

# 学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

川村 彩花

論文題目

歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の二成分制御系転写因子 AtoC が発現調節する標的遺伝子の同定

## I. 緒 言

矯正歯科治療において歯周病の予防および進行防止には注意が必要であり、治療開始前には歯周組織の状態を把握し、基本治療等により歯周環境を整えることが重要である。しかし矯正治療開始後も、矯正装置の装着による清掃性の低下によりデンタルプラークは残留し易く、歯周病原細菌の増殖に伴う歯周病発症・進行リスクが高い状況は継続する。

*Porphyromonas gingivalis* は歯周組織に定着して歯周病の発症や進行に深く関わるグラム陰性嫌気性細菌である。本菌は細菌に特徴的なシグナル伝達機構である二成分制御系 (TCS) を 7 組もち、各組の膜センサーが特定の環境シグナルを受容しその刺激を細胞内の転写因子 (レスポンスレギュレーター) に伝え、支配下の遺伝子群 (標的遺伝子) の発現調節を行うことで生息環境に適応していると推定される。先行研究で標的遺伝子等が解明された 5 組の TCS はいずれも本菌の病原性への関与が認められている。従って未解析のものを含めた全 TCS の標的遺伝子を同定することは、本菌特有の病原因子発見につながるのみならず、その病原性を特異的に抑制しつつも宿主への毒性は少なく抗菌薬耐性が生じにくい、新しい薬剤の開発に応用される可能性もある。

本研究では標的遺伝子が不明な TCS 系レスポンスレギュレーター (RR) のうち AtoC ホモログと推定される PGN\_0775 に着目した。遺伝子発現の最終産物であるタンパク質レベルで親株と遺伝子破壊株間の網羅的な発現比較

解析を行い、*P. gingivalis* の AtoC ホモログ支配下にある標的遺伝子探索を試みた。

## II. 材料および方法

### 1. PGN\_0775 遺伝子ノックアウト変異株の作製

PGN\_0775 遺伝子 (*pgn\_0775*) の中央部にある制限酵素 Bsm I 切断部位にエリスロマイシン耐性カセット ( $Em^r$ ) を逆方向で挿入した DNA 構築体を作製し、それをエレクトロポレーション法で親株 (標準株 ATCC 33277) に導入して生じたゲノム相同組換え体を薬剤耐性で選択し、PGN\_0775 遺伝子ノックアウト株 (PGN0775KO 株) とした。

### 2. PGN\_0775 遺伝子相補株の作製

発現ベクター pTCBexPGN0775 を構築し、大腸菌 S17-1 株を介した接合伝達法により PGN0775KO 株に導入することによって PGN\_0775 遺伝子を相補した。得られた相補株のうちの 2 株を PGN0775C1 および C2 と命名し、転写レベルでの定量解析に用いた。

### 3. 二次元電気泳動解析

標準株と PGN0775KO 株を sTSBHK 液体培地で嫌気培養し、対数増殖期中期 ( $OD_{600\text{ nm}}=1.0$ ) で集菌してトリクロロ酢酸溶液にて変性処理を行い全菌体タンパク質試料を調製した。一次元目の等電点電気泳動では CoolPhoreStar IPG-IEF Type-PX と PowerPhoreStar Pro3900 のシステムを用いて各タンパク質固有の等電点の違いにより分離した。室温で一晩膨潤処理した等電

点ストリップス Immobiline DryStrip (pH 4-7, 18 cm) にサンプル抽出液で可溶化した全菌体タンパク質試料をアプライし、3500V で 10 時間以上泳動したのち、平衡化処理を行った。二次元目の電気泳動に用いる SDS-12.5% ポリアクリルアミドゲル(PAG) 上端に等電点ストリップスを密着させ、ゲル 1 枚あたり 20mA 定電流で約 30 分、50mA 定電流で約 3 時間泳動した後にゲルを取り出し、SYPRO Ruby 染色液を用いて染色した。ゲル中で二次元展開されたタンパク質スポットの蛍光イメージは最高解像度の RAW 画像として撮影・記録した。各タンパク質スポットの検出と相対的シグナル強度(% volume 値: 全タンパク質スポット強度の和に対する個々のスポット強度の割合) の計算、および異なるゲル間での同スポットのアラインメントと相対強度の比較解析には、二次元スポット解析ソフト SameSpots v5.1 を用いた。

#### 4. 質量分析

クマシーブルーで染色された SDS-12.5% PAG から変動タンパク質スポットを含むゲル片を切り出し、ゲル内トリプシン消化で断片化したペプチドを抽出して、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法 (MALDI-TOF) による質量分析 (MS) を行った。

#### 5. 相対定量的リアルタイム PCR (RQPCR) 解析

各菌株から抽出した mRNA を鋳型として cDNA を合成した。RQPCR 解析は 7900HT Fast Real-Time PCR system を用いて実施した。各菌株における測定対象遺伝子の相対的発現量は内在性 16S rRNA の発現量を基準として正規

