

最終講義 若い研究者へ：研究する上でのヒント

中山 浩次

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科
口腔病原微生物学分野

2018.3. 2
長崎大学



Eric Reynolds 教授
メルボルン大学
2017年豪州総理大臣賞受賞

Mike Curtis 教授
ロンドン大学キングス・カレッジ
歯学部長

私
PGLONDON2015にて
2015年6月25日



故 小池 聖淳 先生
電子顕微鏡を用いた解析

SECOND EDITION 1973

ORAL MICROBIOLOGY

EDITED BY
William A. Nolte

SUMMARIZED BY

Kikuo Tajima
Ken-ichi Iwamoto
Koji Nakayama
Masaaki Gotou
Ryoko Ikeda

Faculty of Dentistry, Kyushu University

EDITED BY

Masaatsu Koike, M.D.

Professor, Department of Bacteriology
Faculty of Dentistry, Kyushu University

—1976—

Fukuoka

この Summary は William A. Nolte の "ORAL MICROBIOLOGY" を
我々 5人が小池教授の御指導の下に抄読したものをまとめたものです。抄読会は 昭和50年1月より
9月まで 毎週木曜日に行いました。我々の不勉強から 完全に読み上げることができなかったのは 遺憾な
ことながら、今こうして Summary が完成したことは 無上の喜びであります。単に於ける
細菌学は、極めて重要であり、もう一度 これを読み返して、我々が抄読会で得た知識を整理しておか
なければならぬと思います。また、これを10年後、20年後に手にした時には、どの様な道を自分が
歩んでいようと、冷凍パンに舌つつみ打ち、眠くなるのをじっとこらえて行なつた、抄読会のことを懐しく
思い出すことでしょう。Summaryの完成が予定より3ヶ月も遅れてしまいましたのは、原稿を
清書いたしました。私の個人的な都合によるもので、ここに深くお詫言いたします。

尚、抄読会のみならず、この Summary の原稿にまつましても、いろいろと御助言
御指導下さいました。九州大学歯学部 口腔細菌学、小池聖淳教授、並びに、教員員の皆様に
深く感謝の意を表したいと思つます。

— 序に代えて

昭和51年4月25日 後藤昌昭

[Contents]

- | | | |
|----------------------------------------------------|-------|--------|
| § 1/ Oral ecology | 1-12 | 中山 浩次 |
| § 2/ Defense mechanism of the mouth | 13-17 | 岩本 憲一 |
| § 3/ Bacterial, infectious agents | 19-32 | 池田 良子 |
| § 7/ Periodontal disease | 33-38 | 田島 喜久夫 |
| § 8/ Dental caries | 39-44 | 岩本 憲一 |
| § 9/ Infections of pulp and
periapical tissues. | 45-50 | 後藤 昌昭 |

1977年(昭和52年)の出来事

王貞治選手 本塁打世界新記録 第一回国民栄誉賞受賞
ダッカ日航機ハイジャック事件 「一人の生命は地球より重い」
江川事件(プロ野球ドラフト会議) 「空白の一日」

歌謡曲

ピンク・レディー 「ペッパー警部」

キャンディーズ 「暑中お見舞い申し上げます」

石川さゆり 「津軽海峡・冬景色」

山口百恵 「秋桜」

河島英五 「酒と泪と男と女」

ささきいさお 「宇宙戦艦ヤマト」

アシロマ会議 1975年

組換えDNA実験

物理的封じ込め
生物学的封じ込め



ジェームズ・ワトソン

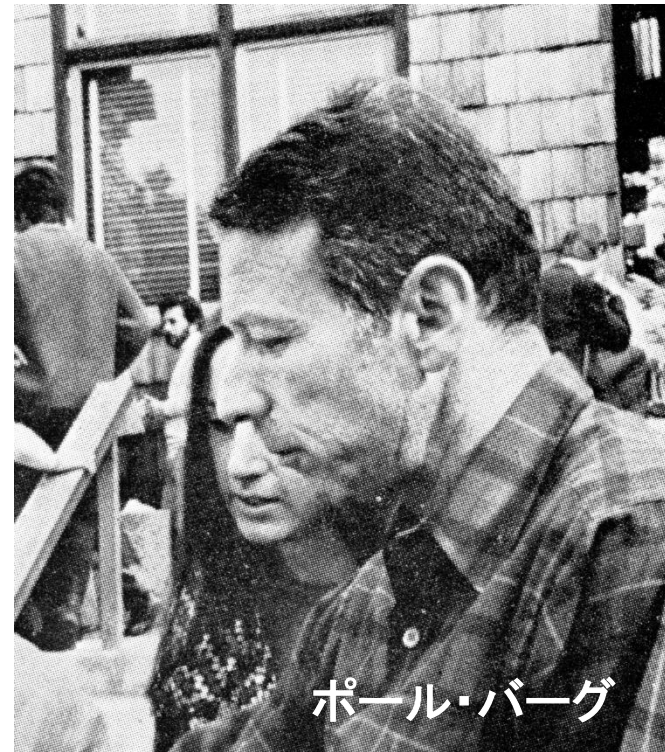


松原謙一 先生



ロイ・カーティス

シドニー・ブレナー



ポール・バーグ

Proc Natl Acad Sci U S A. 1976 Oct;73(10):3628-3632.

Evidence for somatic rearrangement of immunoglobulin genes coding for variable and constant regions.

Hozumi N, Tonegawa S

Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 Aug; 74(8): 3171–3175.

Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA.

Berget SM, Moore C, Sharp PA

第一回日本分子生物学会年会 1978年12月 東京



中山 宏明 先生

九大医学部細菌学—九大医学部生化学—スタンフォード大学—九歯大生化学—九大歯学部細菌学教授
遺伝生化学



関口 睦夫 先生

当時、九州大学理学部分子遺伝学教室教授
第二回日本分子生物学会年会長

放射線生物学

Evidence for the inducibility of the *uvrB* operon.

Fogliano M, Schendel PF.

Nature. 1981 Jan 15;289(5794):196-8.

Expression of the *E. coli uvrA* gene is inducible.

Kenyon CJ, Walker GC.

Nature. 1981 Feb 26;289(5800):808-10.

紫外線傷害除去修復機構 (*uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *uvrD*, *polA*)
は紫外線照射によって誘導される。

Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: in vivo probe for transcriptional control sequences.

Casadaban MJ, Cohen SN.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Sep;76(9):4530-3.

*uvrD*遺伝子はミスマッチ修復機構の一員でもある

Bromouracil mutagenesis and mismatch repair in mutator strains of *Escherichia coli*.

Rydberg B.

Mutat Res. 1978 Oct;52(1):11-24.

Lactose genes fused to exogenous promoters in one step using a Mu-lac bacteriophage: in vivo probe for transcriptional control sequences.

Casadaban MJ, Cohen SN.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Sep;76(9):4530-3.

MAL103 $F^- \Delta(\textit{proABlacIPOZYA})$ Casadaban and Cohen
XIII *rpsL* Mucts (1979) via T. Iino
Mud(Ap^r*lac*) 飯野徹雄 東大
堀内忠郎 九大薬学部
薬品微生物学

recA⁺ gene-dependent regulation of a *uvrD::lacZ*
fusion in *Escherichia coli* K12.

Nakayama K, Irino N, Nakayama H.

Mol Gen Genet. 1983;192(3):391-4.

Abstract

The expression of the *Escherichia coli uvrD* gene was studied with a *uvrD::Mud(Ap^r lac)* insertion mutant. The results indicate that it is inducible by DNA damaging agents in a *recA*⁺ gene-dependent manner.

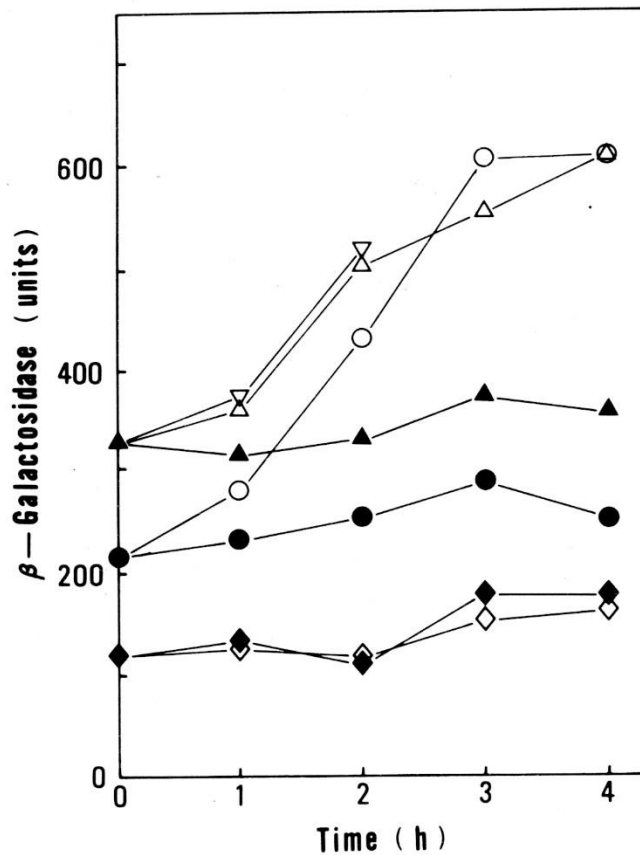


Fig. 2. Time course of induction of β -galactosidase in the *uvrD*- $::$ Mud($Ap^r lac$) strains. Cells were grown in L-broth at 30° C. At A_{600} 0.1, portions of the culture received mitomycin C (1 μ g/ml) or ultraviolet irradiation (6.6 J/m²). Samples were taken at intervals and the activity of β -galactosidase was determined. The residual β -galactosidase activity in the original strain CGSC4212 was less than 4 units, whether induced by isopropyl- β -thiogalactoside or not. Symbols: ▲, KD2192, no treatment; △, KD2192 + mitomycin C; ▽, KD2192 + ultraviolet; ●, KD2193, no treatment; ○, KD2193 + mitomycin C; ◆, KD2194, no treatment; ◇, KD2194 + mitomycin C

研究室を選ぶときは研究領域の先端性について考えるといい

一流誌の論文を読むこと

最新の技術を入手し、使用すること

異なる手法を組み合わせること

学位論文

中山浩次 : 大腸菌の無チミン死の機構に関する遺伝学的研究, **福岡医誌**75:89-106, 1984

Nakayama, H., Nakayama, K., Nakayama, R., and Nakayama, Y.: Recombination-deficient mutations and thymineless death in *Escherichia coli* K12: reciprocal effects of *recBC* and *recF* and indifference of *recA* mutations. **Can. J. Microbiol.** 28:425-430, 1982

Nakayama, H., Nakayama, K., Nakayama, R., Irino, N., Nakayama, Y., and Hanawalt, P. C.: Isolation and genetic characterization of a thymineless death-resistant mutant of *Escherichia coli* K12: identification of a new mutation (*recQ1*) that blocks the RecF recombination pathway. **Mol. Gen. Genet.** 195:474-480, 1984

Nakayama, K., Irino, N., and Nakayama, H.: The *recQ* gene of *Escherichia coli* K12: molecular cloning and isolation of insertion mutants. **Mol. Gen. Genet.** 200:266-271, 1985

Irino, N., Nakayama, K., and Nakayama, H.: The *recQ* gene of *Escherichia coli* K12: primary structure and evidence for SOS regulation. **Mol. Gen. Genet.** 205:298-304, 1986

Nakayama, K., Shiota, S., and Nakayama, H.: Thymineless death in *Escherichia coli* mutants deficient in the RecF recombination pathway. **Can. J. Microbiol.** 34:905-907, 1988

Umezumi, K., Nakayama, K., and Nakayama, H.: *Escherichia coli* *RecQ* protein is a DNA helicase. **Pro. Natl. Acad. Sci. U S A.** 87:5363-5367, 1990

Nakayama, K., Kusano, K., Irino, N., and Nakayama, H.: Thymine starvation-induced structural changes in *Escherichia coli* DNA. Detection by pulsed field gel electrophoresis and evidence for involvement of homologous recombination. **J. Mol. Biol.** 243:611-620, 1994

RecQ DNAヘリカーゼの発見

RecQホモログはヒト疾患の原因遺伝子

Bloom 症候群

Werner 症候群

Rothmund-Thomson 症候群

1986-1988 米国留学 (33-35歳)



Professor Roy Curtiss III

当時、ワシントン大学(セント・ルイス)
現在もフロリダ大学で現役

Construction of an Asd⁺ expression-cloning vector: stable maintenance and high level expression of cloned genes in a *Salmonella* vaccine strain.

Nakayama K, Kelly S, Curtiss R III.

Bio/Technology (The precursor to *Nature biotechnology*) 6:693-697, 1988

Implantation of *Bacteroides gingivalis* in nonhuman primates initiates progression of periodontitis.

Holt SC, Ebersole J, Felton J, Brunsvold M, Kornman KS. **Science**. 1988 Jan 1;239(4835):55-7.

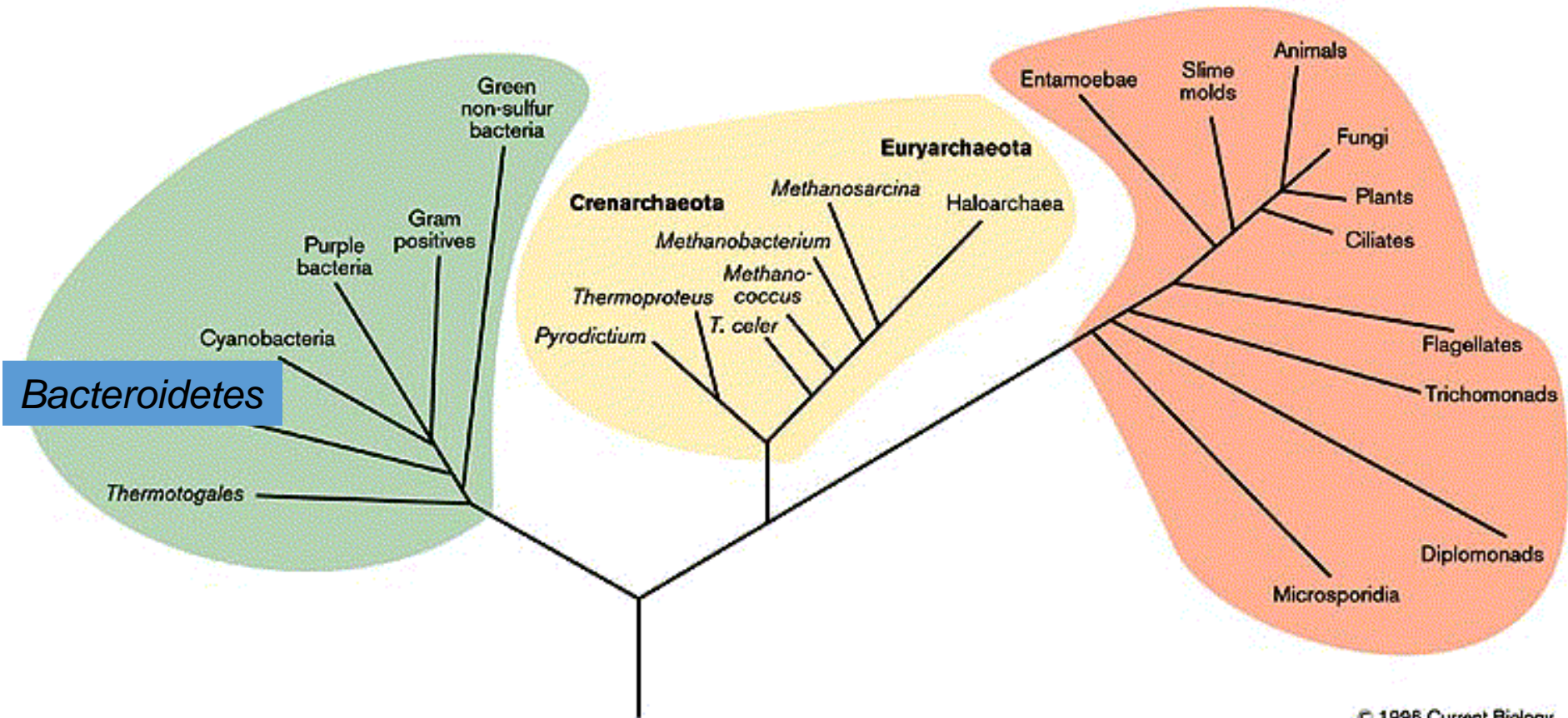
Abstract

Although periodontitis is a bacterial disease, its multidimensional nature and its bacterial complexity have made it difficult to definitively prove that specific microorganisms initiate the disease process. The successful implantation of a rifampin-resistant strain of the putative periodontal pathogen *Bacteroides gingivalis* into the periodontal microbiota of monkeys (*Macaca fascicularis*) resulted in an increase in the systemic levels of antibody to the microorganism and rapid and significant bone loss.

