

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：17301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659817

研究課題名(和文) 歯周病原細菌プレボテラ・インターメディアの部位特異的変異株作製への挑戦

研究課題名(英文) Challenge to generate site-directed mutants of the periodontal pathogen *Prevotella intermedia*

研究代表者

中山 浩次 (Nakayama, Koji)

長崎大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：80150473

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)：歯周病原細菌の一つである *Prevotella intermedia* は *Porphyromonas gingivalis* から我々のグループが見出した病原因子の輸送に関わる新規の分泌システム、Type IX 分泌システム(T9SS)の遺伝子を保有する。が、*Pre. intermedia* では遺伝子操作技術が確立されていない為に病原因子等の詳細な解析は行われてなかった。本研究により、本菌での遺伝子操作技術の確立と遺伝子特異的な変異株作成に初めて成功することができた。作成したT9SSの必須遺伝子、*porK* と *porT* の変異株から本菌の黒色素産生能や赤血球凝集能にT9SSが重要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We found a novel secretion system, the type IX secretion system (T9SS), in *Porphyromonas gingivalis* that translocates virulence factors across the outer membrane. T9SS-related genes are found in the genome of another periodontal pathogen, *Prevotella intermedia*. As molecular genetic manipulation has not been established in *Pre. intermedia*, virulence factors of *Pre. intermedia* have not been elucidated by molecular genetic analysis. In this study, we tried to establish site-directed mutagenesis in *P. intermedia*. We succeeded to generate T9SS mutants. These mutants showed the defects of pigmentation on blood agar plates and hemagglutination, indicating that T9SS is important for the virulence of *Pre. intermedia*.

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 細菌 遺伝子操作

1. 研究開始当初の背景

これまでに我々のグループは代表的な歯周病原菌、*Porphyromonas gingivalis* について、その病原因子の解析及び病原因子の輸送システムについて解析を行い *Por. gingivalis* に存在する新たな分泌機構、Por 分泌機構すなわち Type IX 分泌機構 (T9SS) を見いだした (Sato K. *et. al.* PNAS. 2010)。この機構はタンパク分解酵素などの病原因子を外膜または菌体外へ運ぶ。T9SS に関わる遺伝子群は近縁の歯周病病原菌にも存在する。近年のゲノム解析から *Prevotella intermedia* にも T9SS 関連遺伝子群が存在することが確認されている。*Pre. intermedia* の病原因子としては *Por. gingivalis* と同様にタンパク分解酵素が考えられている。そこで *Pre. intermedia* においても T9SS が病原因子の輸送や分泌に重要な役割を持つと予想されている。しかし *Pre. intermedia* は現時点で遺伝的操作の手法が確立されてないために解析が他の歯周病病原菌に比較して著しく遅れている。そこで本菌での T9SS の役割、また本菌の病原因子の詳細な解析を行うためには遺伝子操作技術の開発が必須となっている。

2. 研究の目的

Pre. intermedia における病原因子、病原因子の輸送機構の詳細な解析に欠かせない、遺伝子操作技術の確立を行う。特に部位特異的な変異導入の手法の開発を行う。また開発した手法を用いて *Pre. intermedia* の病原性に重要な役割を持つと予想される T9SS の変異株の作成を試みる。

3. 研究の方法

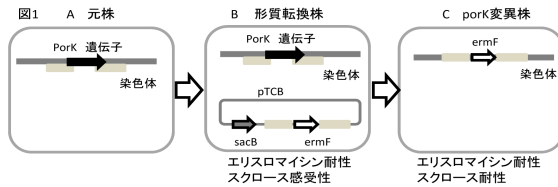
(1) 形質転換可能株の探索

Pre. intermedia に近縁の *Por. gingivalis* での変異株作成の実験においては遺伝子操作の効率が使用する株によって大きく異なっていた。そこで *Por. gingivalis* で確立している形質転換法を用いて、*Pre. intermedia* の種々株から形質転換可能株の探索を行う。具体的には大腸菌 S17-1 株から接合伝達で転移するシャトルプラスミド (テトラサイクリン耐性遺伝子含有) を用い、形質転換菌をテトラサイクリン耐性株として検出した。

(2) 形質転換可能株のゲノム解析

(1) で得られた形質転換可能株から今後の詳細な解析に欠かせない遺伝子情報を得る。その為に全ゲノム配列の決定を次世代シーケンサーを用いて行う。また染色体の数とサイズはパルスフィールド電気泳動により決定する。

