

平成21年5月8日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592387
 研究課題名（和文）
 歯周病細菌の発現する非翻訳RNA遺伝子の網羅的クローニングと機能解析
 研究課題名（英文）
 Molecular cloning and functional analysis of non-coding RNA expressed in periodontal bacteria
 研究代表者
 前田 博史（MAEDA HIROSHI）
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
 研究者番号：00274001

研究成果の概要：

歯周病の原因となる細菌（歯周病細菌）における、非翻訳RNAの役割を解析することを目的として、以下の研究成果を得た。（1）歯周病細菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* に大腸菌と類似した非翻訳RNAが発現していることを示した。（2）*A. actinomycetemcomitans* からRNAシャペロンを同定し、クローニングした。（3）RNAシャペロンを介した非翻訳RNAによる遺伝子発現調節機構が *A. actinomycetemcomitans* に存在する可能性を示した。（4）歯周病の病態には細菌だけでなく古細菌種が関与しており、その解析の必要性を示した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：歯周病学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周免疫機能学

1. 研究開始当初の背景

近年、蛋白質をコードしていない非翻訳RNA(non-coding RNA：ncRNA)が数多く存在することが明らかとなった。これらのRNAは、そのもの自体が機能性分子としての役割をもつと考えられている。分子生物学的手法として広く活用されているRNA干渉(RNAi)も機能性RNA現象のひとつである。RNAi以外では転写を制御するncRNAや、クロマチン構造変換を制御する

ncRNAなどが報告されている。現在、ncRNAの機能解析が精力的に行われているが、ほとんどのncRNAの機能は未解析のままとなっている。さらに、いまだ同定されていないncRNAが数多く存在するため、コンピューターによるncRNAの配列予測や、ショットガンクローニング法などによって新規のncRNAを同定することが様々な生物種で重要な研究課題のひとつとなっている。

微生物のncRNAに関する研究報告は、そのほとんどが大腸菌に関するものである。大腸菌では百種類に及ぶncRNAが報告されている。これまでの機能解析から、既知のncRNAには、mRNAのアンチセンスレギュレーターとして、転写後の遺伝子発現制御に関連した機能をもつものが多い事が分かっている。また、ncRNAがアンチセンスレギュレーターとして機能する際には、mRNAとncRNAの会合を補助するRNAシャペロン（大腸菌のHfqあるいはRsm分子）が重要な役割をもつことも明らかとなってきた。注目されるのは毒素や外膜タンパクなどの病原関連性分子の発現調節にncRNAが関与していることであり、大腸菌以外においてもウェルシュ菌の毒素遺伝子の転写調節を行うncRNAが報告されている。

歯周病細菌においては、ncRNAに関する研究は皆無であり、今後、歯周病細菌の病原性や生命現象を解明する上でncRNAの同定と機能解析は不可欠である。さらに病原因子、あるいは菌の増殖や定着因子と関連性の高いncRNAを同定することができれば、歯周局所での細菌叢コントロールや感染コントロールの戦略にncRNAの分子生物学が組み込まれる可能性は極めて高いと考えられる。

2. 研究の目的

歯周病細菌 *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* ならびに *Porphyromonas gingivalis* の発現するncRNAを同定し、さらにバイオインフォマティックスの手法ならびに分子生物学的手法を用いて、それらの機能を探る。

3. 研究の方法

(1) 相同性検索：

Oral pathogen database の *Aggregatibacter*

actinomycetemcomitans (Aa) ならびに *Porphyromonas gingivalis* (Pg) のゲノム配列中に、EcoCyc database に登録されている大腸菌の 80 種の ncRNA, そして RNA シャペロンである *hfq* と *rsmA (csrA)* 遺伝子の相同性分子を検索した。検索にはNCBI の blast プログラムならびに Genetyx software を用いた。

(2) ncRNA 候補遺伝子の検出： 相同性検索において大腸菌の ncRNA 配列と高い相同性を示した歯周病細菌の候補遺伝子を RT-PCR 法によって検出した。

(3) *hfq* ならびに *rsm* 様遺伝子欠損株の作製： 相同性組み換え法によって Aa (ATCC29523) 染色体遺伝子中の *hfq* ならびに *rsm* 様遺伝子にスペクチノマイシン耐性カセットを挿入して両遺伝子の欠損株を作成した。

(4) 欠損株の蛋白質発現プロファイルの解析： 両欠損株ならびに親株である ATCC 29523 株の菌体を 2 次元電気泳動によって分離し、蛋白質の発現パターンを比較した。

(5) 歯周炎局所における古細菌種の同定： 近年、歯周病細菌に加えて、古細菌種が歯周病の発症と進行に関与していることが示唆されるようになった。このため古細菌種の ncRNA についての解析の必要性を検討するために、歯周炎局所に存在する古細菌種の同定・解析を行った。

