

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19592139

研究課題名（和文） 転写因子の標的遺伝子探索に特化したマイクロアレイの開発と歯周病原細菌への応用

研究課題名（英文） Development and application of the microarray for the isolation of target genes of transcriptional regulators in periodontal pathogens.

研究代表者

西川 清 (NISHIKAWA KIYOSHI)

愛知学院大学・歯学部・講師

研究者番号：50340146

研究成果の概要：歯周病原細菌 *P. gingivalis* 標準株の全ゲノム配列を搭載した新規マイクロアレイとクロマチン免疫沈降法とを組合わせた解析手法を用い、本菌の主要病原因子 FimA 線毛の生合成を調節する二成分制御系転写因子 FimR のゲノム上の結合配列を特定した。更に線毛非形成株 W83 では、FimR にリン酸基を供与するセンサータンパク質 FimS が ATP 結合領域の一部を欠失した機能不全型であることをも明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：歯周病原細菌、転写因子、二成分制御系、標的遺伝子、ゲノムタイリングアレイ、クロマチン免疫沈降法、ChIP-on-chip、センサーキナーゼ

1. 研究開始当初の背景

病原細菌がもつ二成分制御系は、細胞膜のセンサータンパク質によって生息環境の変化を感知し、それをリン酸基のリレーによって細胞質の転写因子タンパク質へ伝達することで、病原性に関連する様々な遺伝子の発現量をコントロールしている。どのような遺伝子（標的遺伝子）が二成分系転写因子の直接的制御下にあるのかを知ることは、支配下にある病原因子の特定、更にはセンサーが感知する環境シグナルの同定へとつながり、二成分系を起点とした細菌病原因子の発現調

節機構の全貌を解明するうえで重要なステップである。近年、標的遺伝子の同定に有用な解析技術として、クロマチン免疫沈降法とマイクロアレイ解析を組み合わせた、いわゆる ChIP-on-chip 法が注目されている。

クロマチン免疫沈降法(ChIP 法)は、架橋固定された細胞中の転写因子とゲノム DNA (クロマチン) の複合体を転写因子特異抗体で回収するというものである。抗体特異的に濃縮された DNA 断片は目的の転写因子結合配列を含み、そのすぐ下流のタンパク質コード領域(以下 ORF)が標的遺伝子である。一方 DNA マ

マイクロアレイは、全遺伝子を網羅した RNA 発現解析や菌株間のゲノム構造比較解析などに用いられ、強力な網羅的遺伝子解析ツールとしての地位を確立している。ChIP-on-chip 法は、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) とマイクロアレイ解析 (chip) 双方の利点を生かした転写因子-DNA 結合解析技術である。ChIP 法で濃縮された DNA 断片を標識し、それをマイクロアレイ上で直接ハイブリッド形成させることで標的遺伝子を一気に同定するという原理である。

重要な歯周病原細菌として研究が盛んなグラム陰性嫌気性細菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg 菌) においては、本研究の開始当初、ゲノム DNA の解読が終了し情報公開されていたのは W83 株のみであり、それを基にした ORF 搭載型マイクロアレイが米国遺伝学研究所 (TIGR) 及び国立歯科学研究所 (NIDCR) によって供給されていた。Pg 菌の持つ二成分制御系転写因子の一つである RprY の、標準株 ATCC33277 における標的遺伝子を同定するため、W83 株のマイクロアレイを用いて ChIP-on-chip を行った結果、酸素ストレス応答に関わる遺伝子群が主たる標的であることが判明したが、同時に解析上の問題点も浮き彫りになった。第一に、W83 株ゲノム中には IS などの転写因子による塩基配列の挿入や欠失が多数認められ、それを基にしたマイクロアレイを標準株 33277 等の他菌株へ応用する際、満足な結果が得られない場合があることである。細菌では、同一種であっても株が異なればゲノム配列にかなりの違いが認められることは珍しくないが、33277 と W83 はまさにその典型である。表現型のうえでも W83 は無線毛株であるため、本菌の主要病原因子 FimA 線毛の解析には不都合である。第二点は、マイクロアレイのデザインが ORF 搭載型であることに因るシグナル検出能力の不安定性である。ChIP 法によって濃縮される DNA 断片は、転写因子結合配列を含んだタンパク質非コード領域 (IGR) が大部分を占める。IGR 配列の検出を ORF 搭載型マイクロアレイで行うには、ORF 領域をもカバーした極微量の長鎖 DNA 断片をプールの必要があった。この方法を余儀なくされた RprY の場合、実験プロトコルが煩雑化し、また結合配列の詳細なマッピングがアレイのデザイン上不可能だったため、他の解析法によるデータの補完も必要となった。これらの問題点を改善するには、標準株である ATCC 33277 のゲノム情報を基に、タンパク質非コード領域をも含めた全ゲノム塩基配列搭載型のマイクロアレイが必要であった。

