

氏名	村 内 利 光
授与した学位	博 士
専攻分野の名称	歯 学
学位授与の番号	博 甲 第 2 4 7 8 号
学位授与の日付	平 成 1 5 年 3 月 2 5 日
学位授与の要件	歯学研究科歯学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	Porphyromonas gingivalisの膿瘍形成株に特異的なInsertion Sequence 1598 周辺遺伝子の構造解析と発現様態に関する研究
論文審査委員	教授 渡邊 達夫 教授 福井 一博 教授 高柴 正悟

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【緒言】

Porphyromonas gingivalis (Pg) は、成人性歯周炎の病原細菌としてその発症や進行に深く関与している。Pg にはマウス皮下への接種によって膿瘍形成を起こす菌株と起こさない菌株が存在する。膿瘍形成株は重度歯周病患者から、非膿瘍形成株は健康な人の歯肉から高頻度に検出されていることから、この Pg の膿瘍形成能 (ability to form necrotic abscess, AFNA) は歯周病の病態に重要な役割を果たしている可能性が高い。Sawada らは膿瘍形成株 W83 と非膿瘍形成株 ATCC33277 との間で遺伝子サブトラクションを行い、膿瘍形成株に特異的な新規インサーションシーケンス (IS) の単離に成功して IS1598 と命名した (*Infect Immun*, 1999)。

近年、IS が細菌毒素遺伝子や薬剤耐性遺伝子などの遺伝子近傍に挿入された場合には、細菌の病原性が変化することがあることも分かってきた。これは IS が新しいプロモーター領域を形成したり、プロモーター自体を運び込むと、病原遺伝子の発現量が増加するためであると考えられている。したがって、IS の挿入が細菌の性状を変化させる機序を解明する上で、IS の周辺領域を調べることは重要である。

Pg における IS1598 の挿入部位が明らかとなっているものは一部分のみであり、その挿入数も菌株ごとに異なっている。AFNA 保有株と AFNA 非保有株は遺伝子レベルで IS1598 の分布が異なることがわかっているが、IS1598 と AFNA との関連については不明な点が多く、どの IS1598 挿入領域が AFNA と関わっているかはわかっていない。本研究は、AFNA 保有株のうち IS1598 の挿入部位が 2 箇所の FDC381 株について IS 周辺領域の遺伝子構造を解析するとともに IS1598 の周辺領域の遺伝子の発現様態を調べ、さらに遺伝子データベースに登録されている Pg の遺伝子情報と照合させることによって AFNA 保有株に共通な挿入領域を明らかにすることで、IS1598 のゲノム上への挿入が AFNA に果たす役割を調べようとするものである。

【材料および方法】

1. 供試菌株：Pg AFNA 保有株として W83, W50, および FDC381 を、また AFNA 非保有株として ATCC33277, SUNY1021, SU63, および ESO59 を供試した。
2. 遺伝子ライブラリーの作製とスクリーニング：遺伝子ライブラリーは AFNA 保有株の中で IS1598 の挿入部位が少ない FDC381 を用いて作製した。すなわち、*Pst* I あるいは *Bam*HI で消化した FDC381 株ゲノム遺伝子断片から、サザンハイブリダイゼーションによって IS1598 を含む遺伝子断片を検出し、その断片長を調べた。この断片長をもとにサイズ分画した *Pst* I, *Bam*HI 断片を pBK Phagemid Vector (Stratagene) に組み込んで size-restricted library を構築した。スクリーニングには、PCR 法で増幅させた IS1598 をプローブとしたプライクハイブリダイゼーション法を用いた。

3. **Genome walking** 法：クローニングした DNA 断片からさらに広範囲の遺伝子構造を調べるために Genome walking 法を用いた。Genome walking 法には Universal Genome Walker™ Kit と Advantage® Genomic Polymerase Mix (ともに Clontech) を用いた。
4. シーケンシング：クローニングした遺伝子断片の塩基配列は、Taq Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit と 377A DNA Sequencer (ともに ABI) を用いて決定した。
5. 相同性検索：相同性の検索は、決定した塩基配列を基に遺伝子断片の構造を GENETYX software で解析し、想定される open reading frame の塩基配列とアミノ酸配列を DDBJ, EMBL, GenBank, および TIGR の細菌遺伝子データベースに登録されているデータと照合した。
6. **IS1598** 周辺領域の菌株間の検索：他の AFNA 保有株の **IS1598** 挿入部位の検索は、W83 株ならびに W50 株に対して行った。ゲノム解析がほぼ完成している W83 株に関しては、W83 ゲノムデータベース (TIGR) 上で検索した。W50 株に関しては、FDC381 株の挿入部位周辺の塩基配列から設計したプライマーと W50 株のゲノム DNA を鋳型として用いた PCR 産物の塩基配列を比較した。
7. ノーザンハイブリダイゼーション：ノーザンハイブリダイゼーションは Northan Max Kit (Ambion) を用い、添付の説明書に従って行った。Pg 各菌株の全 RNA の抽出は、RNA queous (Ambion) を用いて対数増殖期の Pg から行った。なお、プローブは、**IS1598** 周辺遺伝子を組み込んだ pBluescript® II Phagemid Vector (Stratagene) から、Riboprobe® Systems-T3, T7 (Promega) を用いて作製した。