4. 研究成果

(1) 相同性検索： Aa のゲノム上に大腸菌の ncRNA と高い相同性 (60%以上) を示す 8 つの ncRNA 候補配列, ならびに *hfq* と *rsmA* 様遺伝子を同定した (表 1)。Pg のゲノム上には大腸菌の ncRNA ならびに RNA シャペロンとの相同性分子は見出せなかった。

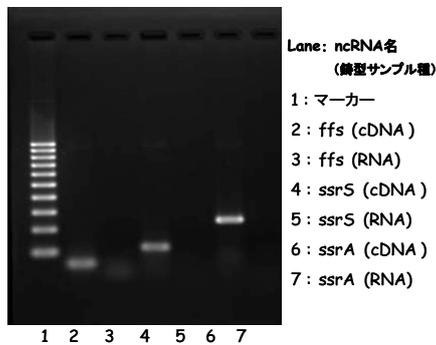
(2) ncRNA 候補遺伝子の検出： 8 つの ncRNA 候補配列のうち、特に高い相同性を示した

3候補 (*ssrA*, *ffs*, *ssrS*) について、RT-PCR法による検出を試みた結果、3つの候補すべての遺伝子発現を確認することができた(図1)。

表1. Aaのゲノム上に同定された大腸菌ncRNAの相同性遺伝子

Name	Identity (%)	Size (nt)	Function
<i>ssrA</i>	82.20	363	tmRNA
<i>ffs</i>	72.60	114	Component of SRP
<i>ssrS</i>	68.90	183	RNAP antagonist
<i>Rybc/SroB</i>	63.80	82	antisense regulator
<i>RyjC</i>	63.20	77	antisense regulator
<i>DsrA</i>	60.70	87	antisense regulator
<i>DicF</i>	60.40	53	antisense regulator
<i>RdlC</i>	60.00	68	antisense regulator

図1. Aa ncRNA候補遺伝子の発現確認(RT-PCR法)



(3) *hfq* ならびに *rsm* 欠損株の作製: 大腸菌の *hfq* ならびに *rsm* と相同性を示す遺伝子をデータベース中の Aa のゲノム上に同定した。同定した遺伝子を PCR 法で Aa ATCC29523 株から増幅し、増幅した遺伝子中にスペクチノマイシン耐性遺伝子を組み込んだ。この薬剤耐性カセットを相同生組み換え法によって Aa ATCC29523 株のゲノム中に挿入した。スペクチノマイシン含有培地を使用して、*hfq* ならびに *rsm* 遺伝子の欠損株を同定・樹立した。

(4) *hfq* ならびに *rsm* 遺伝子欠損株の蛋白質発現プロファイル: 親株である ATCC29523 株ならびに *hfq* と *rsm* の遺伝子欠損株を2次元電気泳動で展開し、蛋白質の発現パターンを比較した(代表例として *hfq* 遺伝子欠損株の2次元電気泳動像を図2に示す)。親株と比較して、*hfq* ならびに *rsm* 遺伝子

欠損株では多くの蛋白質発現量に変化していた(図3, 4)。発現量に変化のあった蛋白質スポットでは、*hfq* ならびに *rsm* 遺伝子ともに発現量が増加しているスポットが多く見られた。