Pg 菌の持つ二成分制御系の中で最も解析が進んでいるのは、センサー FimS とレギュレーター FimR からなる系であり、これらは本菌の主要病原因子 FimA 線毛の生合成を促進す

る役割に特化している。転写因子の FimR は、ゲノム上で一箇所に集積した FimA 線毛関連遺伝子群の先頭に位置する遺伝子 *fimX* の制御領域に結合し、これらの転写を促進する引き金になることが明らかになっているが、その DNA 結合配列は不明であった。

また、Pg 菌と並んで重要な歯周病原細菌の *Tannerella forsythia* (*forsythensis*, Tf 菌) においては、二成分制御系に関する報告はこれまで皆無であった。本菌は増殖が遅く Pg 菌以上に難培養性で、現時点で利用可能な分子遺伝学的技術も極めて限定的であり、遺伝子破壊株の作製ですら系統的な手法が未確立の状況であった。

2. 研究の目的

代表的な歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* (Pg 菌) と *Tannerella forsythia* (Tf 菌) が有する二成分制御系の転写因子に着目し、それらの標的遺伝子を同定するための解析技術の開発と応用を目的とした。

Pg 菌においては、標準株 ATCC 33277 のゲノム解読の進行に合わせ、全ゲノム配列搭載型のマイクロアレイの開発が始まろうとしていた。そこで、知見が豊富な FimR の系を用い、新規マイクロアレイとクロマチン免疫沈降法とを組み合わせた解析によって FimR の DNA 結合配列の特定を試みると同時に、本菌における ChIP-on-chip 解析技術の確立を目指した。

一方、Tf 菌においてはマイクロアレイが未開発のため、転写レベルでの網羅的解析が不可能な状況であった。そこでまずはタンパク質レベルでの網羅的解析に着手することとし、その基礎資料として重要な菌体総タンパク質の二次元展開図 (リファレンスマップ) の作製を試みた。更に本菌のもつ二成分制御系転写因子の一つ TF0022 に注目し、その遺伝子破壊株作製も同時に試みた。

3. 研究の方法

(1) *P. gingivalis* 標準株 ATCC 33277 ゲノムタイリングアレイ

Pg 菌の有線毛標準株 ATCC 33277 のゲノム情報を基に開発されたマイクロアレイは、Affymetrix 社に製造委託され、長崎大学医薬学総合研究科・口腔病原微生物学講座・中山浩次研究室より供与された。その基本デザインは、33277 株の約 2,355 キロ塩基対から成る全ゲノム配列を 25 塩基長のプローブに細分化し搭載した、いわゆるゲノムタイリングアレイである。

(2) ChIP-on-chip プロトコルの開発

本解析は以下の手順で行った (図 1)。
① Pg 菌 33277 株培養液の 1%ホルマリン架橋固定、超音波破碎処理による可溶化クロマチン断片の調製。

- ② 抗 FimR 抗体と Protein A beads を用いた FimR-標的 DNA 断片複合体のアフィニティ濃縮 (免疫沈降)。
- ③ 65 度熱処理による濃縮 DNA の脱架橋固定、PCR 法による増幅、末端のビオチン標識。
- ④ GeneChip マイクロアレイ解析システム (Affymetrix 社) による標識化テスト DNA 及びコントロール DNA のゲノムタイリングアレイへのハイブリダイゼーション、洗浄、免疫染色、及びシグナルの検出。
- ⑤ マイクロアレイ解析ソフト (in silico MolecularCloning array edition) によるテスト (抗体あり) とコントロール (抗体なし) の比較、非特異シグナルの除去、標的 DNA 配列を示すプローブの同定とゲノム上でのマッピング。

