

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 19 日現在

機関番号：33902

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592722

研究課題名(和文) 共用ベクターを用いた難培養性口腔嫌気性菌への遺伝子導入・発現系の開発

研究課題名(英文) Development of an efficient transformation and gene expression system for a fastidious oral anaerobe

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)： 難培養性口腔嫌気性細菌のタンネレラ・フォーサイシアは最も重要な歯周病原菌の一つであるが、その遺伝子操作に必要な基本技術の殆どが未確立のままだった。本研究過程において、血液平板上でバイオフィーム状に増殖させた本菌には菌体外DNAを自発的に取り込み形質転換を容易に起こす性質があることを発見した。これを応用し、狙った遺伝子のみが破壊された変異株を簡単にかつ高効率で作製する方法を確立した。また、本菌のみならず他の重要な歯周病原菌でも自律的に機能する薬剤耐性遺伝子カセットを新規に開発し、その応用として、複数菌種に跨った遺伝子導入と発現が可能となる共用発現ベクターを設計した。

研究成果の概要(英文)： A comF-dependent natural competence has been discovered for the first time in an important periodontal pathogen, *Tannerella forsythia*. Keeping *T. forsythia* in a biofilm throughout the procedure allowed efficient DNA uptake and allelic replacement. Based on this finding, a simple method has been established for efficient targeted mutagenesis in *T. forsythia*. One of the critical conditions affecting the efficiency of transformation is the freshness of biofilm, and the recommended subculture duration of input biofilm is 4 days just before transformation. Furthermore, an autonomous chloramphenicol-resistant CAT cassette, permF-CAT, has been constructed and successfully applied to *T. forsythia*. Using permF-CAT, a final version of the common expression vector has been designed which should be functional not only in *T. forsythia* but also in the other Red Complex anaerobes.

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：嫌気性口腔細菌 タンネレラ・フォーサイシア ポルフィロモナス・ジンジバリス 遺伝子導入 発現ベクター 薬剤耐性カセット ナチュラルコンピテンス バイオフィーム

1. 研究開始当初の背景

Tannerella forsythia (Tf 菌)はヒトの歯周組織に常在する口腔嫌気性細菌であるが、近年その検出量と検出頻度が歯周炎の発生・進行と明確に相関することを示す疫学的な証拠が得られたことから、*Porphyromonas gingivalis* (Pg菌) や *Treponema denticola* (Td 菌) と合わせて「レッドコンプレックス」と総称され、臨床的に最重要の歯周病原細菌群とみなされてきた。しかしTf 菌を対象とした基礎研究の進展は他のレッドコンプレックス細菌と比べ著しく遅れていた。その要因として本菌が難培養性で取扱いが難しいことに加え、遺伝子操作に必要な基盤技術が殆ど未確立のままであることが大きいと思われた。例えばTf菌の遺伝子破壊株作製に関する報告は過去数例のみで、それらに用いられた技術は汎用性が乏しく普及しなかった。また任意の外来遺伝子を導入・発現させる実験系を用いた研究報告に至っては皆無に等しい状況であった。そこで、Tf菌に直接応用できる、汎用性と普及し易さを兼ね備えた遺伝子導入・発現系の新規開発が待たれていた。

一方Pg菌では、90年代末頃までにバクテロイデス属由来のエリスロマイシン耐性遺伝子カセット $ermF$ を応用した遺伝子破壊株作製技術が確立され、更にテトラサイクリン耐性遺伝子をもつバクテロイデス属由来プラスミドpT-COWがベクターとして応用可能なこともわかってきた。研究代表者はこれを改変した利便性の良い発現ベクターpTCBexを2001年に構築し、Pg菌の遺伝子破壊株へ任意遺伝子を導入・発現させる相補実験系を確立した。また2006年以降、研究代表者らが $ermF$ カセットの応用をTf菌にも拡大した結果、効率の面では改善の余地があるものの、遺伝子破壊株作製自体は可能であることが判明し、学会誌等で報告していた。尚、 $ermF$ カセットはPg菌、Tf菌の他、近年Td菌においても他研究機関から応用成功例の報告があった。

