

EDTA) に溶解後、終濃度 0.015 mg/ml の割合でリボヌクレアーゼ A (Sigma Chemical Corp., St. Louis, USA) を加え、 37°C で 30 分間処理して RNA を消化した。再度フェノール/クロロホルム ($1:1, v/v$) で DNA を抽出し、これを $150 \mu\text{l}$ のジエチルエーテルで処理後、エタノール沈澱を行い、精製した染色体 DNA を得た。

4) ライゲーションおよびアガロースゲル電気泳動

ライゲーションおよびアガロースゲル電気泳動は、Maniatis ら³³⁾ の方法に従って行った。また場合により、DNA をアルカリフォスファターゼ (東洋紡) で脱リン酸化処理し、ライゲーションを行った。

5) トランスフォーメーション (形質転換)

E. coli JM109 および BL21 (DE3) のトランスフォーメーションは、Hanahan³⁵⁾ の方法に従って行った。そして、トランスフォーマントを $100 \mu\text{g/ml}$ のアンピシリン、 0.2 mM イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (IPTG) および $40 \mu\text{g/ml}$ の 5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド (X-Gal; ジメチルホルムアミド溶液) 含有 LB 寒天培地にて 37°C で培養し、白いコロニーを選択した。

6) polymerase chain reaction (PCR)

PCR増幅は、2.5-5.0 UのTaq DNAポリメラーゼ（ニッポンジーン）、1.25 mMのデオキシヌクレオチド三リン酸（dNTP）（宝酒造）、プライマーおよび鋳型DNAを用いて50 μ lの反応液中で行った。なお、プライマーは合成したオリゴヌクレオチドあるいはM13 primer M3（宝酒造）を用いた。反応は、94-95 $^{\circ}$ Cで90あるいは180秒間の前変性の後、94-95 $^{\circ}$ Cで90秒間の変性、次いで42あるいは50 $^{\circ}$ Cで120秒間のアニーリング、そして72 $^{\circ}$ Cで60あるいは300秒間の伸長ステップを30または40サイクル行った。なお最後に、72 $^{\circ}$ Cで600秒間の伸長反応を追加した。

7) ゲルからのDNAの抽出および精製

電気泳動後のアガロースゲルからDNAを抽出および精製するために、JET sorb (GENOME D GmbH, Bad Oeynhausen, Germany) および GENE CLEAN II KIT (BIO101 Inc., La Jolla, CA, USA) を用いた。

8) DNAのジゴキシゲニン (DIG) 標識

DNAのDIG標識は、DIG DNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) を用いた。さらに、短いDNA断片のDIG標識は購入時のマニュアルに従いPCRを併用して行った (PCR DIG標識)。

4. サザンプロット分析

サザンプロット分析は、Southern³⁶⁾および Maniatisら³³⁾の方法に従って行った。すなわち、アガロースゲル電気泳動後、DNA断片をHybond N (Amersham) に転写した。プローブの標識およびハイブリダイズしたバンドの検出は、DIG DNA Labeling and Detection Kit (Boehringer Mannheim) を用いて行った。ハイブリダイゼーション反応は、プローブの長さにあわせて厳密な条件で行った。

5. DNA シークエンス分析

DNA シークエンシング反応は、Taq Dye DeoxyTM Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer, Foster City, CA, USA) および DNA Thermal Cycler Model 9600 (Perkin Elmer) を用いて、Sangerら³⁷⁾の dideoxy chain-termination 法により行った。DNA シークエンス分析には DNA Sequencer Model 373A (Perkin Elmer) を、また DNA 塩基配列およびアミノ酸配列の解析には GENETYX programs (SDC、ソフトウェア開発株式会社、Ltd. 東京) を用いた。

6. EcLS の調製

EcLS は、山崎ら^{2,3)}の方法を改良して、その赤血球凝集活性を指標にして精製した。すなわち、*E. corrodens* 1073 の培養菌体を集菌後、終濃度 1% の Triton X-100、10 mM EDTA および 0.1 mM フェニルメチルスルフォニルフルオリド (PMSF) を含む 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0) に懸濁し、超音波破碎装置を用いて、氷冷下で 30 分間超音波処理した。この超音波処理液を $40,000 \times g$ で 1 時間、4℃ で遠心し、遠心上清を 1% Triton X-100、0.1 mM $CaCl_2$ および 0.1 mM PMSF を含む pH 7.2 の PBS に対して透析した。次に、この透析内液を同緩衝液で平衡化した Immobilized N-Acetyl-D-Galactosamine (PIERCE, Rockford, IL, USA) カラムに添加し、非吸着画分を溶出した後、1 mM GalNAc を含む同緩衝液をカラムに添加することによりカラムに吸着した画分を溶出させた。そして、この 1 mM GalNAc 溶出画分をセントリコン-100 (Amicon, Beverly, MA, USA) で濃縮し、これを EcLS とした。

7. N 末端アミノ酸配列の分析

蛋白質をSDS-ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動し、PVDF膜に上述したようにグリシン-メタノール緩衝液を用いて電氣的に転写した。転写膜をCBB色素で弱く染色した後、被験蛋白質バンドを切り出した。なお、N末端アミノ酸配列は、自動化エドマン分解法(477A/120A protein sequencer system:Perkin Elmer)にて決定した。

8. T7発現システムを用いた大腸菌内での外来遺伝子の誘導発現

発現ベクターにリクローニングしたプラスミドを宿主菌 *E. coli* BL21(DE3)に導入後、100 µg/mlのアンピシリンを含有した5 mlのLB培地にて37℃で一晩培養した。そして、培養液を500 mlのアンピシリン含有LB培地に植え継ぎ、37℃で培養し、O.D.600 = 0.6 - 1.0となった時点で最終濃度1 mMとなるようにIPTGを加え、T7プロモーターからの発現を誘導した。そして、さらに37℃で3時間培養した後、集菌した。

9. DNAライブラリーのイムノスクリーニング

E. corrodens 1073の染色体DNAライブラリーのレプリケート(LB寒天培地プレート)をニトロセルロースフィルターディスク(Micron

Separation Inc., Westboro, MA, USA) にプロットした。また、精製した EcLS と *E. coli* JM109 (pBluescript II KS(+)) をそれぞれ、陽性および陰性コントロールとして各フィルターにスポットした。フィルター上のコロニーをクロロホルムの蒸気下で15分間処理し、さらに溶菌緩衝液 (100 mM トリス - 塩酸 pH 7.8, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 1.5% BSA, 1 μg/ml DNase I, 40 μg/ml リゾチーム) で室温にて12-16時間処理することにより、溶菌させた。その後、フィルターを TNT 緩衝液 (10 mM トリス - 塩酸 pH 8.0, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20) で洗い、3% BSA 含有 TNT 緩衝液 (ブロッキング緩衝液) で30分間ブロッキングを行った。そして、抗 EcLS モノクローナル抗体をブロッキング緩衝液で1:100に希釈した溶液でフィルターを2-4時間反応させた。結合した抗体の検出は、抗マウスおよび抗ウサギ免疫グロブリンを含む DAKO LSABTM Kit (DAKO JAPAN、東京) を用いた Labeled Streptoavidin Biotin (LSAB) 法により行った。

10. 組換え蛋白質の細胞分画

組換え体を培養後、遠心 (6,500 × g, 4℃, 5分

間) にて集菌し、50 ml のリゾチーム緩衝液 (30 mM トリス - 塩酸 pH 8.0, 1 mM EDTA, 20% ショ糖, 1 mg/ml リゾチーム) を加え、ゆっくりと懸濁し、10 分間静置した。その後、遠心し (4,500 × g、4℃、5 分間)、上清のペリプラズム画分を得た。また、沈澱物を 50 ml のリゾチーム緩衝液に溶かし、19,000 × g、4℃、5 分間で遠心分離後、沈渣に 50 ml の 100 mM トリス - 塩酸緩衝液 (pH 8.0) を加え、懸濁した。そして、凍結融解を 3 回繰り返した後、100 μl の DNase 緩衝液 (1 U/μl DNase, 150 mM NaCl, 50% グリセリン) を加え、混合し、室温にて 15 分間放置した。その後、遠心し (19,000 × g、4℃、10 分間)、上清の細胞質画分を得た。さらに、沈澱物 (膜画分または不溶性画分) を 50 ml の STE 緩衝液 (100 mM NaCl, 10 mM トリス - 塩酸 pH 8.0, 1 mM EDTA) に懸濁し、この懸濁液に 5 ml の 10% Triton X-100 保存液 (最終濃度 1%) を加え、混合し、氷上にて 15 分間静置した。その後、遠心し (19,000 × g、4℃、15 分間)、上清の Triton X-100 可溶化画分を得た。一方、沈澱物を Triton X-100 不溶性画分とした。

11. 不溶性組換え蛋白質の可溶化および精製

細胞分画で得られた Triton X-100 不溶性画分に

50 ml の蒸留水を加え、懸濁後、19,000 × g、4℃、10分間で遠心分離を行い上清を除いた。さらに、沈澱物に50 ml の尿素液（尿素を含む25 mM トリス - 塩酸、1 mM ジチオトレイトール：DTT）を加え、混合し、30分間水中にて超音波処理した。その後、19,000 × g、4℃、5分間で遠心分離を行い、上清の尿素可溶化画分を得た。また、沈澱物を尿素不溶性画分とした。そして、この尿素可溶化画分を陰イオン交換カラム（DEAE-5PW、東ソー、東京）に添加し、1 mM EDTA を含む尿素液で展開した後、0 - 1.0 M NaCl、流速0.5 ml/min の直線濃度勾配にて溶出した。各フラクションは、UVモニターとSDS-PAGEにより発現組換え蛋白質の存在を確認した。最後に、陰イオン交換カラム溶出画分を5 mM DTT含有0.4 M トリス - 塩酸緩衝液で平衡化したTSK-gel G2000SWカラム（東ソー）に添加し、ゲル濾過による分画を行うことにより尿素を除いた。各フラクションは、UVモニターとSDS-PAGEにより発現組換え蛋白質の存在を確認した。

12. DNA塩基配列登録番号

この論文に示すDNA塩基配列は、DDBJ/EMBL / GenBank Nucleotide Sequence Databases に登録番号D70829およびD78153で

登録した。

結果

1. 45 kDa 蛋白質の分子生物学的解析

1) EcLS の特性および 45 kDa 蛋白質の N 末端アミノ酸配列

E. corrodens 1073 菌体から精製した EcLS の SDS-PAGE パターンを図 1 に示した。非還元条件下では、EcLS は、高分子量の 1 本のバンドとして検出された (500 kDa 以上)。しかしながら、2- β -メルカプトエタノールを添加して、5 分間の煮沸を行った還元条件下では、約 300 kDa と 45 kDa の 2 本のバンドとして検出された。また、抗 EcLS モノクローナル抗体を用いたイムノプロットでは、300 kDa 蛋白質はモノクローナル抗体と特異的に反応したが、45 kDa 蛋白質は反応しなかった。さらに、ビオチン標識した *S. sanguis* 34 菌体を用いた糖鎖結合実験でも、300 kDa 蛋白質は GalNAc 特異的に *S. sanguis* 34 に結合したが、45 kDa 蛋白質には結合能は認められなかった。

45 kDa 蛋白質の N 末端アミノ酸配列をエドマン分析法にて分析し、N 末端の最初の 23 個のアミノ酸配列を得た (図 2)。この配列は *Neisseria* 属の porin 蛋白質の N 末端付近のアミノ酸配列と 22 個のアミノ酸にわたり 36.4% の高い相同性を示した。そ

こで、この45 kDa蛋白質をPorA蛋白質と命名した。

2) PorA蛋白質のN末端領域をコードする遺伝子のクローニング

前項で得られたアミノ酸配列に基づいて、*E. corrodens*のコードン選択を考慮せずに、2種類の縮重混合オリゴヌクレオチドプライマーを合成し(図2)、これらのプライマー(6.5 ng)を用いてPCRを行った。なお、鋳型DNAは*E. corrodens* 1073染色体DNAをEcoRI消化したもの(263 ng)を用いた。PCR産物を12%のポリアクリルアミドゲルにて電気泳動したところ、約70 bpのDNA断片の増幅が確認された。そこで、このPCR産物を3.3%のアガロースゲルにて電気泳動後、70 bp DNAバンドを抽出および精製し、プラスミドpT7Blue(R)T-Vectorに結合させ、*E. coli* JM109に導入した。このクローンから精製したプラスミドをBamHIとSalIで消化し、12%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動した結果、45 kDa蛋白質のN末端領域の挿入が確認された。このプラスミドをpT7N-tと名付け、DNAシーケンス解析を行った。その結果、クローン化した68 bp断片のDNA塩基配列から予想されるアミノ酸配列は、エドマン分解法により決定したPorAのN末端アミノ酸配列と一致していた(図2)。

3) *PorA* 蛋白質をコードする完全な遺伝子のクローニング

クローン化した68bp断片をプローブとしてゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行った。*E. corrodens* 1073染色体DNAを*EcoRI*あるいは*Hind III*で消化し、厳密な条件下でN末端の68bp断片とハイブリダイズさせた。その結果、それぞれ約6.0kbと2.0kbの大きさの断片とハイブリダイズした。次に、これらの約6.0kbと2.0kbの断片からDNAライブラリーを作製後、コロニーハイブリダイゼーションを用いてクローニングすることを試みたが、これらの断片をクローニングすることはできなかった。

そこで、*porA* 遺伝子をクローニングするために以下の操作を行った。はじめに、*E. corrodens* 1073染色体DNAを*Hind III*で消化した後、プラスミドpBluescript II KS(+)に結合したものを作成した。このDNA(3.06 μ g)を鋳型とし、2.5 μ gのセンスプライマー(図2)および2.0pmolのM13 Primer M3を混合し、PCRを行った。PCR産物2.0 μ lを2回目のPCRの鋳型として使用し、再びPCRを行った。そして、2回目のPCR産物を0.9%アガロースゲル電気泳動後、N末端の68bp断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行った

結果、約0.8 kbの大きさの陽性バンドが検出された(図3)。そこで、1.5%アガロースゲル電気泳動後、この陽性バンドから、プラスミドpT7Blue(R)T-Vectorと宿主として*E. coli* JM109を用いてDNAライブラリーを作製した。N末端の68 bp断片をプローブとしてコロニーハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った結果、このプローブに強くハイブリダイズする2つのコロニーを認めた。これらのコロニーから得た2つのプラスミドは、制限酵素地図分析により同一であることが認められ、このプラスミドをpT7N780と名付けた。そこで、これらのプラスミドから得られた約0.8 kbの挿入断片のDNAシーケンス解析を行った。その結果、増幅した780 bpの挿入断片は、センスプライマー配列とセンスプライマー様配列の間の断片であり、完全なporA遺伝子を含んでいないことが分かった。

そこで、次にPorA蛋白質のC末端領域をコードする遺伝子をクローニングすることを試みた。まず、*E. corrodens* 1073染色体DNAをKpnIとEcoRIで消化し、すでにクローン化したN末端の68 bpの断片および0.8 kbの断片をプローブとして、サザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、68 bpプローブとは約3.7 kb、一方0.8 kbプローブとは約3.7 kbと約1.7 kbの大きさのハイブリダイズしたバ

ンドが認められた (図 4) 。そこで、P o r A 蛋白質の C 末端領域をコードすることが予想されるこの 1 . 7 k b 付近の D N A 断片から、プラスミド p B l u e s c r i p t I I K S (+) および *E . c o l i* J M 1 0 9 株をそれぞれベクターと宿主に用いて D N A ライブラリーを作製した。さらに 0 . 8 k b プローブを用いてコロニーハイブリダイゼーションによるスクリーニングを行った。得られた陽性コロニーからプラスミド D N A を精製し、このプラスミドを p K S K - C t と名付け、D N A シーケンス解析を行った。

4) P o r A 蛋白質をコードする遺伝子の D N A 塩基配列とその蛋白質一次構造の解析

プラスミド p T 7 N 7 8 0 および p K S K - C t の各挿入断片をサブクローニングし、D N A 塩基配列を 図 5 に示すように解析した。その結果、これらのクローニングした断片のヌクレオチド配列中に唯一のオープンリーディングフレーム (O R F) が、1 塩基と 9 9 0 塩基の間に存在し、それは 3 3 0 アミノ酸から成る蛋白質に対応していることが分かった (図 6) 。この蛋白質の予想される分子量は 3 5 , 7 4 8 で、S D S - P A G E の結果と一致していなかった。また、T A A 終始コドンの下流 3 1 ヌクレオチドには、1 0 2 4 塩基の位置から始まり 1 0 5 1 塩基の位置まで伸びるステム-アンド-ルー

