

機関番号：17301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592142

研究課題名 (和文) *P. gingivalis* の菌株間の多様性における転移因子の役割解析研究課題名 (英文) The role of mobile genetic elements in *Porphyromonas gingivalis* strain diversity

研究代表者

内藤 真理子 (NAITO MARIKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：20244072

研究成果の概要 (和文)：

歯周病原菌であるポルフィロモナス ジンジバリス菌は我々の研究により菌株ごとにゲノム構造の多様性を持つことが明らかになった。本研究では転移因子の一つである Conjugative transposon (CTn) が実際に菌株間、だけでなく他の菌種の間で遺伝子を受け渡している事を明らかにした。この結果から、歯周病原菌は遺伝子情報のやり取りを通じて多様性と口腔内環境への適応性を獲得していると考えられる。

研究成果の概要 (英文)：

We revealed that periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*, has the extensive genomic diversity among the strains. CTnPgl is one of the mobile genetic elements in *P. gingivalis*. This study shows that CTnPgl can be transferred between *P. gingivalis* strains and other bacterial species. These results suggest that CTnPgl may play important roles for the acquisition of diversity within bacterial species and the adaptability against oral environment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯学

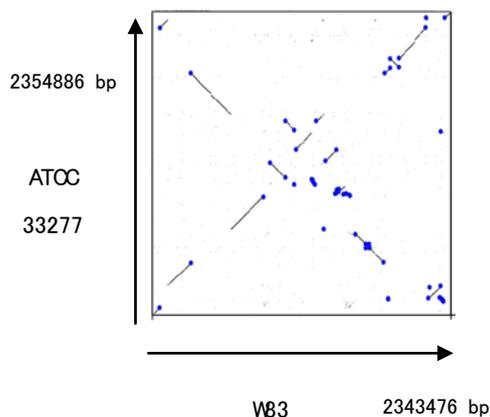
キーワード：口腔細菌学

1. 研究開始当初の背景

(1) 歯周病細菌 *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 株は多くの研究者が基準株として使用しており、この株を親株とした多くの変異株を作製し研究に用いてきた。ATCC 33277 株はゲノム塩基配列が決定されていた W83 株と病原性が異なると報告されている。この株間における病原性を含めた違いがどのような機序で生じるかは解明されていない。

(2) これまでの研究で ATCC 33277 株の全ゲノム塩基配列を決定した。ATCC 33277 株と W83 株のゲノム構造を比較すると、全領域に渡って inversion や組替えによる大規模なゲノムの構造の再構成がみられた。これらの再構成がみられた箇所の中には conjugative transposon (CTn) を含む転移性遺伝子 (mobile genetic elements)、またはその痕跡が認められた。

図1 ATCC33277株、W83株ゲノム構造比較 丸字印ははゲノム再構成部位にみられる転移因子 (CTn, Tn, IS, MITE, large mobile elements) の位置を示す。



2. 研究の目的

転移性遺伝子の一つとして ATCC 33277 株のゲノムには DNA 転移にかかわる一連の遺伝子セットを持つ CTn、CTnPg1 が存在することも明らかになった。CTn のような転移因子は異なる菌株間での遺伝情報の伝達を可能にすると考えられる。そこで本研究では *P. gingivalis* の多様性形成機構の解明をめざして CTnPg1 を始めとする転移性因子の *P. gingivalis* 菌株間での転移機構と DNA

の多様性形成における役割の解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) *P. gingivalis* 菌株間での CTnPg1 転移の検討を行う。ATCC 33277 株 CTnPg1 領域にアンピシリン (Ap) 耐性遺伝子を挿入した株および W83 株の *porT* 遺伝子にエリスロマイシン (Em) 耐性遺伝子を挿入した株を作製、寒天培地上で接合実験を行う。Ap/Em 耐性のコロニー (transconjugant 株) の出現頻度から CTnPg1 の伝達を検討する。transconjugant 株は TS 寒天培地上のコロニー形態の違いとゲノム DNA を用いた菌株識別 PCR で ATCC 33277 株由来か W83 株由来か判定する。また CTnPg1 のゲノムへの挿入はザンハイブリダイゼーションにて確認する。

(2) inverse PCR 法により各 transconjugant 株ゲノム中での CTnPg1 挿入位置を調べ、CTnPg1 の認識する挿入配列、att 配列を推測する。

(3) CTnPg1 の転移に必要な遺伝子の同定。他菌の CTn の研究から CTn の転移に係る遺伝子として指摘されている遺伝子、CTn 内の遺伝子、integrase gene、DNA excision protein と染色体上の *recA* 遺伝子の変異株を作成する。作成した変異株を用いて CTnPg1 の転移への影響を調べる。また CTnPg1 の転移に先立つ染色体からの切り出しによる intermediated form の形成を PCR にて確認する。