図1 変異株作成の手順



(3) 部位特異的な遺伝子操作技術の確立 (T9SS 変異株の作成)

これまでの結果から得られたゲノム配列を基に T9SS に必須であると推測される *porK*, *porT* 遺伝子の上下流領域を含む断片を PCR にて増幅する。その断片の目的遺伝子領域をエリスロマイシン耐性遺伝子に置換した targeting construct を作成、シャトルプラスミド pTCB に挿入する。また変異株作成時に最終的にプラスミドの脱落株を選択する為のカウンターセレクト遺伝子としてスクロース感受性をもたらし *sacB* 遺伝子も挿入する。

作成した変異株作成用のシャトルプラスミドを大腸菌 S17-1 株から接合伝達で *Pre. intermedia* に導入。ゲンタマイシンで大腸菌を殺菌したうえでエリスロマイシン耐性の形質転換株を得る (図 1 B)。得られた形質転換菌からスクロース耐性のプラスミド脱落株を選択することで、目的遺伝子がエリスロマイシン耐性遺伝子に置換した変異株を選択する (図 1 C)。また得られた変異株から染色体 DNA を調製し、サザンハイブリダイゼーションにより特異的な遺伝子破壊を確認する。

また、形質転換菌の作成効率の改善を図るため、近縁菌種の *Bacteroides* へのシャトルプラスミドの接合伝達の条件を参考に実験条件の検討を行う。

(4) *Pre. intermedia* T9SS 変異株の解析

近縁菌 *Por. gingivalis* の T9SS 変異株では T9SS 依存性に輸送されるさまざまな病原因子の輸送が阻害されるために様々な活性、血液寒天培地上での黒色素産生性、赤血球凝集活性、バイオフィーム形成能が失われる。そこで *Pre. intermedia* T9SS 変異株でのこれらの活性の変化を調べる。また遺伝子配列から T9SS 依存性に菌体表層や菌体外へ輸送されると予測されているタンパク分解酵素 *interpain A* の活性についても活性の変化を測定する。

黒色素産生性については 5% 羊脱繊維血を添加した TS 寒天培地で親株、変異株を 5 日培養してコロニーの色調を観察する。

interpain A の活性については親株、変異株の OD0.6 の菌液 10ul を用いて pH7.5、0.1mM Tris-HCl, 5mM EDTA, 2mM DTT 溶液中で蛍光基質 10mM Boc-Val-Leu-Lys-MCA と 37 度にて 10 分反応させる。遊離 MCA を励起光 380nm での蛍光波長 460nm にて計測する。

赤血球凝集活性は親株、変異株を培養後に集

菌、OD6.0 の菌液を調製する。調製した菌液から 2 段階希釈した菌液を丸底 96 穴プレートに分注する。それぞれに PBS 洗浄ウサギ赤血球を最終濃度 1% で添加、室温に静置して赤血球凝集を観察する。

バイオフィーム形成活性は 96 穴プレートで親株、変異株を一日培養する。PBS で洗浄後、バイオフィームを形成した菌をクリスタルバイオレットで染色する。エタノールで色素を抽出後、540nm での吸光度を測定する。

4. 研究成果

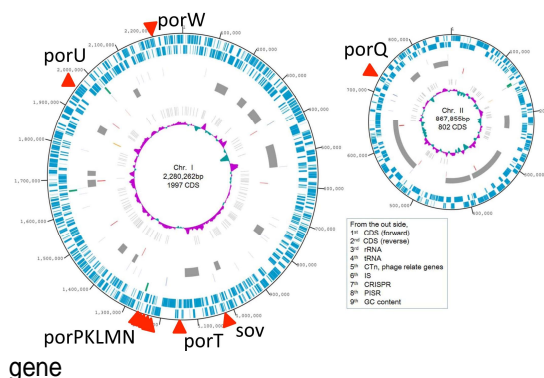
(1) 形質転換可能株の探索

Pre. intermedia の標準株 (ATCC25611) と臨床分離株の計 20 株を用いて大腸菌 S17-1 株からの接合伝達でのシャトルプラスミド (テトラサイクリン耐性遺伝子含有) の導入を行った。結果、臨床分離株の 1 株 (OMA14 株) からのみ低頻度であるがテトラサイクリン耐性の形質転換菌が得られた。