プ構造 ($\Delta G = -25.70 \text{ kcal/mol}$) をとりうる配列 (図6中の配列上に引かれた矢印) があり、この配列は転写終結機能に関係していることが示唆された。また、このORFのG+C含量は48.28%であった。この値は、*E. corrodens* 染色体DNAについて以前に報告された値 (56-58%)^{3,8)} とは異なっていたが、*Neisseriaceae* の染色体DNAの値 (47-52%) と同様であった。さらに、PorA蛋白質は、アミノ酸配列のヒドロパシー解析により、親水性領域と疎水性領域を交互に繰り返す典型的な外膜結合型蛋白質の特徴を有していた (データ未提示)。

5) 他の蛋白質との構造的類似性

PorA蛋白質と他の蛋白質のアミノ酸配列についての相同性をSWISS-ProtおよびNBRFデータベースを用いて解析した。その結果、DNA配列から予測されるPorA蛋白質のアミノ酸配列は、数種の*Neisseria* 属のporin (主要外膜蛋白質) のアミノ酸配列と、361-333個のアミノ酸にわたり37.8-29.6%の相同性と、79.4-68.1%の類似性が認められた (図7)。

6) 発現ベクターへのリクローニングおよびPorA組換え蛋白質の大腸菌内での発現

DNA塩基配列から予想されるPorA蛋白質の分子量は、SDS-PAGEにより得られた分子量と一致していなかった。そこで、クローニングしたporA遺伝子を、バクテリオファージT7プロモーターに特異的に働いて強力にmRNA合成を行えることのできるT7RNAポリメラーゼ／プロモーターシステムを用いて、大腸菌内で誘導発現させた。まずporA遺伝子を図8に示すように発現ベクターpET22b(+)のT7プロモーターおよびSD配列の下流に読み枠を合わせて挿入し、pETN-CおよびpETN-Pを構築した。その結果、porA遺伝子からはいずれもN末端に25個のアミノ酸(PelBリーダ配列を含む)を付加されて発現する形となった。IPTG誘導後、PorA組換え蛋白質の発現をSDS-PAGEにより分析した(図9)。その結果、クローン化したporA構造遺伝子からは、約45kDaの蛋白質が発現された。さらに、N末端からPstIまでの断片(pETN-P)においても同様に約45kDaの蛋白質の発現を認めしたが、発現量はN末端からEcoRIまでの断片(pETN-C)より少なかった(データ未提示)。以上より、porA構造遺伝子は、DNAシーケンスの結果どおりN末端からPstI部位内に局在し、分子量約36,000のアポ蛋白質をコードしていることが分かった。

7) PorA 組換え蛋白質の可溶化と精製

発現した約 45 kDa の蛋白質の菌体での局在性を細胞分画および SDS-PAGE により調べた結果、発現蛋白質は、ペリプラズム画分や細胞質画分あるいは Triton X-100 可溶化画分には存在せず、Triton X-100 でも可溶化されない膜画分または封入体(不溶性)画分に局在していることが判明した(データ未提示)。そこで、発現蛋白質をさらに精製するために、この画分を 8 M 尿素液にて可溶化させ、この 8 M 尿素可溶化画分を陰イオン交換カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を行い、NaCl の直線濃度勾配にて溶出した結果、0.4 M の NaCl 濃度で PorA 組換え蛋白質が溶出された(図 10)。これによりほぼ単一なバンドとして PorA 組換え蛋白質を精製することができた。

8) porA 遺伝子の菌株間の保存性

E. corrodens の中で 1073 以外の菌株にも porA 遺伝子に相同な遺伝子が存在しているかどうかを調べるために、1073, 1080, ATCC 23834 および 612L の 4 菌株からそれぞれ調製した各染色体 DNA を EcoRI, Hind III あるいは Pst I でそれぞれ消化し、pT7N-C の KpnI-XhoI 断片 (porA 遺伝子の ORF 内部領域) をプローブとしたゲノミックサザンハイブ

リダイゼーションを行った (図 11) 。その結果、1073 株では制限酵素で消化した染色体 DNA に対しそれぞれ約 6.0 kb, 2.0 kb および 1.3 kb の各一本の陽性バンドが認められたが、1080, ATCC 23834 あるいは 612L の 3 株の染色体 DNA ではどの制限酵素消化断片に対しても陽性バンドは認められなかった。

2. 抗 EcLS モノクローナル抗体結合蛋白質の分子生物学的解析

1) 抗 EcLS モノクローナル抗体結合蛋白質をコードする遺伝子のクローニング

*Bam*HI 消化した *pBluescript II* KS (+) および *E. coli* JM109 をベクター・宿主として用いて、*E. corrodens* 1073 染色体 DNA を *Sau*3AI にて部分消化した 10-15 kb の断片より、染色体 DNA ライブラリーを作製した。そして、抗 EcLS モノクローナル抗体を用いたイムノスクリーニングを行った結果、この DNA ライブラリー (約 1,200 コロニー) から 3 個の陽性クローンが得られた。この 3 クローンから調製したプラスミド DNA は、それぞれ約 17 kb, 17 kb および 15 kb の大きさで、これらのプラスミドをそれぞれ pAY206, pAY208 および pAY824 と命名した。そして、制限酵素切断地図分析およびサザンプロット分析により、3 個の陽性クローンの保有するプラスミ

ドは、共通の約12kbのSau3AI断片を含んでいることが分かった（データ未提示）。そこで以後の解析にはpAY824を用いた。

2) 陽性クローンによる抗EcLSモノクローナル抗体結合蛋白質の発現

3個の陽性クローンについて、SDS-PAGEおよびイムノプロット分析を行った（図12）。すなわち、陽性クローンを対数増殖中期まで培養した菌体の溶菌液を2-β-メルカプトエタノールの存在下で加熱処理した後（還元条件下）、SDS-PAGEにて蛋白質の発現を分析した。その結果、全てのクローンにおいて、クローン化されたプラスミドの導入により3種類の蛋白質（約60kDa, 25kDa, 10kDa）が大量に発現していた。これらの蛋白質のうち、25kDa蛋白質のみが抗EcLSモノクローナル抗体（500倍希釈）を用いたイムノプロット分析にて反応した。また、非還元条件下で溶菌液を同様にSDS-PAGEで分析すると、25kDa蛋白質よりやや小さい23kDaの蛋白質を含む3種類の蛋白質の大量発現が観察された。しかしながら、この23kDa蛋白質は、抗EcLSモノクローナル抗体を用いたイムノプロット分析では検出されなかった。

3) 抗 EcLS モノクローナル抗体結合蛋白質の産生に必須な遺伝子領域の解析

25 kDa 蛋白質の産生に必須な遺伝子領域を同定するため、一連の欠失プラスミドを作製し、*E. coli* JM109 に導入して 25 kDa 蛋白質の産生能を分析した (図 13)。まず、プラスミド pAY824 を *Pst*I にて消化すると、約 7 kb, 5 kb, 1.8 kb および 0.7 kb の断片に分離した。その中の約 7 kb 断片を含むクローンに 25 kDa 蛋白質の発現が SDS-PAGE にて検出された (データ未提示)。さらに、制限酵素地図分析により、約 7 kb の断片を含むプラスミドは約 4 kb の *E. corrodens* 1073 染色体 DNA 由来の断片と 2.9 kb のプラスミド pBluescript II KS (+) より成ることが分かったので、このプラスミドを pAY824P と名付けた。このプラスミド pAY824P を用いた一連の欠失解析により、25 kDa 蛋白質の産生に必須な領域は、1.2 kb の *Sau*3AI-*Sph*I 断片に存在していることが分かった (図 13)。そして、この抗 EcLS モノクローナル抗体に反応する 25 kDa 蛋白質を LecA と命名した。

4) LecA 蛋白質の産生に必須な領域のヌクレオチド配列とその構造の解析

1,242 bp から成る *Sau*3AI-*Sph*I 断片の完全な

DNA塩基配列を決定した(図14)。その結果、分子量24,586の蛋白質をコードし得る1つのORFが見つかった。このORFは、678bpから成り、396塩基の位置のATGおよび1074塩基の位置のTAAにそれぞれ開始コドンおよび終始コドンと予想されるコドンを認めた。また、予想される開始コドンの8ヌクレオチド上流にリボソーム結合部位³⁹⁾と考えられるAGGAG配列が認められた。さらに、予想される開始コドンの上流に大腸菌プロモーターで保存された-35(TTGACA)および-10(TATAAT: Pribnow box)配列に類似した配列(TTGcCc-19bp-TAactT)が認められた。そして、TAA終始コドンの下流14ヌクレオチドには、1091塩基の位置から始まり1131塩基まで伸びるステム-アンド-ループ構造($\Delta G = -25.50 \text{ kcal/mol}$)をとりうる配列(図15の配列下に引かれた矢印)があり、その配列が転写終結機能に関係していることが示唆された。

このORFのG+C含量は、59.85%であった。この値は、*E. corrodens*染色体DNAについて以前に報告された値(56-58%)³⁸⁾と近似していた。また、LecA蛋白質とSWISS-ProtおよびNBRFデータベース中の蛋白質のアミノ酸配列のホモロジーを検索したが、LecA蛋白質はデータベース中のどの蛋白質とも高い相同性は認められなかった。一方、

LecAのアミノ酸配列は、ハイドロパシー解析およびRobsonの2次構造解析等により、 β -シート構造をとり得る疎水性領域と親水性領域とを交互に繰り返す特徴を有していた(図15)。

5) LecA組換え蛋白質の可溶化と精製

得られた陽性クローン菌株を培養後、「材料と方法」に記したように細胞分画を行った。その結果、*E. coli* JM109で発現したLecA組換え蛋白質は、ペリプラズム画分や細胞質画分あるいはTriton X-100可溶化画分には認められず、Triton X-100でも可溶化されない膜画分または封入体(不溶性)画分に局在することが判明した(データ未提示)。そこで、発現蛋白質をさらに精製するために、Triton X-100不溶性画分を4M尿素液にて可溶化し、この4M尿素可溶化画分について陰イオン交換カラムを用いたHPLCを行い、NaClの直線濃度勾配にて溶出した結果、0.4MのNaCl濃度でLecA組換え蛋白質が溶出された。さらに、この溶出画分を回収し、HPLCによるゲル濾過を行った。その結果、一つのピークのフラクションに約25kDaの発現蛋白質がSDS-PAGEにより認められた(図16)。

DEAEクロマトグラフィーにて精製したLecA組換え蛋白質のアミノ酸配列をエドマン分解法により分析

した。その結果をDNA塩基配列から予想されるアミノ酸配列と比較すると、開始コドンから23番目のAlaからGlnまでの10アミノ酸の配列と一致していた(図17)。

この精製したLecA蛋白質がレクチン活性を有するかどうかを調べるために、ビオチン標識した*S. sanguis* 34菌体を用いて糖鎖結合実験を行った結果、精製したLecA蛋白質には糖鎖結合能は認められなかった。

6) *lecA* 遺伝子の菌株間の保存性

E. corrodens の中で1073以外の菌株にも*lecA* 遺伝子に相同な遺伝子が存在しているかどうかを調べるために、1073, 1080, ATCC 23834および612Lの4菌株からそれぞれ調製した染色体DNAを*EcoRI*, *Hind* IIIあるいは*Pst* Iでそれぞれ消化し、pAY824の*Bss* H II - *EcoRI*断片(*lecA* 遺伝子のORF内部領域)をプローブとしたゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行った(図18)。その結果、1073では、*EcoRI*, *Hind* IIIあるいは*Pst* I消化した染色体DNAに対しそれぞれ4.6 kb, 7.2 kb, 5.6 kbの各一本の陽性バンドが認められ、1080とATCC 23834の2株ではそれぞれ2.9 kb, 5.0 kb, 2.4 kbの各一本の陽性バンドが、また

612L株では2.9kb, 5.0kb, 5.4kbの各一本の陽性バンドが認められた。

考察

歯周病原性因子と考えられている EcLS 複合体の構造を調べるために、EcLS を精製し SDS-PAGE にて分析した結果、非還元条件下では高分子量の 1 本のバンドとして検出されたが、還元下で加熱処理を行うと約 300 kDa と 45 kDa の 2 本のバンドとして検出された (図 1)。これにより 45 kDa 蛋白質は、EcLS の構成蛋白質の 1 つであることが示唆された。しかしながら、抗 EcLS モノクローナル抗体を用いたイムノブロット分析では、この 45 kDa 蛋白質は反応せず、300 kDa のバンドに対して強く反応した。また、ビオチン標識した *S. sanguis* 34 菌体との結合実験でも、300 kDa のバンドにのみ結合が認められ、この結合は GalNAc の添加により抑制された。これらのことから、抗 EcLS モノクローナル抗体に対するエピトープと EcLS の糖鎖認識領域はともに 300 kDa の蛋白質複合体に局在し、45 kDa 蛋白質はどちらも含まないことが示唆された。しかしながら、この 45 kDa 蛋白質は、EcLS 複合体中に多量に含まれていることから、EcLS 複合体の主要な構成成分であると思われる。

この 45 kDa の蛋白質 (PorA 蛋白質) をコードする *porA* 遺伝子の DNA 塩基配列より予想されるアミ

ノ酸配列から推定される分子量(35,748)は、還元下でのE c L SのS D S - P A G E分析により得られた値(約45,000)と一致しなかった。また、*p o r A*遺伝子を大腸菌内で発現させ、S D S - P A G Eにて分析した場合でも、組換え発現蛋白質は約45k D aの分子量を示した。したがって、D N A塩基配列から推定される蛋白質の分子量と発現蛋白質のS D S - P A G E分析の値の相異は、アポ蛋白質の翻訳後の修飾による可能性が高い。例えば、P o r A蛋白質の22番目のアミノ酸残基のA s n - L y s - S e r - G l uおよび206番目のアミノ酸残基のA s n - L e u - S e r - A l aには、グリコシレーションサイトとして保存されたモチーフが存在し、これによりP o r A蛋白質に糖鎖が結合するのかもしれない。このことを考慮すると、D N A塩基配列からの推定分子量と発現蛋白質のS D S - P A G Eによる値との相異が理解できる。

図5に示した2k bのクローン化断片中に、330アミノ酸から成る蛋白質に対応する990b pの唯一のO R F(*p o r A*)が認められた(図6)。なお、今回の研究でクローン化された断片には、プロモーター領域、開始コドンおよびシグナルペプチドシーケンスは含まれていなかった。しかしながら、P o r Aと相同性が認められた*N e i s s e r i a*属の*p o r i n*蛋白質では全てそのN末端にシグナルペプチドシーケンスが存在して

いた。したがって、今回の研究でクローン化された断片の上流にもこれと相同な配列が存在することが推定された。このことから、この配列が本蛋白質の外膜への輸送・分泌に働く内部シグナルとして機能する⁴⁰⁾可能性が考えられる。

Carbonettiら⁴¹⁾やWolffら⁴²⁾は、大腸菌での*Neisseria*属のporinの発現により大腸菌の生存力が損なわれたと報告している。さらに、大腸菌でクローン化したporin蛋白質は、致死的效果をもたらすという報告も多数ある^{41, 43, 44)}。これらの致死的效果の原因として、大腸菌菌体の浸透圧の不安定性、porin自身の活性、大腸菌のporinとの置換、多量の外来蛋白質の存在により外膜蛋白質の構造が保てない、といったことが推察されているが、明確な答えは明らかにされていない。こうしたことを考慮すると、本研究においてEcoRIおよびHindIIIでそれぞれ消化した染色体DNAから構築したDNAライブラリーより約6.0kbおよび2.0kbの断片をクローニングできなかつたことが理解でき、またこれらの2つの断片はそれ自身のプロモーター領域を含む完全なporA遺伝子を含んでいたことが示唆される。

porA遺伝子が大腸菌内で発現させる際、porA ORFの約100bp下流のPstI部位までを発現ベクターへ挿入した場合(pETN-P)と、クローニングし

た 2 k b の全領域を発現ベクターへ挿入した場合 (p E T N - C) とでは、 p E T N - C の方が 4 5 k D a の組換え蛋白質の発現量が多かった。この結果は、 P s t I より下流の E c o R I 部位までの約 1 k b の領域に p o r A 遺伝子の転写・発現をポジティブに調節する遺伝子が存在する可能性を示唆するものと考えられる。

p o r A 遺伝子の G + C 含量は 4 8 . 2 8 % であり、この値は *E. corrodens* の染色体 DNA について以前に報告された値 (5 6 - 5 8 %)³⁸⁾ とは異なっていた。これにより p o r A 遺伝子は、異なる細菌源から獲得された可能性が示唆された。例えば、この値は *Neisseriaceae* の染色体 DNA の値 (4 7 - 5 2 %) に近似しており、ホモロジー分析の結果と考え合わせると、 p o r A 遺伝子は進化の過程において *Neisseriaceae* から獲得されたものかもしれない。さらに、 p o r A 遺伝子の *E. corrodens* 菌株間の保存性を p o r A 遺伝子の内部領域をプローブとしたゲノミックサザンハイブリダイゼーションにて調べた結果、 1 0 7 3 株以外の *E. corrodens* の各菌株の染色体 DNA には p o r A 遺伝子は認められなかった (図 1 1) 。ホモロジー解析やゲノミックサザンハイブリダイゼーションの結果と、系統発生的に 1 0 7 3 株は *E. corrodens* 内で最も離れて位置するという報告⁴⁵⁾、さらに 1 6 S r R N A 配列の保存性に基づく *E.*

corrodens は *Neisseria* family に属すると提案する F. E. Dewhist ら⁴⁶⁾ の報告を考え合わせると、*porA* 遺伝子は *E. corrodens* 以外の細菌から 1073 株に伝達されたものである可能性が強い。

