

ゲノム情報に基づいた *P. gingivalis* の宿主内での病原性因子調節機構の解析

●中山 浩次 ◆内藤 真理子 ◆雪竹 英治
長崎大学大学院歯薬学総合研究科

<研究の目的と進め方>

Porphyromonas gingivalis はもっとも有力な歯周疾患の原因菌と考えられている。また近年では全身の慢性炎症性疾患との関連性も強く疑われている。同菌は毒素を持たず、病原性因子として線毛、各種プロテアーゼ、莢膜、LPS 等が知られているが、他の菌体成分の関与を含め病原性に不明な点が多い。*P. gingivalis* については病原性の異なる3株のゲノム配列情報が利用できる予定であり、本研究ではこれらのゲノム情報をもとに遺伝子欠損株を作製し、作製した変異株を解析することによって新たな病原性因子を明らかにし、これまでに知られている病原因子を含めたグローバルな病原性因子の調節機構を明らかにすることを目的とする。現時点で2株のゲノム配列情報が利用可能である。2003年に公開されたW83株のゲノム配列と本研究で配列解読が進められたATCC33277株のゲノム配列である。両者のゲノムを比較し、一方のゲノムにのみ存在する個々の遺伝子が本菌の病原性にどのように関与しているかを明らかにする。これと並行し、マウス体内で有意に発現している病原性因子の探索をおこない、特にその調節機構を明らかにしていく。

<2007年度の研究の当初計画>

ATCC33277株の配列は共同研究者らにより解読が終了した。そしてアノテーション等の情報の整理もほぼ終了している。本年度はこのゲノム情報をdatabaseへ登録する。またこれまでのATCC33277株の配列解析による成果を論文としてまとめ、発表する。論文受理に合わせてATCC33277株の配列情報を公開する。弱毒株である33277株の全塩基配列が決定できたことから、強毒株W83株のゲノムと比較することでW83株固有の遺伝子や33277株固有の遺伝子が同定できた。この情報をもとにどの遺伝子が強毒性、弱毒性を規定しているかについてそれぞれ変異株を作成し、病原性を比較検討する。

マウス体内で発現量の増加する蛋白質の中の2種類、DNA-binding response regulator RprY (PG1089)、TPR domain protein (PG1385) が制御あるいは相互作用している病原性因子を明らかにしていく。このために酵母 two-hybrid system を確立するとともにDNAチップを用いて解析していく。さらにATCC33277株のゲノム配列をもとにtiling DNAアレイを作製する。市販のチップでは得られない各遺伝子の転写単位の決定、遺伝子発現の調節領域の同定等を行う。また、マウスあるいは培養細胞感染時でのcDNAを用いる事により、感染時での*P. gingivalis* の遺伝子発現メカニズムの解析を目指す。

<2007年度の成果>

Porphyromonas gingivalis ATCC 33277株のゲノム配列を病原性の異なる別の株(W83株)のゲノム配列と比較した際のもっとも

特徴的なのは、ゲノム全領域に渡って多数の再構成がみられることである事をこれまでに報告した。そこで詳細に再構成の箇所を検討した。これまでに赤痢菌等で株間でのゲノムの再構成がゲノム中に3カ所程度報告されているが、*P. gingivalis* では175箇所と多数の再構成が検出された。またこれらの中で大規模なゲノムの構造の組替え部位は35カ所で、そのうちの29カ所にはinsertion sequence (IS)などの転移因子、もしくはその痕跡が認められた。これらの転移因子は*P. gingivalis* の株間でそれぞれの有無、個々の数が異なっていた。

さらに転移因子miniature inverted-repeat transposable element(MITE)の一つはこれまでに他の生物で報告されているものと違った特殊な構造をもつことが明らかになった。このMITEは両端に二つのくり返し配列とその内部に41bpのくり返し配列を最大14個タンデムに持つことから、我々はMITEPgRS (MITE of *P. gingivalis* with repeating sequences)という名前を提唱した。MITEPgRSは*P. gingivalis* ATCC 33277株、W83株双方に存在し*P. gingivalis* に特徴的な転移因子と推測された。

転移因子としてATCC33277株のゲノムにのみ、転移に関わる遺伝子群をひとそろいもつintactなconjugative transposon (CTn)、CTnPg1が一個みいだされた。*P. gingivalis* の株間の多様性にはCTnを含むtransposable elementが関係していることが示唆された。そこでこのCTnが実際にゲノム配列から切り出され他の*P. gingivalis* 株に伝達するかを検討した。CTnPg1が実際にゲノム配列から切り出されてcircular intermediate formを形成するかはCTnPg1両端に外向きにプライマーをおいたPCRにて確認した。また切り出されあとのゲノム配列も同様に確認された。得られたPCR産物の塩基配列を決定したところCTnPg1は両端にある14bpのdirect repeat sequenceを利用して切り出されることがわかった。次にCTnが実際に*P. gingivalis* の株間で伝達するか検討した。ATCC 33277株のCTnPg1領域にアンピシリン耐性遺伝子を挿入した株およびW83株のporTにエリスロマイシン耐性遺伝子を挿入した株を作製し、接合実験に供した。ATCC33277株からW83株へのCTnPg1の伝達効率は 10^{-5} ~ 10^{-6} であった。さらにrecA変異株を受容菌に用いると伝達が起こらないことから、CTnPg1の伝達はrecAに依存することが示された。また、W83株からATCC 33277株へ接合伝達も観察され、CTnPg1以外の接合伝達機構の存在が示唆された。これまでに近縁の菌である*Bacteroides*属菌でも抗生物質存在下でCTnを介した接合伝達が活性化されることが報告されている。今回発見した*P. gingivalis*でのCTnの伝達には抗生物質による前処理は不要であったことから、*Bacteroides*属菌と異なるCTn転移の調節機構の存在と*P. gingivalis* 菌株間の活発な遺伝子転移が推測された。

