

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592704

研究課題名(和文) 組み込み接合エレメントCTnPg1による口腔内細菌間での遺伝子伝達

研究課題名(英文) Characterization of the Porphyromonas gingivalis conjugative transposon CTnPg1: the gene transfer among oral bacteria and CTnPg1-like family CTns.

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病原菌であるブルフィロモナス・ジンジバリスのゲノムから見いだされた転移因子の一つであるConjugative transposon (CTn)、CTnPg1がフェージや菌体外のDNAを介さずに直接生菌間で伝達することを明らかにした。また公開されているdatabaseの検索からCTnPg1の類似のCTnをヒトの口腔や腸管の嫌気性菌のゲノムから見出した。本研究の結果から、CTnPg1類似CTnがヒトの口腔や腸管のバイオフィルム中に存在する菌間で伝達し、実際に多くの菌の間で広く分布していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Conjugative transposon (CTn), CTnPg1 was one of mobile elements that were defined from Porphyromonas gingivalis. CTnPg1 can transfer among live bacteria not by transformation and transduction. CTnPg1-like CTns were found in anaerobic bacteria that composed biofilms in human oral and intestines. These results suggested that CTnPg1 and CTnPg1-like CTns are widely distributed and actively transferred among oral and intestinal bacteria.

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 遺伝子転移 ゲノム解析 転移性因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々のグループはこれまでに歯周病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 株の全ゲノム配列を決定した際に新たな conjugative transposons (CTn), CTnPg1 を見出した。これまでに公開されている W83 株のゲノムと比較したところ、大規模かつ多数個所でのゲノム構造の組換えが起きていることが本菌のゲノム構造の特徴であることが明らかになった。(Naito, et al, DNA Res. 2008) 見出した大規模組換え箇所の大半に見られる転移性遺伝子の一つが CTnPg1 であり、ATCC33277 株では完全長のものが一個と left 側 1/3 の領域のみの部分 CTn が一個存在していた。

(2) ATCC33277 株の CTnPg1 遺伝子内にマーカーとなる抗生物質耐性遺伝子を挿入した株を作成、これを donor として CTnPg1 の生菌間での転移について調べた。結果、*Por. gingivalis* の他の菌株間のみならず他菌種、*Bacteroides thetaiotaomicron*, *Prevotella oralis* へ伝達すること、受容菌の染色体中の配列、挿入配列 “TTTTCnnnnAAAA” に特異的に挿入されることを明らかにした。

2. 研究の目的

(1) 口腔内の嫌気性菌において初めて転移活性が認められた *Por. gingivalis* ATCC 33277 株の CTnPg1 の転移活性の詳細を明らかにする。CTnPg1 の転移活性に必要な遺伝子を検索する。また CTnPg1 の転移が菌体外の DNA の直接の取り込みによる形質転換 (transformation)、ファージ感染による形質導入 (transduction) ではないことを明らかにする。

(2) これまでの研究から CTnPg1 類似の CTn と CTnPg1 を比較したところ個々の CTn の accessory 遺伝子の領域に多様性が認められ、それぞれ異なる transporter 遺伝子を持っていることが示された。そこで CTnPg1 の accessory 遺伝子の一つである transporter 遺伝子の解析を行う。この遺伝子の抗生物質や薬物の排除における役割を検討する。

(3) 次世代シーケンサーの普及によって病原細菌のゲノム解析情報は増大している。そこで公開されている complete 及び draft genome sequence の中から CTnPg1 及びその類似 CTn を検索する。見いだされた CTn 間で遺伝子比較、core 遺伝子の保存性と accessory 遺伝子産物の多様性を解析する。また見いだされた CTnPg1 類似 CTn が実際に生菌中で転移活性を持つか検討する。

2. 研究の方法

(1) CTnPg1 の転移活性の解析

CTnPg1 の転移は Donor とする ATCC33277 菌株 (CTnPg1 中にエリスロマイシン耐性遺伝子を挿入: KDP183) と recipient とする W83 株 (アンピシリン耐性遺伝子挿入: KDP385) それぞれの生菌を一晩共培養する。その後エリスロマイシン耐性、アンピシリン耐性のコロニーの出現で CTnPg1 の転移活性を調べる。CTnPg1 の転移が transformation や transduction ではないことを示す為に、Donor と recipient の共培養の際に DNA 分解酵素を作用させて影響を調べる。また Donor に KDP183 生菌ではなく KDP183 の染色体 DNA もしくは pore size 0.2um でろ過した培養上清を用いて CTnPg1 の転移が起こるか調べる。

CTnPg1 の転移に必要な遺伝子を同定するために CTnPg1 のインテグレース遺伝子、DNA excision 遺伝子の変異株を作成。また Donor と recipient それぞれの recA 遺伝子の変異株を作成する。これらの変異株を用いて CTnPg1 の染色体からの切り出しと生菌間での転移活性におけるこれらの遺伝子の役割を検討する。染色体からの切り出しは形成される環状の intermediated form の形成を CTnPg1 の両端に外向きに作成した primer pair を用いた PCR にて確認する。