一般に、病原性の *Neisseria* 種属の porin は、菌体表層の主要抗原であり、その porin 活性に加えて様々な病原特性を有していることが示唆されている。例えば、外来の膜（人工二重膜やヒト赤血球膜）と接触すると菌体外膜から直接侵入・転移したり⁴⁷⁾、多形核白血球の脱顆粒の不活性化と関連すること⁴⁷⁾ が報告されており、細胞侵入を含むバクテリアと真核細胞との相互作用等の感染ステップに porin が活発な役割を担っていることが推察されている。またこの推論は、非病原性の *N. sicca* からの porin が転移能を欠失していることにより強く裏づけられている⁴⁸⁾。そして、このような特性から *Neisseria* 属の porin は、適当なワクチン構成物と成り得る可能性も示唆されている⁴⁹⁾。このような *Neisseria* 属の porin 蛋白質に知られている生物活性が *E. corrodens* 1073 においてどのように発揮されるのかは、今後の興味ある研究課題と考えている。

PorA 蛋白質は、*E. corrodens* の culture filtrate antigen (AgA)⁵⁰⁾ にその分子量と外膜に局在する複合体であるという点で似ている。

AgAは、主要な菌体外膜蛋白質であり、他のグラム陰性菌のものと類似していることが報告されている³⁰⁾。SDS-PAGEにおいて、非還元条件下でのAgAは高分子量の単一バンドとして検出されるが、還元下でのAgAは42kDaの蛋白質として分離される。またAgAは、11株の臨床分離株と標準株であるATCC 23834の計12株の中で、1073株と530株にしか認められておらず³⁰⁾、AgAとPorAは同一あるいは類似の蛋白質であるのかもしれない。

さらに加えて、このPorA蛋白質は、ECLS複合体の構成蛋白質でもあるので、細菌付着に関連する役割を担っていることも考えられる。Neisseria属のporin蛋白質は、ホモトリマーとして外膜に局在しporeを形成している³¹⁾。したがって、E. corrodens 1073のPorA蛋白質もまたポリマーとして外膜に存在し、レクチン様活性を有する他のECLS構成蛋白質を菌体表層に輸送・連結しているのかもしれない。これらの考察は、ECLSが高分子量であり、細菌菌体表層に強固に結合しているという知見²⁸⁾と一致している。また、1073株は他の株に比べ付着活性が高く、菌体表層のレクチン様物質の分布が多いとの報告³²⁾もあり、porA遺伝子が1073株に特異的である結果(図11)と考え合わせると、この活性および分布は菌体表層に付着因子を固定化する

P o r A の働 き と 関 連 し て い る の か も し れ な い 。

一 方、45 k D a 蛋 白 質 の ク ロ ー ニ ン グ と 並 行 し て、抗 E c L S モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 に 特 異 的 に 結 合 す る 約 25 k D a の 蛋 白 質 を コ ー ド す る 遺 伝 子 (*l e c A*) を ク ロ ー ニ ン グ し た。ク ロ ー ン 株 の 溶 菌 液 を 非 還 元 条 件 下 で S D S - P A G E に よ り 分 離 す る と、23 k D a の 蛋 白 質 の 大 量 発 現 が 認 め ら れ た が、モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 と は 反 応 し な か っ た。し か し、ク ロ ー ン 株 を 2 - β - メ ル カ プ ト エ タ ノ ー ル の 存 在 下 で 加 熱 処 理 し た 還 元 条 件 下 で は、非 還 元 条 件 下 に 比 べ て や や 大 き い 25 k D a の 蛋 白 質 の 大 量 発 現 が 認 め ら れ、こ の 蛋 白 質 は モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 と 特 異 的 に 反 応 し た。こ れ は、還 元 処 理 に よ る 蛋 白 質 の 高 次 構 造 の 変 化 に よ り こ の 発 現 蛋 白 質 の 抗 体 に 対 す る エ ピ ト ー プ 領 域 が 露 出 し た の か も し れ な い。し た が っ て、*i n v i v o* で の E c L S 複 合 体 中 で は、*L e c A* 蛋 白 質 は 他 の 構 成 蛋 白 質 と の 相 互 作 用 な ど に よ り 還 元 さ れ た 状 態 で 存 在 し て い る こ と が 考 え ら れ る。

N a k a e ら³²⁾ は、*E. c o r r o d e n s* 1073 と *S. s a n g u i s* あ る い は *A. v i s c o s u s* と の 菌 体 間 凝 集 が、抗 E c L S モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 や G a l N A c に よ り 抑 制 さ れ る こ と を 報 告 し て い る。し た が っ て、抗 E c L S モ ノ ク ロ ー ナ ル 抗 体 に 対 す る エ ピ ト ー プ 領 域 は、E c L S 複 合 体 中 で 糖 鎖 認 識 領 域 に 近 接 し て 局 在 し て い る と 考 え ら れ て い る。一 方、本 研 究 に お い て ビ オ チ ン 標 識 し

た *S. sanguis* 34 菌体を用いた糖鎖結合実験では *LecA* 蛋白質には糖結合能は認められなかった。これらにより、1) この 25 kDa 蛋白質は *EcLS* 複合体の構成蛋白質の 1 つであり、抗体に対するエピトープ領域を保有するが *GalNAc* に対する糖鎖認識領域は含まない、2) 糖鎖認識領域は *EcLS* 複合体中で 25 kDa 蛋白質の近傍に存在する蛋白質に局在する、といったことが示唆された。しかしながら発現した *LecA* 蛋白質は、大腸菌内で封入体様の不溶性画分に存在し、本来の立体構造を形成できないためにレクチン活性が認められないことが考えられる。さらにポリマーやヘテロマーの形成により、*LecA* 蛋白質にレクチン活性が現れる可能性もあり、分子生物学的なさらなる研究が必要と考えている。

今回クローニングした *lecA* 遺伝子領域を導入した大腸菌において、顕著な増殖阻害が観察された。しかしながら、*lecA* 遺伝子の必須領域のみでは阻害は見られなかった。さらに欠失解析により増殖阻害を生じる領域は、*lecA* 遺伝子の下流に局在することが示された（データ未発表）。この下流に局在する遺伝子が、*lecA* 遺伝子を含む *EcLS* 複合体の発現に関する転写・発現調節を行っている可能性がある。

LecA 蛋白質の発現に必要な遺伝子領域の全塩基配列を決定した結果、約 25 kDa の蛋白質をコードし得

る1つのORFが認められた(図14)。このORFのATG開始コドンの8塩基上流にはリボソーム結合部位と考えられるShine-Dalgarno配列(AGGGAG)が、さらにその上流には大腸菌で保存されている-35(TTGACA)および-10(TATAAT: Pribnow box)のプロモーター領域に類似した配列(TTGcCc-19bp-TAactT)が認められた。*lecA*遺伝子が*E. coli* JM109内で高効率で発現したことからも、この*E. corrodens*由来のプロモーター配列が*E. coli*においても機能することが示唆された。さらに、大腸菌内で発現した25kDaの蛋白質を精製してエドマン分解法にて決定したN末端のアミノ酸配列は、DNA塩基配列から予想されるアミノ酸配列の23残基目のAlaから32残基目のGlnまでと一致していた。このことから、*lecA*遺伝子は25kDaの発現蛋白質をコードしていることが確認された。そしてこの結果より、大腸菌内で発現したmatureな蛋白質は、N末端から22残基目のAlaまでが切断されていることが示唆された。また、DNA塩基配列から予想されるアミノ酸配列においても、開始コドンのMetから22残基目のAlaまでは膜分泌のシグナルペプチドとしての特徴を有していた(図17)。したがって、*LecA*蛋白質は、ペリプラズムに分泌される膜関連蛋白質の1つであると考えら

れる。これは、DNA塩基配列から推定されるアミノ酸配列のヒドロパシープロフィール解析（図15）においても、親水性領域と β -シート構造をとり得る疎水性領域を交互に繰り返し、7回膜を貫通する膜結合型蛋白質の特徴を有していたこととも一致する。

LecA蛋白質は、データベースを利用したホモロジー分析により他の既知のタンパク質とは相同性を認めなかった。また、*lecA*遺伝子のORFのG+C含量は59.85%であり、この値は*E. corrodens*の染色体DNAについて以前に報告された値(56-58%)³⁸⁾と近似していた。さらに、*lecA*遺伝子の内部領域をプローブにしたゲノミックサザンハイブリダイゼーションにより、*lecA*遺伝子は供試した4菌株全ての染色体DNA上に1コピーのみ存在することが明らかとなった（図18）。これらの結果から、LecA蛋白質は*E. corrodens*でよく保存された蛋白質であることが示唆された。さらに、このことはGalNAc特異的なレクチン様付着因子が*E. corrodens*で広く保存されている結果³²⁾と一致する。

以上のことから、LecA蛋白質はレクチン活性を有するレセプター結合蛋白質である付着因子本体に近接して局在するマイナーサブユニットである可能性が示唆された。すなわち、付着因子本体に最も近接して局在し、加熱処理した還元条件下でも付着因子複合体か

ら解離しない程度に強固に付着因子本体と結合している蛋白質であると考えられる。

本研究のまとめとして、*E. corrodens* 1073 における EcLS 付着因子複合体モデルを構築してみた (図 19)。すなわち、PorA 蛋白質は、ホモロジー解析等より菌体外膜上で他の付着因子複合体構成蛋白質のターミネーターおよびアンカー、あるいは外膜チャンネルとして機能することが示唆された (図 19)。また、その抗原性と機能より *Neisseria* 属の porin と同様に、*E. corrodens* 1073 の PorA もワクチンとなり得る可能性があると考えられる。一方、LecA は付着因子本体に近接して局在する EcLS 複合体マイナーサブユニットであり、膜貫通型蛋白質であると考えられる。本研究でクローニングされた 2 種類の蛋白質は、宿主組織への定着および感染という点において、付着因子本体を菌体外膜表層に輸送・固定化するという機能、また主要外膜蛋白質としての抗原性を含む様々な機能を有すると考えられる。

総括

E. corrodens 1073 の付着因子複合体である EcLS について分子生物学的手法を用いて解析し、以下の結果を得た。

1. EcLS は、非還元条件下での SDS-PAGE では高分子量の 1 本のバンドとして検出されたが、還元条件下では約 300 kDa と 45 kDa の 2 本のバンドとして検出された。抗 EcLS モノクローナル抗体を用いたイムノプロット解析およびビオチン標識した *S. sanguis* 34 を用いた糖鎖結合実験より、抗体に対するエピトープおよび糖鎖認識領域はともに 300 kDa 蛋白質に局在することが示唆された。
2. EcLS の主要構成蛋白質である 45 kDa 蛋白質をコードする遺伝子 (*porA*) をクローニングし、全塩基配列を決定した。
3. T7RNA ポリメラーゼ / プロモーターシステムを用いて大腸菌内で *porA* 遺伝子を発現させ、この組換え発現蛋白質を可溶化し、精製した。
4. ホモロジー解析から、45 kDa 蛋白質は *Neisseria* 属の *porin* 蛋白質と高い相同性を認め、菌体表層に他の付着因子構成蛋白質を分泌・固定化すること、また強い抗原性と歯周病原性を有する可能性が示唆された。

5. 抗 *E c L S* モノクローナル抗体に特異的に結合する約 25 kDa の蛋白質をコードする遺伝子 (*l e c A*) をクローニングし、全塩基配列を決定した。
6. *L e c A* 組換え発現蛋白質を可溶化し、精製した。
7. 発現蛋白質の解析により、*L e c A* 蛋白質は *E c L S* 複合体中で糖鎖認識領域に近接して局在する外膜結合型の蛋白質であることが示唆された。
8. *E . c o r r o d e n s* の 4 菌株に対するゲノミックサザンハイブリダイゼーションにより、*P o r A* はレクチン様付着活性と相関し、*L e c A* は *E . c o r r o d e n s* で保存性の高い蛋白質であることが示唆された。

以上の研究結果より、*E . c o r r o d e n s* 1073 の付着因子複合体 (*E c L S*) を構成する *L e c A* 蛋白質は、レクチン活性を有する付着因子本体と還元条件下でも解離しない程強度に結合し、*E c L S* 中で立体構造的に非常に近接して局在する蛋白質であることが示唆された。また、*P o r A* 蛋白質は、菌体外膜上に *E c L S* を固定化させるターミネター/アンカーあるいは外膜チャンネルとして機能しながら *E c L S* を構成することが示唆された。さらに、*P o r A* はホモロジー解析の結果より、抗原性や外来膜への転移、多形核白血球の脱顆粒の不活性化など様々な生物活性を有する可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究課題を与えられ、終始御指導を賜った歯科保存学第一講座恵比須繁之教授に心より感謝の意を表し、本研究の実施に御指導を戴いた歯科保存学第一講座中江英明講師、阿座上弘行博士、口腔細菌学講座小野恒子講師に深甚なる謝意を表します。また、N末端アミノ酸配列を分析していただいた大塚製薬株式会社細胞工学研究所高橋真行博士、保田世津子博士、ならびにDNAシーケンサーを使用させていただいた国立南和歌山病院森脇要博士、飯田さよみ博士に深甚なる謝意を表します。また、御校閲を戴いた口腔細菌学講座三宅洋一郎教授、口腔生理学講座細井和雄教授、ならびに研究の円滑な遂行のために特別の御配慮を戴いた歯科保存学第一講座の教室員の方々に深謝いたします。

参考文献

- 1) Ofek, I. and Beachey, E. H. : General concepts and principles of bacterial adherence in animals and man. Beachey, E. H., Bacterial adherence Chapman and Hall, London and New York, 3-29 (1980)
- 2) Gibbons, R. J. and van Houte, J. : Bacterial adherence in oral microbial ecology. Ann. Rev. Microbiol. 29, 19-44 (1975)
- 3) Gaastria, W. and de Graaf, F. : Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. Microbiol. Rev. 46, 129-161 (1982)
- 4) Smith, H. : Microbial surfaces in relations to pathogenicity. Bacteriol. Rev. 41, 475-500 (1977)
- 5) Reed, W. P. and Williams, R. C. Jr. : Bacterial adherence: First step in pathogenesis of certain infections. J. Chron. Dis. 31, 67-72 (1978)
- 6) Ofek, I., Beachey, E. H. and Sharon, N. : Surface sugars of animal cells as determinants of recognition in bacterial adherence. Trends Biochem. Sci. 3, 159-160 (1978)
- 7) Socransky, S. S. : Microbiology of periodontal disease. Present status and future considerations. J. Periodontol. 48, 497-504 (1977)
- 8) Slots, J. : The predominant cultivable microflora of advanced periodontitis. Scand. J. Dent. Res. 85, 114-121 (1977)
- 9) Tanner, A. C. R., Haffer, C., Bratthall, G. T., Visconti, R.