Bacteria

Archaea

Eucarya



なぜこの菌 (*Porphyromonas gingivalis*) を選んだか？

1. 歯周病に関係してそう
2. グラム陰性の嫌気性菌は研究者人口が少なそう
3. 医学領域でよく研究されている細菌 (サルモネラ、赤痢菌、コレラ菌、結核菌、ブドウ球菌、レンサ球菌など) とは分類学上、かなり隔たってそう
4. *Porphyromonas* 属の近縁の *Bacteroides* 属や *Prevotella* 属は腸内マイクロバイオータの主要細菌
5. 生物学的にわかっていないことが多そう

ジンジバリス菌の特徴

1. グラム陰性
2. 偏性嫌気性（酸素耐性）
3. 糖非発酵性
4. 分泌性タンパク質分解酵素
5. ヘム鉄要求性
6. 血液寒天平板上での黒色集落形成
7. 赤血球凝集性
8. 線毛形成
9. 血小板凝集性
10. 歯周病原性

ジンジバリス菌の特徴

1. グラム陰性
2. 偏性嫌気性（酸素耐性）
3. 糖非発酵性
4. 分泌性タンパク質分解酵素
5. ヘム鉄要求性
6. 血液寒天平板上での黒色集落形成
7. 赤血球凝集性
8. 線毛形成
9. 血小板凝集性
10. 歯周病原性

ジンジバリス菌は嫌気性細菌であるが、スーパーオキシド・ジスムターゼをもつ。

スーパーオキシド・ジスムターゼ (SOD)



ジンジバリス菌のSODは
鉄でもマンガンでも活性
がある

Isolation of superoxide dismutase mutants in
Escherichia coli: is superoxide dismutase necessary
for aerobic life?

Carlioz A, Touati D.

EMBO J. 1986 Mar;5(3):623-30.

The *sodA sodB* mutant was unable to grow
aerobically on minimal glucose medium. Growth
could be restored by removing oxygen, by providing
an SOD-overproducing plasmid or by supplementing
the medium with the 20 amino acids.

活性酸素

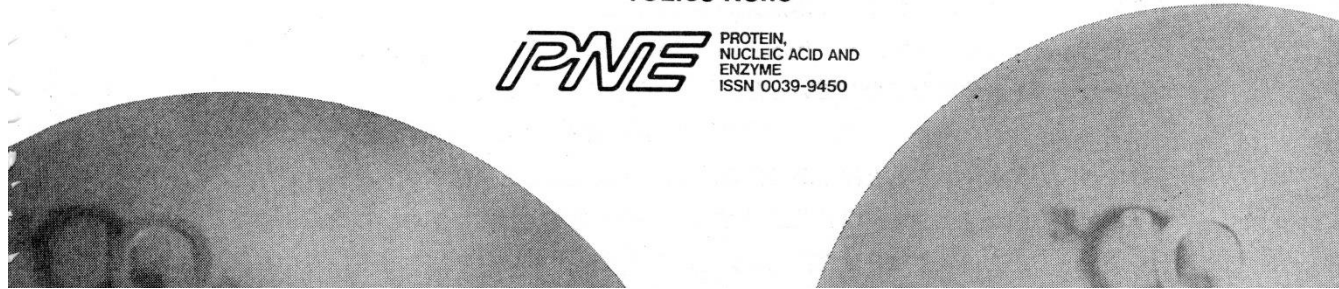
生物での生成・消去・作用の分子機構

蛋白質核酸酵素 臨時増刊

1988-12

VOL.33 NO.16

PNE PROTEIN,
NUCLEIC ACID AND
ENZYME
ISSN 0039-9450



第Ⅳ部 ●酸素ストレスに対する適応

A

酸素ストレスによる適応応答の誘導とその機構

米井脩治・泉 忠秀

わかっているからである。大腸菌の *sodA**sodB* 変異株では、好気性条件下で培養するだけで自然突然変異率の著しい増大が認められている^{39,40)}。この事実もまた、活性酸素が通常の生育条件でも不断に生成していることを物語っている。

39) Farr, S. B., D'Ari, R., Touati, D.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**, 8268-8272 (1986)

40) Yonei, S., Mori, T.: 未発表

41) Demple, B., Halbrook, J.: *Nature*, **304**, 466-468 (1983)

QC774: Δ lac U169 *rpsL* ϕ (*sodA-lacZ*)49 Cm^R (*sodB-kan*)1- Δ 2 Km^R

The superoxide dismutase-encoding gene of the obligately anaerobic bacterium *Bacteroides gingivalis*.

Nakayama K.

Gene. 1990 Nov 30;96(1):149-50.

Abstract

The gene (*sod*) encoding the superoxide dismutase (SOD) of the obligately anaerobic bacterium *Bacteroides gingivalis* was cloned. The amino acid (aa) sequence of the SOD, deduced from the nucleotide sequence of the *sod* gene, basically resembled that of known Fe-SODs. However, the aa sequence of the *B. gingivalis* SOD was found to be intermediate between those of Fe-SOD and Mn-SOD in a limited region around the putative second ligand, where major differences between the aa sequences of Fe-SOD and Mn-SOD are known to exist.

Rapid viability loss on exposure to air in
a superoxide dismutase-deficient mutant of
Porphyromonas gingivalis.

Nakayama K.

J Bacteriol. 1994 Apr;176(7):1939-43.

Abstract

Porphyromonas gingivalis, an obligate anaerobe, exhibits a relatively high degree of aerotolerance and possesses superoxide dismutase (SOD) which is induced by exposure to air. To clarify roles for SOD in this organism, the gene encoding SOD (*sod*) on the *P. gingivalis* chromosome was disrupted in a gene-directed way by use of a suicide plasmid containing a mutated *sod*. A *sod* mutant thus obtained showed no SOD activity in crude extracts and exhibited a rapid viability loss immediately after exposure to air, whereas the wild-type parent showed no decrease in viability for at least 5 h under aerobic conditions. These results clearly indicate that SOD is essential for aerotolerance *in P. gingivalis*.

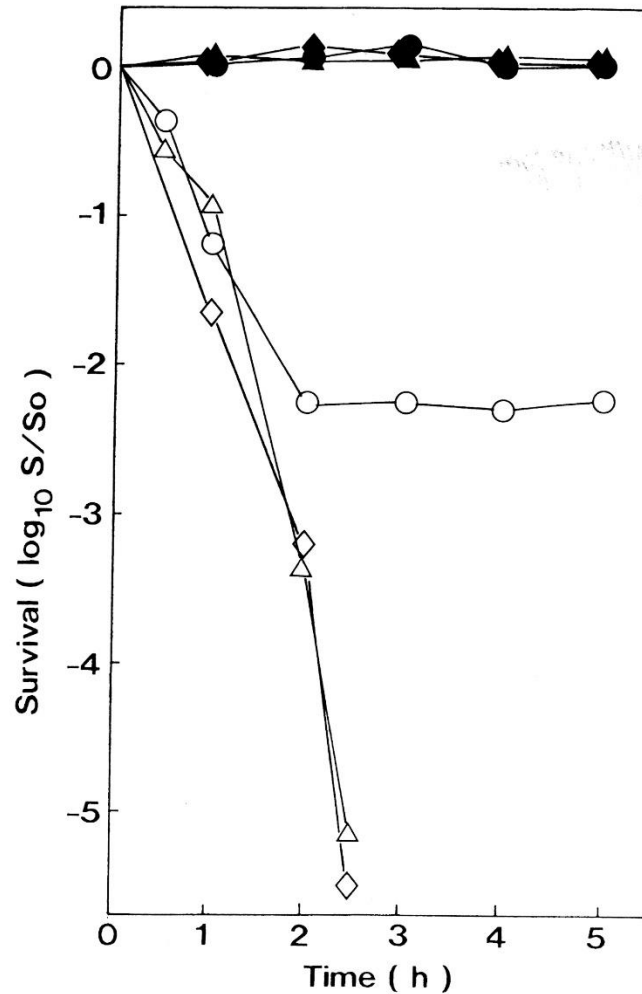


FIG. 4. Sensitivity of *P. gingivalis* mutants to air. Cells of *P. gingivalis* mutants and their wild-type parent (ATCC 33277) were anaerobically grown in enriched BHI broth at 37°C with vigorous shaking (100 cpm). Samples were withdrawn at intervals and plated, after dilution in enriched BHI broth, on enriched tryptic soy agar plates. The plates were anaerobically incubated for 7 days at 37°C. Symbols: ○, KDP100; ●, KDP101; △, KDP102; ▲, KDP103; ◇, KDP104; ◆, ATCC 33277. S, number of surviving cells; So, number of viable cells at time 0.

新しい分野に挑戦するときには自分の得意とする手法を用いるといい

いろいろな文献に目を通すこと

材料を入手するときには伝手があるといい

研究の着想から実験、論文作成、投稿、エディターとのやり取りのすべてができて一人前の研究者

Yamakura F, Rardin RL, Petsko GA, Ringe D, Hiraoka BY, Nakayama K, Fujimura T, Taka H, Murayama K.: Inactivation and destruction of conserved Trp159 of Fe-superoxide dismutase from *Porphyromonas gingivalis* by hydrogen peroxide. **Eur J Biochem.** 1998 Apr 1;253(1):49-56.

Hiraoka BY, Yamakura F, Sugio S, Nakayama K.: A change of the metal-specific activity of a cambialistic superoxide dismutase from *Porphyromonas gingivalis* by a double mutation of Gln-70 to Gly and Ala-142 to Gln. **Biochem J.** 2000 Jan 15;345 Pt 2:345-50.

Kikuchi, Y., Ohara, N., Sato, K., Yoshimura, M., Yukitake, H., Sakai, E., Shoji, M., Naito, M., Nakayama, K.: Novel stationary-phase-upregulated protein of *Porphyromonas gingivalis* influences the production of superoxide dismutase, thiol peroxidase and thioredoxin.

Microbiology-SGM 151:841-853, 2005

Ohara, N., Kikuchi, Y., Shoji, M., Naito, M., Nakayama, K.: Superoxide Dismutase-encoding gene of the obligate anaerobe *Porphyromonas gingivalis* is regulated by the redox-sensing transcription activator OxyR.

Microbiology-SGM 152:955-966, 2006



山本健二 先生

当時、九州大学歯学部歯科薬理学教授
長崎大学歯学部歯科薬理学の助教授をされていた
ジンジバリス菌のジンジパイン遺伝子のクローニング

Construction and characterization of arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain)-deficient mutants of *Porphyromonas gingivalis*. Evidence for significant contribution of Arg-gingipain to virulence.

Nakayama K, Kadowaki T, Okamoto K, Yamamoto K.

J Biol Chem. 1995 Oct 6;270(40):23619-26.

ジンジバリス菌のRgpジンジパイン完全欠損株の作製

Genetic analyses of proteolysis, hemoglobin binding, and hemagglutination of *Porphyromonas gingivalis*. Construction of mutants with a combination of *rgpA*, *rgpB*, *kgp*, and *hagA*.

Shi Y, Ratnayake DB, Okamoto K, Abe N, Yamamoto K, Nakayama K.

J Biol Chem. 1999 Jun 18;274(25):17955-60.

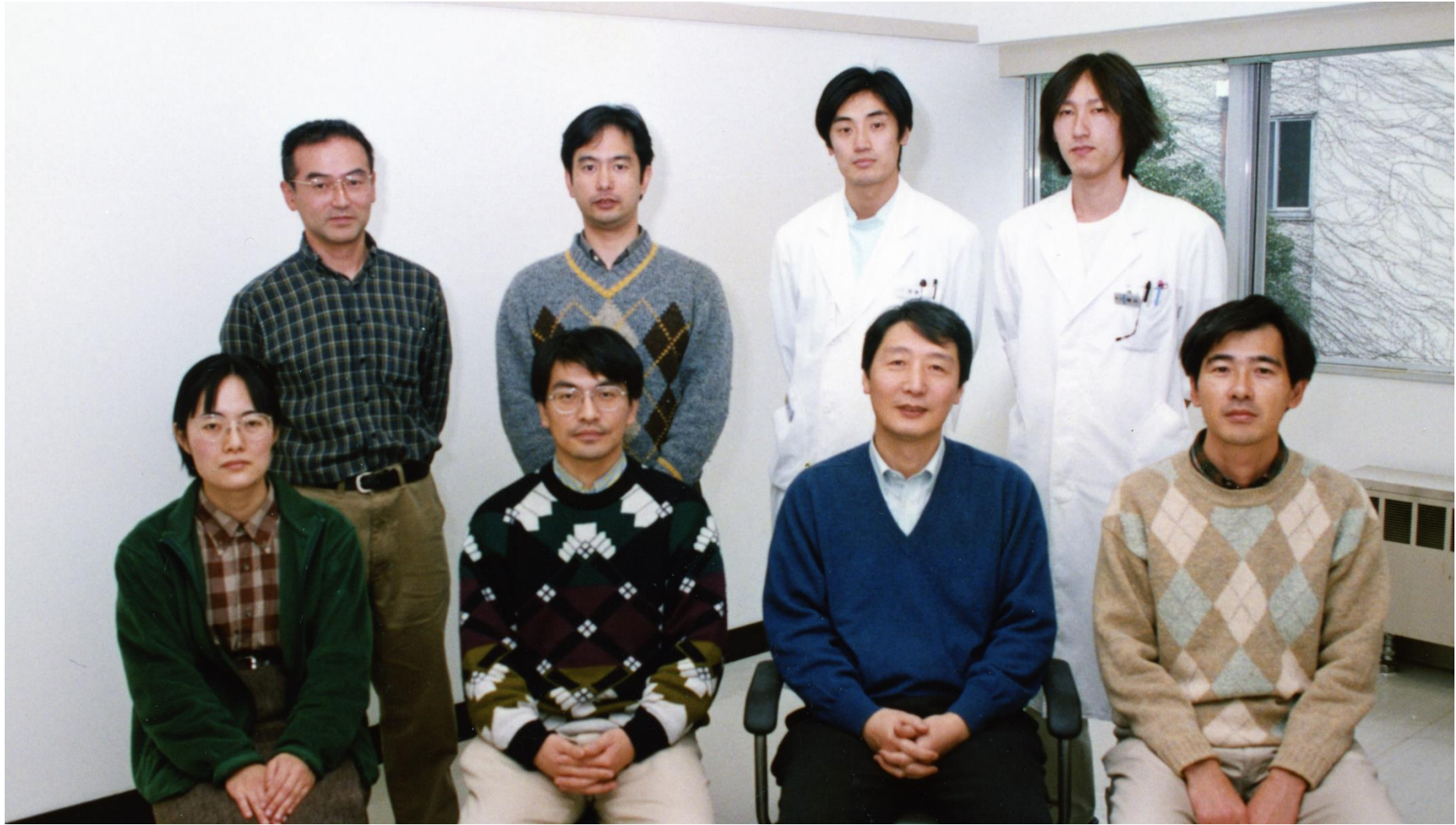
ジンジバリス菌のRgp Kgpジンジパイン完全欠損株の作製



加藤 有三 先生
当時 歯学部長



山田 毅 先生
第二代 口腔細菌学講座教授



2000年(平成12年)12月着任当時

破骨細胞分化に関する論文

Hotokezaka, H., Sakai, E., Kanaoka, K., Saito, K., Matsuo, K., Kitaura, H., Yoshida, N., and Nakayama, K.: U0126 and PD98059, specific inhibitors of MEK, accelerate differentiation of RAW264.7 cells into osteoclast-like cells. **J. Biol. Chem.** 277(49):47366-47372, 2002

Kitaura, H., Nagata, N., Fujimura, Y., Hotokezaka, H., Yoshida, N., and Nakayama, K.: Effect of IL-12 on TNF- α -mediated osteoclast formation in bone marrow cells: apoptosis mediated by Fas/Fas ligand interaction. **J. Immunol.** 169(9):4732-4738, 2002

Nagata, N., Kitaura, H., Yoshida, N., and Nakayama, K.: Inhibition of RANKL-induced osteoclast formation in mouse bone marrow cells by IL-12: involvement of IFN- γ possibly induced from non-T cell population. **Bone** 33:721-732, 2003

Saito, K., Ohara, N., Hotokezaka, H., Fukumoto, S., Yuasa, K., Naito, M., Fujiwara, T., and Nakayama, K.: Infection-induced up-regulation of the costimulatory molecule 4-1BB in osteoblastic cells and its inhibitory effect on M-CSF/RANKL-induced in vitro osteoclastogenesis. **J. Biol. Chem.** 279(14):13555-13563, 2004

Fujimura, Y., Hotokezaka, H., Ohara, N., Naito, M., Sakai, E., Yoshimura, M., Narita, Y., Kitaura, H., Yoshida, N. and Nakayama, K.: Hemoglobin receptor protein (HbR) of *Porphyromonas gingivalis* inhibits receptor activator NF- κ B ligand-induced osteoclastogenesis from bone marrow macrophages. **Infect. Immun.** 74(5):2544-2551, 2006