2. 研究の目的

プロモータ配列を内蔵する $ermF$ カセットがレッドコンプレックス3菌種全てで機能するという事実は、プロモーターを含めた遺伝子制御配列の多くがこれら3菌種間で共通もしくは類似し、機能的に互換性がある可能性を示唆していた。そこで、Pg菌で機能するプラスミドpTCBexもTf菌に発現ベクターとして直接応用できるのではないかと考えた。

本研究の目的は、Tf菌へ任意の遺伝子を高い効率で導入し発現させるための分子遺伝学的基盤技術の確立を目指すことであった。その柱となるのは、1)液体培養された菌体とエレクトロポレーションを用いた従来法よりも効率が高く安定した結果が得られる新規の遺伝子導入技術の確立と、2)P

g、Tf両菌種に任意の遺伝子を導入し発現させる際の運び屋(ベクター)として機能する共用プラスミドベクターの開発、の2つである。更にこれらの新技術を用い、両菌種においてバイオフィーム形成等の病原性発現調節に関与するとみられる2成分制御系センサー遺伝子の破壊(ko)株作製と性状解析への応用も目指した。

3. 研究の方法

(1)プラスミドpTCBexの全塩基配列決定と小型発現ベクターpEPT1exへの改変

キャピラリーシーケンサー3100AvantとBig Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (共にAB社)及びカスタムオリゴDNA(理科研)を用いてpTCBexの全塩基配列9.7-kbpを決定し、遺伝子解析ソフトGENETYX ver.8にて制限酵素地図を作成した。これを基に削除可能領域を予想し、各種制限酵素とカスタムプライマー及びTOYOBO社KOD-Plus Mutagenesis Kitを用いたインバースPCR法(i-PCR)を繰り返すことで不要な接合関連遺伝子領域等の削除を行い、全長7.5-kbpに小型化されたエレクトロポレーション専用発現ベクターpEPT1exを構築した。

(2)Pg菌fimS発現ベクターライブラリー作製

①エラープローンPCR法によるFimSセンサーコード領域への変異導入: 校正機能の欠如した耐熱性DNAポリメラーゼPfu II (Agilent社)を用いfimS遺伝子のセンサードメインコード領域内にランダムに変異を導入した1.1-kbpのPCR産物を調製した。これをメガプライマーとして利用し、pEPT1exに野生型fimS遺伝子全長が予め組み込まれた構築体を鋳型として正確なPCRを行い(TOYOBO社KODplus-Neo使用)、正常センサードメインコード域をランダム変異導入配列に置換した。更に制限酵素DpnIで鋳型のみを消化後、大腸菌DH5 α 株へ形質転換して変異導入ベクターライブラリーを作製した。

②Pg菌fimS変異株ライブラリーの作製と評価: 有線毛Pg菌株ATCC33277のfimS遺伝子座を $ermF$ 挿入でノックアウトして得た線毛欠損株AGFS1に対し、DH5 α から抽出したfimS変異導入pEPT1exライブラリーをエレクトロポレーション法で直接導入した。血液平板上で黒色コロニーを形成したエリスロマイシン・テトラサイクリン2重耐性株を選択し、96穴プレートに移して数日間液体培養した各菌株を直接鋳型としてPCRを行い、各株が保持するプラスミド由来のFimSセンサーコード域DNA断片を増幅した。得られた1.1-kbpのPCR産物は直接シーケンス反応の鋳型として用い、変異導入された塩基を特定した。更にそれによって生じるアミノ酸の置換を予測した。

③Pg菌fimS変異株の表現型解析と機能マップ作製: 抗FimA線毛タンパク抗体を用

いた全菌体サンプルのWestern blot解析によって各fimS変異株の線毛産生能を評価した。このデータとfimSシーケンスデータを基に、ランダム変異導入で生じたFimSセンサードメイン内のアミノ酸置換と線毛産生量を対応づけたFimSセンサードメイン機能マップを作製した。