(2) CTnPg1 の accessory 遺伝子の解析

口腔病原細菌 *Por. gingivalis* ATCC 33277 株の CTnPg1 が持つ accessory 遺伝子の中の、transporter 遺伝子と推測される、ナトリウムイオン作動性多剤排出ポンプ遺伝子 (putative Na⁺ driven multidrug efflux pump, PGN0081) の解析を行う。PGN0081 遺伝子の発現をマイクロアレイで確認する。また PGN0081 遺伝子の変異株を作成する。作成した変異株と野生株を用いて 96 穴マイクロプレートによる最少発育濃度 (MIC) を 6 種の抗生物質 (levofloxacin, norfloxacin, ciprofloxacin, puromycin, テトラサイクリン、クロラムフェニコール) 2 種の薬剤 (EtBr, SDS) について測定する。

(3) CTnPg1 類似 CTn の解析

CTn の遺伝子の中で転移に関わる core 遺伝子群は高度に保存されているので、CTnPg1 の core 遺伝子、インテグレース遺伝子 (PGN0094) と TraG 遺伝子 (PGN0065) の配列を基に公開されている complete と draft の genome database を検索する。類似の配列が見いだされた genome は CTnPg1 全長の配列と相同性検索を行う。また相同性のみなられた領域の末端に CTnPg1 特異的な挿入配列 “TTTTCnnnnAAAA” が存在するか確認をする。見いだされた CTnPg1 類似の CTn それぞれの遺伝子間の保存性を調べる。また各 CTn の accessory 領域遺伝子にどのような機能遺伝

子が存在するか調べる。また完全長の CTnPg1 類似 CTn が見いだされた菌において転移活性があるか、染色体からの CTn の切り出しと環状 intermediated form の形成がみられるか PCR にて調べる。

さらにゲノム配列が未決定な *Por. gingivalis* の菌株において CTnPg1 が存在するか、core 遺伝子、TraG 遺伝子配列と mob 遺伝子配列に対する DNA probe を用いたサザンハイブリダイゼーションを行って調べる。

3. 研究成果

(1) CTnPg1 の転移活性

DNA 分解酵素存在下で減少しなかったことと、donor に生菌ではなく染色体 DNA を用いると転移がみられなかったことから、CTnPg1 の転移活性は菌体外の DNA の直接の取り込みによる形質転換 (transformation) ではないことを明らかにした。また過した培養上清を用いても転換体が得られなかったことからファージ感染による形質導入 (transduction) でもないことも明らかになった。

これまで他の CTn での研究で報告がある、インテグ्रेस遺伝子、DNA excision 遺伝子、recA 遺伝子それぞれの変異株を用いて CTnPg1 の転移活性を調べた。CTnPg1 は染色体からの切り出しには自身のインテグ्रेस遺伝子が必須で、近縁の *Bacteroides* の CTn、CTnDOT 等では必要な donor 側の recA 遺伝子と DNA excision 遺伝子は不要であることが明らかになった。また CTnPg1 の転移において自身のインテグ्रेस遺伝子が必須であること、また recipient の recA 遺伝子が必須であることが明らかになった。これらの結果はこれまでに報告されている他の CTn とは異なることから CTnPg1 が異なった機構で転移していることが示唆された。

(2) CTnPg1 の accessory 遺伝子の解析

CTnPg1 のもつ accessory 遺伝子の一つである transporter 遺伝子 (PGN0081) の発現をタイリングアレイを用いて解析した。PGN0081 遺伝子は染色体の他の領域に存在する同種の遺伝子よりも 2.5-6 倍の mRNA を発現していた。PGN0081 が実際に重要な機能を持つことが示唆されたことから、PGN0081 遺伝子の変異株を作成した。作成し変異株を用いて最少発育濃度 (MIC) を 6 種の抗生物質を用いて親株と比較した。結果 2 倍以上の有意な MIC の変化がみられるものはなかった。PGN0081 の機能についてはさらなる検討が必要であることが示された。

(3) CTnPg1 類似 CTn の解析

ゲノム配列 data base から CTnPg1 類似 CTn の検索を行った。結果、*Por. gingivalis* TDC60, *Por. endodontalis* ATCC35406,

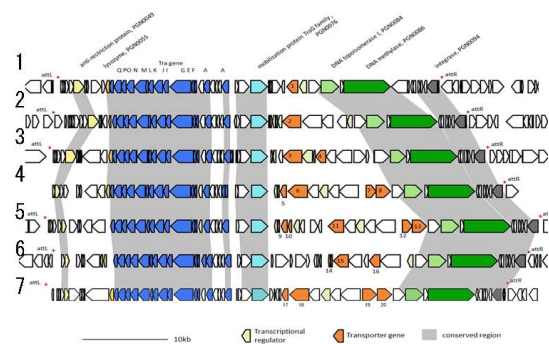


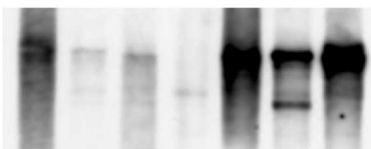
図 1 CTnPg1 及び CTnPg1 類似 CTn 陰付：保存領域、(identity >70%)、橙色：transporter 遺伝子、1: *Por. gingivalis* ATCC33277 CTnPg1, 2: *Por. gingivalis* TDC60, 3: *Por. endodontalis*, 4: *Pre. buccae*, 5: *Pre. intermedia*, 6: *Bac. Fragilis*, 7: *Pre. nigrescens*.