トランスポゾン変異導入

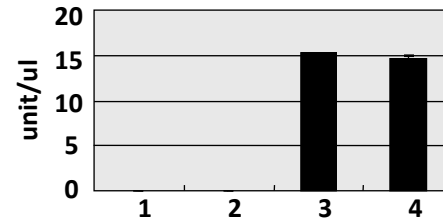
rgpA rgpB kgp

野生株

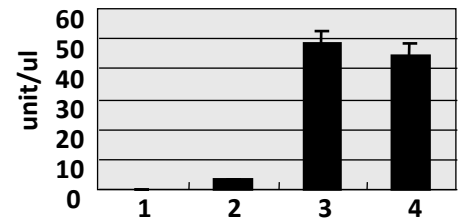
porT



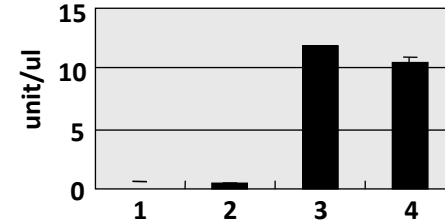
(1) Kgp (cell lysate)



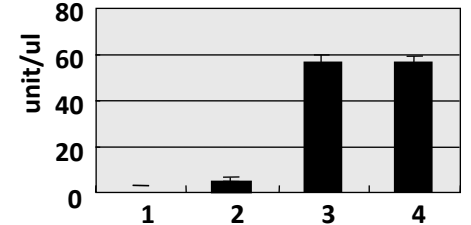
(2) Rgp (cell lysate)



(3) Kgp (supernatant)

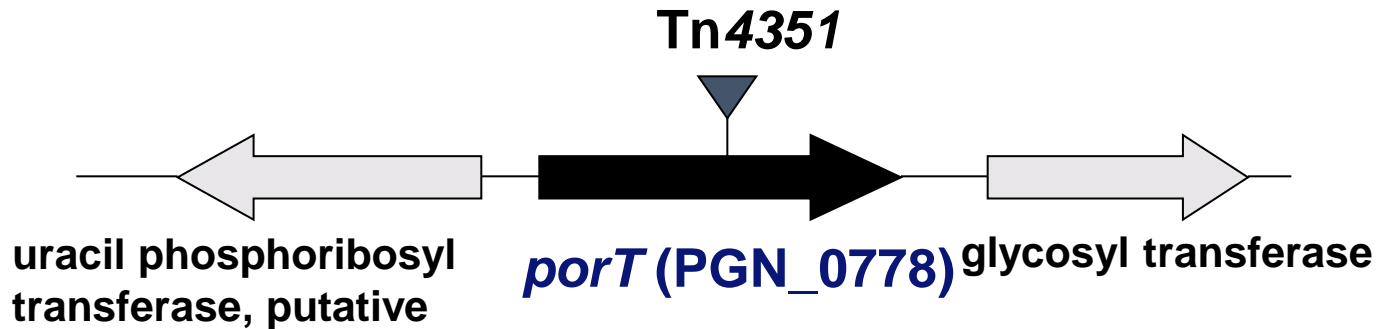


(4) Rgp (supernatant)



1: *kgp rgpA rgpB*
 2: *porT*
 3: *porT porT⁺*
 4: wild type

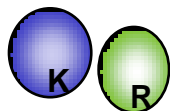
トランスポゾンDNAの挿入部位



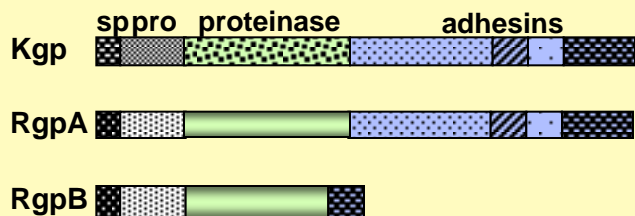
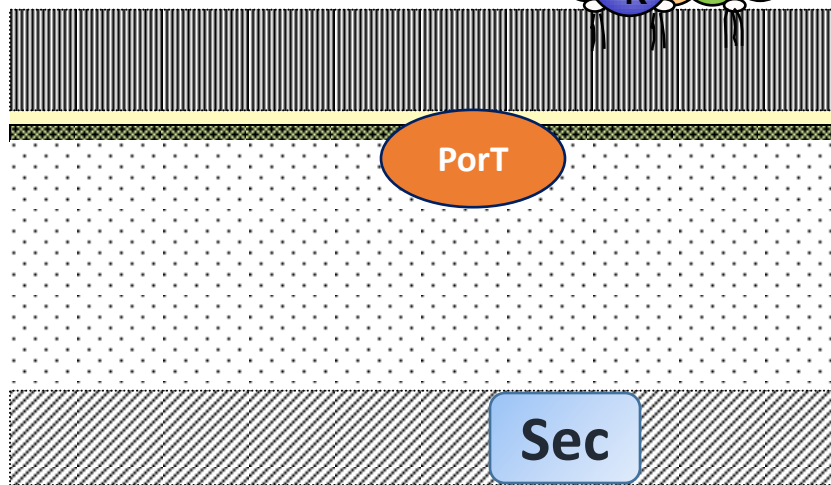
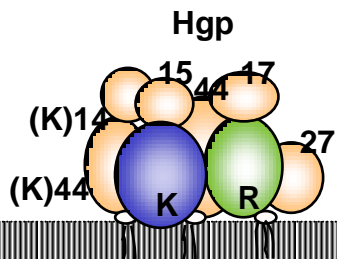
野生株



単量体



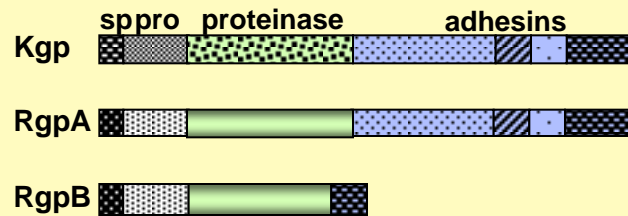
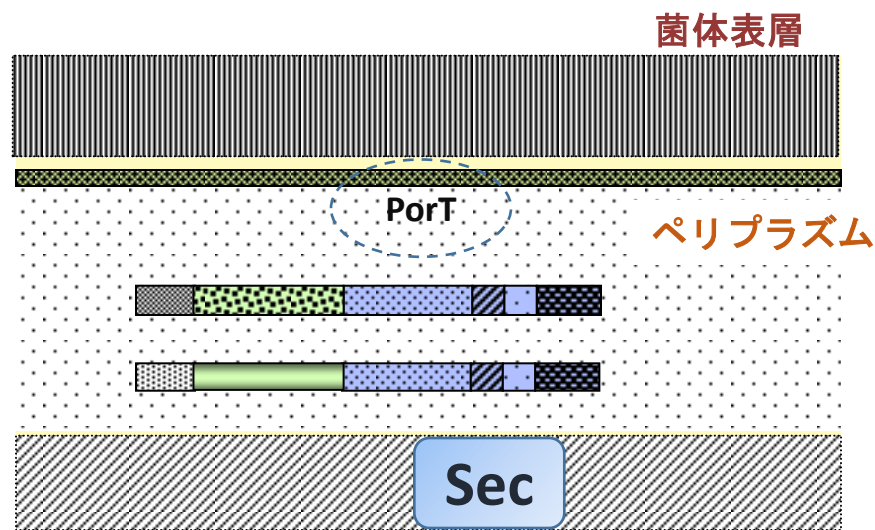
複合体

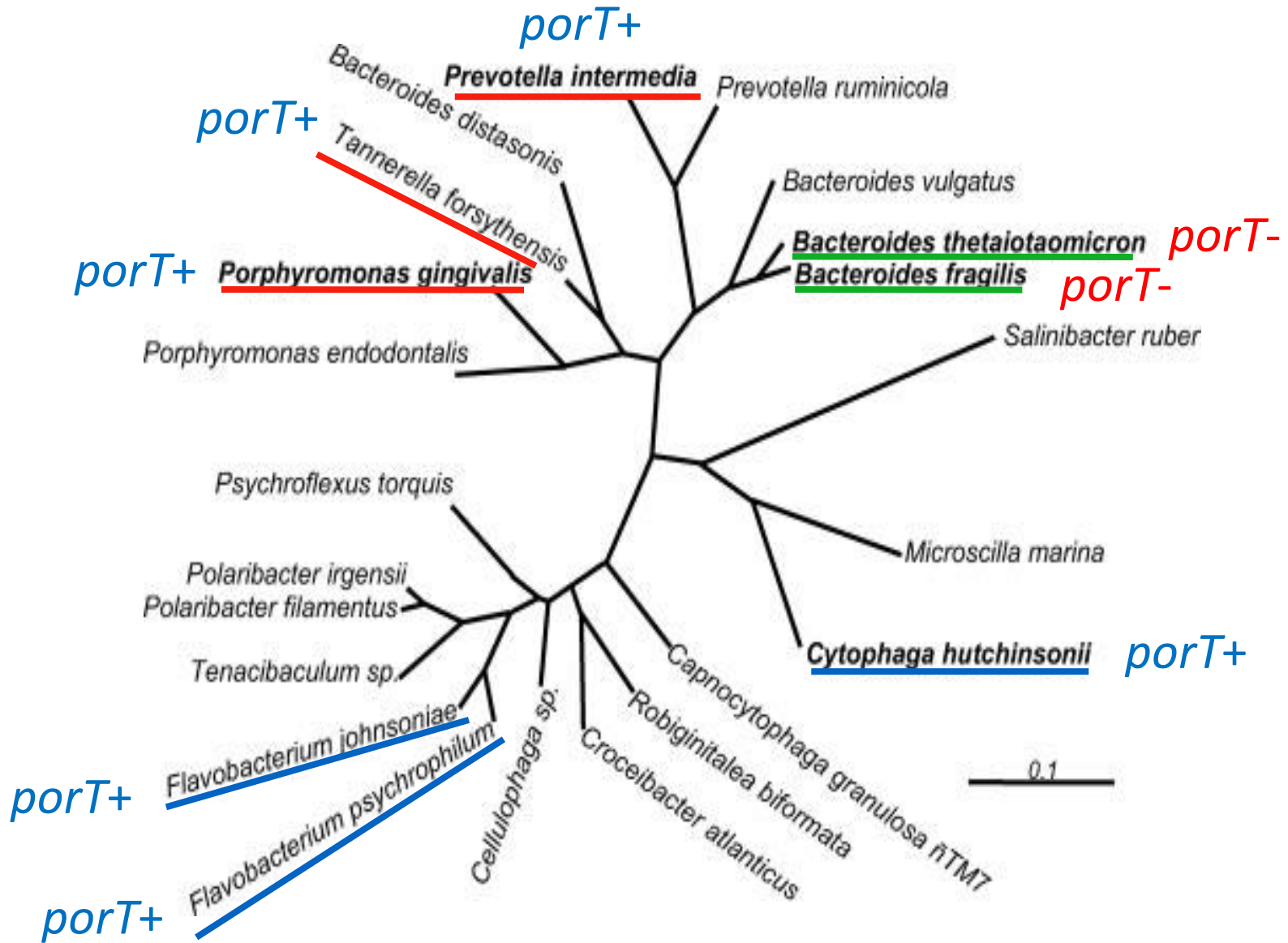


porT 変異株



Sato et al. J Biol Chem 2005

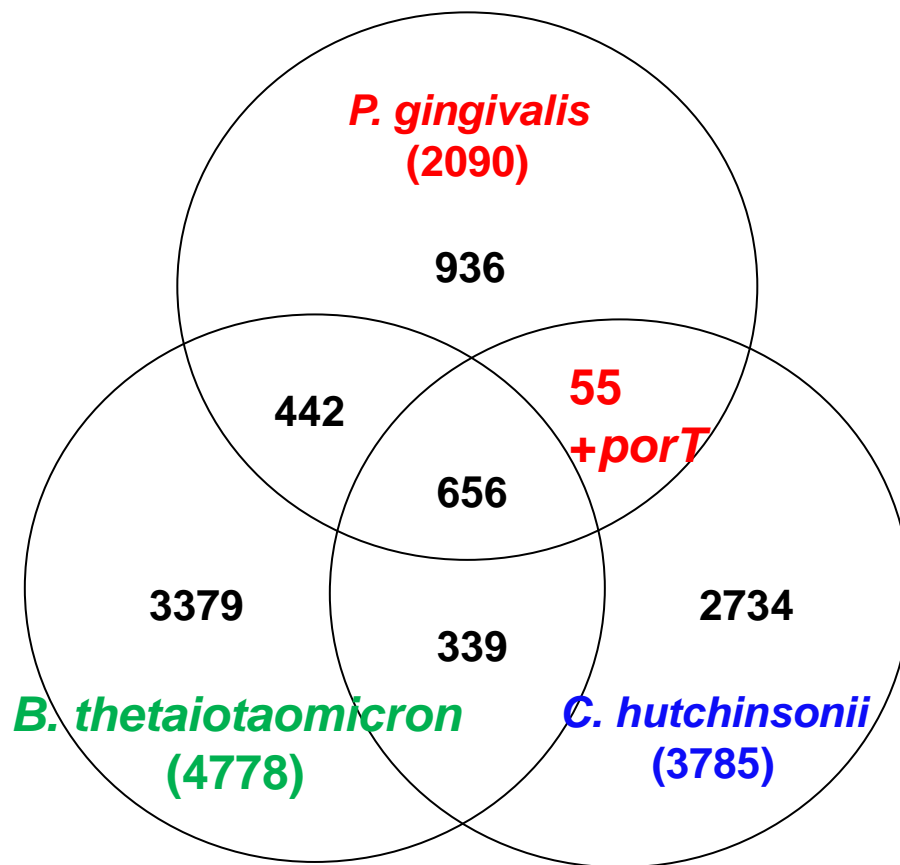






平川英樹 主任研究員
かずさDNA研究所
植物ゲノム研究部
情報解析施設長

当時、九大農学部



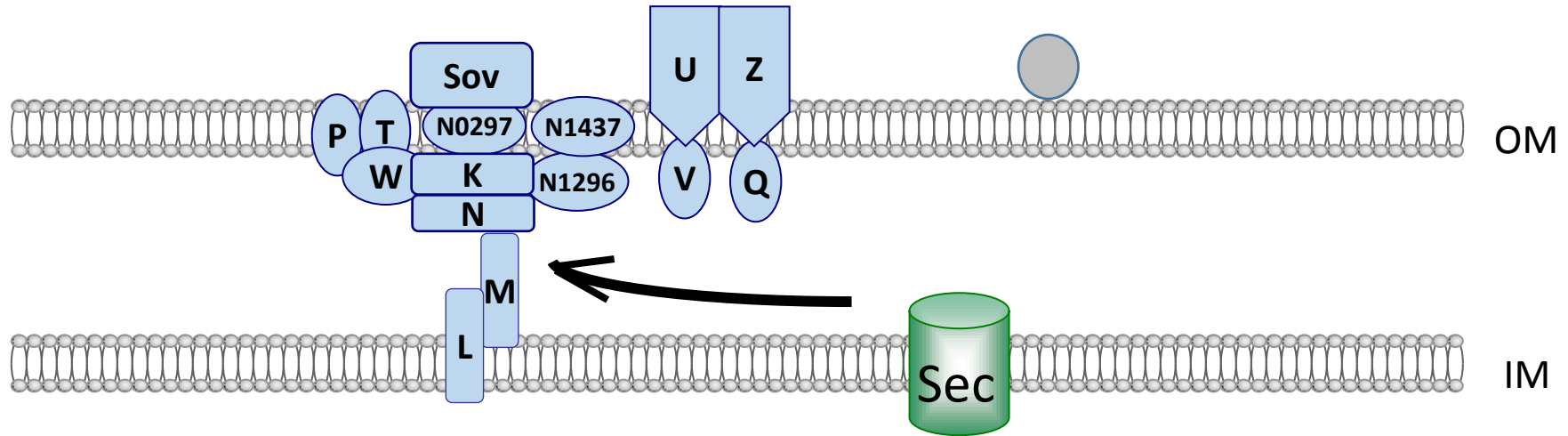
ベン図解析

*porT*と同じグループの55遺伝子中の46遺伝子についてジンジバリス菌の変異株を作製したところ、下記の10遺伝子変異株が*porT*変異株と同じ性状を示した。