- A. and Socransky, S. S. : A study of the bacteria associated with advancing periodontitis in man. *J. Clin. Periodontol.* 6, 278-307 (1979)
- 10) Crawford, A. C. R., Socransky, S. S., Smith, E. and Phillips, R. : Pathogenicity testing of oral isolates in gnotobiotic rats. *J. Dent. Res.* 56, B120 (1977)
- 11) Listgarten, M. A., Johnson, D., Nowotny, A., Tanner, A. C. R. and Socransky, S. S. : Histopathology of periodontal disease in gnotobiotic rats monoinfected with *Eikenella corrodens*. *J. Periodont. Res.* 13, 134-148 (1978)
- 12) Irving, J. T., Socransky, S. S. and Tanner, A. C. R. : Histological changes in experimental periodontal disease in rats monoinfected with gram-negative organisms. *J. Periodont. Res.* 13, 326-332 (1978)
- 13) Johnson, D. A., Behling, U. H., Lai, C. H., Listgarten, M., Socransky, S. S. and Nowotny, A. : Role of bacterial products in periodontitis: Immune response in gnotobiotic rats monoinfected with *Eikenella corrodens*. *Infect. Immun.* 19, 246-253 (1978)
- 14) Johnson, D. A., Behling, U. H., Listgarten, M. and Nowotny, A. : Role of bacterial products in periodontitis: Humoral immune response to *Eikenella corrodens*. *Infect. Immun.* 22, 382-386 (1978)
- 15) Ebisu, S. and Okada, H. : Agglutination of human erythrocytes by *Eikenella corrodens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 18,

153-156 (1983)

- 16) Yamazaki, Y., Ebisu, S. and Okada, H. *Eikenella corrodens* adherence to human buccal epithelial cells. *Infect. Immun.* 31, 21-27 (1981)
- 17) Miki, Y., Ebisu, S. and Okada, H. : The adherence of *Eikenella corrodens* to guinea pig macrophages in the absence and presence of antibacterial antibodies. *J. Periodont. Res.* 22, 359-365 (1987)
- 18) Ebisu, S., Nakae, H. and Okada, H. : Coaggregation of *Eikenella corrodens* with oral bacteria mediated by bacterial lectin-like substance. *Adv. Dent. Res.* 2, 323-327 (1988)
- 19) Nakae, H., Yumoto, H., Matsuo, T. and Ebisu, S. : Mitogenic stimulation of murin B lymphocytes by the *N*-acetyl-D-galactosamine specific bacterial lectin-like substance from *Eikenella corrodens*. *FEMS Microbiol. Lett.* 116, 349-354 (1994)
- 20) Rao, V. K. and Progulsk-Fox, A. : Cloning and sequencing of two type 4 (*N*-methylphenylalanine) pilin genes from *Eikenella corrodens*. *J. Gen. Microbiol.* 139, 651-660 (1993)
- 21) Rao, V. K., Whitlock, J. A. and Progulsk-Fox, A. : Cloning, characterization and sequencing of two haemagglutinin genes from *Eikenella corrodens*. *J. Gen. Microbiol.* 139, 639-650 (1993)
- 22) Ebisu, S., Miki, Y., Fukuhara, H. Okada, H. and Nakao, M. : An electron microscopic study on the morphology of *Eikenella*

- corrodens*. J. Osaka Univ. Dent. Sch. 21, 137-143 (1981)
- 23) Eshdat, Y., Ofek, I., Yashouv-Gan, Y., Sharon, N. and Mirelman, D. : Isolation of a mannose-specific lectin from *Escherichia coli* and its role in the adherence of the bacteria to epithelial cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 85, 1551-1559 (1978)
- 24) Eshdat, Y. and Sharon, N. : *Escherichia coli* surface lectins. in Methods in Enzymology. 83, 386-391 (1982)
- 25) Finkelstein, R. A. and Hanne, L. F. : Purification and characterization of soluble hemagglutinin (Cholera lectin) produced by *Vibrio cholerae*. Infect. Immun. 36, 1199-1208 (1982)
- 26) Gilboa-Garber, N. : *Pseudomonas aeruginosa* lectins. in Methods in Enzymology. 83, 378-385 (1982)
- 27) Nagata, K., Nakao, M., Shibata, S., Shizukuishi, S., Nakamura, R. and Tsunemitsu, A. : Purification and characterization of galactosephilic component present on the cell surfaces of *Streptococcus sanguis* ATCC10557. J. Periodontol. 54, 163-172 (1983)
- 28) Yamazaki, Y., Ebisu, S. and Okada, H. : Partial purification of a bacterial lectinlike substance from *Eikenella corrodens*. Infect. Immun. 56, 191-196 (1988)
- 29) Yanish-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. : Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene 33, 103-119 (1985)

- 30) Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (London)* 227, 680-685 (1970)
- 31) Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. : Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354 (1979)
- 32) Nakae, H., Ebisu, S. and Okada, H. : Production and characterization of monoclonal antibodies against bacterial lectin of *Eikenella corrodens*. *J. Periodont. Res.* 28, 404-410 (1993)
- 33) Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. : Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y. (1982)
- 34) Marmur, J. : A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Mol. Biol.* 3, 208-218 (1961)
- 35) Hanahan, D. : Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166, 557-580 (1983)
- 36) Southern, E. M. : Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98, 503-517 (1975)
- 37) Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. : DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467 (1977)
- 38) Jackson, F. L. and Goodman, Y. E. : Genus *Eikenella*. In

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. vol 1, 597-600

(1984)

- 39) Shine, J. and Dalgarno, L. : The 3'-terminator sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets and ribosome binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71, 1342-1346 (1974)
- 40) Barlow, A. K., Heckels, J. E. and Clarke, I. N. : The class 1 outer membrane protein of *Neisseria meningitidis*: gene sequence and structural and immunological similarities to gonococcal porins. *Mol. Microbiol.* 3, 131-139 (1989)
- 41) Carbonetti, N. H. and Sparling, P. F. : Molecular cloning and characterization of the structural gene for protein I, the major outer membrane protein of *Neisseria gonorrhoeae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9084-9088 (1987)
- 42) Wolff, K. and Stern, A. : The class 3 outer membrane protein (PorB) of *Neisseria meningitidis*: gene sequence and homology to the gonococcal porin PIA. *FEMS Microbiol. Lett.* 83, 179-186 (1991)
- 43) Gotschlich, E. C., Seiff, M. E., Blake, M. S. and Koomey, M. : Porin protein of *Neisseria gonorrhoeae*: cloning and gene structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 8135-8139 (1987)
- 44) Murakami, K., Gotschlich, E. C. and Seiff, M. E. : Cloning and characterization of the structural gene for the class 2 protein of *Neisseria meningitidis*. *Infect. Immun.* 57, 2318-2323 (1989)

- 45) Tanner, A. C. R. , Badger, S., Lai, C. H., Listgarten, M. A., Visconti, R. A. and Socransky, S. S. : *Wolinella* gen. nov., *Wolinella succinogenes* (*Vibrio succinogenes* Wolin et al.) comb. nov., and description of *Bacteroides gracilis* sp. nov., *Wolinella recta* sp. nov., *Campylobacter concisus* sp. nov., and *Eikenella corrodens* from humans with periodontal disease. Int. J. Syst. Bacteriol. 31 (4) 432-445 (1981)
- 46) Dewhirst, F. E., Paster, B. J. and Bright, P. L. : *Chromobacterium*, *Eikenella*, *Kingella*, *Neisseria*, *Simonsiella*, and *Vitreoscilla* species comprise a major branch of the beta group *Proteobacteria* by 16S ribosomal ribonucleic acid sequence comparison: transfer of *Eikenella* and *Simonsiella* to family *Neisseriaceae* (emend.). Int. J. Syst. Bacteriol. 39, 258-266 (1989)
- 47) Blake, M. S. and Gotshlich, E. C. : in *Bacterial Outer Membranes as Model Systems*, ed. Inouye, M. John Wiley and Son, New York. 377-400 (1987)
- 48) Blake, M. S. : In *The Pathogenic Neisseriae*. (Schoolnik, G. K., Ed.) American Society for Microbiology, Washington D. C. 251-258 (1985)
- 49) Saukkonen, K., Leinonen, M, Abdillahi, H. and Poolman, J. T. : Comparative evaluation of potential components for group B meningococcal vaccine by passive protection in the infant rat and *in vitro* bactericidal assay. Vaccine 7, 325-328 (1989)
- 50) Maliszewski, C. R., Shuster, C. W. and Badger, S. J. : A

- type-specific antigen of *Eikenella corrodens* is the major outer membrane protein. Infect. Immun. 42, 208-213 (1983)
- 51) Blake, M. S. and Gotshlich, E. C. : Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Neisseria gonorrhoeae*. Infect. Immun. 36, 277-283 (1982)
- 52) Ward, M. J., Lambden, P. R. and Heckels, J. E. : Sequence analysis and relationship between meningococcal class 3 serotype proteins and other porins from pathogenic and non-pathogenic *Neisseria* species. FEMS Microbiol. Lett. 73: 283-289 (1992)
- 53) Butt, N. J., Lambden, P. R. and Heckels, J. E. : The nucleotide sequence of the *por* gene from *Neisseria gonorrhoeae* Strain P9 encoding outer membrane protein PIB. Nucleic Acids Res. 18: 4258-4258 (1990)

図の説明

図1 : E c L S の S D S - P A G E 解析

S D S - P A G E は、0.1% S D S を含む7.5% ポリアクリルアミドゲル電気泳動後、クマシーブルー染色を行った。

レーン1 : 非還元条件下

レーン2 : 還元条件下

P o r A 蛋白質を矢印により示している(レーン2)。

図2 : 45 k D a 蛋白質のN末端領域のクローニングフローチャート

図3 : P C R 産物のサザンハイブリダイゼーション解析

プローブとしてプラスミド p T 7 N - t を用いた。

パネル A : アガロースゲル電気泳動パターン

パネル B : サザンハイブリダイゼーションパターン

レーン1 : S t y I 消化した λ D N A

レーン2 : P C R 産物

レーン3 : p B l u e s c r i p t II K S (+)

レーン4 : p T 7 N - t

図4 : *E. corrodens* 1073 染色体DNAのゲノミックサザンハイブリダイゼーション解析

染色体DNAを *KpnI* および *EcoRI* で消化したものを泳動後、膜に転写し、サザンハイブリダイゼーション解析を行った。

パネルA : アガロースゲル電気泳動パターン

パネルB : サザンハイブリダイゼーションパターン

レーン1 : N末端の70bpプロープ

レーン2 : 0.8kb断片プロープ

図5 : クローン化断片の制限酵素地図とシーケンスに用いたDNA断片

蛋白質をコードする領域を囲んでいる。制限酵素部位を図示し、塩基対の長さを数字で表している。矢印は、シーケンスした断片の長さや方向を示している。

図6 : *porA* 構造遺伝子を含む1.2kb断片のDNA塩基配列および推定されるアミノ酸配列

porA ORFの推定されるアミノ酸配列をDNA塩基配列の下に示している。DNA塩基配列は、5'から3'方向に示している。終始コドンを示し、転写・終結に参与すると考えられるステム-

アンド-ループ構造領域を矢印で上側に示している。また、エドマン分解法により分析したN末端アミノ酸配列を下線で示している。

図7 : *E. corrodens* 1073のPorA蛋白質と
*Neisseria*属のporin蛋白質のアミノ酸配列
の比較

*は完全なアミノ酸の一致を示し、・はアミノ酸の類似を示している。シグナルペプチド配列は実線で囲んでいる。それぞれの蛋白質のアミノ酸残基数を左右に示している。

OMA1 NEIGO : *N. gonorrhoeae*のPIA
porin⁴¹)

OMA1 NEIME : *N. meningitidis*のPIA
porin⁴⁰)

OMB NEILA : *N. lactamica*のPIB
porin⁵²)

OMB NEISI : *N. sicca*のPIB porin⁵²)

OMB1 NEIGO : *N. gonorrhoeae*のPIB
porin⁵³)

OMB4 NEIME : *N. meningitidis*のPIB
porin⁵²)

図8 : *porA*発現ベクターの構築

porA 遺伝子をプラスミド pET22b(+) の T7 プロモーター下流に読み枠が合うように挿入し、pETN-C および pETN-P を構築した。

図 9 : 大腸菌における *porA* 遺伝子発現の SDS-PAGE 解析

レーン 1, 2 : *E. coli* BL21(DE3)(pETN-C)

レーン 3, 4 : *E. coli* BL21(DE3)(pET22b(+))

レーン 1 および 3 は、IPTG 添加により T7 プロモーターを誘導している。レーン 1 の 45 kDa の位置に PorA 発現蛋白質が認められる。

図 10 : 精製した PorA 組換え蛋白質の SDS-PAGE 解析

レーン 1 : *E. coli* BL21(DE3)(pETN-C) を IPTG 誘導した全菌体抽出液

レーン 2 : 膜画分および封入体様不溶性画分を 8M 尿素にて可溶化した画分

レーン 3 : DEAE クロマトグラフィーによる溶出画分

レーン 3 の 45 kDa の位置にほぼ単一に精製された PorA 組換え蛋白質が認められる。

図 11 : *porA* 遺伝子をプローブとした *E. corrodens* 菌株間におけるゲノミックサザンハイブリダイゼーション解析

プローブとして *porA* 遺伝子の ORF の *KpnI* - *XhoI* 断片を用いた。

レーン 1 - 3 : *E. corrodens* 1073 染色体
DNA

レーン 4 - 6 : *E. corrodens* 1080 染色体
DNA

レーン 7 - 9 : *E. corrodens* ATCC 23834
染色体 DNA

レーン 10 - 12 : *E. corrodens* 612L 染色体
DNA

レーン 1, 4, 7, 10 : *EcoRI* 消化した染色体
DNA

レーン 2, 5, 8, 11 : *HindIII* 消化した染色体
DNA

レーン 3, 6, 9, 12 : *PstI* 消化した染色体 DNA

図 12 : 抗 EcLS モノクローナル抗体陽性クローンの
SDS-PAGE およびイムノブロット解析

パネル A : SDS-PAGE パターン (クマシーブル
ー染色)

パネル B : イムノプロットパターン

レーン 1, 4 : *E. coli* JM109 (pBlue-script II KS(+))

レーン 2, 3 : *E. coli* JM109 (pAY824)

レーン 1, 2 : 非還元条件下

レーン 3, 4 : 還元条件下

パネル B のレーン 3 の 25 kDa の位置に抗 EcLS モノクローナル抗体に反応するバンドが検出された。

図 13 : 25 kDa 蛋白質をコードする遺伝子領域の制限酵素地図およびディリジョン解析

制限酵素部位および一連のディリジョン断片を図示している。構築したディリジョンプラスミドは *E. coli* JM109 に導入し、それらの溶菌液を SDS-PAGE にて解析した。

SphI-*Sau3AI* 領域に 25 kDa 蛋白質発現に必要な領域が局在している。

図 14 : *lecA* 遺伝子領域の DNA 塩基配列および推定されるアミノ酸配列

lecA ORF の推定されるアミノ酸配列を DNA 塩基配列の下に示している。DNA 塩基配列は、5' から 3' 方向に示している。終始コドンをも * 印で示し、転写・終結に関与すると考えられるステム

- アンド - ループ構造領域を矢印で配列の上側に示した。エドマン分解法で分析したN末端アミノ酸配列を二重下線で示している。

Shine-Dalgarno配列、-35および-10プロモーター領域を配列の下に示し、制限酵素部位を配列の上側に示している。塩基数を左側に示している。

図15 : LecA蛋白質のヒドロパシープロフィール

LecAの親水性および疎水性をKyte & Doolittleパラメーターにより解析した。+側に疎水性を、-側に親水性を示している。

図16 : 精製したLecA組換え蛋白質のSDS-PAGE解析

レーン1 : *E. coli* JM109 (pAY824SS : 図13) の全菌体抽出液

レーン2 : 膜画分および封入体様不溶性画分を4M尿素にて可溶化した画分

レーン3 : DEAEクロマトグラフィーによる溶出画分

レーン3の25kDaの位置にほぼ単一に精製されたLecA組換え蛋白質が認められた。

図 17 : *LecA* 蛋白質の予測される構造

DNA塩基配列より予測されるペプチド鎖を実線で囲み、プロセッシングが生じると考えられる部位で区切っている。さらに、ペリプラズム領域、外膜貫通領域、細胞外領域のペプチド鎖の局在を示している。

図 18 : *lecA* 遺伝子をプローブとした *E. corrodens* 菌株間におけるゲノミックサザンハイブリダイゼーション解析

プローブとして、*lecA* 遺伝子 ORF の *BssHII* - *EcoRI* 断片を用いた。

レーン 1 - 3 : *E. corrodens* 1073 染色体
DNA

レーン 4 - 6 : *E. corrodens* 1080 染色体
DNA

レーン 7 - 9 : *E. corrodens* ATCC 23834
染色体 DNA

レーン 10 - 12 : *E. corrodens* 612L 染色体
DNA

レーン 1, 4, 7, 10 : *EcoRI* 消化した染色体
DNA

レーン 2, 5, 8, 11 : *HindIII* 消化した染色体
DNA

レーン 3, 6, 9, 12 : *Pst*I 消化した染色体 DNA

図 19 : EcLS 複合体の構築モデル

PorA、*LecA*、レクチン様付着因子をそれぞれ矢印で示している。*PorA* 蛋白質は、菌体外膜上でターミネーター/アンカーおよび外膜チャンネルとして機能し、主要抗原あるいは菌周病原性因子であることが示唆された。*LecA* 蛋白質は、外膜貫通型蛋白質で、EcLS 複合体のマイナーサブユニットとして機能し、レクチン様付着因子に近接して局在していることが示唆された。

Molecular biological analysis of the component proteins of the adhesin complex from periodontopathogenic *Eikenella corrodens*.

Hiromichi YUMOTO

Department of Conservative Dentistry, Tokushima University School of Dentistry, 3-18-15 Kuramoto-cho Tokushima, Tokushima 770, Japan

ABSTRACT: *Eikenella corrodens* 1073 has a cell-associated *N*-acetyl-D-galactosamine-specific lectin-like substance (EcLS), which mediates the adherence of this bacteria to various host tissue cell surfaces. In this study, we cloned the genes encoding two component proteins of EcLS. EcLS migrated as proteins of about 300 and 45kDa upon SDS-PAGE under reducing conditions. At first, we cloned the gene encoding this 45kDa protein using a polymerase chain reaction and Southern hybridization. This gene was cloned into the expression vector pET22b(+) and the recombinant plasmid was transformed into *Escherichia coli* BL21(DE3). Then, the expression of the cloned gene was induced with isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside. The expressed 45kDa protein was purified after solubilization of inclusion bodies with urea and DEAE-Sepharose column chromatography. The nucleotides of this cloned fragments were sequenced and an open reading frame (ORF) was found. This ORF comprised 990 nucleotides and encoded a polypeptide of 330 amino acids (Mr, 35,748). The amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence was highly homologous to those of the porins of *Neisserial* species.