(3) Tf菌バイオフィームへのDNA導入と遺伝子破壊株作製

① 2成分制御系遺伝子ko構築体の作製： Tf菌のハイブリッド型2成分制御系遺伝子TF2307及びTF2924全長をTf菌ゲノムからPCR増幅し大腸菌プラスミドベクターpUC19のSmaI切断部位へクローン化した。次にTF2307はMluI切断部位、TF2924は1.2-kbpのSnaBI断片除去部位にermFが挿入された遺伝子ko構築体をそれぞれ作製した。

② permF-CATカセットの構築とcomF遺伝子ko構築体の作製： ermFカセットからプロモーター領域(permF、283-bp)をPCRで増幅・調製した。またCAT構造遺伝子(660-bp)は大腸菌プラスミドベクターpACYC184からPCR増幅した。これら断片を重複PCR法にて連結し、全長943-bpのpermF-CATカセットを調製した。

comF遺伝子を含む1.2-kbpの断片はTf菌ゲノムからPCR増幅し、pUC19ベクターへクローン化した。これを制限酵素AvaIで切断しpermF-CATを挿入連結することでcomF-ko構築体を得た。

③ Tf菌バイオフィームを用いた形質転換(バイオフィーム直接混合法)： 血液寒天プレート上で4-29日間培養したTf菌標準株の菌塊(バイオフィーム)2-8mgを新鮮な血液寒天プレートにのせ、そこに1-2µgの遺伝子ko構築体を含む極少量のDNA溶液を直接混合し24時間以上嫌気培養した後、1µg/mlエリスロマイシンまたは10µg/mlクロラムフェニコール含有選択プレート上に移して12日間以上嫌気培養した。発育した薬剤耐性コロニーの一部をサンプリングし、PCR法で目的とする遺伝子座にカセット挿入変異が生じていることを確認した。

4. 研究成果

(1) 小型発現ベクターpEPT1exの開発とPg菌への応用

① pEPT1exの構造： pTCBexは全長が10-kbpとサイズの大きなプラスミドで、その導入効率を高めるために専ら特殊な大腸菌を介した接合法によってPg菌へ導入していた。しかし大きなベクターサイズはクローニングを困難にし、更に接合法のTf菌への応用は大腸菌との分離培養ができず不可能であった。そこで、これをエレクトロポレーション導入専用ベクターとして全長7.5-kbpまで小型化したものがpEPT1exである(図1)。薬剤耐

性マーカーがtetQ依存性のテトラサイクリン耐性であることはpTCBexと同様である。

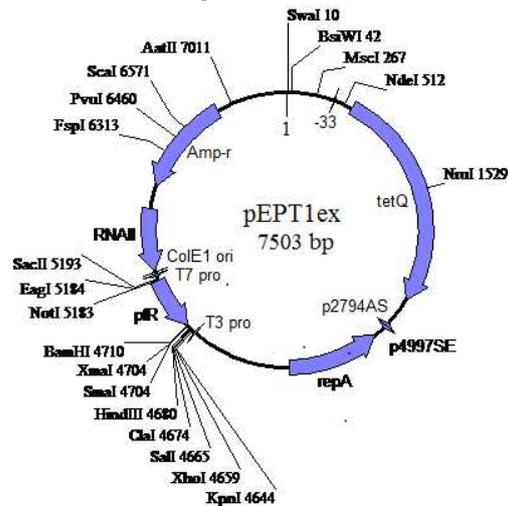


図1. pEPT1exの構造

② Pg菌2成分系センサーFimSの機能マッピング： pEPT1exがPg菌で機能することを検証するため、Pg菌の線毛発現やバイオフィーム形成の調節に重要な2成分系センサーであるFimSのセンサードメイン機能マップ作製実験へ応用した。その結果100以上のPg菌形質転換株が得られ、そのうち約50株は変異型fimS遺伝子が組込まれたpEPT1exを保持していた。各変異株におけるFimSセンサードメイン内の変異アミノ酸の位置と線毛産生能との関係をまとめた機能マップを図2に示す。