Sato et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010

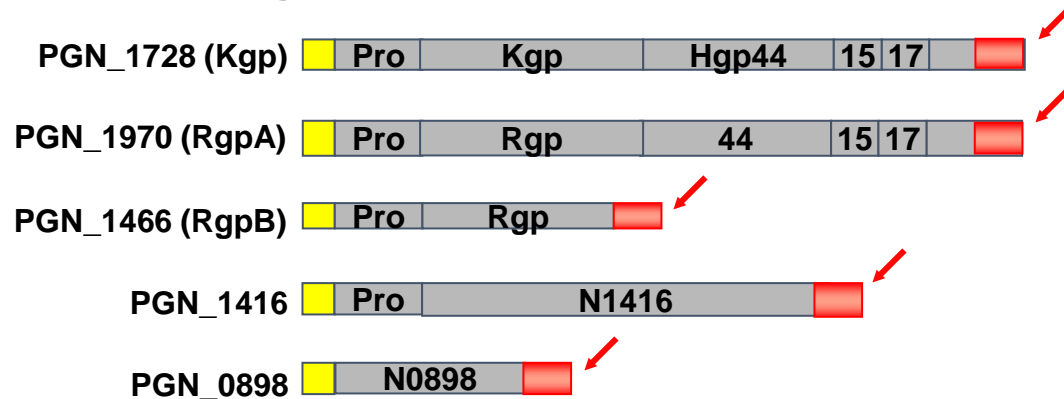
PGN	Gene	<i>C. hutchinsonii</i>	<i>F. johnsoniae</i>	Putative function
0022	<i>porU</i>	CHU3237	Fjoh1556	未知タンパク質
0645	<i>porQ</i>	CHU2991	Fjoh2755	未知タンパク質
0832	<i>sov</i>	CHU0029	Fjoh1653 <i>sprA</i>	滑走運動関連タンパク質 SprA
1019	<i>porX</i>	CHU1040	Fjoh2906	二成分制御系調節タンパク質
1674	<i>porM</i>	CHU0173	Fjoh1855 <i>gldM</i>	滑走運動関連タンパク質 GldM
1675	<i>porL</i>	CHU0172	Fjoh1854 <i>gldL</i>	滑走運動関連タンパク質 GldL
1676	<i>porK</i>	CHU0171	Fjoh1853 <i>gldK</i>	滑走運動関連タンパク質 GldK
1677	<i>porP</i>	CHU0170	Fjoh3477	未知タンパク質
1877	<i>porW</i>	CHU0177	Fjoh1051 <i>sprE</i>	滑走運動関連タンパク質 SprE
2001	<i>porY</i>	CHU0334	Fjoh1592	二成分制御系センサータンパク質

ジンジバリス菌の9型分泌機構

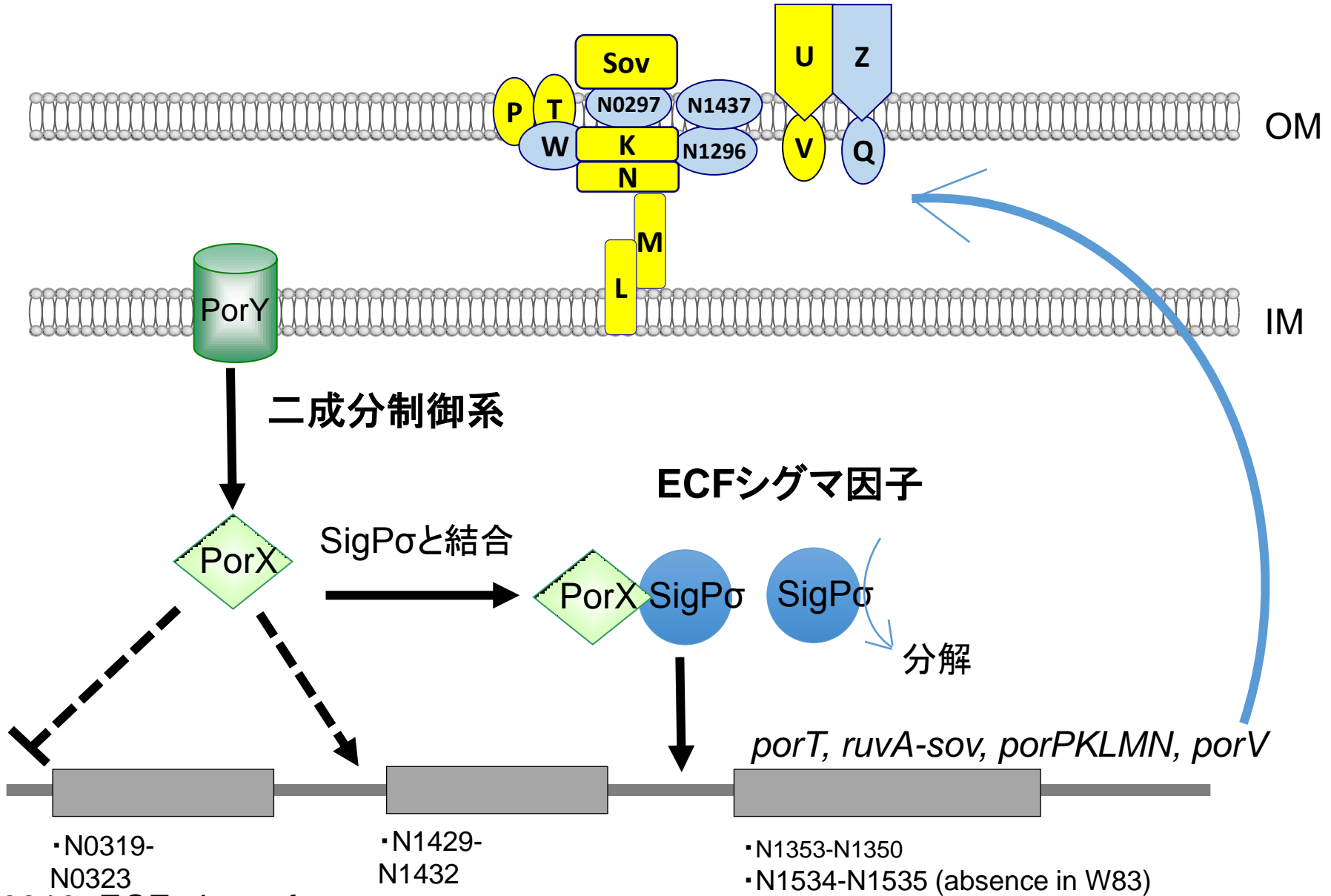


Signal peptide

T9SS_CTD_signal



PorXY二成分制御系—SigP シグマ因子直列調節



N0319: ECF-sigma factor

N1430: Acr-type transporter

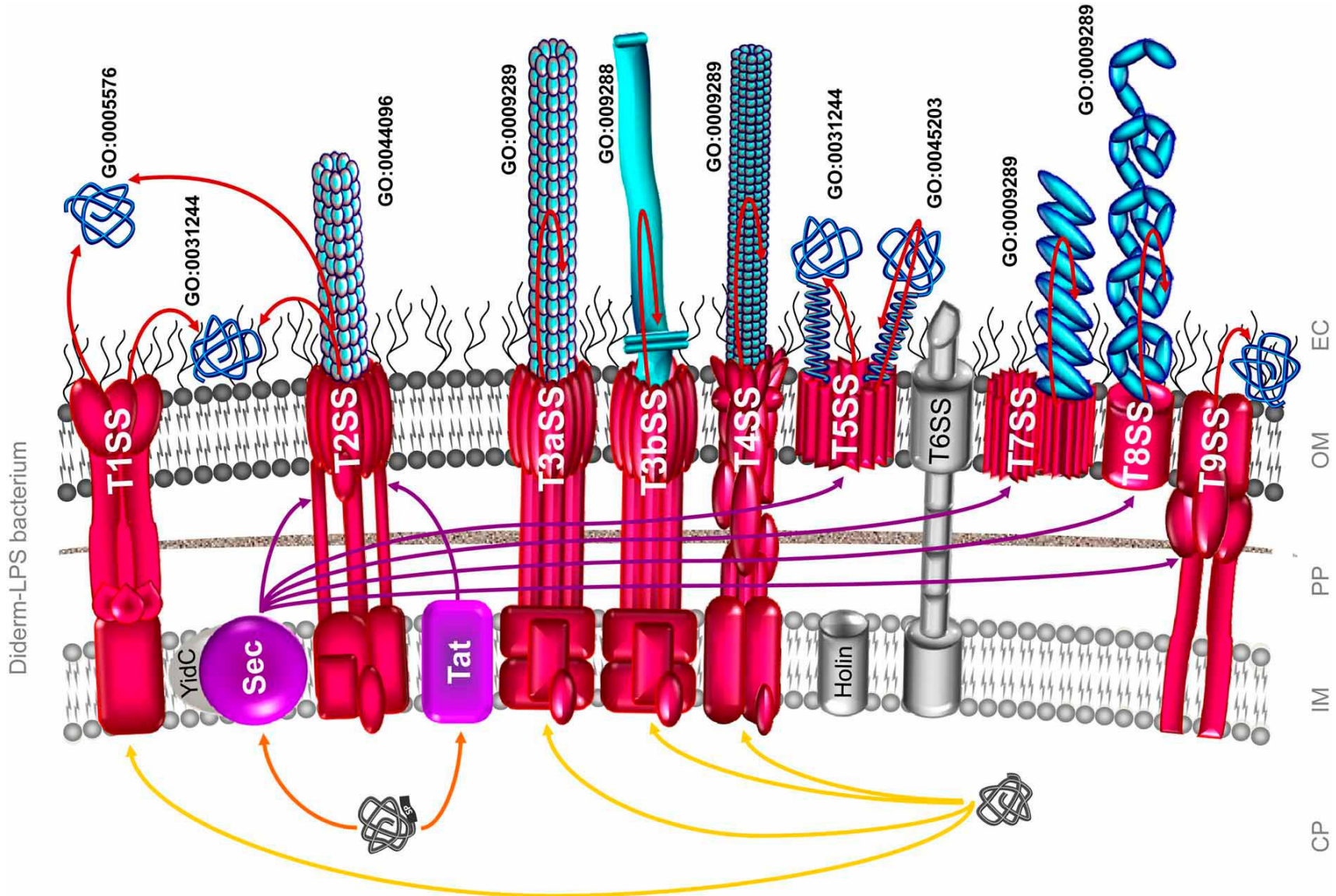
Kadowaki et al. Sci Rep, 2016
Yukitake et al. 未発表

ジンジバリス菌のT9SSによって分泌されるCTDタンパク質

PGN_1728	<i>kgp</i> , リシン特異的ジンジパイン
PGN_1733	<i>hagA</i> , ヘマグルチニン
PGN_1970	<i>rgpA</i> , アルギニン特異的ジンジパインA
PGN_1466	<i>rgpB</i> , アルギニン特異的ジンジパインB
PGN_0152	<i>tapA</i> , 61-kDa 抗原タンパク質, PG91 Kondo et al. IAI, 2010
PGN_0659	<i>hbp35</i> , 35-kDa ヘミン結合タンパク質 Shoji et al. BMC Micro, 2010
PGN_0291	未同定
PGN_0335	CPG70, 亜鉛カルボキシペプチダーゼ
PGN_0654	リポタンパク質
PGN_0795	未同定
PGN_0898	ペプチジルアルギニン・デイミナーゼ
PGN_1476	未同定
PGN_1767	46-kDa 抗原タンパク質, PG99
PGN_1416	<i>pepK</i> , リシン特異的ペプチダーゼ Nonaka et al. FEMS ML, 2014
PGN_0123	未同定

その他

ジンジパン分泌機構は新しい分泌機構 (T9SS)



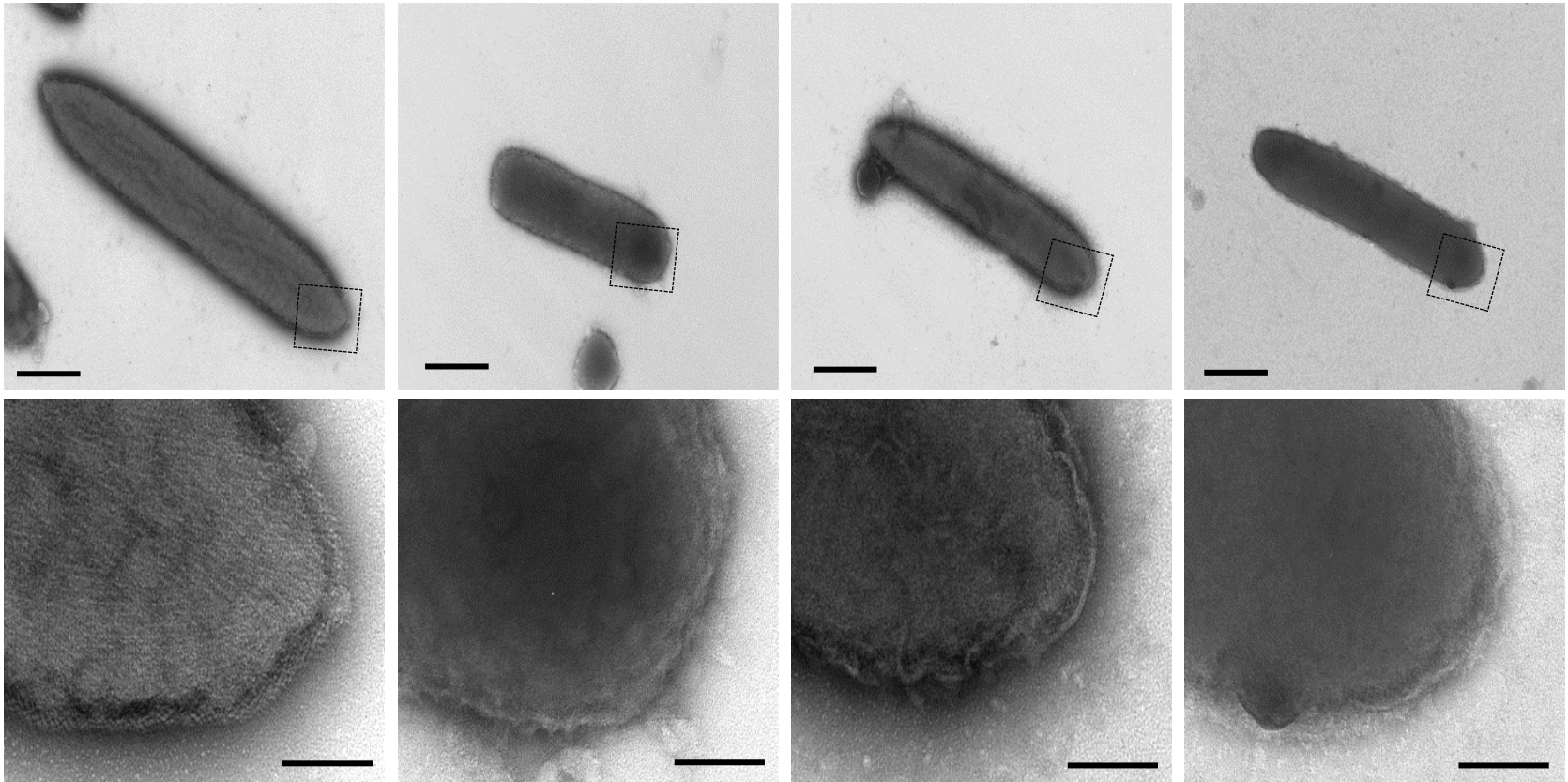
歯周病細菌 *Tannerella forsythia* の T9SS 欠損変異株は S-layer を形成しない。

WT

porK

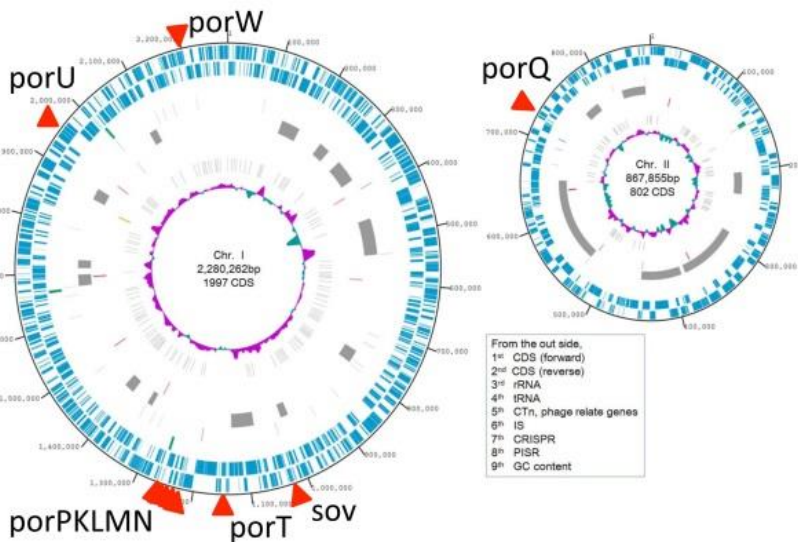
porT

sov



歯周病細菌 *Prevotella intermedia* のT9SS欠損変異株は血球凝集が起こらず、黒色集落を形成せず、タンパク質分解酵素Interpain Aを分泌せず、バイオフィルムを形成しない。