(4) 他の類縁菌への CTnPg1 の転移の検討。donor として *Bacteroides* と *Prevotella* の Ap 耐性菌株を用いる。また recipient として *P. gingivalis* ATCC 33277 株の CTnPg1 中の遺伝子間に Em) 耐性遺伝子を挿入した株を作製する。これらの菌を用いて (1) の手法に従って CTnPg1 の転移を検討する。

(5) 公開されているすべてのゲノム配列に対する homology 検索により CTnPg1 に類似の CTn が他の菌にも存在するか検討する

4. 研究成果

(1) ATCC 33277 CTnPg1- Ap<sup>r</sup> 株と W83*porT*:Em<sup>r</sup>株を作成した。これらを寒天培地上での接合実験に供したところ、Ap/Em耐性の transconjugant コロニーが得られた。

Transconjugantの出現頻度からATCC 33277株からW83株へのCTnPg1の伝達効率は $10^{-5}$ ~ $10^{-6}$ であった。また、W83株からATCC 33277株への遺伝子伝達も同等の効率で観察され、CTnPg1以外の遺伝子伝達機構の存在が示唆された。また得られたtransconjugantのゲノムDNAを用いたPCRにより株を確認した (glucose kinase PCR)。

(2) inverse PCR を用いて transconjugant株、18株のCTnPg1挿入位置を含むDNA断片を増幅、回収、塩基配列を決定し計17箇所のCTnPg1の挿入位置 (*att* site) を決定した。決定した挿入位置は糖鎖等の菌の表層構造物の合成遺伝子の中やその近傍にみられたことから、CTnPg1の伝達は *P. gingivalis*の表層構造に影響を及ぼしていることが推測された。また実験に用いた transconjugant株のうち7株ではCTnPg1の挿入がゲノム上の2カ所に認められた。得られたCTnPg1の挿入位置からCTnPg1が認識する挿入配列は13bpの (TTTTCNNNNAAAA) であることが明らかになった。

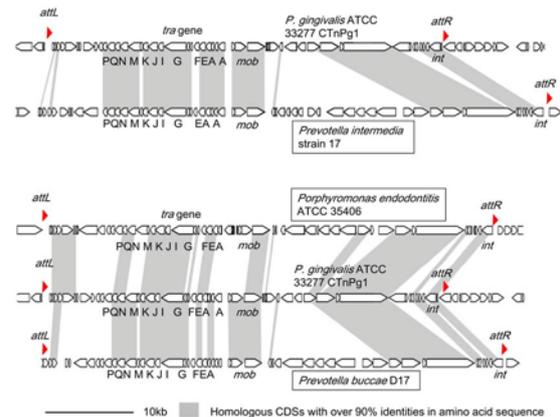
(3) CTnPg1中の遺伝子変異株うち integrase変異株のみでCTnPg1が染色体から切り出されたintermediated formが検出されなかった。CTnPg1が integrase依存性に切り出されていることを確認した。また integrase変異株ではCTnPg1の転移は見られなくなった。またDonorの33277株染色体上の *recA*遺伝子の変異株ではCTnPg1の転移には影響は見られなかった。一方recipientとしてW83株の *recA*遺伝子変異株を用いるとCTnPg1の転移は全く見られなかった。またW83株の *recA*遺伝子変異の相補株をrecipientとして用いるとCTnPg1の転移は回復した。これらの結果から *P. gingivalis*のCTnPg1の染色体からの切り出しは自身の integrase geneに依存すること、染色体への挿入はrecipientの *recA*遺伝子に依存性であることが明らかになった。CTnPg1は *recA*非依存性に伝達する近縁の *Bacteroides*のCTnとは違った機構を持つことが示唆された。

(4) donorとしてATCC 33277株のCTnPg1領域に Em 耐性遺伝子を挿入した株を作成した。この株と recipient に Ap 耐性遺伝子をもつ近縁の菌種、 *Bacteroides* 3種、 *Prevotella* 2種を用いてCTnPg1の伝達を検討した。近縁の菌種のうち *Bacteroides thetaiotaomicron*と *Prevotella oralis*へのCTnPg1の伝達が伝達効率  $10^{-5}$ ~ $10^{-7}$ で認めら