Subsequently, we cloned the gene encoding the protein reacting with the anti-EcLS monoclonal antibody from a gene bank, produced from *E. corrodens* 1073 chromosomal DNA in *E. coli* JM109. SDS-

PAGE analysis revealed that clones produce three *Eikenella* proteins of about 60kDa, 25kDa and 10kDa, and immunoblot analysis revealed that the 25kDa protein reacts with the monoclonal antibody. The nucleotides of this cloned fragment were sequenced and an ORF was found. This ORF comprised 678 nucleotides and encoded a polypeptide of 226 amino acids (M_r , 24,586). The amino acid sequence deduced from the nucleotide sequence had no homology to any previously sequenced proteins. The expressed 25kDa protein was purified using DEAE-Sephrose column and gel filtration chromatography after solubilization of inclusion bodies with urea. The NH₂-terminal amino acid sequence of this purified protein and hydrophathy profile analysis revealed that this 25kDa protein is a cell membrane-associated protein.

Our findings suggest that the 45kDa and 25kDa proteins of *E. corrodens* 1073 are components of the EcLS complex, and the 45kDa protein may act as a major antigen and periodontopathogen on the outer membrane as are the *Neisserial* porin proteins, and the 25kDa protein may be a minor subunit, located near the lectin-like adhesin, in the EcLS complex.

图 1

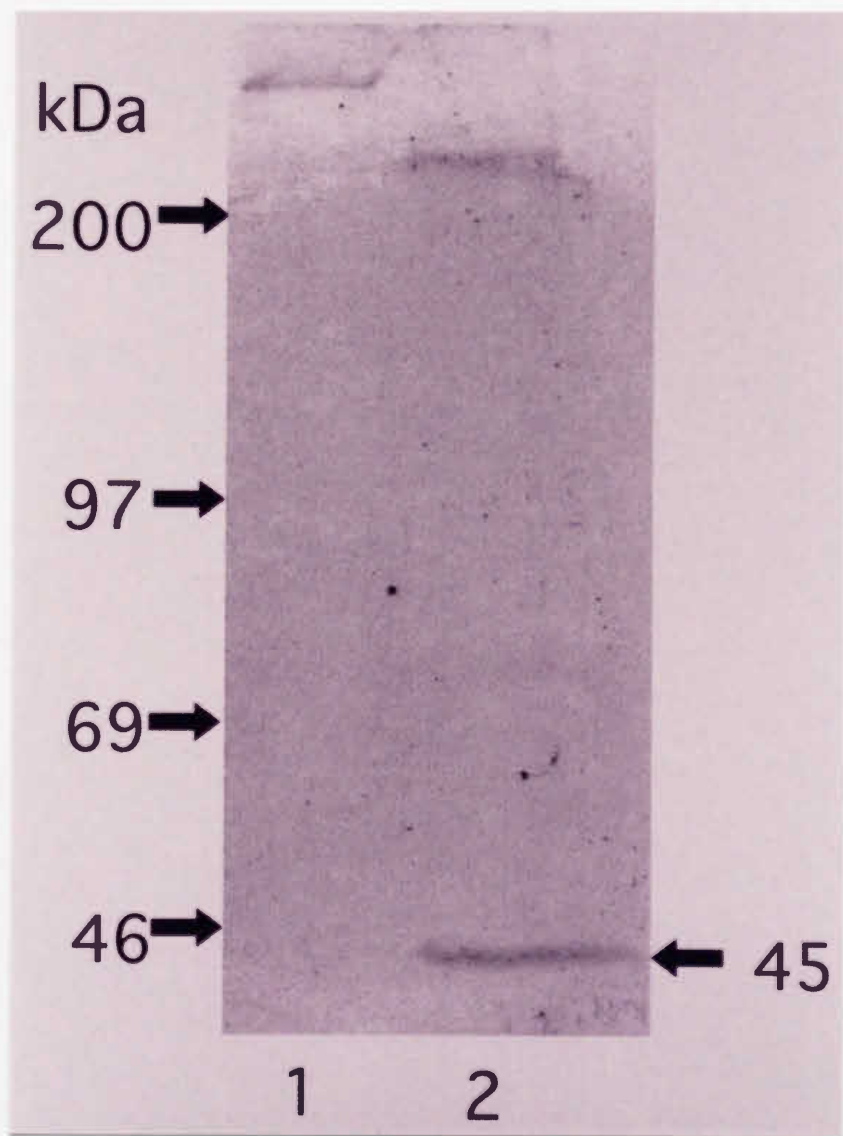


図 2

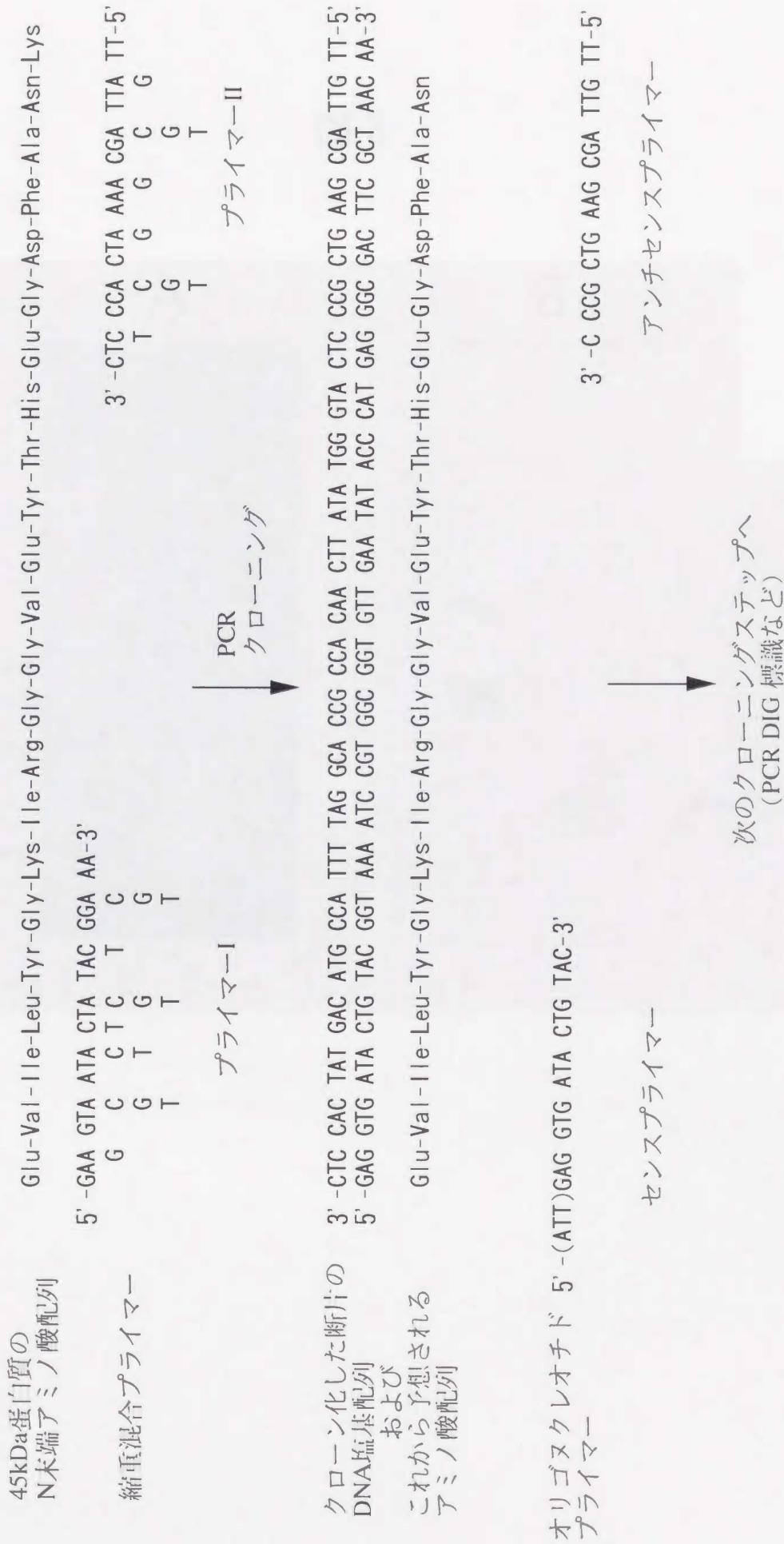


图 3

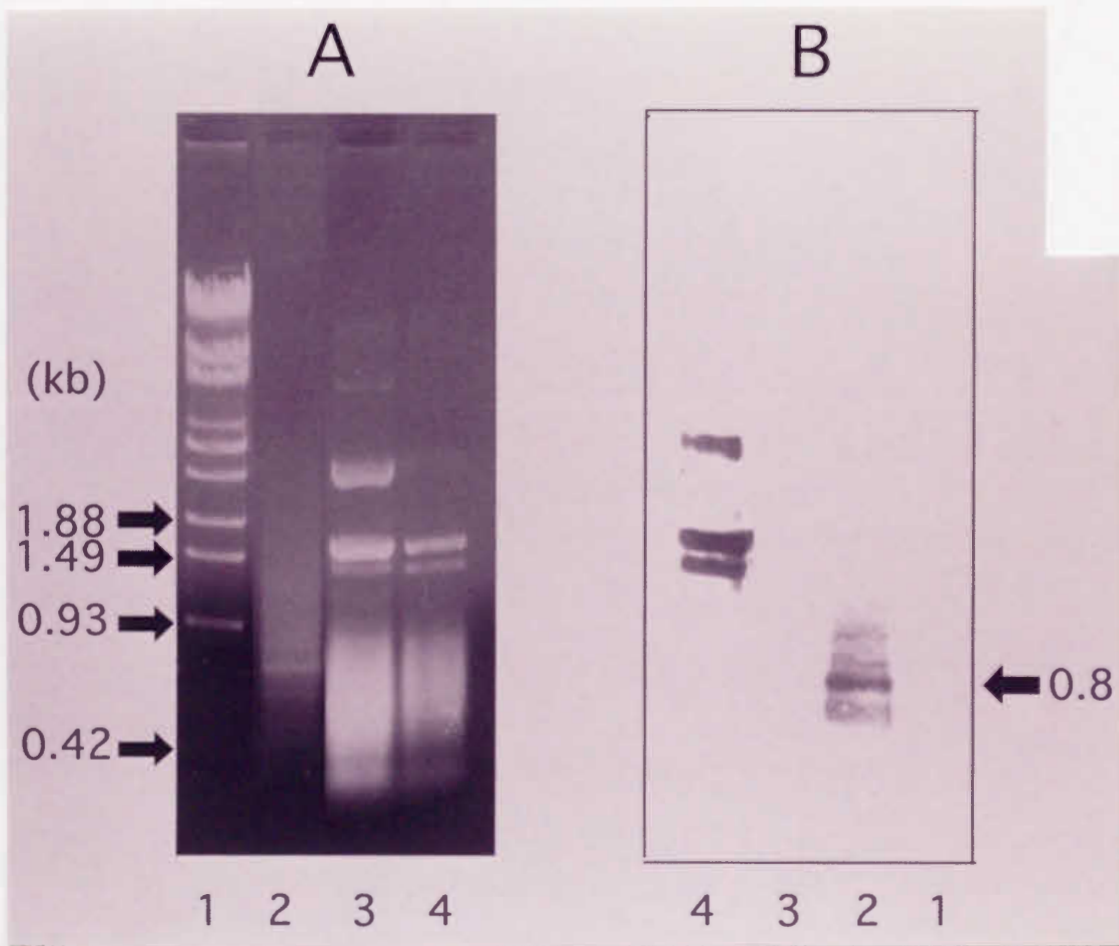


图 4

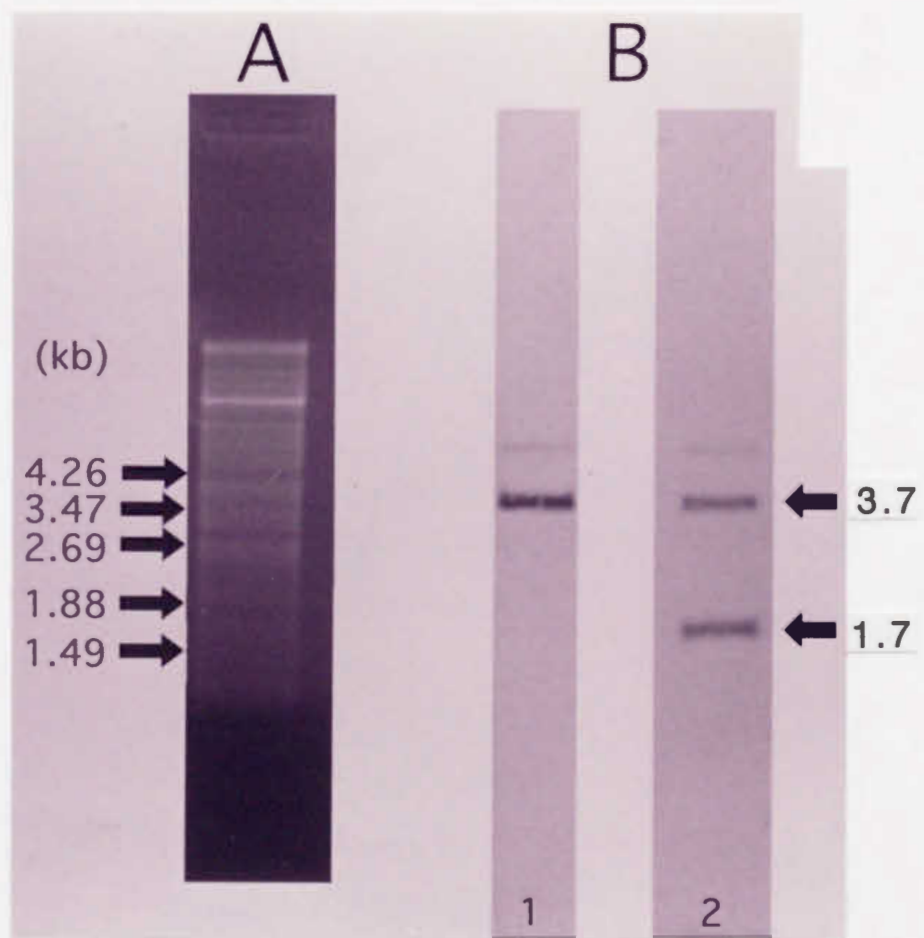
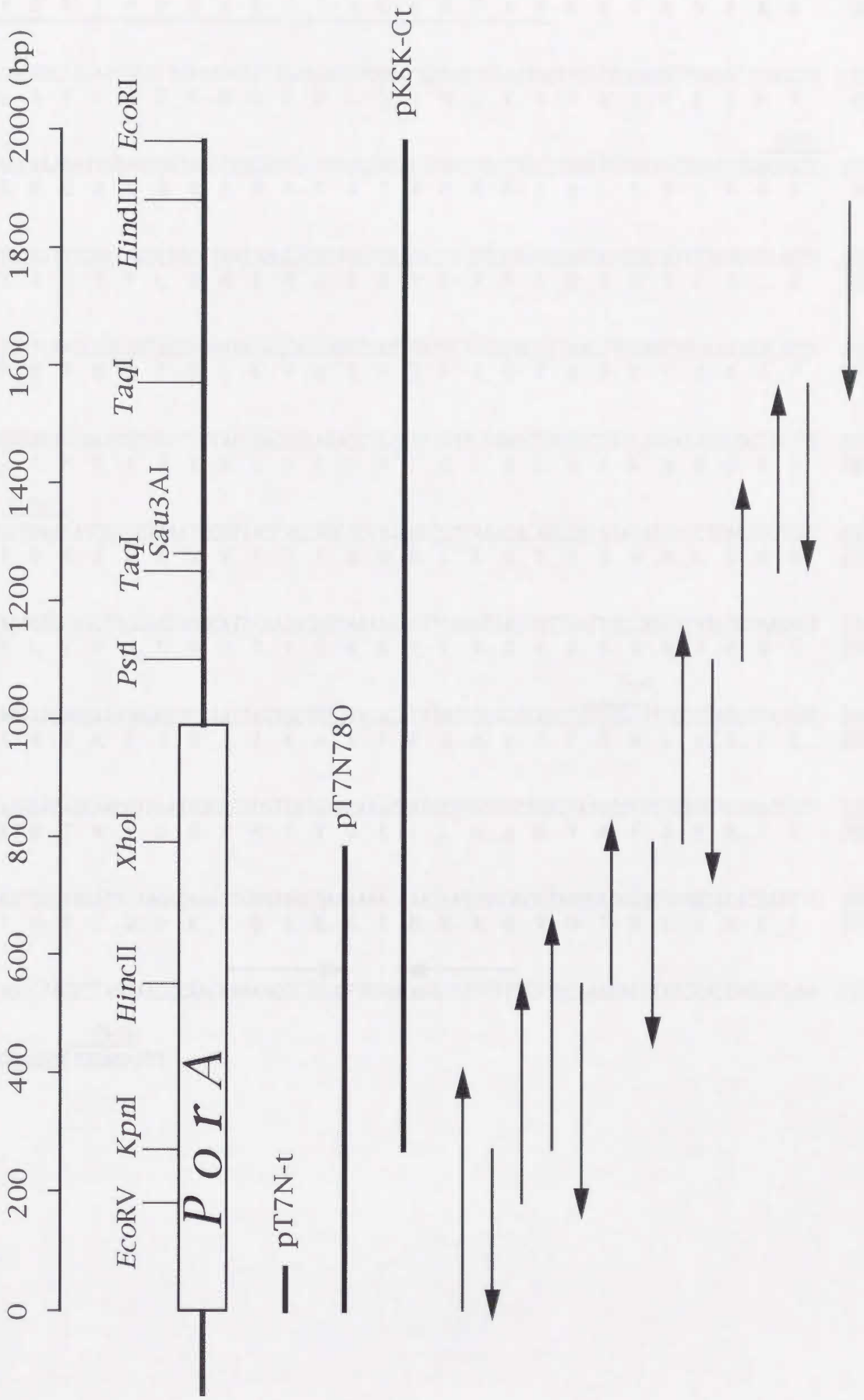