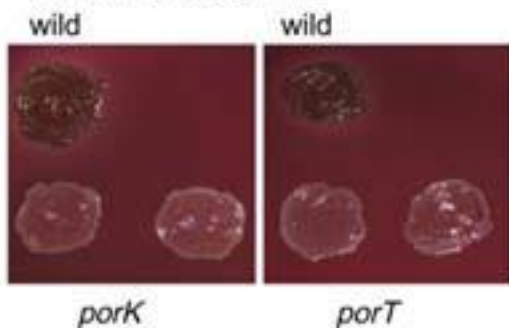
Naito et al. 投稿中



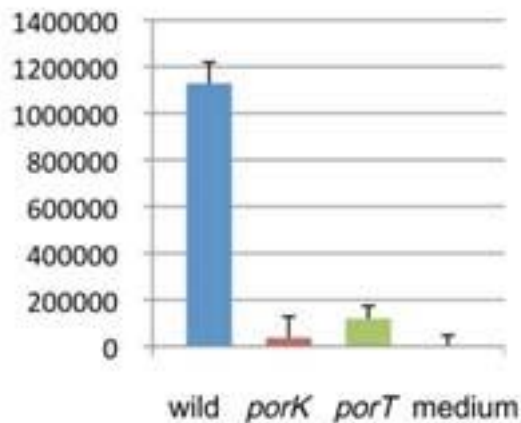
赤血球凝集試験



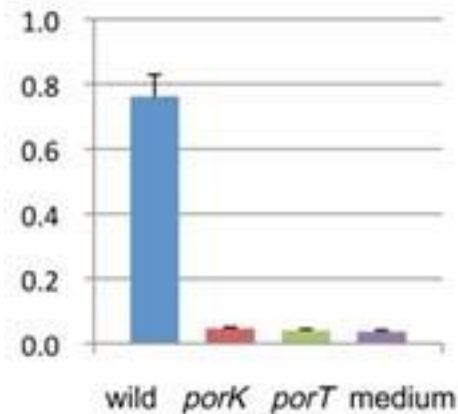
a) 黒色色素産生性



Interpain A 活性



バイオフィルム形成能



バクテロイデーテス門細菌のT9SSと病原性

歯周病

- *Porphyromonas gingivalis*
- *Tannerella forsythia*
- *Prevotella intermedia*
- *Capnocytophaga ochracea*



カプノサイトファーガ感染症

- *Capnocytophaga canimorsus*
- *Capnocytophaga cynodegmi*



魚病原菌

- *Tenacibaculum maritimum* (滑走細菌症)
- *Flavobacterium psychrophilum* (アユ冷水病)
- *Flavobacterium columnare* (カラムナリス病)
- *Flavobacterium branchiophilum* (細菌性鰓病)



鳥病原菌

- *Riemerella anatipestifer*

歯周病細菌のゲノム解析

Naito M, Hirakawa H, Yamashita A, Ohara N, Shoji M, Yukitake H, Nakayama K, Toh H, Yoshimura F, Kuhara S, Hattori M, Hayashi T, and Nakayama K.: Determination of the genome sequence of *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 and genomic comparison with strain W83 revealed extensive genome rearrangements in *P. gingivalis*. **DNA Res.**, 15(4): 215-225, 2008

Naito M, Ogura Y, Itoh T, Shoji M, Okamoto M, Hayashi T, and Nakayama K: The complete genome sequencing of *Prevotella intermedia* strain OMA14 and a subsequent fine-scale, intra-species genomic comparison reveal an unusual amplification of conjugative and mobile transposons and identify a novel *Prevotella*-lineage-specific repeat. **DNA Res.** 23(1):11-19, 2016

自分の発想を大切にすること

その分野の専門家の協力を仰ぐこと

いいスタッフ、大学院生に恵まれること

学外共同研究者はその分野の第一人者であるといい

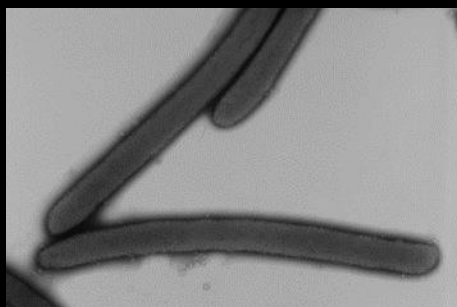
T9SSは滑走運動と関係がある

滑走関連
タンパク質

歯周病原菌
9型分泌機構関連
タンパク質

滑走運動

Flavobacterium johnsoniae
(ジョンソニエ菌)

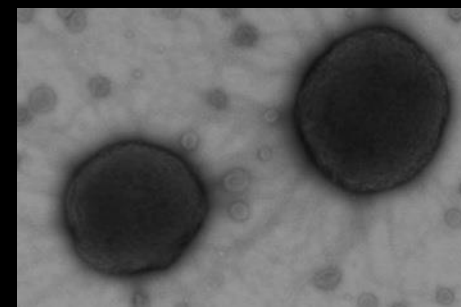


Gene ID	Name	Gene ID
Fjoh_ 1516	gldA	-
Fjoh_ 1793	gldB	PGN_ 1061
Fjoh_ 1794	gldC	-
Fjoh_ 1540	gldD	-
Fjoh_ 2722	gldF	-
Fjoh_ 2721	gldG	-
Fjoh_ 0890	gldH	PGN_ 1566
Fjoh_ 2369	gldI	PGN_ 0743
Fjoh_ 1557	gldJ	PGN_ 1676
Fjoh_ 1853	gldK (porK)	PGN_ 1676
Fjoh_ 1854	gldL (porL)	PGN_ 1675
Fjoh_ 1855	gldM (porM)	PGN_ 1674
Fjoh_ 1856	gldN (porN)	PGN_ 1673
Fjoh_ 1653	sprA (sov)	PGN_ 0832
Fjoh_ 0979	sprB	-
Fjoh_ 1051	sprE (PorW)	PGN_ 1877
Fjoh_ 3477	porP	PGN_ 1677
Fjoh_ 1466	sprT (porT)	PGN_ 0778
Fjoh_ 1556	porU	PGN_ 0022
Fjoh_ 2906	porX	PGN_ 1019
Fjoh_ 1592	porY	PGN_ 2001

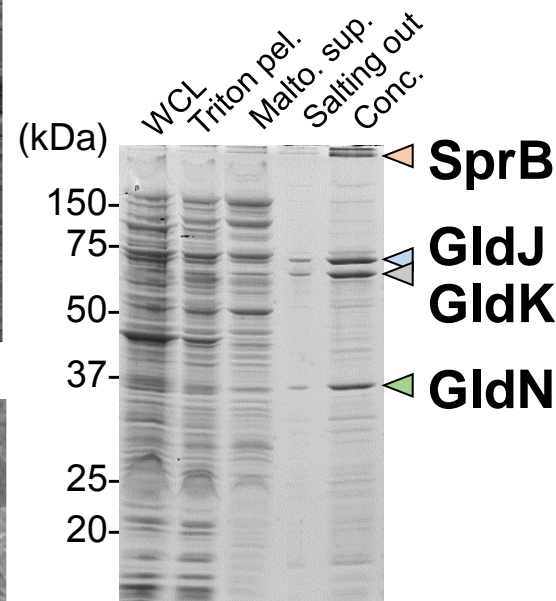
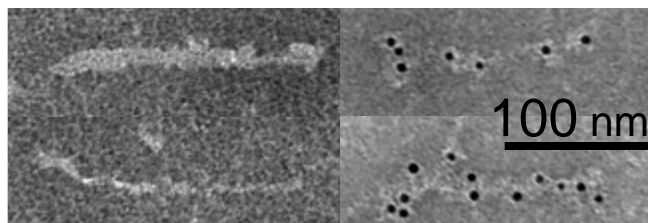
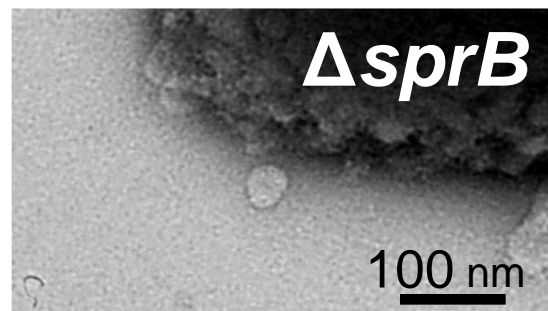
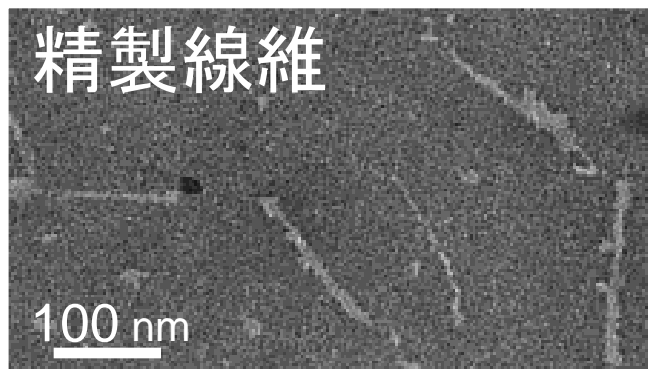
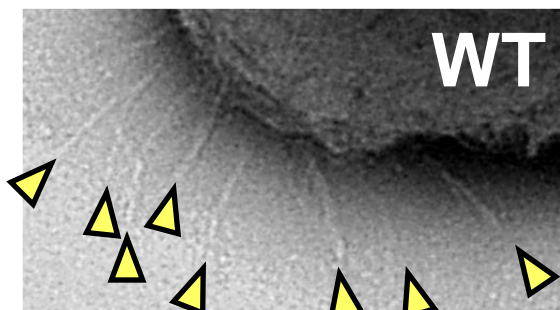
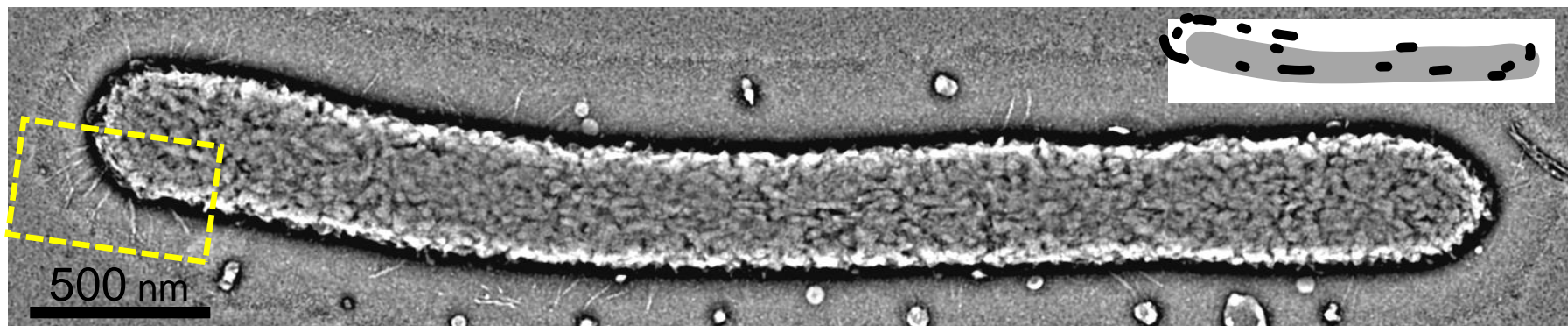
Sato, et al (2010) PNAS
McBride, Zhu. (2013) J.Bac

非運動性

Porphyromonas gingivalis
(ジンジバリス菌)



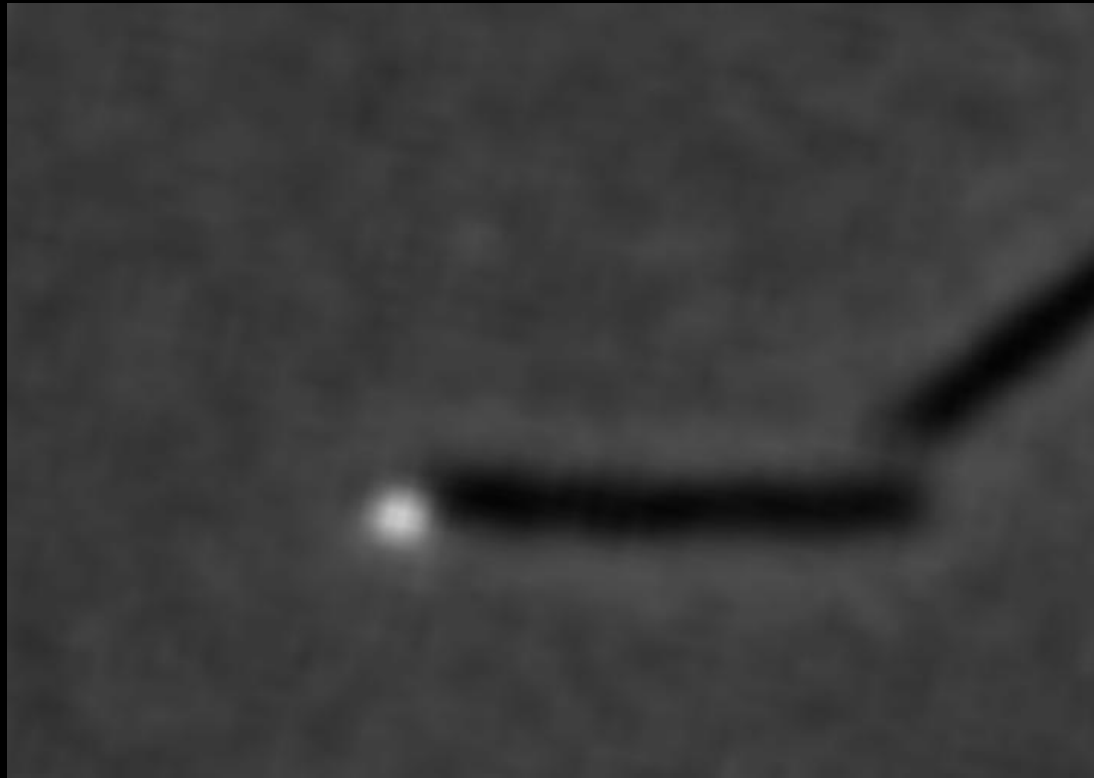
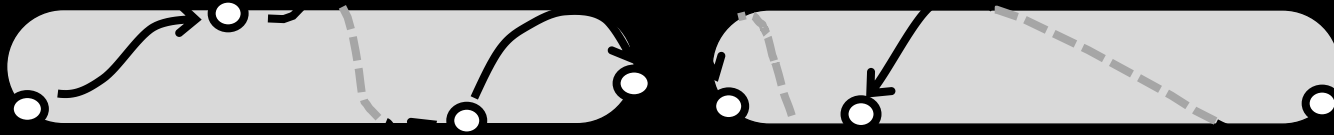
ジョンソニエ菌の菌体表層構造



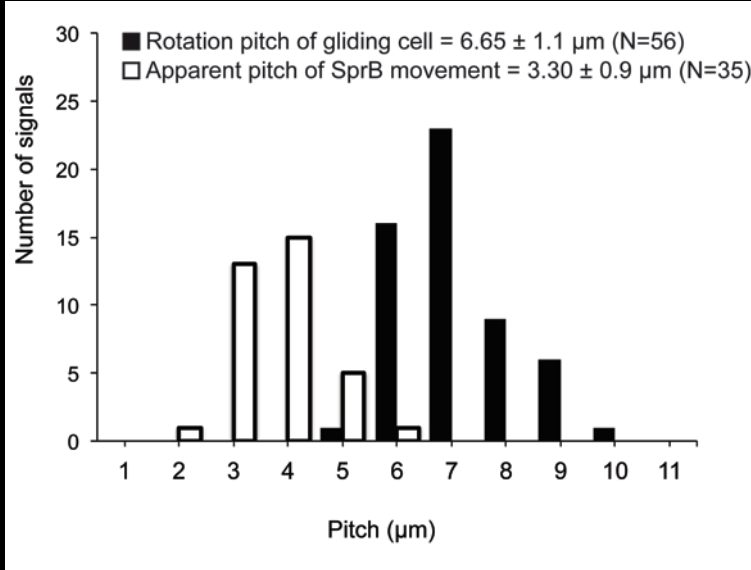
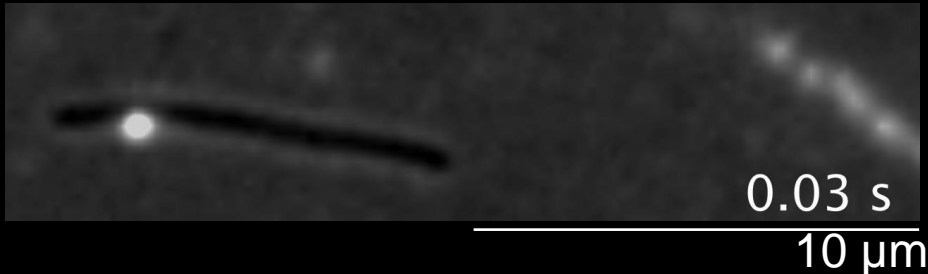
150 nmの線維状構造物はSprB

SprBは菌体表面を左巻きラセン状に動く

全反射顕微鏡での観察



菌体上の定点を標識：
 菌体は進行方向に向かって反時計回りに回転しながら滑走している



回転ピッチ = $6.7 \pm 1.1 \mu\text{m}$ (N=56)

SprBの見かけのらせんピッチ = $3.3 \pm 0.9 \mu\text{m}$ (N=35)
 (滑走装置のピッチは $6.6 \mu\text{m}$)

菌体の長さ = $6.5 \pm 1.5 \mu\text{m}$ (N=116)