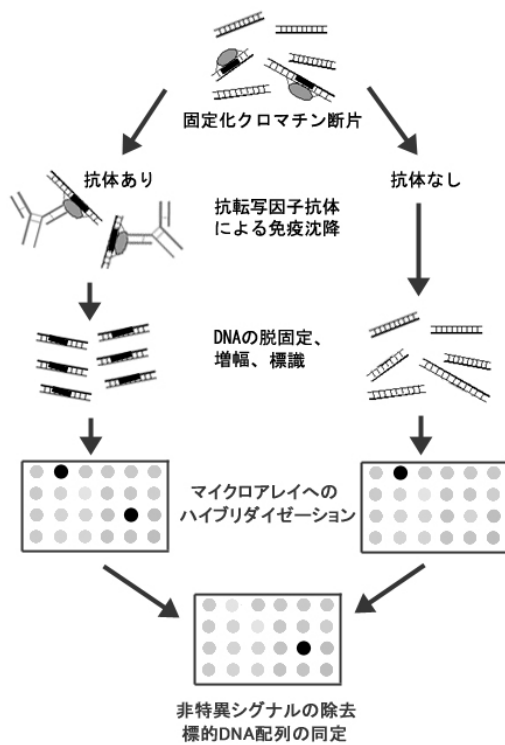


図 1. ChIP-on-chip 法の概略

(3) *Tannerella forsythia* が有する TF0022 レギュレーターの解析

① TF0022 遺伝子のクローニング: Tf 菌の TF0022 遺伝子がコードするタンパク質は二成分制御系のセンサーとレギュレーターが融合したユニークなドメイン構造をとり、Pg 菌でバイオフィーム形成などを調節している GppX と同一性が高い (図 2)。

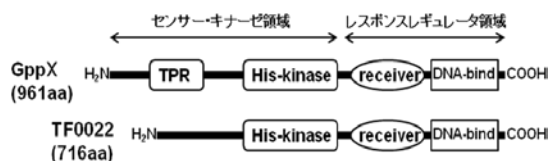


図 2. TF0022 のドメイン構造

そこで標準株のゲノム DNA から TF0022 遺伝子全長の PCR 増幅を試み、得られた断片をクローニング用プラスミドに組み込んだ。

② エリスロマイシンカセット挿入による TF0022 変異株の作製: TF0022 遺伝子ノックアウト変異株作製には、エリスロマイシン耐性遺伝子カセット (*ermF-ermAM*, 以下 Em^r) を用いた、Pg 菌では標準的な方法を応用した。プラスミドに組み込まれた TF0022 遺伝子中央の Afe I 切断部位に Em^r を挿入した構築体を作製し、エレクトロポレーション法で標準株に導入した。相同組換えを起こしたクローンをエリスロマイシン含有平板培地で選択培養し、ゲノム DNA を抽出後、サザンハイブリダイゼーション法にて TF0022 遺伝子座の解析を行った。

③ 菌体総タンパク質の二次元電気泳動: 標準的な液体または平板培養にて得た菌体ペレットをトリクロロ酢酸処理後に細胞溶解液に溶解し、Immobiline DryStrip (pH4-7, GE 社) を用いて一次元目の等電点電気泳動を行った。次に、還元・アルキル化処理した一次元 strip を 12% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で二次元展開後、クマシーブルーで染色した。

④ 質量分析とリファレンスマップ作製: 二次元電気泳動ゲル上に展開されたタンパク質スポットを切り出し、還元・アルキル化を経てトリプシン処理後抽出したペプチドを解析試料とし、AB 社製 4800 MALDI TOF/TOF[®] Analyzer を用いて質量分析を行った。更に同定されたタンパク質とゲル上のスポットを対応づけたリファレンスマップを作製した。

⑤ 標準株と TF0022 変異株の網羅的なタンパク質発現比較解析: GE 社の画像解析ソフト ImageMaster 2D Platinum を用いて各タンパク質スポットの検出とスポット強度の正規化、更に異なったゲル間での各スポット強度の比較解析を行った。