(2) 形質転換可能株のゲノム解析

パルスフィールド電気泳動により形質転換可能株 OMA14 の染色体は 2 個でそれぞれの大きさは約 2.3Mb と 0.86Mb であることが明らかになった。さらに次世代シーケンサーによる全ゲノム配列決定の結果、第一染色体 2280262 bp、第二染色体 867855bp のそれぞれのゲノム配列を決定した。この決定した配列から 2799 個の遺伝子を検出、T9SS に必須の遺伝子群 (porKLMNPQTUW, sov) のすべてが本菌ゲノムに存在することを確認した (図 2)。

図 2. Circular map of *Pre. intermedia* OMA14 chromosomes and position of T9SS essential



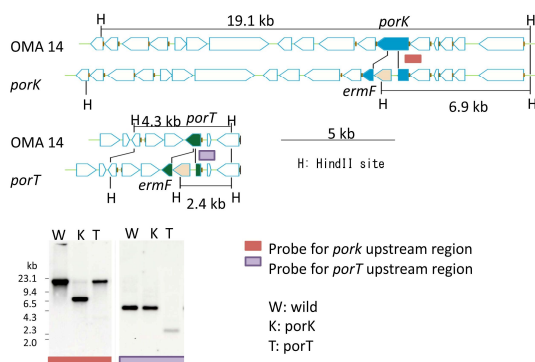
(3) 部位特異的遺伝子操作技術の確立

porK, porT 遺伝子の変異株作成のために以下の手順で変異導入用のシャトルプラスミドを作成した。

各遺伝子の上下流領域それぞれ約 800bp と目的遺伝子領域をエリスロマイシン耐性遺伝子に置換した targeting construct をシャトルプラスミドに挿入した。plasmid 上の targeting construct と染色体の目的配列との間で相同組換えを起こすことで目的遺伝子の変異株を得ることを目的としている。こ

の為に相同組換えが起きなかった plasmid 保有株を除くカウンターセクション方法の開発が必要である。そこで好気性や通性嫌気性のグラム陰性菌ではカウンターセクションの手段として広く用いられているが、偏性嫌気性菌ではまだ応用例が少ない *Bacillus subtilis* 由来の *sacB* 遺伝子を使用した。*sacB* 遺伝子はスクロース存在下で致死性をもたらす。近縁の *Por. gingivalis* を用いた予備実験で SacB+保持株はスクロース存在下で致死性を示すことを確認した。そこで targeting construct を挿入済みシャトルプラスミドに *sacB* 遺伝子を挿入、*Pre. intermedia* OMA14 株に大腸菌からの接合伝達にて作成したプラスミドを導入した。エリスロマイシン耐性形質転換菌の出現効率は 10 の-10 乗未満であった。得られた形質転換菌をエリスロマイシンとスクロース存在下で培養、目的遺伝子の変異株を得た。作成された変異株は染色体 DAN を用いたサザンハイブリダイゼーションにより目的遺伝子、*porK*, *porT* それぞれの破壊を確認した (図 3)。

図 3. サザンハイブリダイゼーションによる *porK*, *porT* 変異株の確認



当初確立した *Pre. intermedia* の部位特異的遺伝子操作の効率は十分なものではなかった。エリスロマイシン耐性の形質転換菌の出現頻度は 10 の-10 乗未満であり、さらにこの形質転換菌が安定に得られない問題があった。そこで形質転換菌を安定的に得るために大腸菌からの接合伝達の条件を検討した。*Bacteroides* へのシャトルプラスミドの接合伝達の条件 (接合伝達時に一晩好気条件に置く) を参考に、接合伝達時に一時的に好気状態に置くことを試みた。まず *Pre. intermedia* OMA14 の耐酸素性を調べた。結果、菌体を寒天培地上に塗布後、好気状態に置いたところ、生存率は 2 時間では変化しなかったが、3 時間以上では急速に悪化した。そこで *Pre. intermedia* OMA14 への接合伝達時に 2 時間好気状態に置いた後に嫌気培養を行った。結果、形質転換菌の出現頻度は安定的に 10 の-10 乗から -9 乗となり改善することができた。