滑走装置は菌体上で左巻き1ターンのらせん構造をしている

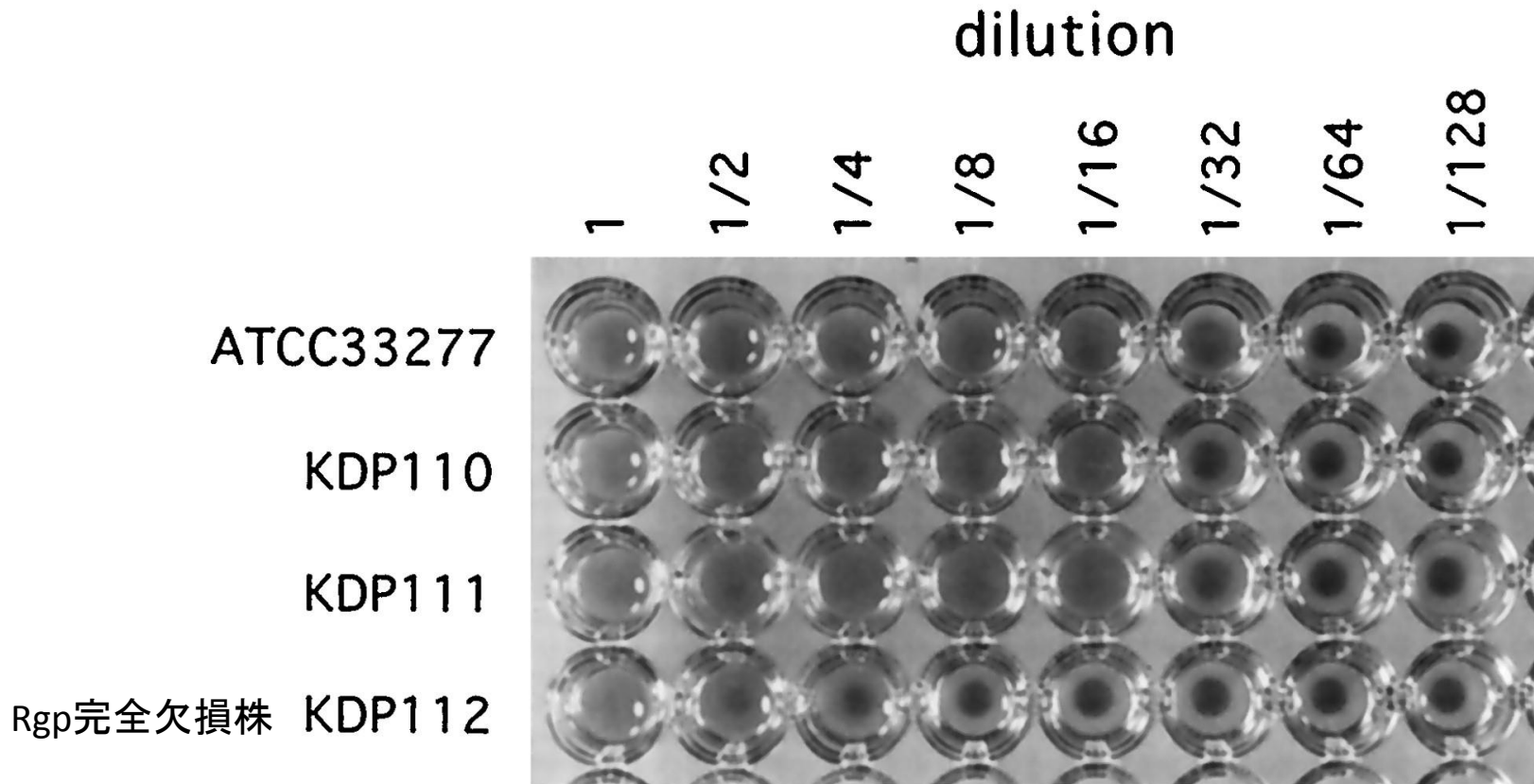
必要な場合は新しい解析技術にも果敢に挑戦すること

映像表現はインパクトがある(百聞は一見に如かず)

自分の研究分野を支える基礎的な科学に関心をもつこと

ジンジバリス菌の線毛についての研究

Hemagglutinating activity of the *rgp* mutants.



Koji Nakayama et al. J. Biol. Chem. 1995;270:23619-23626

Infect Immun. 1994 Aug;62(8):3305-10.

Hemagglutinating and chemotactic properties of synthetic peptide segments of fimbrial protein from *Porphyromonas gingivalis*.

Ogawa T, Hamada S.

Porphyromonas gingivalis 381 fimbriae, their synthetic peptide segments, and lipopolysaccharide (LPS) were examined for hemagglutinating and migration-stimulating activities. *P. gingivalis* 381 fimbriae clearly caused hemagglutination, and several oligopeptide segments such as FP381(61-80), FP381(171-185), and FP381(302-321), corresponding to the amino acid residue numbers based on the amino acid sequence of fimbrillin proposed by Dickinson et al. (D. P. Dickinson, M. A. Kubinieć, F. Yoshimura, and R. J. Genco, J. Bacteriol. 170:1658-1665, 1988), were also demonstrated to agglutinate erythrocytes although less effectively than the native fimbriae. Furthermore, *P. gingivalis* 381 LPS but not *Escherichia coli* O55:B5 LPS definitely exhibited hemagglutination. *P. gingivalis* fimbriae as well as their synthetic peptides possessing hemagglutinating activity enhanced the chemotaxically induced migration of human peripheral blood monocytes. The results of the analyses using synthetic peptide FP381(61-80), its related compounds, and an analog suggested that the amino acid sequence XLTXLTXNXX within fimbrial protein molecules may play an important role structurally in the attachment of the protein to host cells such as erythrocytes and monocytes.

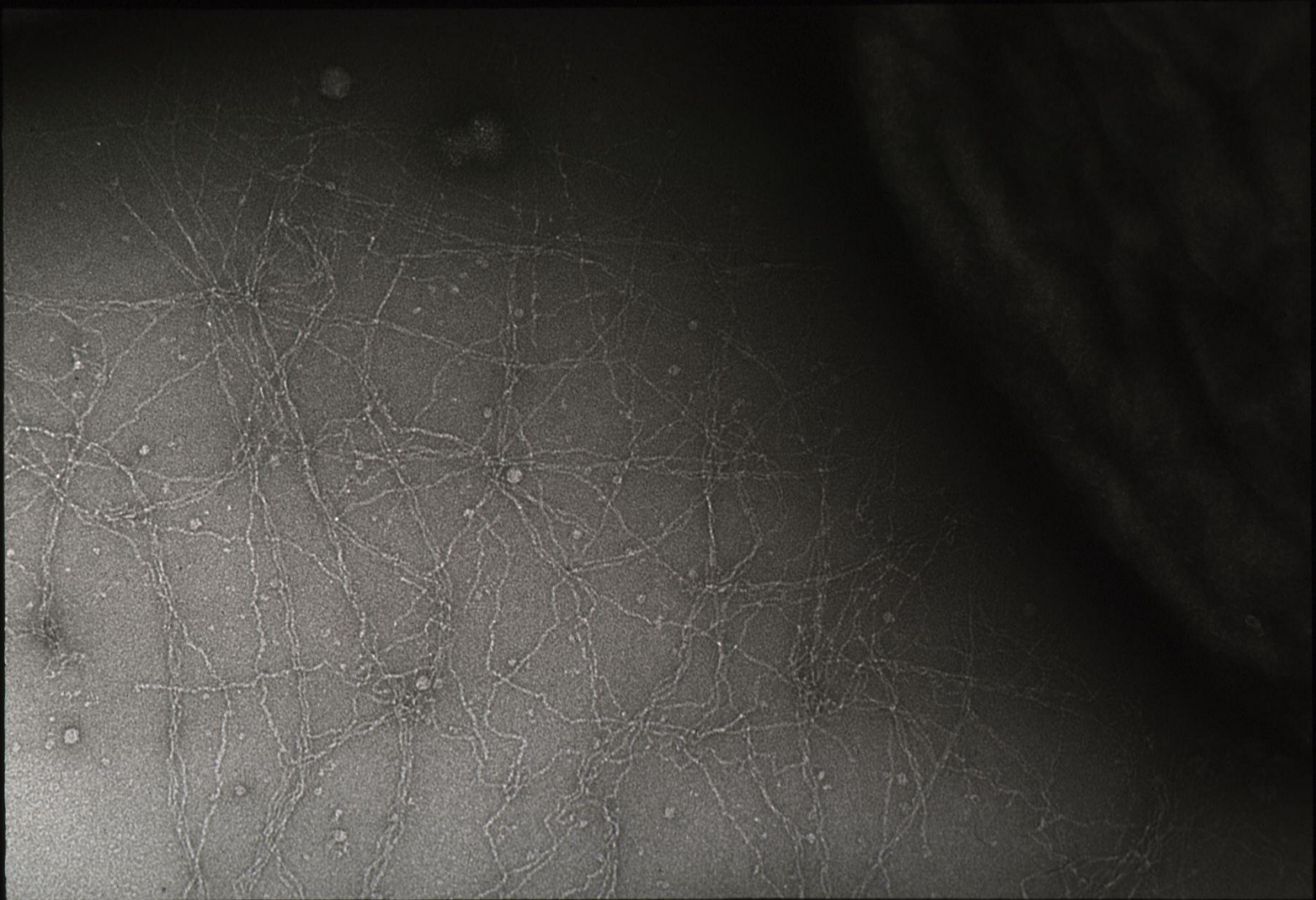
J Bacteriol. 1984 Dec;160(3):949-57.

Purification and characterization of a novel type of fimbriae from the oral anaerobe *Bacteroides gingivalis*.

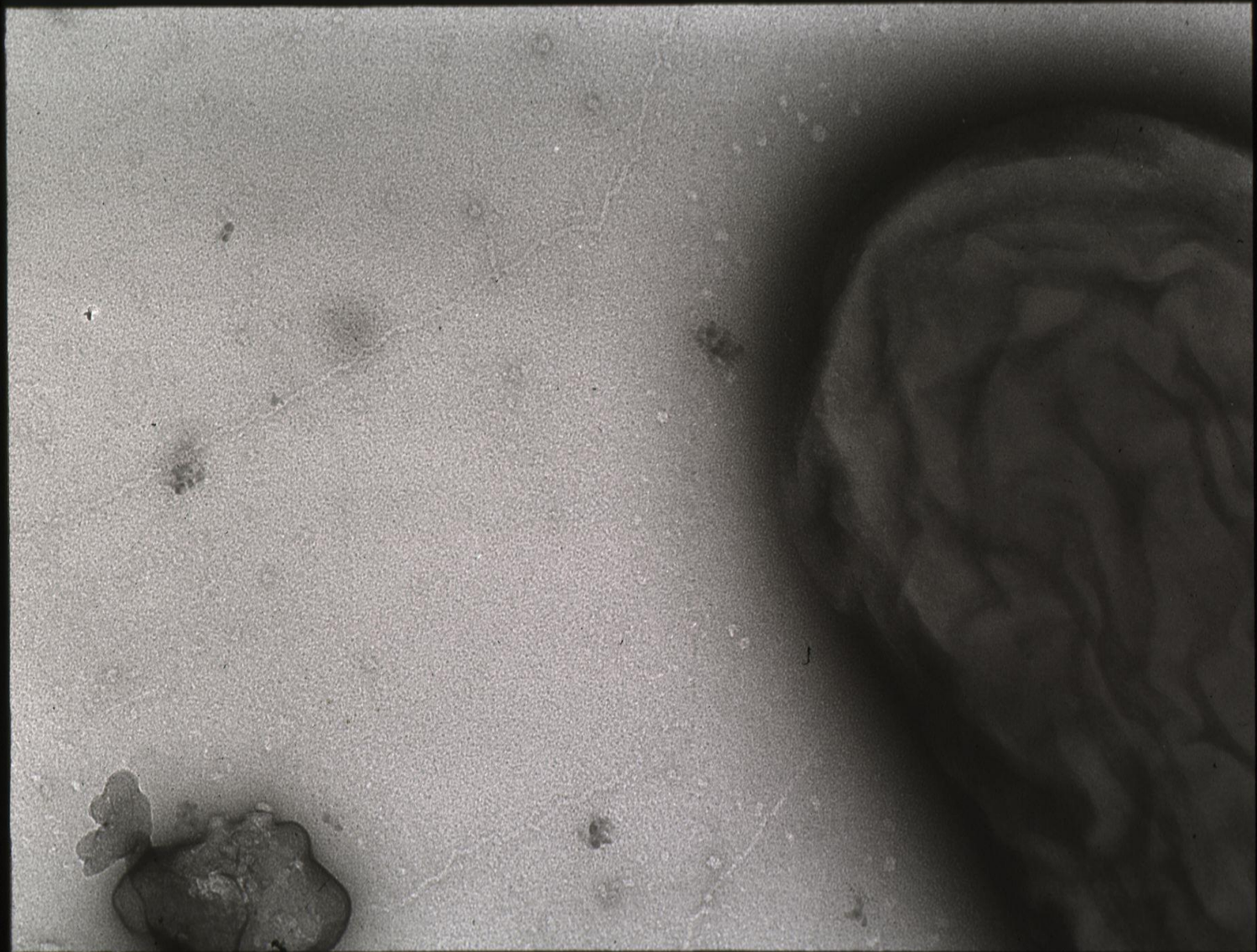
Yoshimura F, Takahashi K, Nodasaka Y, Suzuki T

Fimbriae and their constituent protein (fimbrilin) were purified to homogeneity from the bacterial wash fluid and cell lysate fraction, respectively, of *Bacteroides gingivalis* 381. Fimbriae, observed by negative staining, were curly, single-stranded filaments with a diameter of ca. 5 nm. The apparent molecular weight of the fimbrilin was 43,000. Fimbriae were resistant to sodium dodecyl sulfate denaturation at 70 degrees C. Heating at 100 degrees C in sodium dodecyl sulfate was needed to completely dissociate them to monomers of fimbrilin. Different sets of antigenic determinants seemed to be exposed on the surfaces of fimbriae and sodium dodecyl sulfate-denatured fimbrilin. **Purified fimbriae did not show either hemagglutinating activity or hemagglutination inhibitory activity**, although it has been inferred on the basis of circumstantial evidence that fimbriae are correlated to hemagglutinating activity of the organism. Hemagglutinin activity, however, was detected in culture supernatant, and this observation suggests that fimbriae of a different type or a lectin-like protein may be acting as hemagglutinin in *B. gingivalis*.

ジンジバリス菌野生株（ATCC33277）の線毛



Rgp完全欠損株 (*rgpA rgpB*) の線毛



FimAピリンおよびMfa1ピリンのN末端アミノ酸配列

FimA

19

RGP?



MKKTKFFLLGLAALAMTACNKDNEAEPVTEGNATISVVLKTSNSNRAFGVG

成熟型

43 kDa

Mfa1

20

RGP?