本年度はまた網羅的な遺伝子発現の解析をめざして、市販のDNAアレイでは得られない各遺伝子の転写単位の決定、遺伝子

発現の調節領域の同定等を目指す為にカスタム DNA アレイを作製した。DNA アレイのプロープは ATCC33277 株の両鎖のゲノム配列をもとに 8+/- 3 bp 間隔に全ゲノム配列にわたってオーバーラップするように設計した。この tiling DNA アレイをもちいてまずはアレイへの target の反応条件を検討し決定した。現在までに野生株の対数増殖期の菌体から調製した RNA より作製したカスタム DNA アレイに反応させデータを得た。野生株の対数増殖期には機能が推定される遺伝子だけではなく機能未知の hypothetical protein の一部も発現することがこれまでに明らかになった。

いままでの研究で本菌の病原性発現に関わると示唆された TPR domain 蛋白質の変異株 (TPR 変異株) を昨年作製した。そこで本年はこの変異株と野生株から外膜画分を調製して発現量の変化した分子の同定を行った。同定は SDS-PAGE にて展開した外膜画分で発現量が増加した蛋白質のバンドを切り出して、MALDI-TOF MASS にて解析、蛋白質を同定した。これまでに抗原性が報告されている表面抗原蛋白質の一つと転移性遺伝子の一つの発現が変化していることを明らかにした。Yeast two-hybrid system を用いて TPR domain 蛋白質と結合活性が示唆される約 40 種類の *P. gingivalis* 蛋白質を同定した。これらの蛋白質の欠損株を現在作製中である。

<国内外での成果の位置づけ>

P. gingivalis はもっとも有力な歯周疾患の原因菌と考えられているほか、口腔領域のみならず全身の慢性炎症性疾患との関連性が強く疑われている。その病原因子は同菌の持つ種々のプロテアーゼが重要であるが、未知の病原因子が関与する可能性は十分疑われる。以前より幾つかの株を比較し、ビルレンスが異なることが示されているが、その違いが何に由来するかは不明である。今回強毒株 W83 株に続いて比較的弱毒性の ATCC33277 株のゲノム配列が解読できたことで、両ゲノムの比較が行うことができ、また、それを基にした実験的検討も可能となった。*P. gingivalis* の異なる株のゲノムを解読する計画は米国でも進んでいるが、本研究結果はそれに先んずる結果となった。また本菌の今回見出し出した本菌のゲノム構造の多様性といった特徴は本菌の株間の多様性形成の進化過程を推測させる結果であった。

本研究では 2 成分制御系の RprY および TPR domain タンパク質が本菌の病原性因子の発現に関わることが示唆された。TPR domain 蛋白質は細菌においても広く分布しているが、細菌におけるその機能については未だほとんど解明されていない。そのため、本研究で得られる成果は *P. gingivalis* のみならず病原細菌の研究に広く影響を与える可能性がある。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

本年度までに tiling DNA アレイの実験の準備が整ったが、野生株と各種変異株での遺伝子発現の比較を実施するには至らなかった。また病原性に関わると推測された調節因子における蛋白質発現パターンの変化を細胞画分ごとに網羅的に解析するには至らなかった。その理由としてはそれぞれのシステム (tiling DNA アレイと MALDI-TOF MASS) の長崎大学での整備に時間がかかってしまったことがあげられる。しかし、現在、すべてのシステムが整った状態にある。

<今後の課題>

これまでの解析で *P. gingivalis* の病原性の調節に関わると推測される調節遺伝子についてその変異株と野生株の遺伝子発現パターンを *in vitro* および *in vivo* の環境で生育した菌で比較する。具体的には本年作製した tiling DNA アレイを用いて全遺伝子の発現レベルを網羅的に比較する。また tiling DNA アレイを使うことによりこれまでの発現アレイと違って、個々の遺伝子の転写単位を推測できる。推測された転写調節領域の解析も今後の課題である。酵母 two-hybrid system によって得られる TPR domain 蛋白質と相互作用する分子の機能についてそれらの欠損株を網羅的に作製し、ビルレンスの程度を検討していくことで TPR domain 蛋白質の *P. gingivalis* の病原性における意義を明らかにしていく。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

1. Yoshimura M. et al.: Proteome analysis of *Porphyromonas gingivalis* cells placed in a subcutaneous chamber of mice. Oral Microbiol. Immunol., In press.
2. Kondo Y. et al.: Involvement of tetratricopeptide repeat-containing protein in the virulence of *Porphyromonas gingivalis*. Interface Oral Health Science, In press.

2) データベース/ソフトウェア

- P. gingivalis* ATCC33277 株ゲノム情報の登録作業完了。データベース公開の準備中。

本研究の一部は基盤ゲノム服部正平先生班、久原哲先生班および応用ゲノム林哲也先生班との共同研究である。