图5



☒ 6

GAGGTGATACTGTACGGTAAATCCGTGGCGGTGTTGAATATACCCATGAAGGCGACTTTGCAAACAAGTCCGAGAAAAACGCTTGGGGC 90
E V I L Y G K I R G G V E Y T H E G D F A N K S E K N A W G 30

GTAGTTGACTATAGCAGCTACATCGGCTTCAAAGTTCTGAAGACTTGGCGGTAATCTGAAAGCTATTTGGCAAGTTGAGTCTCGCGTA 180
 V V D Y S S Y I G F K G S E D L G G N L K A I W Q V E S R V 60

EcoRV KpnI
 GATATCGGCGGCGGAAAGATAGCAGTGGTAACCCCGTGGCTTCGCTACACGTGACTCCTTCATTGGTTTGGAAAGTTGGCTTCGGTACC 270
 D I G G G K D S S G N P R G F A T R D S F I G L E G G F G T 90

GTTAAAGTTGGTTATGTTTCCACCCCTCTGCGTAACACCCACGCTGCTCAAGACCAGTGGGAATACAGCAGCGATATTTTGGGTTTAGGT 360
 V K V G Y V S T P L R N T H A A Q D Q W E Y S S D I L G L G 120

CGCTACACTCGCTTCTCTACCCGCCGTACCAGCTTAAACTACCAGTCTCCTGATTTTGCTGGCTTAACTTCGAGTTCCAAATGGCTCCC 450
 R Y T R F S T R R T S L N Y Q S P D F A G F N F E F Q M A P 150

GGTAAGAATGCTCATACTCCGGATGCCCGTACTAATGACGGCAAACCTGCATTCCGGTTTGGGCTTGGGCTATAAAAACAGCGGCTTCTTC 540
 G K N A H T P D A R T N D G K P A F G L G L G Y K N S G F F 180

HincII
 CGCGTTACGCTGTTGACTATGCTCGTAAATCCGTTACCACCACCTCTAACGGCCTCAAAGACAGCCATGTACATAACCTGAGTCTGGT 630
 A R Y A V D Y A R K S V T T T S N G L K D S H V H N L S A G 210

TATGATGCTAATAATCTGTATGTTGCAGGTGGCATTCAATACGGTAAAAACGTTGAGGTTAGTGTGATTCCAGAATATCGCTAACACT 720
 Y D A N N L Y V A G G I Q Y G K N V E V S V D S Q N I A N T 240

XhoI
 CATGAAGATGGCACTAACAGCAAAGAGGCTCAAATTACTGCTGCCTACACATTTGGTGCAGTTACCCCTCGAGTTTCTGTAGCTTATGGC 810
 H E D G T N S K E A Q I T A A Y T F G A V T P R V S V A Y G 270

CGCTTTGATAGCAAAGACACCAACGTAGATGGCGCTCGTTATGTACAAGCTATCCTTGGTGTGCTGACTATGCCTTCTCTCGTCGCACTACT 900
 R F D S K D T N V D G A R Y V Q A I L G A D Y A F S R R T T 300

GGTATTGTATCTACTGGCTGGATTCAAGACAAAGTGGGTAGCGAAAAACCAATAACTGGGGCGTAGGCACCGGCTTGGTACACAAATTC 990
 G I V S T G W I Q D K V G S E K T N N W G V G T G L V H K F 330