4. 研究成果

(1) FimR 結合配列の特定

過去の研究により、Pg 菌の二成分制御系転写因子 FimR は FimA 線毛関連遺伝子群先頭の FimX 遺伝子座上流-217 塩基から-140 塩基の範囲内のどこかに結合すると推定されていた。本研究でゲノムタイリングアレイを初めて応用した ChIP-on-chip 解析を試みた結果、FimR 結合領域が FimX 遺伝子上流-213 から-189 塩基までの 25 塩基対からなる領域内であることが判明した。その内部には転写因子の結合配列として典型的なリピート配列が存在し、これが FimR との結合に重要なコンセンサス配列と推定される (図 3、下線部)。この方法で得られたデータの解像度は、放射性同位元素を用いた DNaseI フットプリント法で得られるデータに迫るものであり、要求

される実験手技自体も格段に簡単なものとなった。

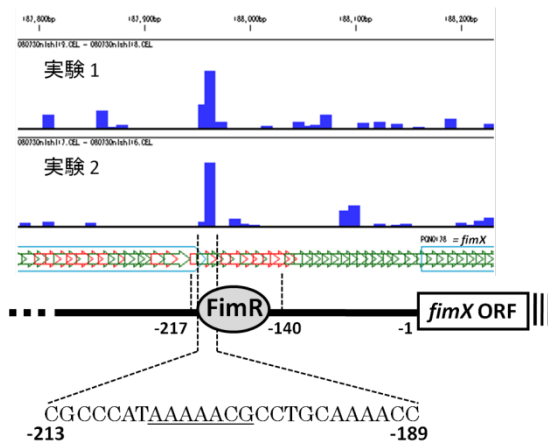


図 3. ChIP-on-chip 解析で特定された FimX 遺伝子上流の 25 塩基長の FimR 結合領域

興味深いことに、線毛非形成株 W83 の FimR 結合配列を有線毛の 33277 株と比較したところ、リピート配列を構成する 2 塩基が異なる塩基に置換していた (図 4)。

33277 CGCCCATAAAAAACGCCTGCAAAAACC
W83 CGCCCATAAAAAATACCTGCAAAAACC

図 4. W83 の FimR 結合配列に認められた変異

W83 株は FimA 線毛関連遺伝子群を全て保有するにもかかわらず線毛タンパク質を産生せず、その原因が永らく不明であった。今回特定した FimR 結合配列内に変異が認められたことから、これに起因する FimR の標的配列への結合親和性の変化が W83 株の線毛非形成性の主要原因ではないかと考えられた。しかしこの仮説は、後述するセンサータンパク質 FimS の構造・機能解析の結果、否定されることとなった。

(2) W83 が有するセンサー FimS の機能不全性の証明と線毛非形成との関連

W83 株と 33277 株では FimS の一次構造にも違いがあることが既に判っていたが、機能との関連は不明であった。そこで 33277 株の FimS 遺伝子を発現ベクターに組み込み W83 株に導入したところ、FimA 線毛タンパク質の産生が誘導された (図 5B、レーン 2)。逆に W83 株の FimS 遺伝子を 33277 株の FimS 欠損変異株に導入した場合は、FimA の産生は誘導されなかった。このことから、W83 型 FimS の機能不全性が初めて明らかになった。更に 33277 型 FimS とは一次構造が異なる領域のうち、どの領域が W83 型の機能不全性に関わっているのかを探るため、33277 と W83 のキメラ型 FimS 遺伝子を二種類作製し W83 株に導入した

(図 5A)。その結果、W83 型では欠失している C 末端の G3 box という保存領域を 33277 型から付け足すだけで、W83 型 FimS は機能を回復し FimA タンパク質の産生を誘導することが判明した (図 5B、レーン 5)。