化し、菌株間の発現量比較解析には比較サイクル閾値法 ( $\Delta\Delta$ CT 法) を用いた。比較解析の基準となるキャリブレーターには WT 株または KO 株の測定値を適宜用いた。

### III. 結果

二次元電気泳動によるプロテオーム比較解析で変動スポットとして絞り込み、質量分析で同定した 5 つのタンパク質のうち 4 つは PGN0775KO 株で発現が抑制されており、その内訳はアルギニン特異的システインプロテアーゼ RgpB、チアミン生合成タンパク質 ThiF、および IX 型分泌装置 (T9SS) 選別ドメイン含有タンパク質 (PGN\_0654 と PGN\_0657) であった。一方、運動性関連タンパク質 G1dB とわずかに相同性を持つリポタンパク質は、標準株で発現が抑制されていた。

RQPCR 解析の結果、相補株 C1/C2 における *pgn\_0775* mRNA の発現量は標準株の 33 倍または 23 倍であった。これらの値は *pgn\_0775* を組込んだ発現ベクター pTCBex のプロトタイププラスミドの推定コピー数 (細胞あたり 25 コピー) に近く、PGN0775KO 株への *pgn\_0775* 遺伝子相補に成功したことを示すのみならず、RQPCR の実験精度の高さをも保証するデータであると考えられた。T9SS 選別ドメイン含有タンパク質 PGN\_0654 および 0657 をコードする遺伝子の転写レベルは、KO 株では標準株の約半分に低下しており、プロテオーム解析の結果と発現変動の方向性が一致した。さらに、その KO 株に *pgn\_0775* 遺伝子を相補すると、これら 2 つの遺伝子の転写レベルが標準株

と同等程度もしくはそれ以上に回復し、*pgn\_0654* と *pgn\_0657* 両遺伝子の発現が PGN\_0775 RR により正方向に調節されていることが転写レベルで裏付けられ、有力な標的遺伝子候補であると考えられた。一方、GldB、RgpB および ThiF の転写レベルでの菌株間変動は、いずれもプロテオーム比較解析で示された発現変動データと一致せず、これらの遺伝子発現は PGN\_0775 RR による転写レベルでの直接的な調節を受けていないと考えられた。

*pgn\_0654* と *pgn\_0657* の塩基配列をデータベースから入手し、ATCC 33277 ゲノム上で相同性検索を行った結果、3つの T9SS 輸送タンパク質と C25 システインペプチダーゼ N 末端領域をそれぞれコードする 4つの遺伝子が集積する領域を見出し、その先頭に *pgn\_0654*、末端に *pgn\_0657* が位置することが判明した。また、逆転写 PCR により、この遺伝子群からの転写産物が 4 遺伝子をすべて含んだ 1 転写単位として発現し、オペロンを構成していることが示された。

#### IV. 考察

PGN\_0654、0656、および 0657 の C 末端領域に CTD モチーフが見いだされたこと、および液体培地から遠心沈査として得た菌体試料中にこれらのタンパク質が存在した事実から、これら 3つのタンパク質は *P. gingivalis* の細胞質で合成された後、IX型分泌装置に認識されて外膜の外側まで輸送され、細胞表面に保持されていることが強く示唆される。また PGN\_0654、0656、および 0657 をコードする遺伝子はオペロンを構成していることから、これ

らは同時に発現したのち *P. gingivalis* の細胞表層で協調しつつ何らかの役割を担っていると考えられる。アミノ酸相同性検索では PGN\_0654 および PGN\_0657 と相同性のある他種生物由来タンパク質がヒットしないことから、これらは *P. gingivalis* に特徴的な外膜タンパク質と予想され、宿主免疫系に特異的に認識される抗原として作用し、歯周局所で炎症反応を活性化する可能性があると考えられる。

## V. 結論

1. PGN\_0654 および PGN\_0657 をコードする遺伝子は転写レベルでの発現変動の方向性がタンパク質レベルでの解析結果と一致し、PGN\_0775 RR によって正方向に転写調節される有力な標的遺伝子候補であると判明した。
2. *P. gingivalis* 標準株ゲノム上で 3 つの T9SS 輸送タンパク質と 1 つの C25 システインペプチダーゼ N 末端領域をコードする 4 遺伝子集積領域の先頭に *pgn\_0654*、末端に *pgn\_0657* が位置し、これら 4 遺伝子は一転写単位のおペロンを構成していることが判明した。
3. PGN\_0654、0656、および 0657 ポリペプチドは保存された CTD モチーフを有し、かつ他種生物のタンパク質と相同性が認められないことから、T9SS によって菌体表層へ輸送される *P. gingivalis* に特異的な外膜タンパク質であると推定された。
4. 以上の解析結果を総合すると、*P. gingivalis* の AtoC ホモログ PGN\_0775

(論文内容の要旨)

No. ....7.....

愛知学院大学

RR は、IX 型分泌系により菌体表層へ輸送される膜タンパク質をコードするオペロンの転写を促進する機能を持ち、*P. gingivalis* 特異的な抗菌療法の有望なターゲットとなり得ると推定され、臨床応用への可能性が示唆された。