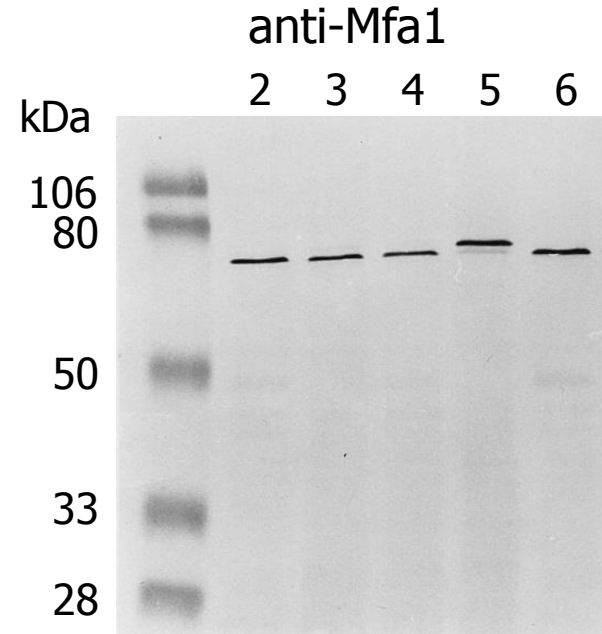
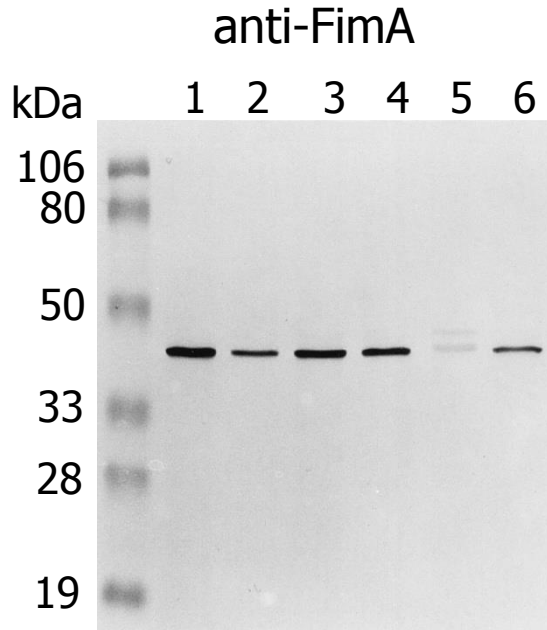


MKLNKMFLVGALLSLGFASCSKEGNGPDPDNAAKSYMSMTLSMPMGSARA

成熟型

75 kDa

FimAピリンおよびMfa1ピリンの形成へのRgpプロテアーゼの関与



1. purified pilin
2. 33277
3. KDP110 (*rgpA*)
4. KDP111 (*rgpB*)
5. KDP112 (*rgpA rgpB*)
6. KDP113 (*rgpB+*)

FimAピリンおよびMfa1ピリンのN末端アミノ酸配列

FimA

19

MKKTKFFLLGLAALAMTACNKDNEAEPVTEGNATISVVLKTSNSNRAFGVG

RGP



成熟型

43 kDa

Mfa1

20

MKLNKMFLVGALLSLGFASC SKEGNGPDPDNAAKSYMSMTLSMPMGSARA

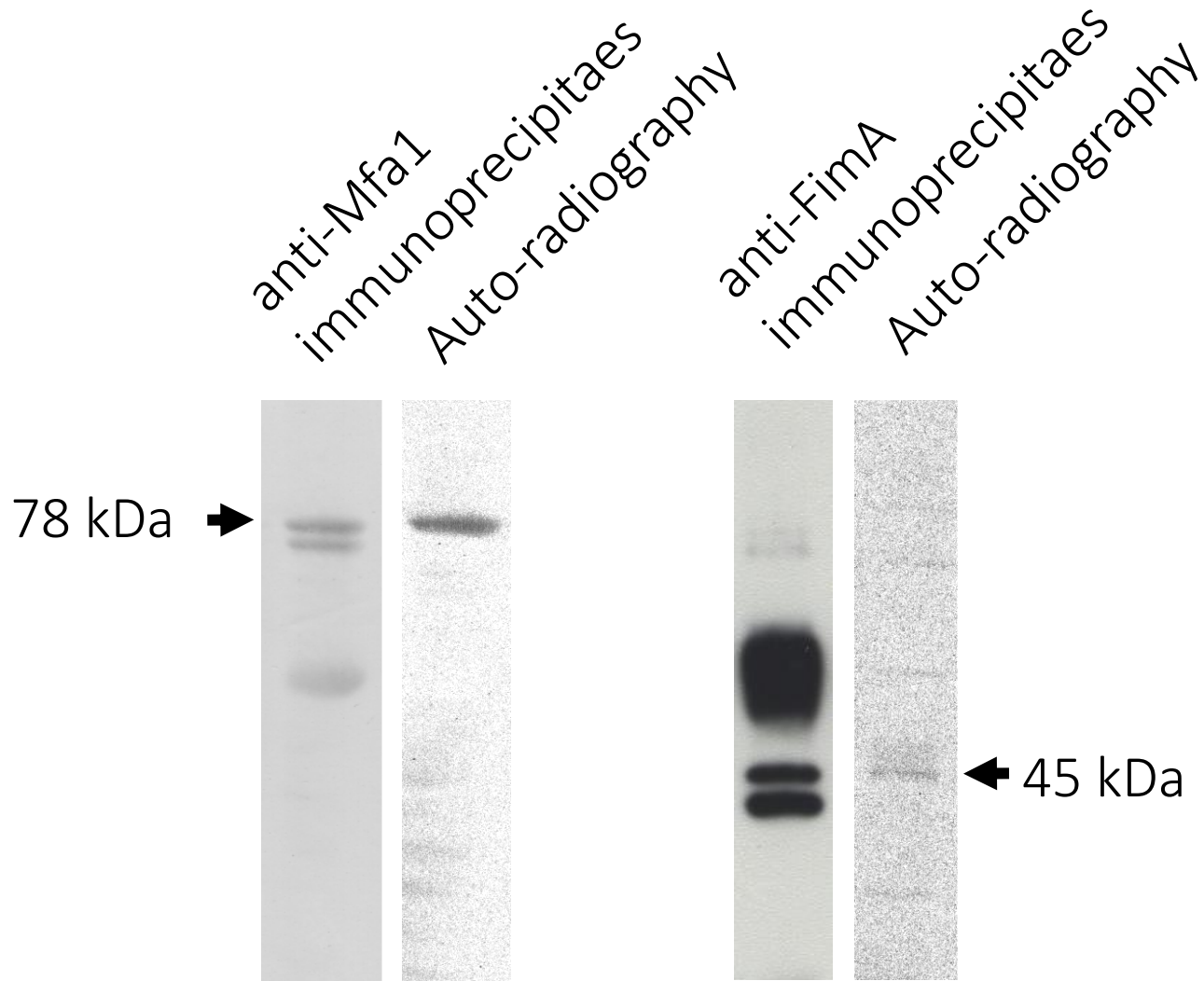
RGP



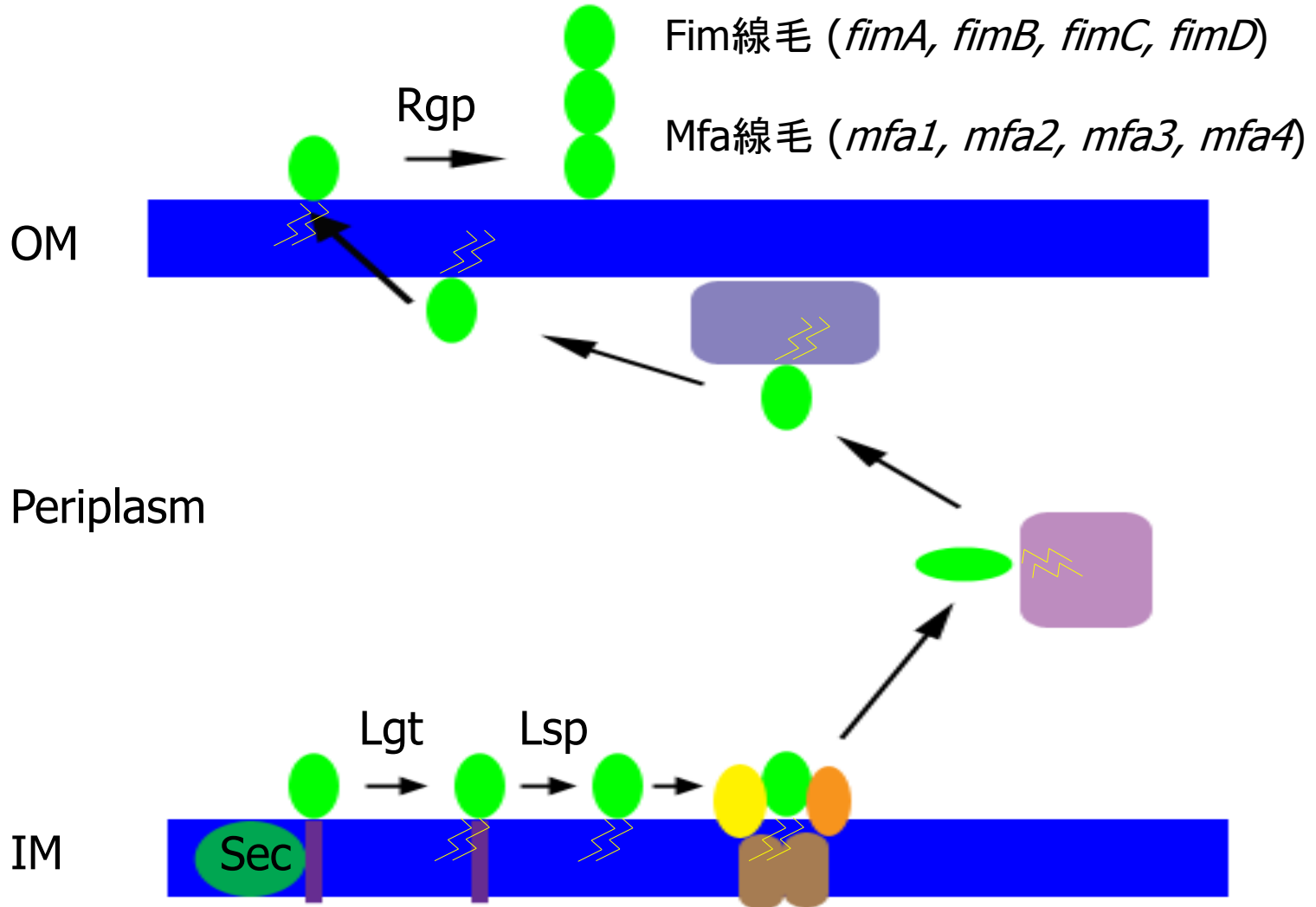
成熟型

75 kDa

放射標識パルミチン酸ラベルによるリポタンパク質解析



ジンジバリス菌のFimおよびMfa線毛の形成過程



予想と異なる結果が得られたときはチャンスかも

いろいろな可能性(最悪なものを含めて)を考えること

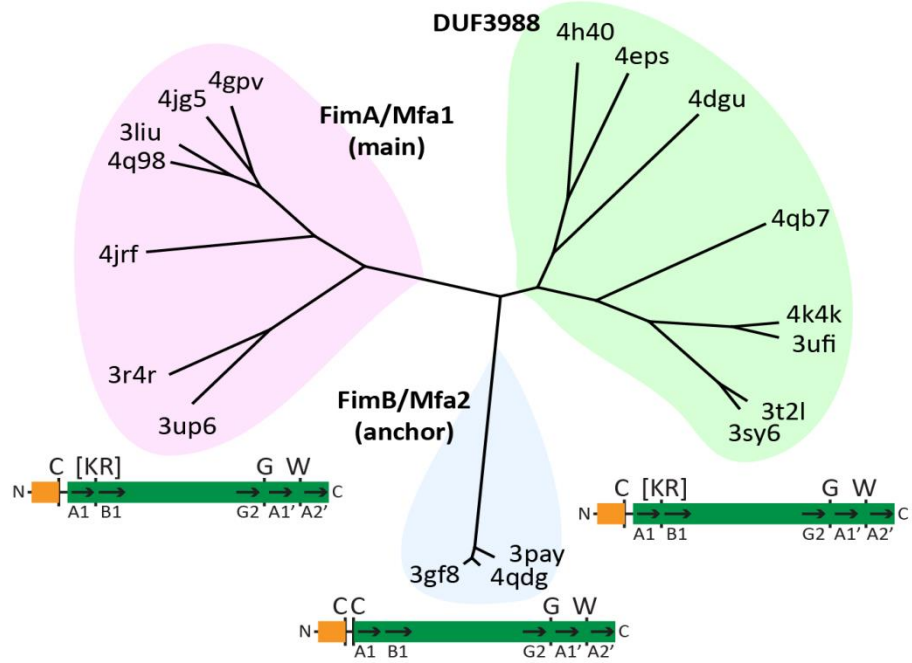
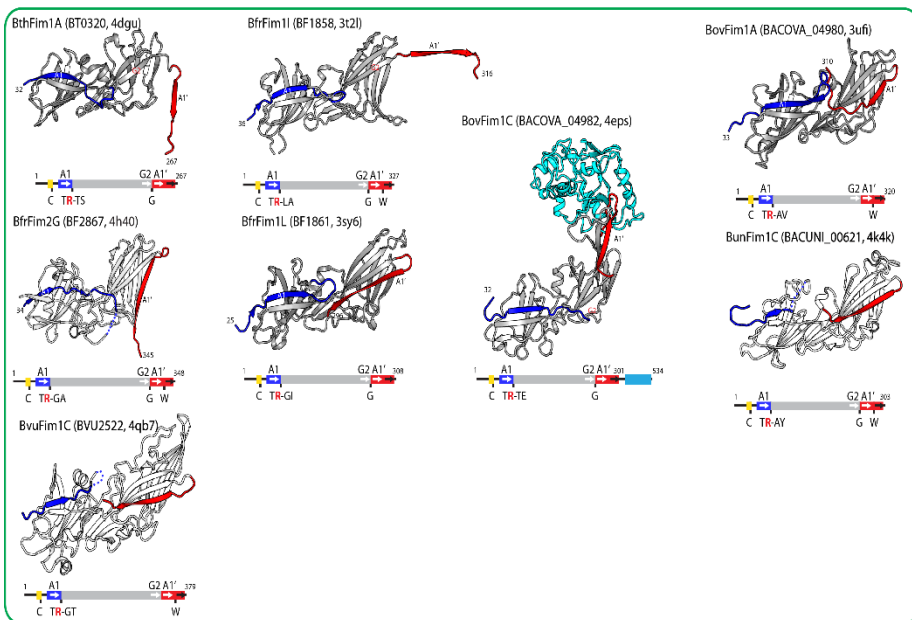
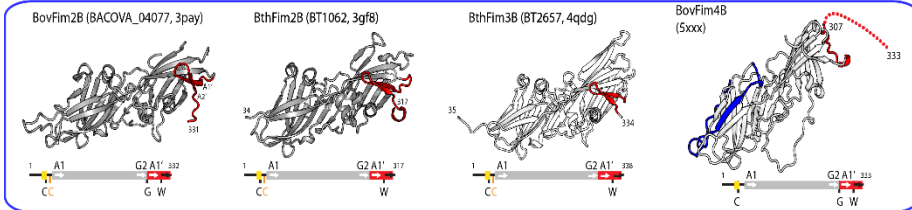
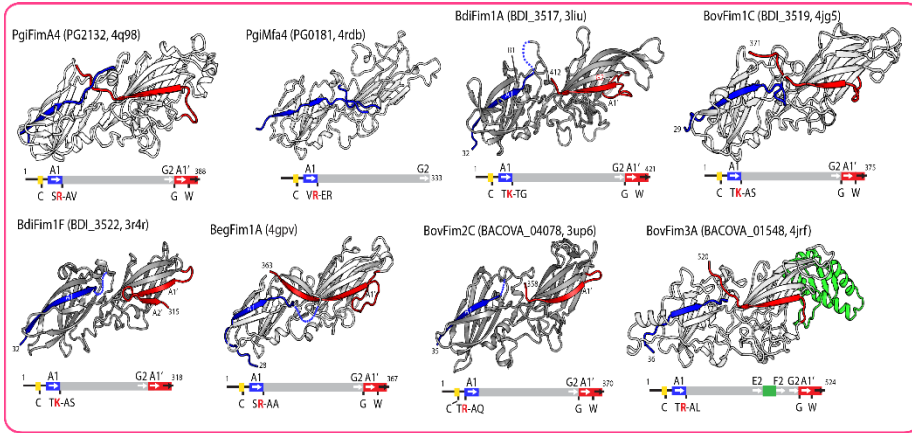
赤血球凝集性の本体は？

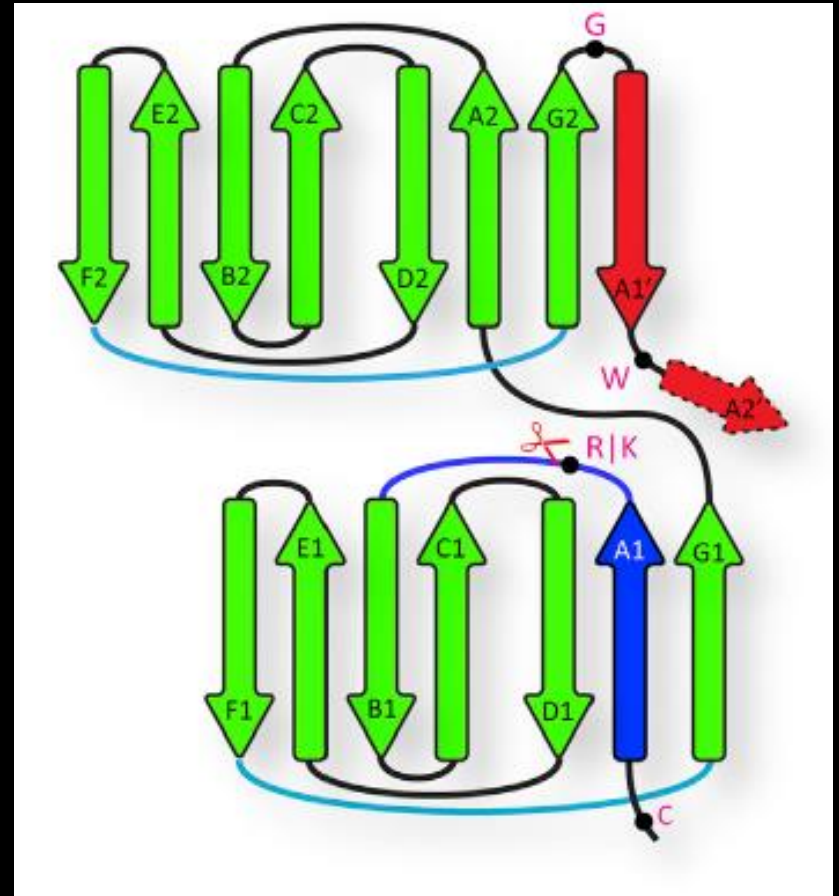
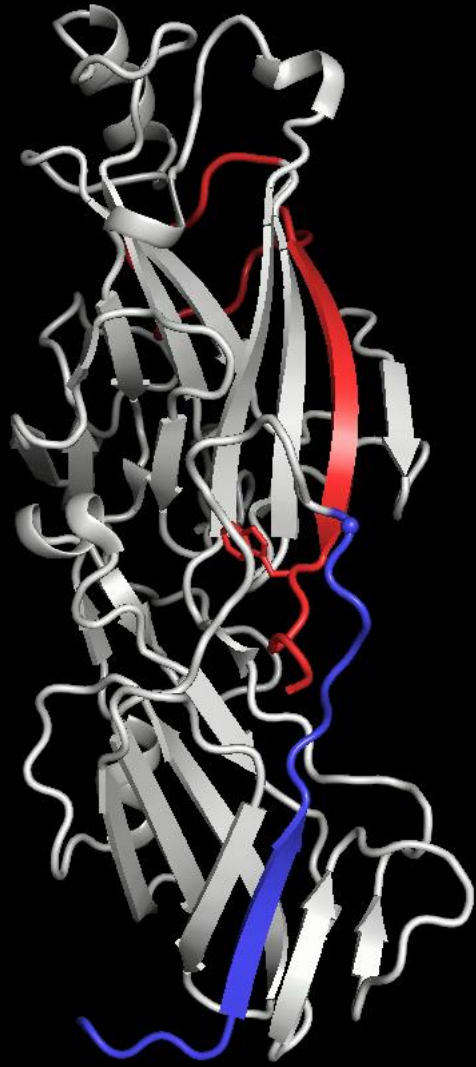
Sakai, E., Naito, M., Sato, K., Hotokezaka, H., Kadowaki, T., Kamaguchi, A., Yamamoto, K., Okamoto, K., Nakayama, K.: Construction of recombinant hemagglutinin derived from the gingipain-encoding gene of *Porphyromonas gingivalis*, identification of its target protein on erythrocytes, and inhibition of hemagglutination by an inter-domain regional peptide. **J. Bacteriol.** 189(11):3977-3986, 2007