TAATTTGGGCTAGCCTAGTCTAGTAACCCAACAAAAGGCTTGCTTCGGCAAGCCTTTTTTCTTGCCACCATCTATCCACCTGGCTCAA 1080
 *

PstI
 GCAATGCTACTTGCAGGTCTGCAGAATT

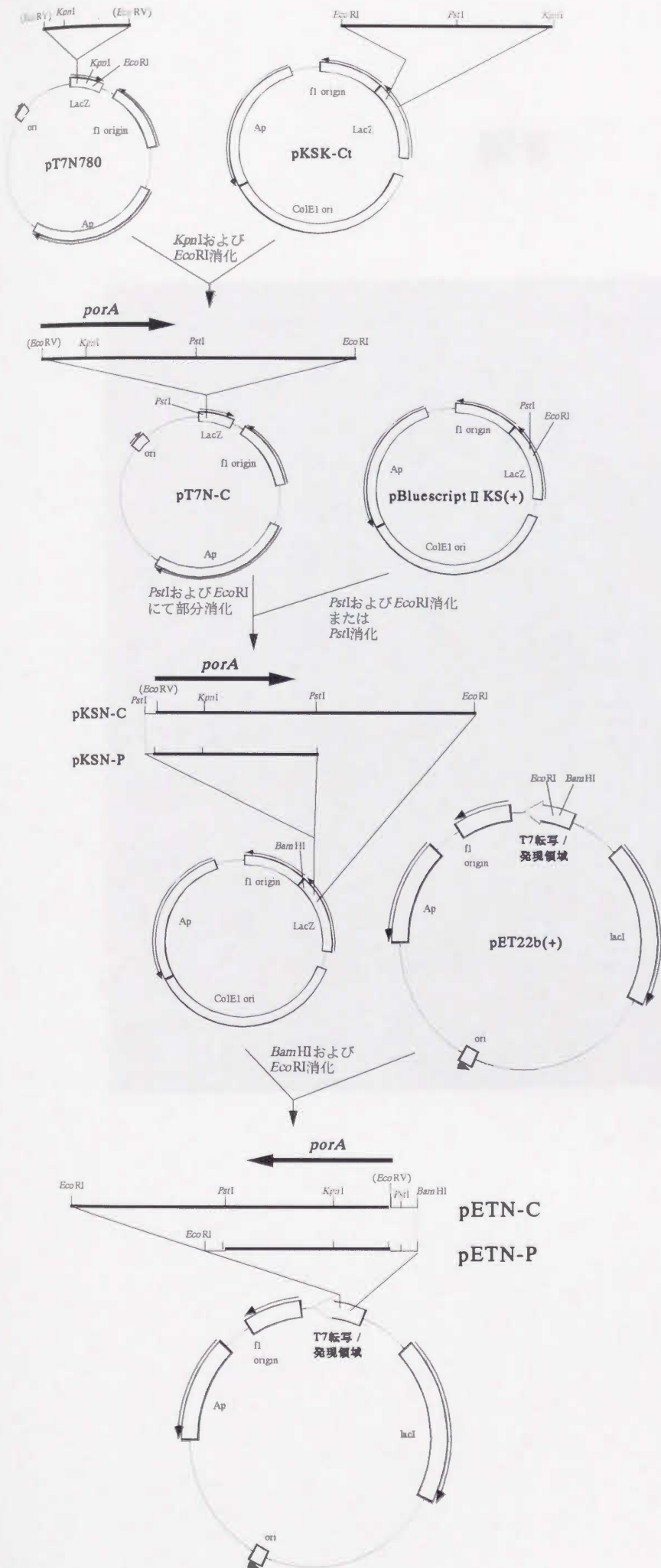


图 9

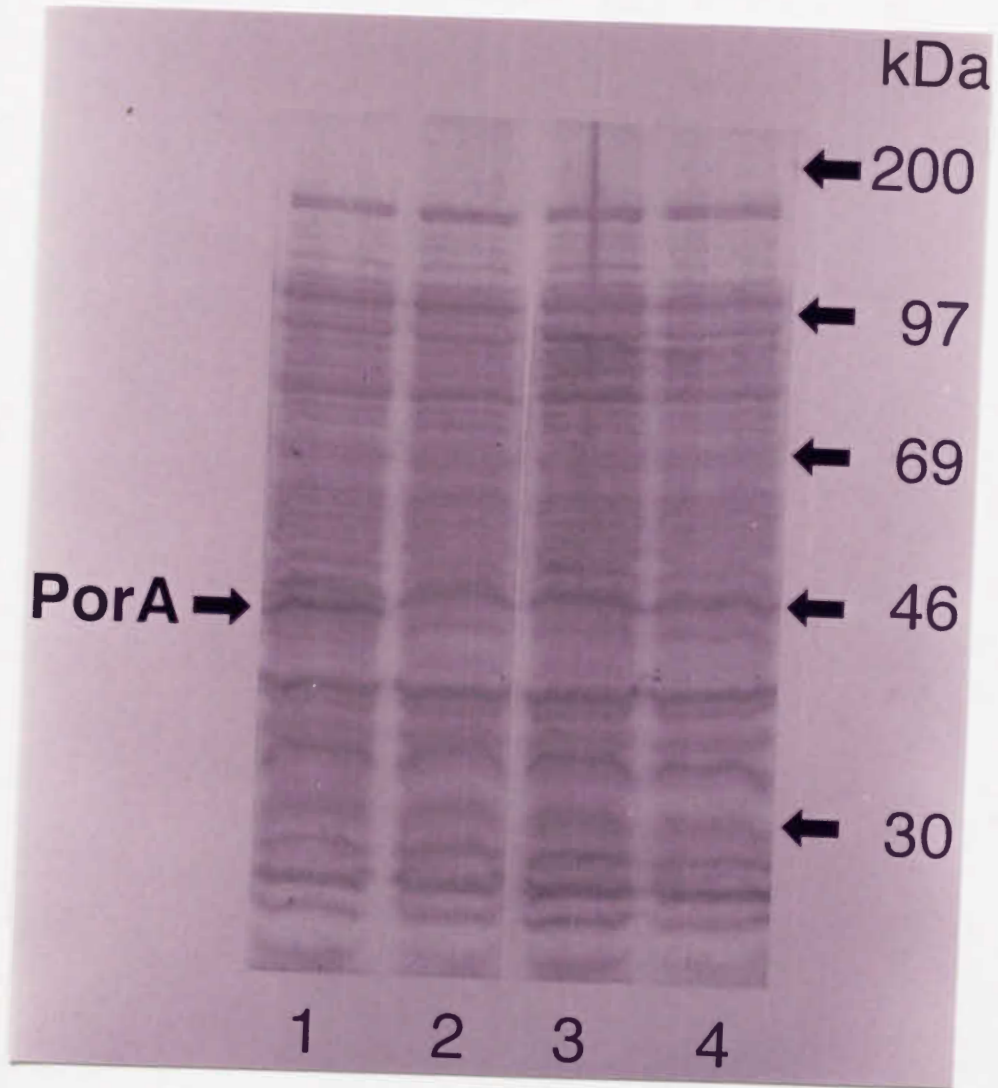


图 10

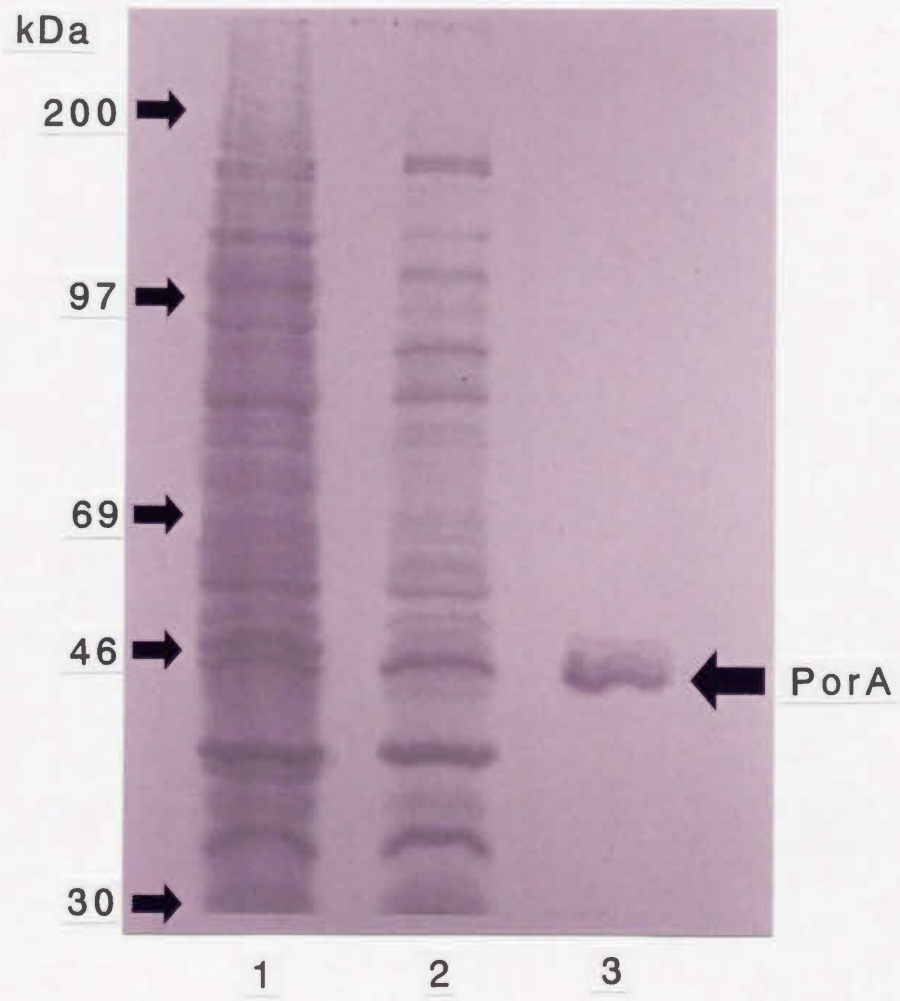


图 11

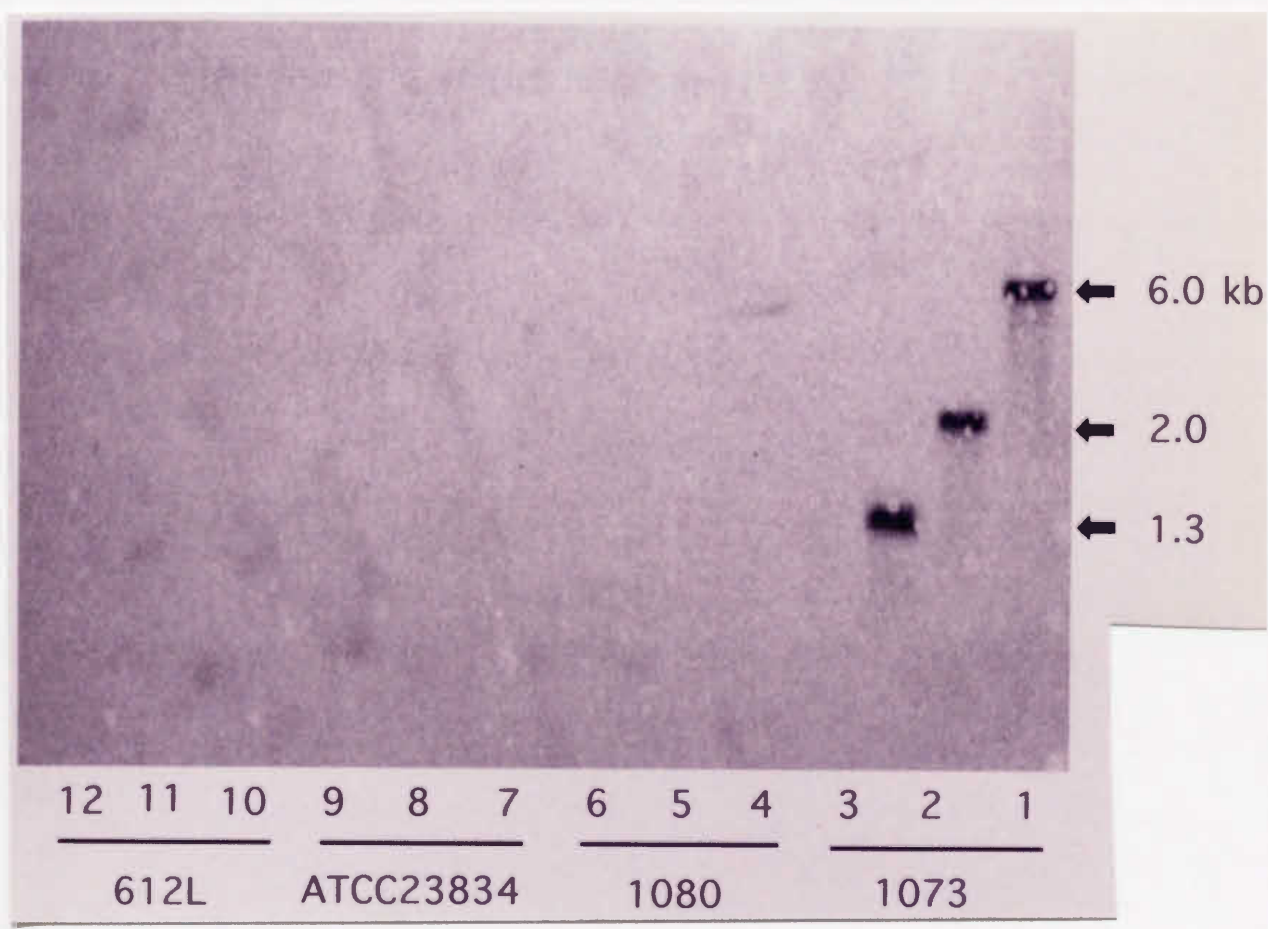
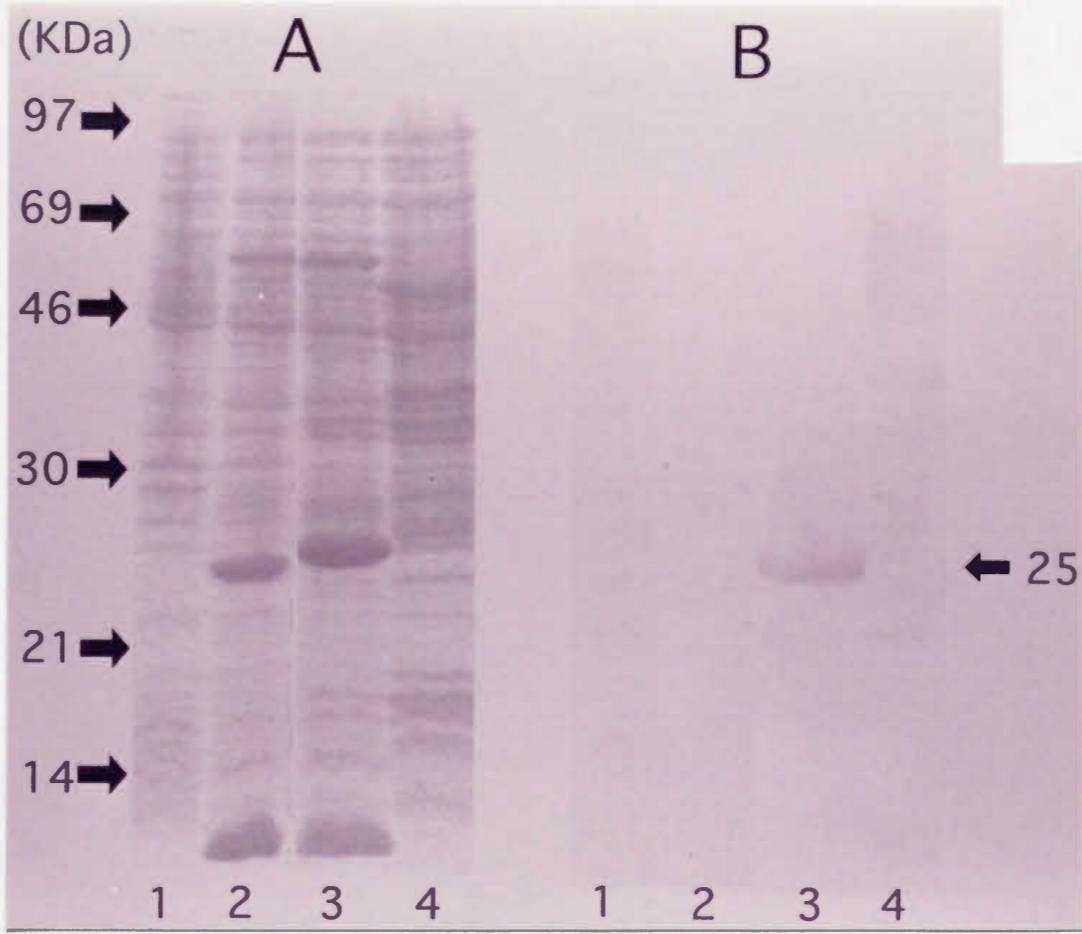


图 1 2



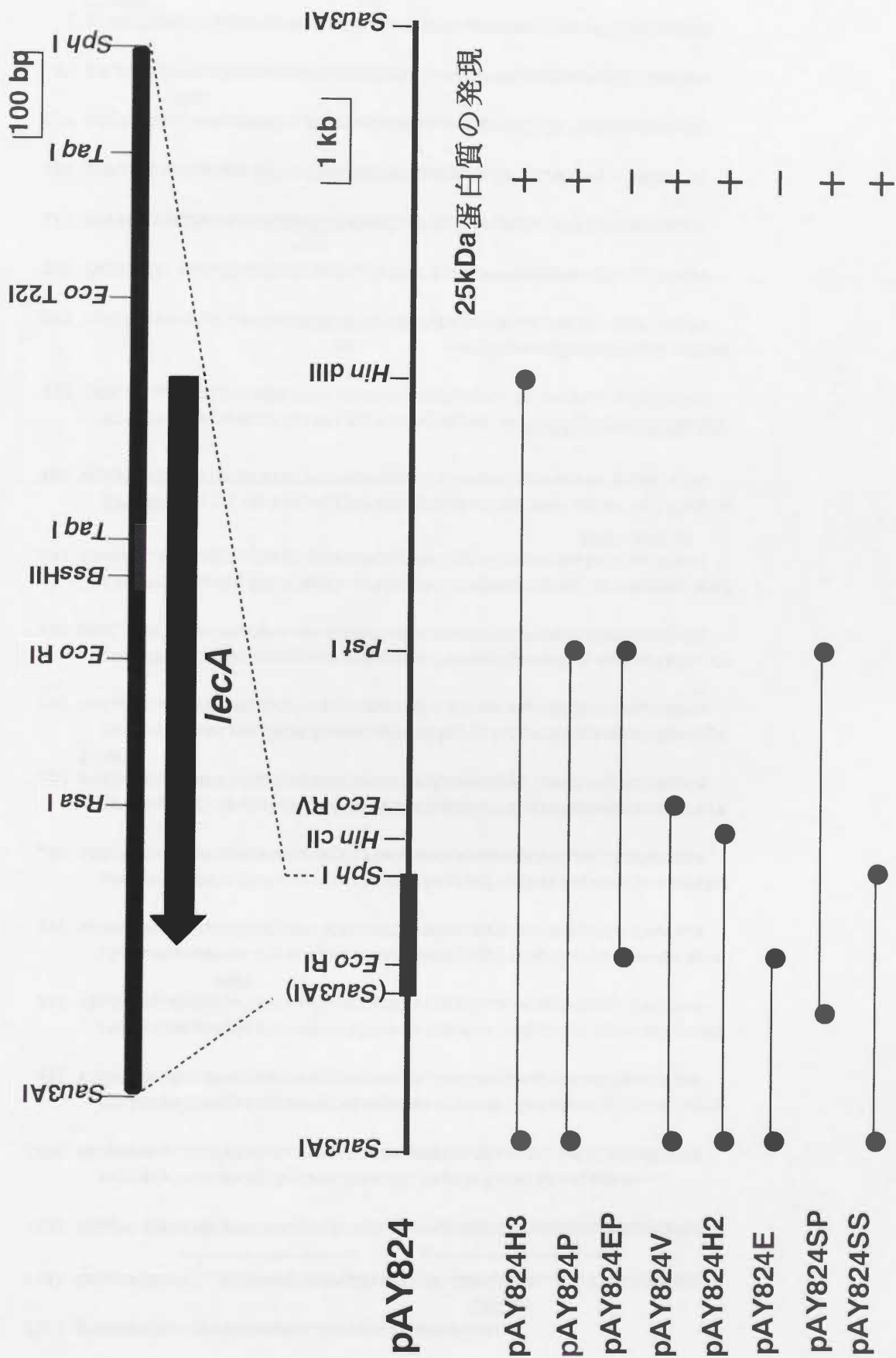


图 1 4

SphI
 1 GCATGCGGGCGATGTGGTGTATCTCGCCCCGAACGAGCGCCATGCGCTGAGCGCCGTGAG

61 CGCTTGCCGGATGTTGCTGGTGTGGTGAATGTGGATTGAACTTGGATAAAGCAGCAGGC
TaqI
 121 GTGGTATGTCGAACCGCCTGTTTTGCTGAGGCTGCTTAAAAATAAAATGGCGGCTGGA

181 TAAGGCTGTTTTAGGTAGCCTTTGCTTTAATTTTACGGCTACCTGAAAAATGAATGCCC
 -35
 241 ATAAAGCCGCTACATACTTTAACTTGGGGCTAACCGTAGTTTAAGAAAACAGTCTGTTAC
 -10
 301 AATGCATCCGTTGTTCTGCATCGGGTTTTGCCCGCGAAAAAGCCCGACCCGCCTAGAGAA

361 CGCCAATAACATTCCAACATGAAGGGAGTTTAAAAATGAAATTTTGGCAATCAACTGTAT
 SD MetLysPheTrpGlnSerThrValLeu

421 TAGCTGCTTTGGCTGTGGGCATCGCTGCCCGGCATTCCGCCCGCGGCACCGTGTCTT
AlaAlaLeuAlaValGlyIleAlaAlaProAlaPheAlaAlaGlyGlyThrValSerTyr

481 ATGTCTGCCAACAGCCAAACAGGTGGATGTGAGCTATCAGTTCAACAGCCGCGGCAAAC
ValCysGlnGlnAlaLysGlnValAspValSerTyrGlnPheAsnSerArgGlyLysPro

TaqI BssHII
 541 CGGTGTCTGCCCGCGCCCGCTCAACGGCAGCAACCGCAACATGGCTTTCGACGCGCGCC
ValSerAlaArgAlaArgLeuAsnGlySerAsnArgAsnMetAlaPheAspAlaArgArg

601 GCTCCGACAGCACGGGCACAGCGTTTTAAAGACCGTGCCGGCTACAACCTGACCGGCCCGG
SerAspSerThrGlyThrAlaPheLysAspArgAlaGlyTyrAsnLeuThrGlyProVal

661 TGCTCACTGCCAGCAACTACCGCAGCGAAGAGGGCATCAGCATCCTCTCTCCGCGCAGCG
LeuThrAlaSerAsnTyrArgSerGluGluGlyIleSerIleLeuSerProArgSerGlu

EcoRI
 721 AATTCCCTGTATAAAGACTGTAATCCGCGTCAAAACGAGCCTGCCCGCCAAGCTCCGCCCC
PheLeuTyrLysAspCysAsnProArgGlnAsnGluProAlaArgGlnAlaProProAla

781 CTTAGCCCGCAGCGCAGCGTGGCCTACGTTTGCCAGCAAGGCCCGCCTTGAACGTGA
SerAlaArgSerGlySerValAlaTyrValCysGlnGlnGlyArgArgLeuAsnValAsn

841 ATTACCGCTTCAACTCTGCCGGTGTGCCACCAGCGCCGAACCTGCGCGTGAACAACCGCA
TyrArgPheAsnSerAlaGlyValProThrSerAlaGluLeuArgValAsnAsnArgAsn

RsaI
 901 ATCTGCGCCTGCCGTACAACCTGTCGGCTTCCGACAATGTGGACACTGTATTGAGCGCCA
LeuArgLeuProTyrAsnLeuSerAlaSerAspAsnValAspThrValPheSerAlaAsn

961 ACGGCTACCGCCTGACCACCAATGCCATGGATTCCGCCAACTACCGCAGCCAAGACATCA
GlyTyrArgLeuThrThrAsnAlaMetAspSerAlaAsnTyrArgSerGlnAspIleIle

1021 TCGTGAGCGGCCAAATGGCCAAATGCTGTATAAAGATTGTTCTCCTGCCCGTTAATCGG
ValSerAlaProAsnGlyGlnMetLeuTyrLysAspCysSerProAlaArg***

1081 AGTGGCGGATAAACAAGCAGGCACAACCTTGCGGTTGTGCCTGTTTTGTTGGCTATGGT
 -----> <-----
 1141 GTTTCAGGTAGCCTTTGGGGGCTCAATGATGGCCAGCAGCTTTTCTGCCAAATCGGTTTG
Sau3AI
 1201 TCGGAATCGGTAAAGCGGATGCTCAAGCCTTCGGCTAGATC