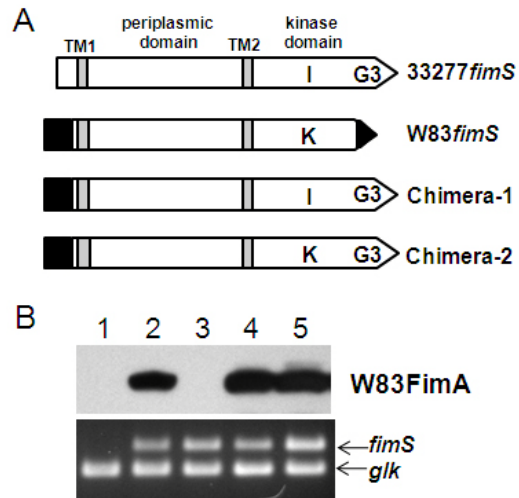


図 5. A: 33277 株と W83 株間の FimS の構造の違いとキメラ体の構築。B: 各 FimS 遺伝子を導入した W83 株の FimA 産生誘導能の検出。レーン 1, W83 親株; 2, 33277 *fimS* 導入株; 3, W83 *fimS* 導入株; 4, Chimera-1 導入株; 5, Chimera-2 導入株。

二成分系センサータンパク質のキナーゼ活性を担うドメイン内には、リン酸基の供給源である ATP を捕捉するためのポケット構造があるが、G3 box はその構成要素である。G3 box が欠失すると FimS キナーゼドメインへの ATP 結合効率が低下するので、FimS の自己リン酸化反応が起こり難くなり、FimR へのリン酸基リレーが阻害される。その結果 FimR は活性型へと構造を変えられず、線毛関連遺伝子群 (*fim* gene cluster) の転写促進因子として機能しない。つまり W83 が線毛タンパク質非産生株である主原因は、FimX 遺伝子上流の FimR 結合配列内に見いだされた変異にあるのではなく、FimS の構造変異に基づくリン酸リレー機構の破綻で充分説明がつくことが明らかになった (図 6)。

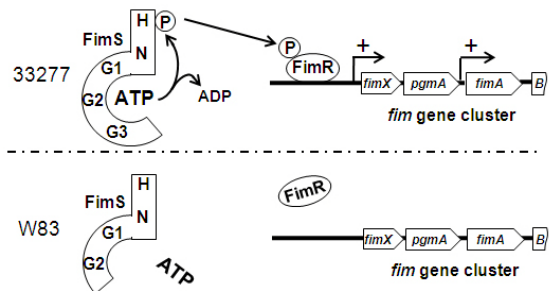


図 6. G3 box を欠失した W83 株 FimS センサーキナーゼの機能不全と FimS-FimR リン酸リレー機構の破綻

以上の新知見は FimSR が Pg 菌の主要病原因子 FimA 線毛の合成を調節する唯一の二成分制御系であり、本菌の病原性を抑制する上で有望な標的となり得ることをも示唆した点で重要な成果であり、既に論文にまとめ、現在英文専門誌に投稿中である。

(3) *T. forsythia* の TF0022 レギュレーター変異株作製とプロテオミクス解析

T. forsythia に対するエリスロマイシンの最小発育阻止濃度測定結果から、変異株の選択培養には終濃度 $1 \mu\text{g/ml}$ のエリスロマイシンを培地に添加することと決定した。得られた 2 つの TF0022 変異株候補コロニーから抽出したゲノム DNA を制限酵素 *StuI* で消化し、サザンブロット法で解析したところ、いずれも TF0022 遺伝子座に Em^r カセットが挿入され、同遺伝子が不活化していることが判明した (図 7)。これで従来 Tf 菌の薬剤耐性マーカーとして用いられていたクロラムフェニコール耐性に加え、新たにエリスロマイシン耐性が利用可能となり、二重変異株作製などへの応用が本菌においても可能になると期待される。またこの Em^r カセットにはプロモーター等の制御配列が内在するため単独で機能し、挿入場所を選ばないという大きな利点がある。これが Tf 菌でも機能したという事実は、内在する転写・翻訳制御配列が Pg 菌のみならず Tf 菌でも共通認識され機能したことを意味するので、分子遺伝学的解析技術の開発が遅れている Tf 菌に対し、既に Pg 菌で実用化されている多くの技術が流用可能であることが示唆される。