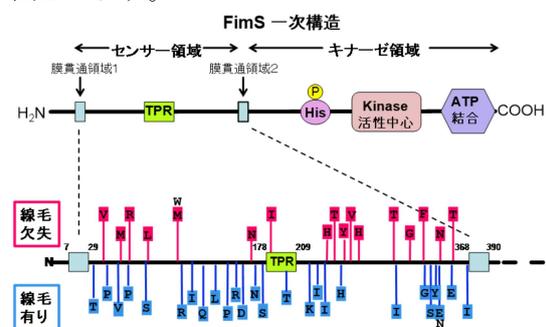


図2. FimSセンサードメイン機能マップ

FimSが環境中の未知シグナルを受容すると、Pg菌の線毛産生と歯周局所でのバイオフィーム形成が促進される。そのセンサー領域内のどのアミノ酸がシグナル受容に重要なかを見極める上で機能マップは欠かせない。実験開始当初は、線毛欠損株が保有するFimSではセンサードメイン中央部のTPRモチーフ付近に変異が集中すると予想したが、結果は図2に示すように単純ではなく、線毛産生能に影響するアミノ酸変異はセンサードメイン全域にわたって散在していた。今後更にデータを集積し、FimSの立体構造予測データ等と重ね合わせて環境シグナル同定や新薬開発等に役立てたい。

本実験によってpEPT1exが少なくともPg菌では発現ベクターとして十分機能することが確かめられた。またPg菌を宿主とした発現ベクターライブラリーの構築は恐らく本研究が最初の成功例と思われる。

(2) Tf菌におけるナチュラルコンピテンスの発見と遺伝子破壊株作製法の確立

Pg菌バイオフィームには外環境中のDNAを積極的に取り込む機構(ナチュラルコンピテンス)があり、それがcomF遺伝子依存性であるとの報告が近年なされた。これにヒントを得てTf菌標準株のゲノムデータベースを探索し、comF相同遺伝子クラスターの存在を確認した(図3)。

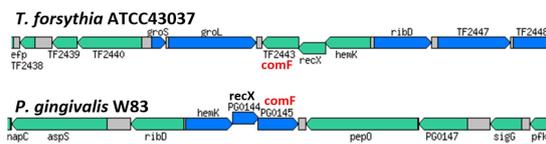


図3. Tf菌及びPg菌ゲノム上のcomF相同遺伝子クラスター

そこで、血液平板上で培養したTf菌バイオフィームに薬剤耐性カセットを含むDNA断片を直接混合し、平板状で回復培養と選択培養を行った結果、従来法よりも格段に高い効率で薬剤耐性株が多数得られた。つまりTf菌においてもナチュラルコンピテンスの仕組みが存在することを初めて発見した。

この「バイオフィーム直接混合法」によって、Tf菌の2種類のハイブリッド型2成分制御系遺伝子・TF2307およびTF2924の挿入変異株作製に成功した(図4および図5)。これらの遺伝子はいずれも、液体培養された菌体とエレクトロポレーションを用いた従来方法では変異株を作製することができなかったが、この新しい導入方法を用いることによって短期間のうちに容易にかつ再現性良く作製することができた。

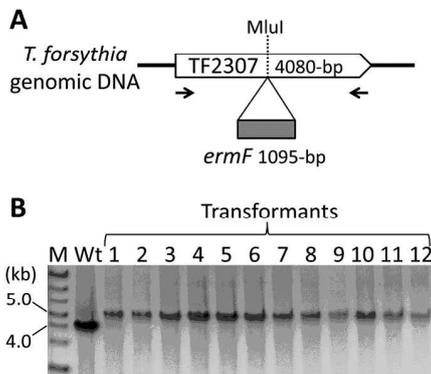


図4. (A) TF2307ko構築体の作製. (B) 得られた形質転換株コロニーのPCR法による検証: Wt, 親株; Transformants, ermF挿入TF2307ko株.

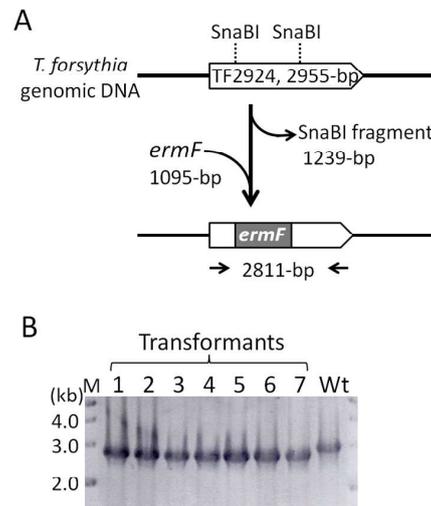


図5. (A) TF2924ko構築体の作製. (B) 得られた形質転換株コロニーのPCR法による検証: Wt, 親株; Transformants, ermF挿入TF2924ko株.