赤血球凝集素は血小板凝集の主成分

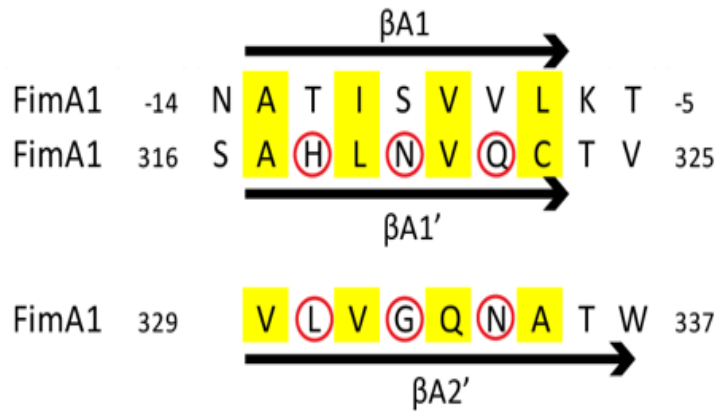
Naito, M., Sakai, E., Shi, Y., Ideguchi, H., Shoji, M., Ohara, N., Yamamoto, K., and Nakayama, K.: *Porphyromonas gingivalis*-induced platelet aggregation in plasma depends on Hgp44 adhesin but not Rgp proteinase. **Mol. Microbiol.** 59:152-167, 2006

FimAピリンを含む *Bacteroidia* 綱細菌の線毛ピリン20種類のX線結晶構造解析



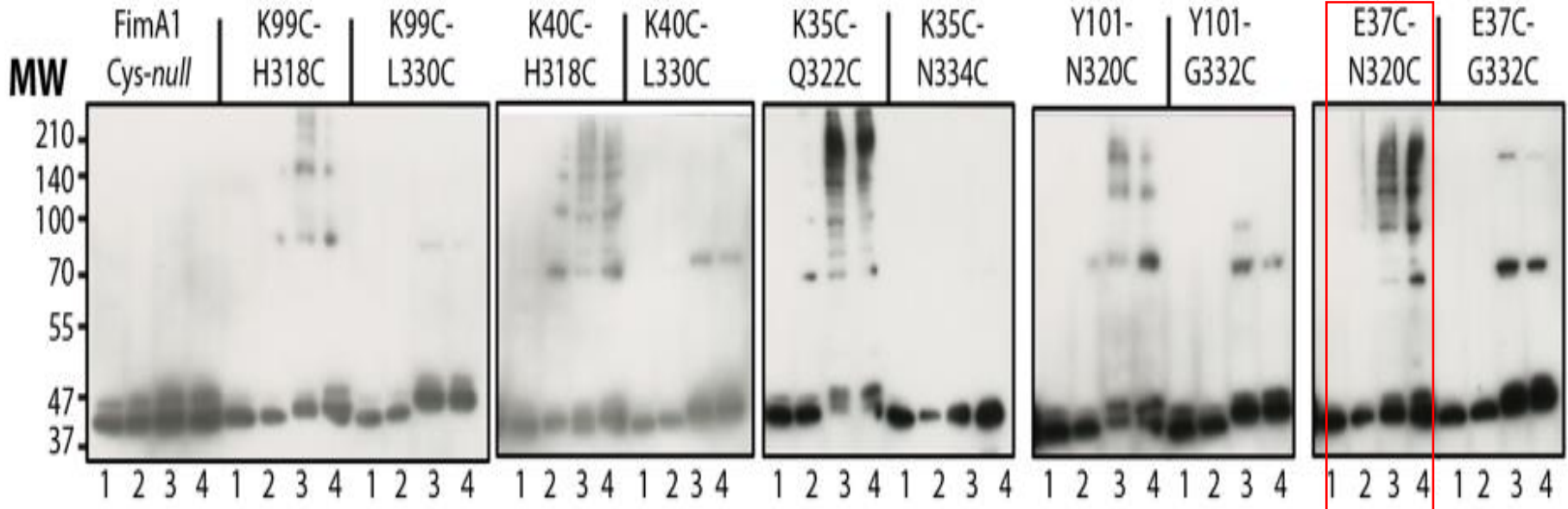
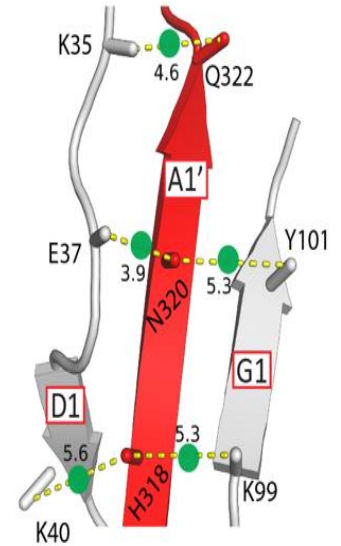


アミノ酸残基のCys置換法による近接ストランド解析



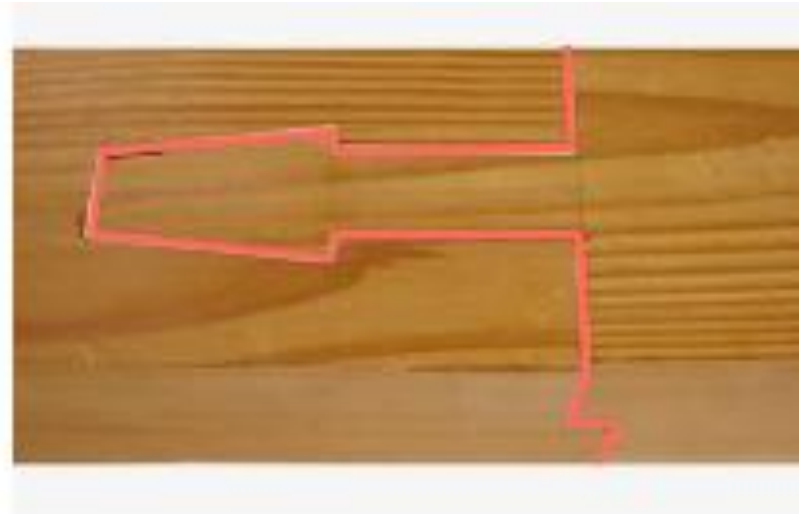
Lanes

	1	2	3	4
H ₂ O ₂ (mM)	0	0	0.5	2.0
βME	+	-	-	-



Anti-FimA 100°C 10 min

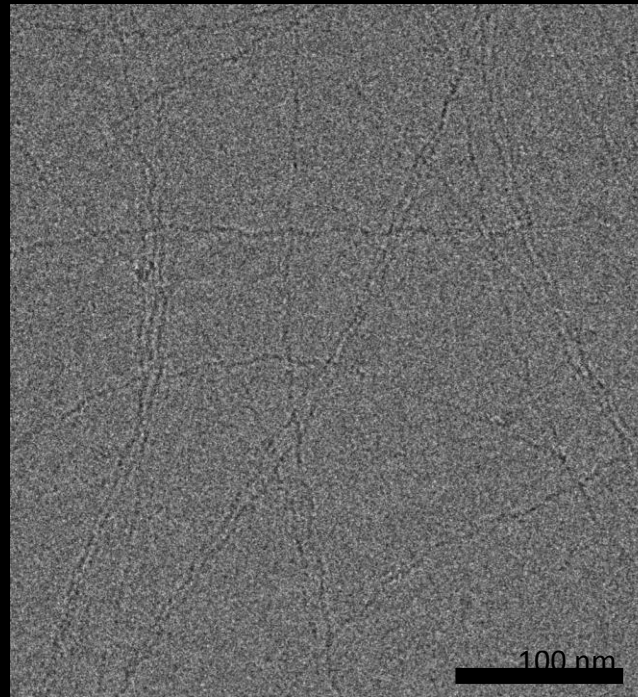
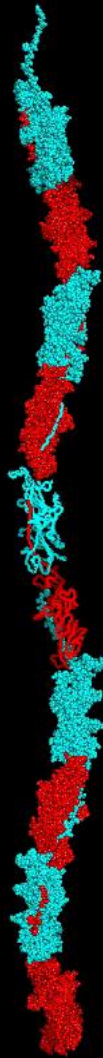
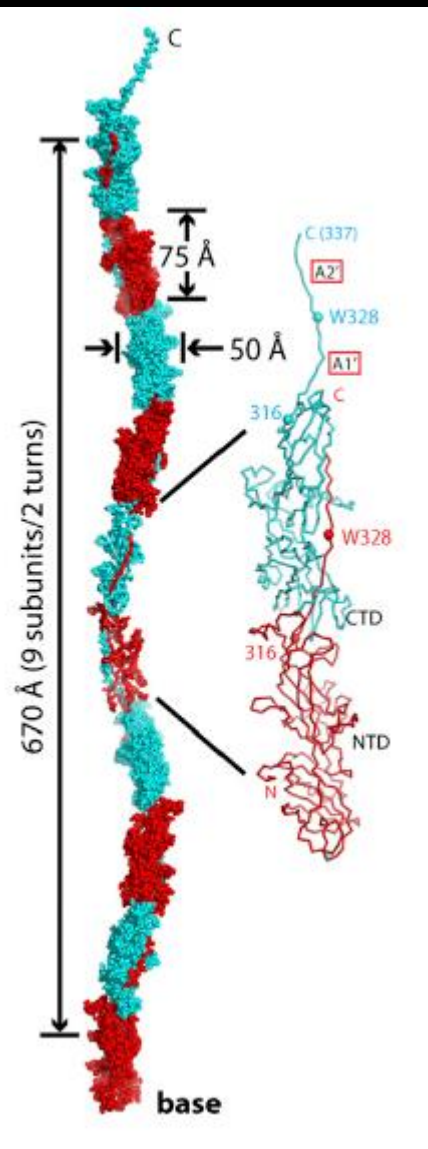
Xu, Shoji, et al., Cell, 2016



日本の伝統的木工技法 腰掛鎌継ぎ

5型線毛

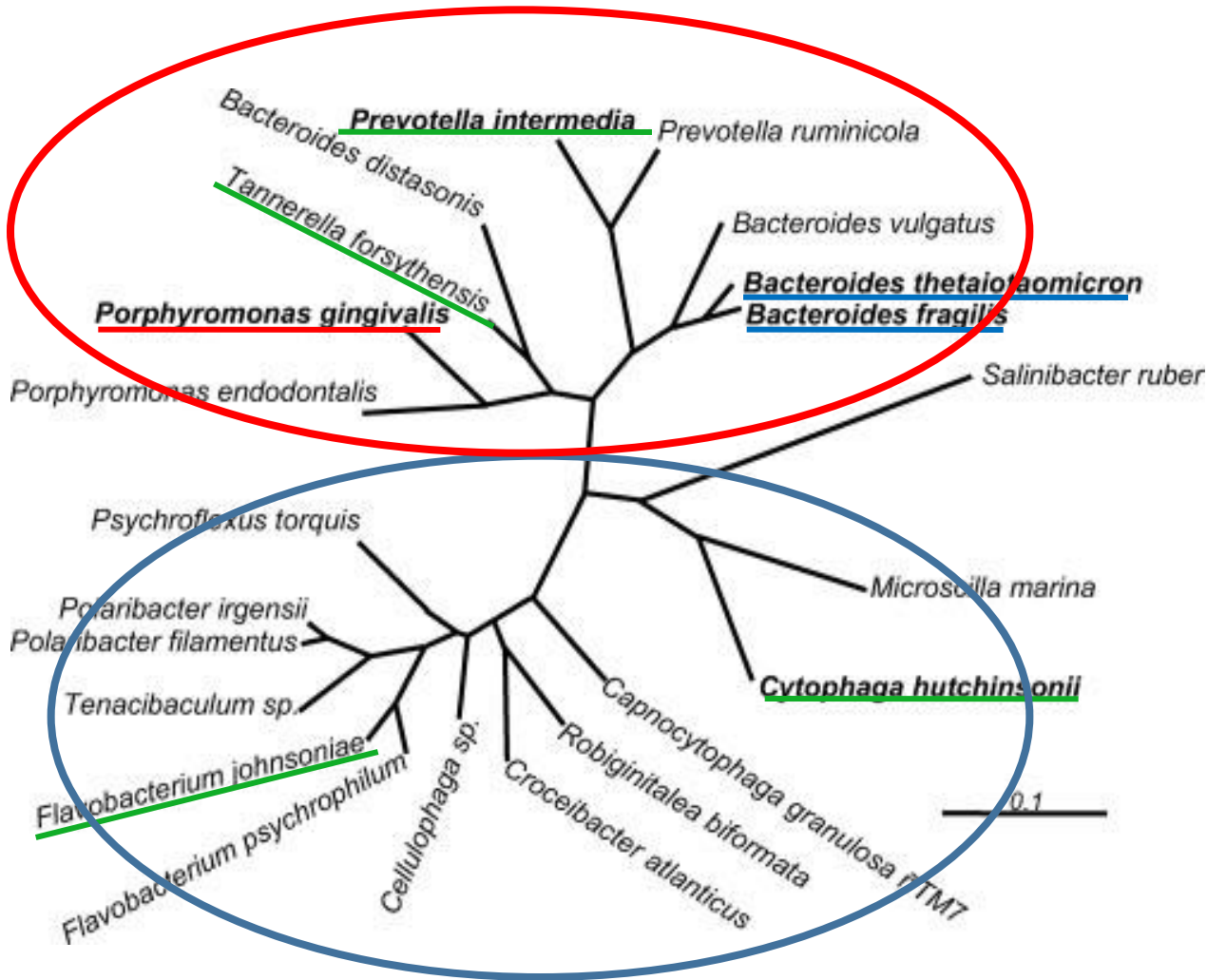
組換えFimAのRgpB消化により再構成したFim線毛のクライオ電子顕微鏡像



Shibata, Shoji et al. 未発表

~5 Å

嫌氣性寄生(共生)細菌 非滑走運動 → 5型線毛形成



APPLIED AND ENVIRONMENTAL
MICROBIOLOGY, June 2007, p. 3536–

16S rRNA-based phylogenetic tree of the phylum *Bacteroidetes* derived from 16S rRNA gene sequence data. The tree was constructed using the fastDNAmI method. Species with complete genome sequences that were used in this study are indicated in bold. Bar, 0.1 nucleotide substitution per site.

好氣性環境細菌
滑走運動

いい指導者に巡り合うこと

研究人脈を広げること

いいスタッフ、大学院生、共同研究者をもつこと

オリジナリティのある(独創的な)研究を目指す

研究結果は一般的関心事 (general interest) であるといい

研究者の生活というのは、世間的基準では基本的に楽ではなく、また研究の中に楽しみを見い出せない人には、つらいとんでもない生活であることをまず認識する必要がある

凡人でも優れた独創的と言われる研究を仕上げるためには：
好奇心 (curiosity) を大切にして、勇気 (courage) を持って困難な
問題に挑戦すること (challenge)
必ずできるという確信 (confidence) を持って、全精力を集中
(concentration) し、そして諦めずに継続すること (continuation)

本庶 佑 エッセイ「独創的研究への近道：オンリーワンをめざせ」

研究者にとって最も大切なことは何ですか？

HONEST

Mary Louise Robbins (ジョージ・ワシントン大学微生物学名誉教授)

ご清聴ありがとうございました