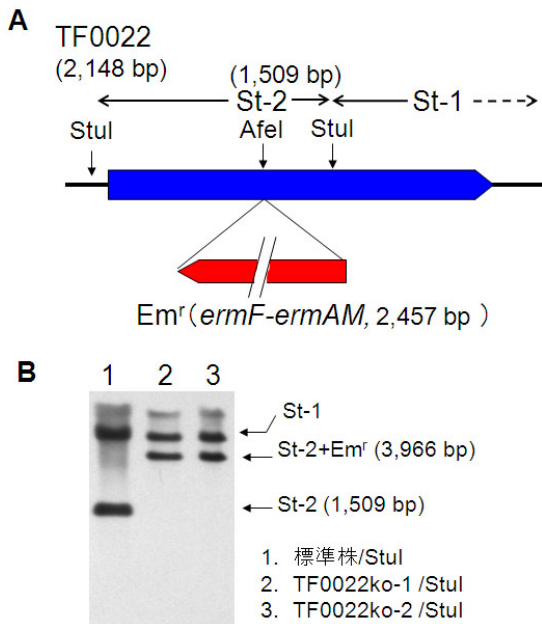


図 7. A: TF0022 遺伝子座への Em^r カセット挿入。
B: TF0022 変異株のサザンブロット解析。

更に、二次元電気泳動法と質量分析とを組み合わせたプロテオミクス解析によって、標準株 ATCC 43037 が産生する 200 以上のタンパク質の同定に成功し、それらの二次元展開図を作製した (図 8)。

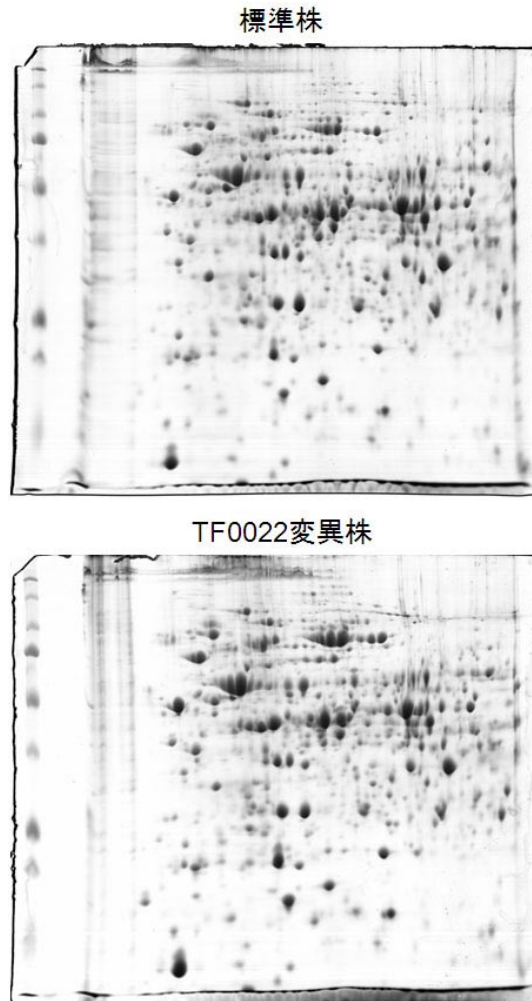


図 8. Tf 菌標準株 ATCC 43037 及び TF0022 変異株の総タンパク質の二次元展開図

これらを基にした、TF0022 変異株と標準株が産生するタンパク質の網羅的比較解析の結果、TF0022 レギュレーターはアミノ酸代謝・タンパク質合成・糖代謝等に関わる酵素群に加え、シアリダーゼ・ペプチダーゼ等の病原因子や、ヒートショックタンパク質、酸化ストレス等に応答する蛋白質の発現をも正に調節している傾向が認められた。生息環境が悪化した場合でも、嫌気性菌たる本菌の長期生存に TF0022 レギュレーターが貢献している可能性が示唆され、本菌の菌周局所での頑固な生存を抑制する上で有望な標的となり得ると考えられる。