バイオフィーム直接混合法を用いたTf菌の形質転換効率に影響を与える因子について更に検討した結果、以下の2つの条件が最も重要であることを突き止めた。

i) 予め脱気した血液寒天培地上で準備培養開始後4日から1週間程度以内に増殖した新鮮なバイオフィームを形質転換に用いる(図6)

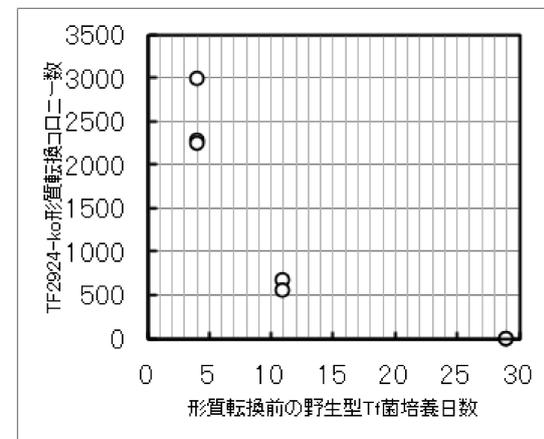


図6. Tf菌バイオフィームの新鮮度と形質転換効率との関係

ii) 薬剤カセット挿入遺伝子構築体との直接混合から24時間程度の回復培養期間を経て選択培地に塗り広げるまでの全期間、宿主のTf菌は常に血液寒天培地上でバイオフィーム状に保つ

以上の新知見をまとめた論文は2013年7月、英文専門誌に受理された。本論文は電子版掲載開始から2014年3月末までの期間にのべ180回のダウンロード数または閲覧数を記録し(出版元のElsevier社調べ)、当該研究分野コミュニティーの本研究成果への関心の高さを示している。

(3) 共通薬剤耐性カセットpermF-CATの開発と応用

①本薬剤耐性カセット開発の背景：当初Pg菌とTf菌の両菌種において共用発現ベクターとして使用することを念頭に開発したpEPT1exプラスミドであったが、実際にTf菌への導入を試みたところ、バイオフィーム直接混合法、エレクトロポレーション法いずれの導入法を用いてもテトラサイクリン耐性の形質転換株は得られなかった。Tf菌ゲノムにはtetQ遺伝子が存在するにもかかわらず自然耐性でないことから、Tf菌ではtetQ遺伝子産物が元々機能しない可能性が最も疑われた。そこでtetQに代わる薬剤耐性遺伝子として過去にTf、Pg両菌種で応用実績があるクロラムフェニコール耐性のCAT遺伝子に着目し、これをermFのプロモーターと連結して自律機能を持たせた薬剤耐性カセットpermF-CAT (CATカセット)を開発した。

②CATカセットのTf菌への応用 (comF-ko株の作製と意義)：バイオフィーム直接混合法を用いてCATカセットをTf菌ゲノムのcomF遺伝子座に相同組み換えで挿入し、クロラムフェニコール耐性comF-ko株を容易に作製した。この事から新規のCATカセットはTf菌で機能することが確かめられた。

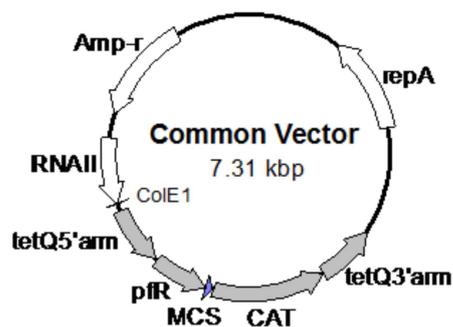
次にcomF-ko株を宿主としてermFカセットを含むTF2307ko及びTF2924ko構築体を導入したところ、エリスロマイシン耐性の形質転換株は全く得られなかった。一方陽性対照実験としてTf菌野生株を宿主に用いた場合は多数の耐性株が得られ、TF2307及びTF2924の遺伝子座にermFが挿入されていた。この結果は、Tf菌で観察されるナチュラルコンピテンスがPg菌と同様comF遺伝子依存性であることを示唆している。