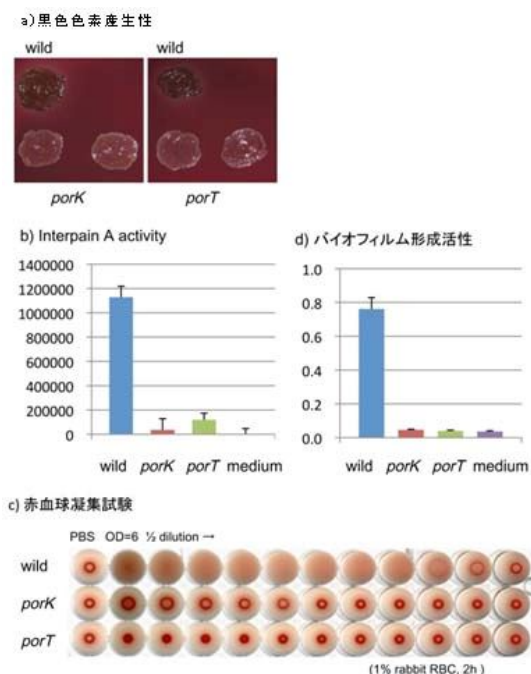
(4) *Pre. intermedia* T9SS 変異株の解析 *Pre. intermedia* *porK*, *porT* 変異株の性状を

調べたところ *Por. gingivalis* の T9SS 変異株と同様に羊脱繊維血を加えた血液寒天上でのヘム鉄の獲得による黒色色素産生性がみられなくなった(図 4 a)。本菌の蛋白分解酵素 interpain A はその遺伝子のアミノ酸配列情報から T9SS 依存性に菌体表層、培地中に輸送されることが予測されていた。そこで whole cell を用いて interpain A 活性の測定を行ったところ、*Pre. intermedia* *porK*, *porT* 変異株では interpain A 活性が完全に失われていた(図 4 b)。この結果により本菌では interpain A が T9SS 依存性に輸送されていることが実験的に初めて明らかになった。また赤血球凝集活性とバイオフィーム形成活性を調べたところ、*Pre. intermedia* *porK*, *porT* 変異株ではそれらの活性が失われていた(図 4 c,d)

これらの結果から *Pre. intermedia* の病原性因子と考えられている蛋白質分解酵素 interpain A の輸送や、本菌の持つ黒色色素産生性、赤血球凝集活性、バイオフィーム形成活性に T9SS が重要であることを明らかにすることができた(論文作成中)。

Pre. intermedia は他の歯周病原菌と異なり、妊娠性歯周炎、思春期性歯周炎との関連が知られている。しかし詳細な関連性は未だ解明されてない。本研究により確立できた遺伝子操作技術は本菌の病原因子、さらに各種歯肉炎との関連性についての研究を著しく進展できることが期待される。

図 4 *Pre. intermedia* T9SS 変異株(*porK*, *porT* 株)の性状



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 0件)

[学会発表](計 17件)

- 内藤真理, Site-directed mutagenesis in *Prevotella intermedia*: genetic analysis of *P. intermedia* Por secretion system. First International Conference on *Porphyromonas gingivalis* and Related Bacterial Species. 2012年08月27-28日, 良順会館(長崎市)
- 内藤真理子, ゲノム解析からみえてきた歯周病細菌の新たな側面□□第55回歯科基礎医学会学術大会, 2013年09月21-22日, 岡山コンベンションセンター(岡山市)
- 内藤真理子, 小椋義俊, 林哲也, 中山浩次(代表), 歯周病原菌 *Prevotella intermedia* 臨床分離株 OMA14 の全ゲノム配列決定, 第8回日本ゲノム微生物学会年会, 2014年3月7-9日, 東京農業大学キャンパス17号館(東京都)
- 内藤真理子, 庄子幹郎, 成田由香, 中山浩次(代表), *Prevotella intermedia* における病原遺伝子特異的変異株作成, 第87回日本細菌学会総会, 2014年3月26-28日, タワーホール船橋(東京都)

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 浩次 (NAKAYAMA, Koji)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 80150473

(2) 研究分担者

内藤 真理子 (NAITO, Mariko)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 20244072

(3) 連携研究者

庄子 幹郎 (SHOJI, Mikio)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 10336175

雪竹 英治 (YUKITAKE, Hideharu)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・技術職員
研究者番号: 30380984