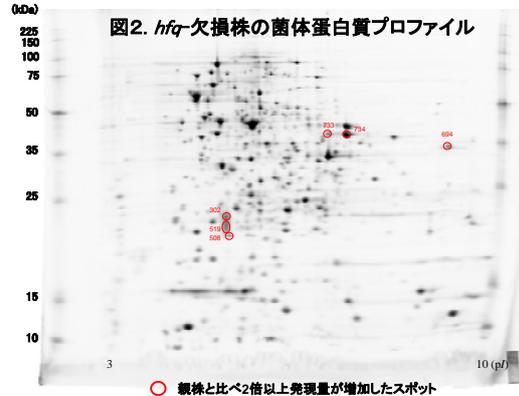


図3. *Hfq*-欠損株において発現量の変化したスポット数

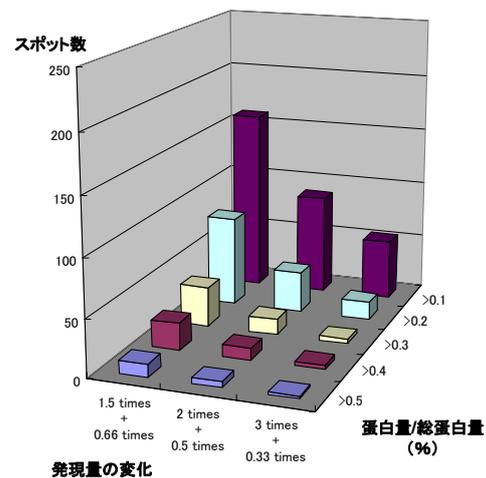
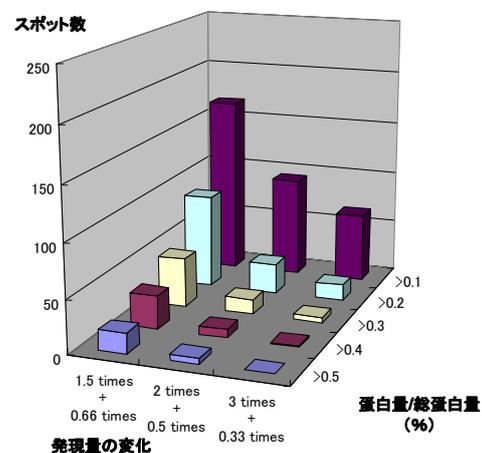


図4. *Rsm*-欠損株において発現量の変化したスポット数



(5) 歯周炎局所からの古細菌の同定：
日本人歯周炎患者の病変部から古細菌、*Methanobrevibacter oralis* とその類縁菌種を同定した。古細菌は歯周病の重度な部位から高頻度に検出された (表2)。

表2. 歯周炎局所からの古細菌の検出

Pocket depth (mm)	Disease type	Archaea positive	Pg positive
≤ 3	Healthy (n = 30)	0 (0%)	14 (46.7%)
	Aggressive (n = 6)	0 (0%)	4 (66.7%)
	Chronic (n = 22)	0 (0%)	16 (72.7%)
	Total	0 (0%)	20 (71.4%)
4-5	Aggressive (n = 5)	0 (0%)	4 (80.0%)
	Chronic (n = 10)	1 (10%)	7 (70.0%)
	Total	1 (6.7%)	11 (73.3%)
≥ 6	Aggressive (n = 35)	8 (22.9%)	30 (85.7%)
	Chronic (n = 33)	6 (18.2%)	29 (87.9%)
	Total	14 (20.6%) [†]	59 (86.8%) ^{††}
Total patient sample (n = 111)		15 (13.5%) ^{†††}	90 (81.1%) ^{††}

Pg, *Porphyromonas gingivalis*.

[†]P < 0.01, significantly different from healthy group and ≤ 3mm group (Fisher's exact test).

^{††}P < 0.001, significantly different from healthy group (Fisher's exact test).

^{†††}P < 0.05, significantly different from healthy group (Fisher's exact test).

(6) 考察と結論：歯周病細菌 Aa には、大腸菌と同様に RNA シャペロンを介した ncRNA による遺伝子発現調節機構の存在する可能性が、示唆された。欠損株において発現量の増加するスポットが多く見られたのは、ncRNA の多くが mRNA サイレンシングに関与しているためと考えられる。大腸菌と系統的に離れた Pg では、ncRNA の同定には戦略を変更する必要がある。歯周病の病態への関与が強くと示唆された古細菌種においても今後、解析を行う必要がある。

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1件)

Yamabe K, Maeda H, Kokeguchi S, Tanimoto I, Sonoji N, Asakawa S, Takashiba S. Distribution of *Archaea* in Japanese patients with periodontitis and humoral immune response to the components. *FEMS*

Microbiol Lett, 287(1):69-75, 2008. (査読有)

[学会発表] (計2件)

(1) 山部こころ, 前田博史, 苔口進, 目黒道生, 園井教裕, 谷本一郎, 高柴正悟. 古細菌 (*Methanobrevibacter oralis*) chaperonin 分子 (group II) の抗原性に関する研究. 第51回日本歯周病学会秋季学術大会、日本歯周病学会会誌 51 (秋季特別号) p121、2008/10/19 四日市.

(2) 前田博史, 苔口進, 谷本一郎, 小出康史, 山部こころ, 園井教裕, 新井英雄, 高柴正悟. *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* からの small non-coding RNAならびにRNAシャペロンの同定. 第52回日本歯周病学会秋季学術大会、日本歯周病学会会誌 50 (春季特別号) p196, 2008/04/25, 大宮.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 博史 (MAEDA HIROSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：00274001

(2) 研究分担者

高柴 正悟 (TAKASHIBA SYOGO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：50226768

新井 英雄 (ARAI HIDEO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：70222718

谷本 一郎 (TANIMOTO ICHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：00280686

曾我 賢彦 (SOGA YOSHIHIKO)
岡山大学・医学部・歯学部附属病院・助教
研究者番号：70509489

(3) 連携研究者
なし