現在これらのデータを論文にまとめ、英文専門誌に投稿準備中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- ① Yoshimura, F., Murakami, Y., Nishikawa, K., Hasegawa, Y., and Kawaminami, S. Surface components of *Porphyromonas gingivalis*. Journal of Periodontal Research, 44, 1-12, 2009. 査読有り
- ② 西川 清. 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の線毛非形成株に認められる FimS ヒスチジンキナーゼの機能低下と *fimS* 遺伝子の変異. 第38回東海乳酸菌研究会研究報告書, 38, 37-42, 2009. 査読なし
- ③ Nagano, K., Murakami, Y., Nishikawa, K., Sakakibara, J., Shimozato, K. and Yoshimura, F. Characterization of RagA and RagB in *Porphyromonas gingivalis*: study using gene-deletion mutants. Journal of Medical Microbiology, 56, 1536-1548, 2007. 査読有り
- ④ Duran-Pinedo, A., Nishikawa, K., and Duncan, M.J. The RprY response regulator of *Porphyromonas gingivalis*. Molecular Microbiology 64, 1061-1074, 2007. 査読有り

[学会発表] (計 9 件)

- ① 西川 清. 歯周病原細菌 *Porphyromonas gingivalis* の線毛非形成株に認められる FimS ヒスチジンキナーゼの機能低下と *fimS* 遺伝子の変異. 平成 20 年度 東海乳酸菌研究会 研究報告会, 2009. 2. 7, 中日パレス (名古屋)
- ② Niwa, D., Nishikawa, K., Murakami, Y., Nakamura, H., and Yoshimura, F. : Proteomic analyses of a two-component regulator mutant of *Tannerella forsythensis*. The 56th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2008. 11. 30, Aichi-Gakuin University (Nagoya)
- ③ 丹羽大介, 西川 清, 中村 洋 : *Tannerella forsythensis* レスポンスレギュレーター変異株のプロテオーム解析. 第 129 回日本歯科保存学会 2008 年度秋季学術大会, 2008. 11. 6, 富山国際会議場 (富山)
- ④ 西川 清. 微生物部門ワークショップ 「口腔病原細菌のゲノム解析とその応用」 *Porphyromonas gingivalis* 線毛の発現調節機構. 第 50 回 歯科基礎医学会学術大会 および総会, 2008. 9. 25,

TOC 有明コンベンションホール (東京)

- ⑤ Niwa, D., Nishikawa, K., Murakami, Y., Nakamura, H., and Yoshimura, F. Generation and proteomic analysis of a two-component regulator mutant of *Tannerella forsythensis*. American Society for Microbiology 108th General Meeting, Abstract H-009, 2008. 6. 2, Boston Convention & Exhibition Center (Boston, MA, USA)
- ⑥ 長谷川義明, 西川 清, 佐藤啓子, 村上幸孝, 中村 洋, 吉村文信 : *Porphyromonas gingivalis* の Mfa1 線毛構成成分 *mfa2* の機能解析. 第 81 回日本細菌学会総会, 2008. 3. 24, 京都国際会館 (京都)
- ⑦ 佐藤啓子, 西川 清, 大野公稔, 雪竹英治, 村上幸孝, 中山浩次, 吉村文信 : *Porphyromonas gingivalis* 鉄輸送関連タンパク質. 第 49 回歯科基礎医学会学術大会, 2007. 8. 31, 北海道大学 (札幌)
- ⑧ 丹羽大介, 西川 清, 村上幸孝, 中村 洋, 吉村文信 : *Tannerella forsythensis* の 2 成分制御系変異株作成と表現型の解析. 第 49 回歯科基礎医学会学術大会, 2007. 8. 31, 北海道大学 (札幌)
- ⑨ Nishikawa, K., Duncan, M.J., and Yoshimura, F. FimX-Y: The key membrane proteins for *Porphyromonas gingivalis* fimbriation. American Society for Microbiology 107th General Meeting, Abstract B-463, 2007. 5. 25, Metro Toronto Convention Centre (Toronto, Canada)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西川 清 (NISHIKAWA KIYOSHI)
愛知学院大学・歯学部・講師
研究者番号 : 50340146

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

佐藤 啓子 (SATO KEIKO)
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号 : 70410579

(4) 研究協力者

丹羽 大介 (NIWA DAISUKE)
愛知学院大学・歯学部・大学院生
マーガレット ダンカン (MARGARET DUNCAN)
米国フォーサイス研究所・上級主任研究員