【結果】

1. **IS1598** 挿入遺伝子断片のクローニング

FDC381 株のゲノム DNA から、**IS1598** を含んだ 4 kbp の *Pst*I 消化断片と 4 kbp ならびに 7 kbp の *Bam*HI 消化断片をクローン化した。

2. **IS1598** 周辺の塩基配列の解析

FDC381 株染色体 DNA から 2 箇所の **IS1598** 周辺領域の遺伝子の塩基配列を決定した。一方の **IS1598** 上流には *E. coli* のリボヌクレオチド リダクターゼ (*nrdD*) とアミノ酸配列で 33% の相同性を示す *nrdD* 様遺伝子が存在し、下流には W83 株で複数の挿入が報告されている **IS195** が存在した。もう一方の **IS1598** 周辺領域には赤血球凝集素の一つヘマグルチニン B と 2 つの未知の遺伝子が存在し、新規の挿入遺伝子が **IS1598** の中に挿入されていた。

3. AFNA 保有株に共通した **IS1598** 周辺領域の同定

IS1598 周辺領域を検索した結果、他の AFNA 保有株 W83 ならびに W50 においても **IS1598** は *nrdD* 様遺伝子と **IS195** の間に存在していたので、この領域は AFNA 保有株に共通であった。

4. **IS1598** 周辺遺伝子の mRNA 発現

nrdD 様遺伝子の mRNA 量は、AFNA 保有株に比べて AFNA 非保有株のほうが少なかった。**IS195**、ヘマグルチニン B、および 2 つの未知の遺伝子の mRNA 量は、AFNA 保有株と AFNA 非保有株の間に有意な差はみいだせなかった。

【考察および結論】

Pg AFNA 保有株 W83, W50, および FDC381 に共通な **IS1598** 挿入部位を決定し、その周辺領域の遺伝子構造を明らかにした。さらに AFNA 保有株と AFNA 非保有株について周辺領域の遺伝子発現を mRNA レベルで比較し、AFNA 保有株では **IS1598** が近傍の *nrdD* 様遺伝子の mRNA 量を増加させている可能性が示唆された。*nrdD* は、DNA 合成のためのデオキシリボヌクレオチドを供給するものである。AFNA 保有株に共通な **IS1598** の挿入は、Pg の増殖に影響すると推測される *nrdD* 様遺伝子の発現を変化させることによって、AFNA に関わっているのかもしれない。

論文審査結果の要旨

Pg はマウス皮下への接種によって膿瘍形成を起こす。この Pg の膿瘍形成能 (ability to form necrotic abscess, AFNA) は歯周病の発症あるいは進行に重要な役割を果たしている可能性が高い。Sawada らは膿瘍形成株と非膿瘍形成株との間で遺伝子サブトラクションを行い、膿瘍形成株に特異的な新規のインサーションシーケンス (IS) *IS1598* を同定した。近年、IS が細菌毒素遺伝子や薬剤耐性遺伝子などの遺伝子近傍に挿入された場合には、細菌の病原性が変化することがあることも分かってきた。これは IS が新しいプロモーター領域を形成したり、プロモーター自体を運び込むと、病原遺伝子の発現量が増加するためであると考えられている。したがって、IS の挿入が細菌の性状を変化させる機序を解明する上で、IS の周辺領域を調べることは重要である。

本研究は、AFNA 保有株のうち *IS1598* の挿入部位が 2 箇所 FDC381 株について IS 周辺領域の遺伝子構造を解析し、*IS1598* の周辺領域の遺伝子の発現様態を調べることで、*IS1598* のゲノム上への挿入が AFNA に果たす役割を解明しようとするものである。

得られた結果は次の通りである。1) Pg AFNA 保有株 W83, W50, および FDC381 に共通な *IS1598* 挿入部位の存在とその周辺領域の遺伝子構造を明らかにした。2) AFNA 保有株と AFNA 非保有株について周辺領域の遺伝子発現を mRNA レベルで比較し、AFNA 保有株では *IS1598* が近傍の *nrdD* 様遺伝子の mRNA 量を増加させていた。

これらの結果は *IS1598* が *nrdD* 様遺伝子の発現を変化させ、この遺伝子の発現増大が Pg の AFNA に関与している可能性を示唆するものである。

本申請論文は学位論文として価値があると認めた。