れた。CTnPg1は菌株間だけでなく、菌種間の遺伝子形質の伝達を行っていることが明らかになった。

(5) NCBIと Human Microbiome Databaseに公開されているすべてのゲノム配列に対する homology 検索によりCTnPg1に類似のCTnが *P. gingivalis*の近縁の口腔内嫌気性菌、 *Porphyromonas endodontitis*、 *Prevotella buccae*、 *Prevotella intermedia*に見出された。これらのCTnPg1類似CTnにおいてCTn伝達に関わる遺伝子、 integrase 遺伝子、 *tra* 遺伝子 *mob* 遺伝子は高度に保存されていた。またそれぞれの両端にはCTnPg1で決定した *att* 配列 (TTTTCNNNNAAAA) がCTnPg1と同様に認められた。

図2 CTnPg1類似CTn アミノ酸配列の相同性が90%以上の遺伝子間を灰色着色にて表示した。



転遺伝性遺伝子、CTnPg1は口腔内嫌気性細菌である *P. gingivalis*で最初に認められた完全な構造をもつCTnであるが、実際に生菌間で転移活性を持つかはこれまで不明だった。本研究によってCTnPg1が  $10^{-7}$  から  $10^{-6}$ の頻度で *P. gingivalis* 菌株間で、更には他の菌、腸内細菌 *Bacteroides*と口腔内細菌 *Prevotella*へ転移することを初めて明らかにした。変異株を用いた実験から、CTnPg1の転移にはこれまでに解析されている他菌のCTnとは違いrecipient側の *recA*遺伝子に依存することが示された。またCTnPg1の挿入される染色体上の配列も近縁の菌である *Bacteroides*のCTnとは違うことから、CTnPg1はこれらとは別のCTnであることが示唆された。ゲノム配列 data baseの検索結果から、他の口腔内嫌気性細菌にCTnPgに類似するCTnが存在することを明らかにした。これらの結果はCTnPg1およびその類似CTnがヒト

の口腔および腸内に存在する嫌気性菌の間に広く分布し遺伝子の水平伝播に寄与していることを示唆するものである。またこの事は歯周病原菌が遺伝子情報のやり取りを通じて多様性と口腔内環境への適応性を獲得していることを示唆するものである。

#### 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 7 件)

① Sato K, Naito M, Yukitake H, Hirakawa H, Shoji M, McBride MJ, Rhodes RG, Nakayama K: A protein secretion system linked to bacteroidete gliding motility and pathogenesis. Proc Natl Acad Sci USA 107: 276-281, 2010 (査読有)

② Naito M, Hirakawa H, Yamashita A, Ohara N, Shoji M, Yukitake H, Nakayama K, Toh H, Yoshimura F, Kuhara S, Hattori M, Hayashi T, and Nakayama K. Determination of the genome sequence of *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 and genomic comparison with strain W83 revealed extensive genome rearrangements in *P. gingivalis*. DNA Res., 15(4): 215-225, 2008. (査読有)  
<http://naosite.lb.nagasaki-u.ac.jp/dspace/handle/10069/20817>

[学会発表] (計 30 件)

- ① 内藤真理子, 佐藤啓子, 雪竹英治, 庄子幹郎, 中山浩次: *Porphyromonas gingivalis* の conjugative transposon CTnPg1 の伝達機構の解析, 第 52 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 東京, 9 月 {Journal of Oral Biosciences, 52, Supp. 1, p185, 2010}
- ② Naito M, Sato K, Shoji M, Yukitake H, Hayashi T, Nakayama K: Characterization of *Porphyromonas gingivalis* Conjugative Transposon CTnPg1. 88th IADR, Barcelona, Spain, 2010 {Program, pp160, 2010}
- ③ 内藤真理子, 佐藤啓子, 雪竹英治, 庄子幹郎, 中山浩次: *Porphyromonas gingivalis* の conjugative transposon

CTnPg1 の伝達機構の解析, 第 4 回日本ゲノム微生物学会年会, 福岡, 3 月 {プログラムおよび講演抄録集 p59, 2010}

- ④ 内藤真理子, 佐藤啓子, 雪竹英治, 庄子幹郎, 林 哲也, 中山浩次: *Porphyromonas gingivalis* の transposon CTnPg1 の伝達機構, 第 3 回日本ゲノム微生物学会年会, 東京, 3 月 {要旨集, p. 59, 2009}
- ⑤ 内藤真理子, 佐藤啓子, 雪竹英治, 庄子幹郎, 中山浩次: *Porphyromonas gingivalis* の接合による遺伝子形質の伝達, 第 50 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会, 東京, 9 月 {Journal of Oral Biosciences, 50, Suppl., p218, 2008}

[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

内藤 真理子 (NAITO MARIKO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号: 20244072

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

庄子幹郎 (SHOJI MIKIO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号: 10336175