(4) Pg菌-Tf菌共用発現ベクターの最終デザイン

①pEPT1exCATの構築とTf菌への応用：Tf菌で機能することが確かめられたCATカセットをpEPT1exのtetQ領域と置換し、新たにpEPT1exCATを構築した。ところが、これをTf菌標準株に形質転換したところ、クロラムフェニコール耐性コロニーは複数得られたものの、それらからプラスミド抽出キットで抽出されたプラスミド様DNAの構造は何れも導入したpEPT1exCATとは全く異なるものであった。恐らくTf菌に導入されたプラスミドは制限修飾系や組換え酵素群の作用によって大幅な構造変化を来したと考えられ、導入時のプラスミド構造を本菌で保持することは非常に困難であるとの結論に至った。そしてPg菌-Tf菌共用発現ベクターの設計を根本的に改める必要に迫られた。

②共用発現ベクターの最終デザイン：バイオフィーム直接混合法の確立でTf菌

では相同組換えによる外来DNAのゲノムへの挿入が高効率で行えるようになった。またゲノム中に本菌では機能していないと考えられるtetQ領域が存在することも明らかになった。そこで、遺伝子発現に必須のエLEMENTとCATカセットを連結し、更にその両端にtetQの部分配列を連結したDNA断片を構築すれば、それをTf菌ゲノムのtetQ領域に組換え挿入することは容易であると考えられた。Pg菌で機能するpEPT1exの基本構造を生かしつつ、前述のDNA断片と融合した新しい構造を考案し、これをTf菌-Pg菌共用発現ベクターの最終デザインとした(図7)。



Amp-r: *E. coli*用アンピシリン耐性カセット
RNAlI, ColE1: *E. coli*用 plasmid複製ELEMENT
tetQ5'arm: *T. forsythia*用 tetQ 5'側挿入配列
pfR: 任意遺伝子発現用プロモーター
MCS: 任意遺伝子クローニング部位
CAT: クロラムフェニコール耐性カセット
tetQ3'arm: *T. forsythia*用 tetQ 3'側挿入配列
repA: *P. gingivalis*用 plasmid複製ELEMENT

図7. 共用発現ベクターの最終デザイン

本共用ベクターが大腸菌及びPg菌に導入されると、各菌種に特異的な複製ELEMENTが機能し、プラスミド構造のまま安定に複製・保持される。一方Tf菌に導入された場合では、有効な複製ELEMENTが存在しないためプラスミドとしては保持されず、代わりにプロモーター・外来遺伝子・CATカセットをtetQ5'armとtetQ3'armで挟んだ領域(図7の着色部分)のみがTf菌の持つ相同組換え機構によってゲノムのtetQ領域に挿入され、ゲノムDNAと一体化することで安定に複製・保持される。プラスミド、ゲノム、どちらの保持形式であれ、一旦本ベクターのMCS部位にクローン化された外来遺伝子は直上流のpfRプロモーターによって自律的にその発現がドライブされることになる。

この共用発現ベクターの応用としては、例えば複数のレッドコンプレックス細菌種を同時対象とした相同遺伝子の発現解析などを想定しており、これまで困難だった菌種横断的な研究手法の新展開が今後期待できる。

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1件)

- ① Kiyoshi Nishikawa, Yoshinobu Tanaka,
A simple mutagenesis using natural
competence in *Tannerella forsythia*,
Journal of Microbiological Methods,
査読有、Vol.94、No.3、2013、378-380
DOI:10.1016/j.mimet.2013.07.011

[学会発表](計1件)

- ① Kiyoshi Nishikawa, Natural competen-
ce of *Tannerella forsythia*: application
to the insertional mutation of a two-
component system-related gene,
Abstract No.4LBA-0704、第35回日本
分子生物学会年会、2012年12月14日、
福岡国際会議場・マリンメッセ福岡

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