図 15

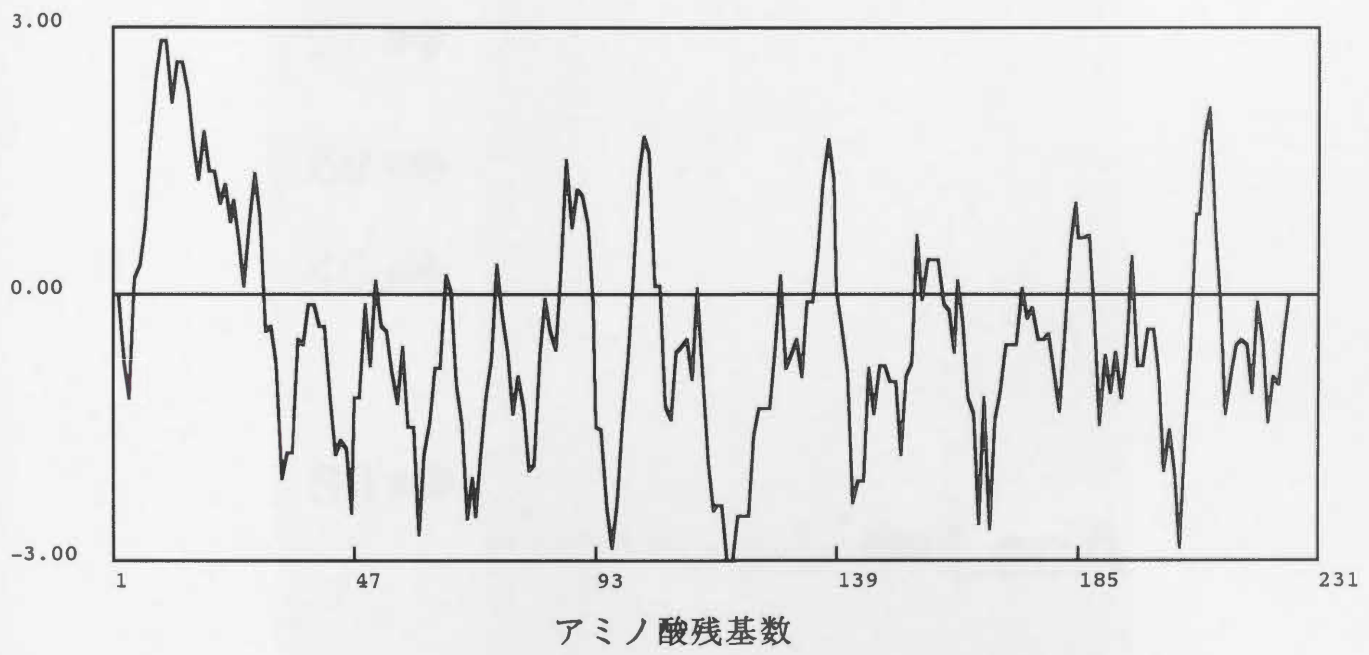


図 16

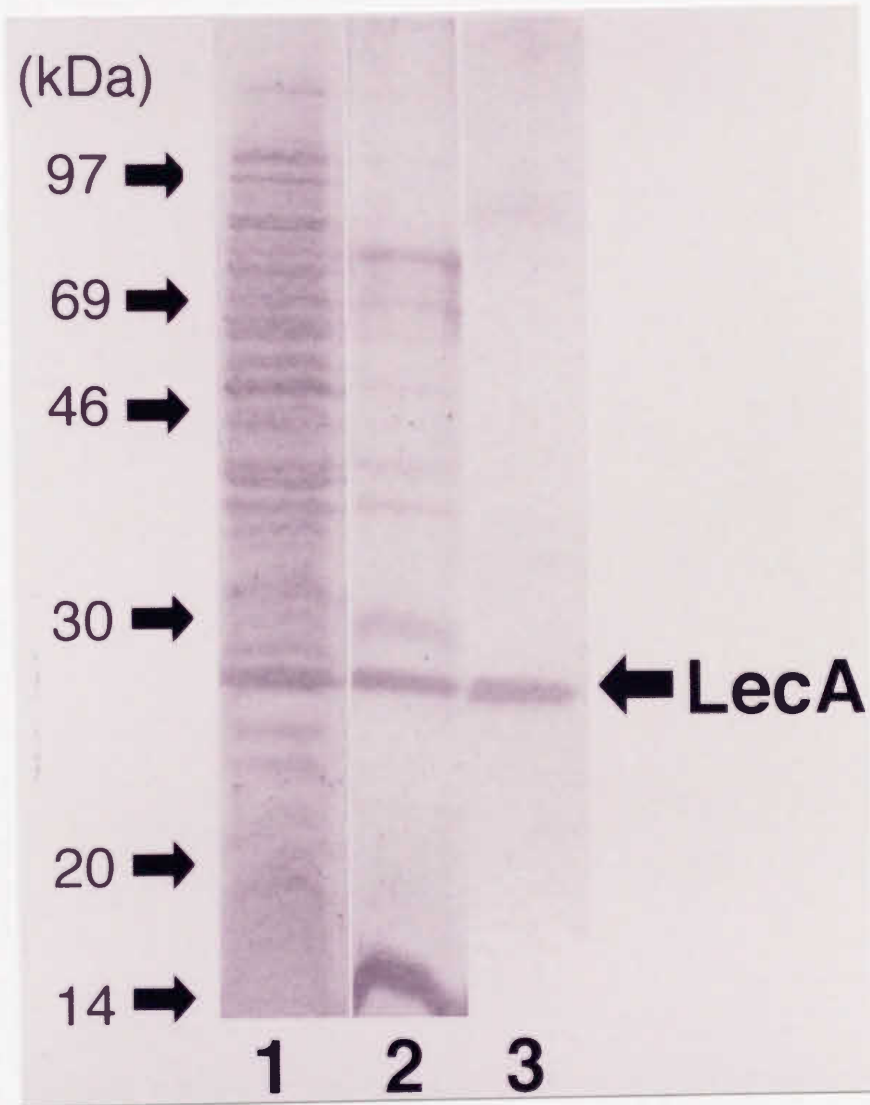


図 17

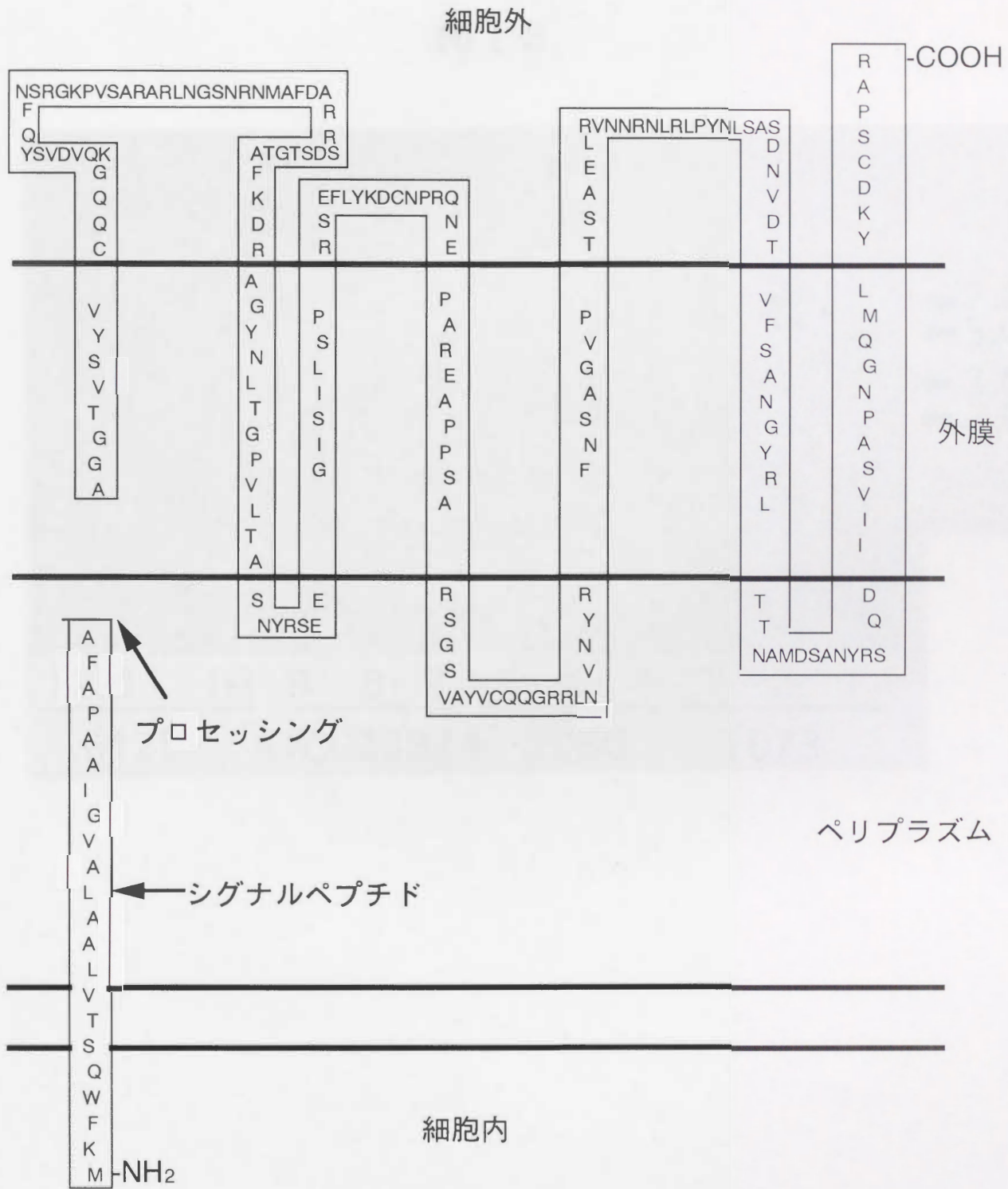


图 18

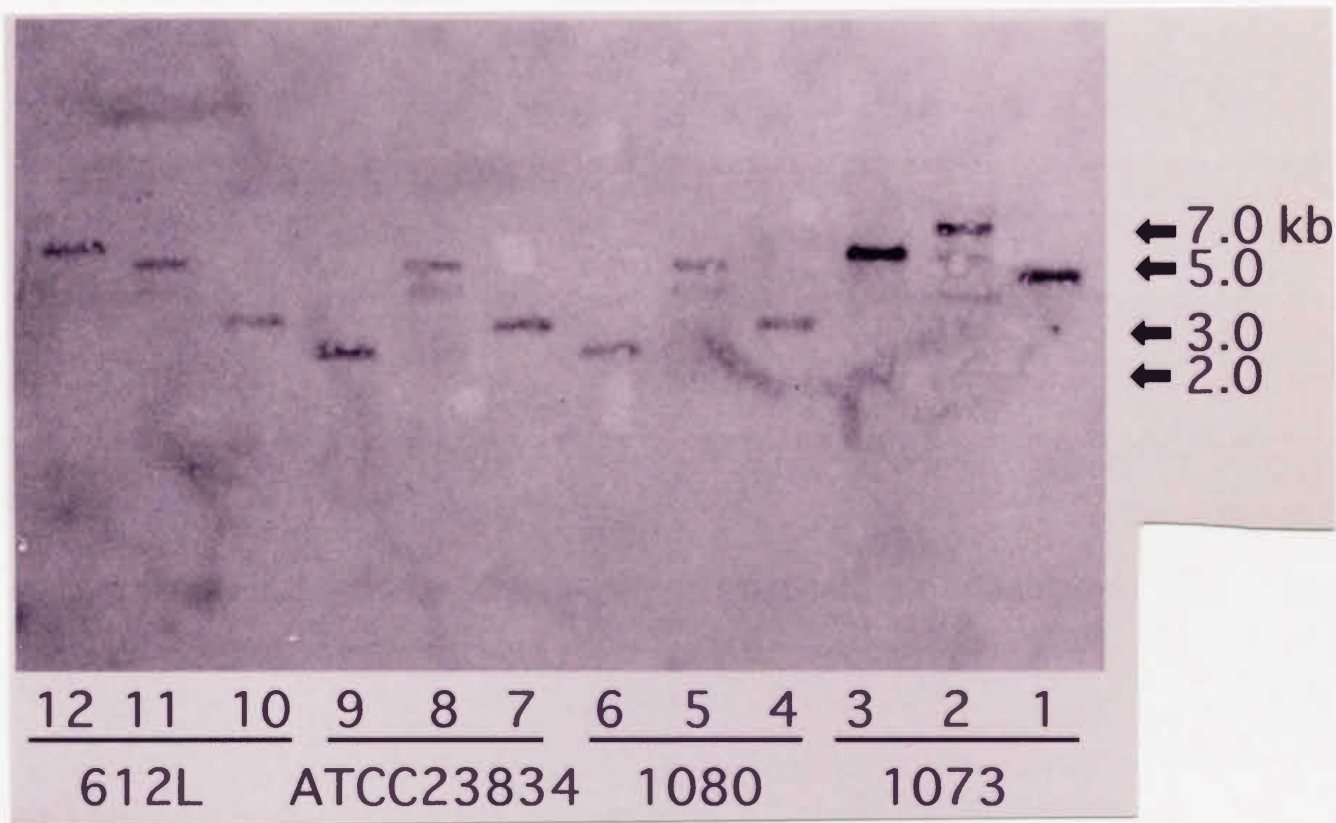
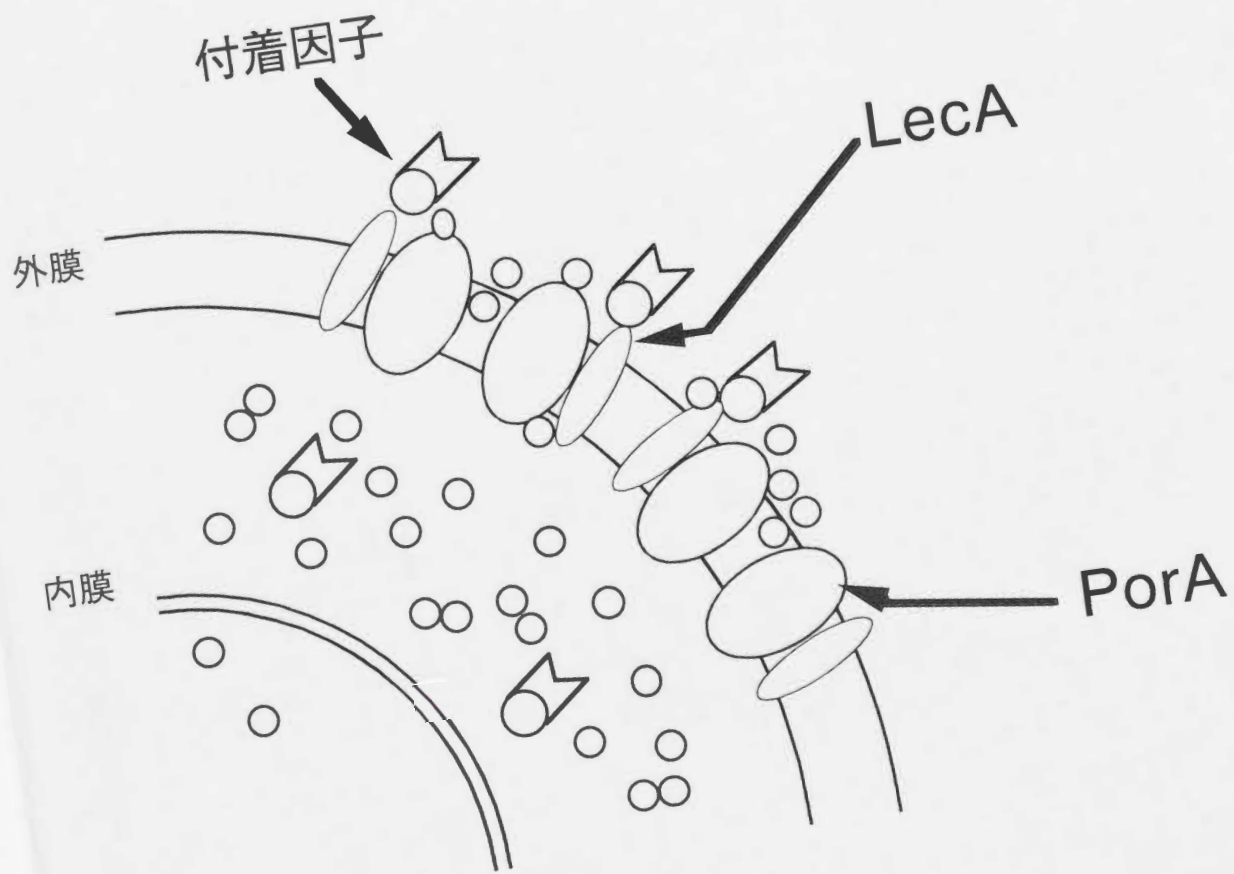
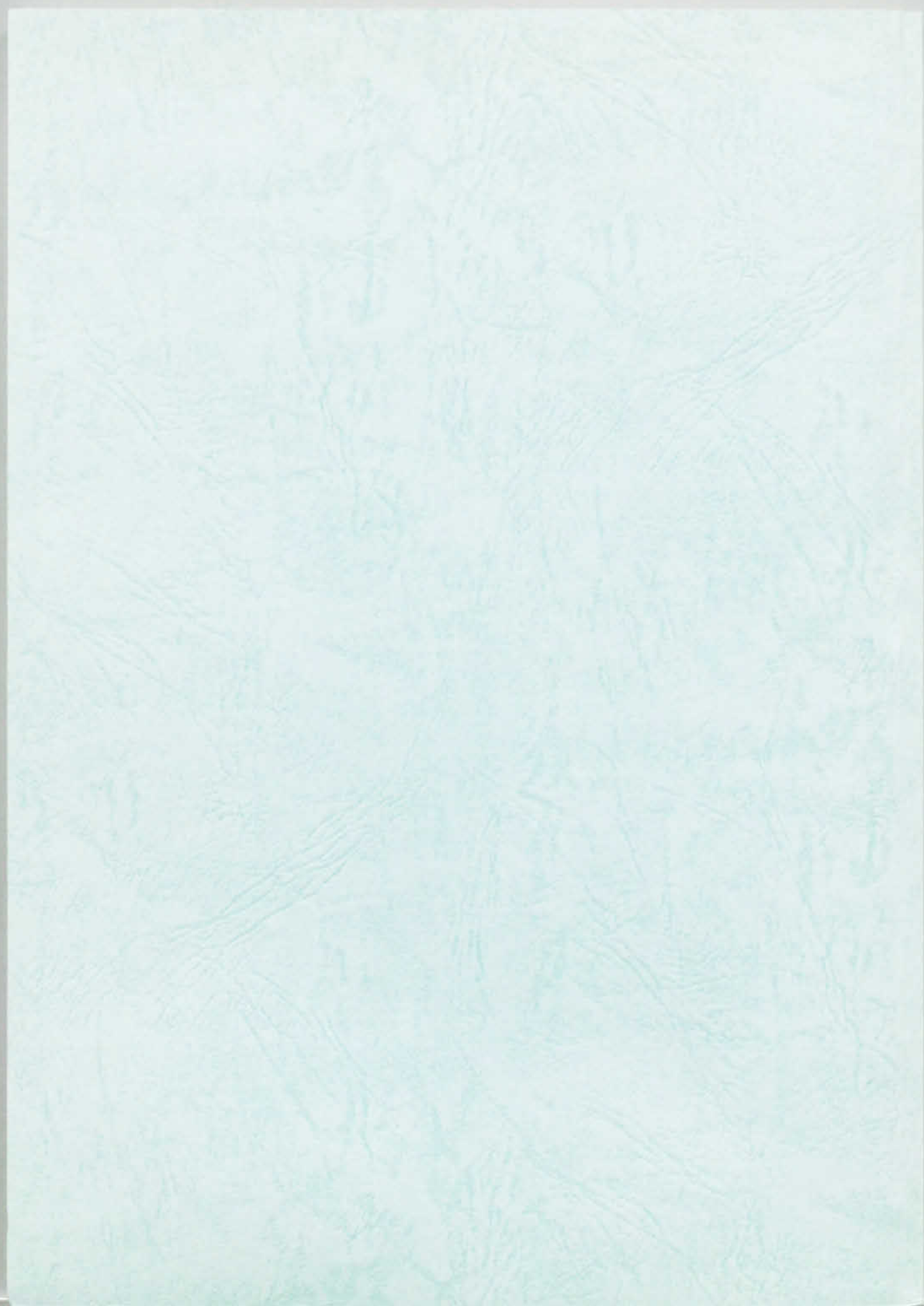


图 19





inches 1 2 3 4 5 6 7 8
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 **M** 8 9 10 11 12 13 14 15 **B** 17 18 19