Prevotella buccae D17, *Prevotella intermedia* strain17, *Bacteroides fragilis* strain 638R, *Prevotella nigrescens* ATCC33563 のゲノム中に CTnPg1 類似 CTn が存在することが明らかになった (図 1)。左側末端が配列未決定の *Pre. buccae* 以外の CTn の両端には CTnPg1 の att 配列、" TTTTCnnnnAAAA " が保存されていることを確認した。また core 遺伝子領域の、tra 遺伝子、DNA 修飾関連遺伝子、インテグ्रेस遺伝子、リソゾーム遺伝子などはこれらの CTn 間で高度に保存されていた。accessary 領域においては各 CTn ごとに遺伝子の数、遺伝子の種類が異なっているが、それぞれの CTn には一個以上の transporter 関連遺伝子 (図 1 中橙色) が存在していた。

上記の結果から口腔内の細菌群に CTnPg1 が広く存在していることが予測されたので、ゲノム配列が未決定の *Por. gingivalis* の 4 株 (TDC117, TDC275, SU63, GAI7802) について CTnPg1 及び CTnPg1 類似 CTn にて保存されている TraG 遺伝子配列と mob 遺伝子配列に対する DNA probe を用いたサザンハイブリダイゼーションを行った。またゲノム配列から CTnPg1 を持つ ATCC3327 株、TDC60 株と CTnPg1 を保有しない W83 株もコントロールとして用いた。2 種のプローブのうち TraG 遺伝子配列のプローブは TDC60 に対しては反応が弱い、明らかに TDC275, SU63, GAI7802 の 3 株のゲノム DNA に明らかな反応が認められた (図 2)。この結果はこれらの株でも CTnPg1 類似の CTn が存在することを示すものである。

また CTnPg1 類似 CTn が認められた *Pre. intermedia* strain17 のゲノム DNA を調整、これを用いて染色体からの CTn の切り出しと環状 intermediated form の形成がみられるか PCR を用いて調べた。結果環状 intermediated form 由来の増幅産物が検出さ

ATCC W83 TDC TDC TDC SU GAI
33277 60 117 275 63 7802



TraG + - + - + + +
probe

図2 Southern blotting analysis to present CTnPg1 in *Por. gingivalis* strains.

れた。また増幅産物のシーケンス解析からCTnの両端に保存されているatt配列、"TTTTCnnnnAAAA"において切り出しと左右の断端の結合が起きていることが確認された。この結果は*Pre. intermedia*においてもCTnPg1類似CTnが転移活性を持つ可能性を示している。*Por. gingivalis*のCTnPg1の転移は他のCTnと違い特別なストレス(抗生物質暴露、UV照射等)を必要としないが、今回の結果は*Pre. intermedia*においてもCTnPg1類似CTnの転移には特別なストレスを必要としないことを示唆するものである。

この研究によりCTnPg1類似のCTnが認められた菌はいずれもヒト口腔及び腸管由来の嫌気性菌であった。この結果から、CTnPg1類似CTnがヒトの口腔や腸管のバイオフィルム中に存在する菌間で伝達し、実際に多くの菌の間で広く分布していることが示唆された。

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)

Mariko Naito (代表), Keiko Sato, Mikio Shoji, Hideharu Yukitake, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi and Koji Nakayama., Characterization of the *Porphyromonas gingivalis* conjugative transposon CTnPg1: determination of the integration site and the genes essential for conjugal transfer. *Microbiology*, 査読有, vol. 157 (2011) pp2022-2032
DOI: 10.1099/mic.0.047803-0

[学会発表](計11件)

内藤真理子 (代表), The impact of genomics on research in periodontal bacteria. Kyudai Oral Bioscience 2014 第8回九大国際シンポジウム, 2014年2月28日-3月1日, 福岡リーセントホテル(福岡市)
内藤真理子(代表), 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(代表), 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(代表), 佐藤啓子, 雪竹英治, 庄子幹郎, 中山浩次 Conjugative transposon CTnPg1のaccessory geneの解析, 第85回日本細菌学会総会, 2012年3月27-29日, 長崎ブリックホール(長崎市)

内藤真理子(代表), Extensive genomic rearrangement in periodontal pathogen, *Porphyromonas gingivalis*: implication of mobile genetic elements. XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, International Union of Microbiological Societies, 2011年9月5-10日, 札幌コンベンションセンター(札幌市)

[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・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 20244072

(2)研究分担者

(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

佐藤啓子(SATO, Keiko)
長崎大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 70410579