

Porphyromonas gingivalis ATCC 33277 株 RpoN 低度産生株の
性状解析

加野 小奈美

(平成 26 年 12 月 12 日受付)

緒言

歯科疾患実態調査によれば日本の成人の約 80%は歯周病に罹患している¹⁾。歯周病は、口腔内の種々の菌による混合感染によって起こり、動脈硬化²⁾、糖尿病³⁾、誤嚥性肺炎⁴⁾の発症・増悪の一因と考えられている。*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, さらに *Tannerella forsythia* の3菌種は重度歯周病患者から高頻度に分離されることから、歯周病の重症度との関連性が示唆されており、古くから、レッドコンプレックス (red complex) と称されている⁵⁾。中でも *P. gingivalis* はもっとも研究が進んでいる歯周病細菌である⁶⁾。

P. gingivalis はグラム陰性偏性嫌気性球桿菌であり、代謝の上では糖非発酵性を特徴とする。そして血液寒天培地上で黒色の集落を形成する⁷⁾。*P. gingivalis* の主な病原性因子として、付着因子としての線毛、内毒素であるリポ多糖 (LPS)、各種タンパク質分解酵素、赤血球凝集素などが知られている⁶⁾。

P. gingivalis ではこれまでに4株について、全ゲノムの塩基配列が解読されている。しかし、ゲノム上の遺伝子の多くは機能が未知のままである⁸⁻¹¹⁾。また各遺伝子の発現に関わる転写調節機構についても明らかになっていない部分が多い。転写を直接に制御する酵素はRNAポリメラーゼであり、原核生物のRNAポリメラーゼ (ホロ酵素) は、2つの α 因子、 β 因子、および β' 因子からなる4量

体タンパク質のコア酵素と、 σ 因子（シグマ因子）から構成される^{12),13)}。コア酵素にシグマ因子が結合することで転写が開始されるが、シグマ因子は遺伝子のプロモーターを識別する働きをしている。シグマ因子は、1つの原核細胞のなかに複数種存在し、その使い分けによって転写される遺伝子セットが異なっている^{14),15)}。

それぞれの細菌が持つシグマ因子の種類は菌種により異なり、*P. gingivalis* では菌株間で保有するシグマ因子の数が異なっている。また、他菌種では、*Escherichia coli*（大腸菌）は7種類¹⁶⁾、枯草菌は19種類のシグマ因子を保有している¹⁷⁾。大腸菌の7種類のシグマ因子は、RpoD (σ^D, σ^{70})、RpoE (σ^E)、RpoF (σ^F)、RpoH (σ^H, σ^{32})、RpoN (σ^N, σ^{54})、RpoS (σ^S, σ^{38})、および FecI (σ^{FecI}) であるが、RpoD が主要シグマ因子であり、栄養増殖状態においてハウスキーピング遺伝子をはじめとした最も多くの遺伝子発現を行っている。栄養枯渇に伴う増殖停止（増殖定常期）の際には RpoD に替わって RpoS が主に発現し、増殖定常期遺伝子発現のセントラルレギュレーターとして機能している¹⁸⁾。また RpoN は運動性や窒素代謝に関わる遺伝子の発現を制御している²⁰⁾。RpoE, RpoF, RpoH, および FecI は環境変化に応じて発現し、その環境への適応に必要な遺伝子発現を行う。なかでも RpoH は熱ストレスをはじめ、さまざまなストレスに対して応答して働くことが知られている¹⁹⁾。競合的に働くシグマ因子のなかで特に外的

環境の変化に対応して細胞質外機能を制御するシグマ因子を extracytoplasmic function (ECF) シグマファミリーと呼んでいる^{21), 22)}。

P. gingivalis ATCC33277 株では, PGN_0274, PGN_0319, PGN_0450, PGN_0638, PGN_0970, PGN_1108, PGN_1202 (RpoN, σ^N, σ^{54}), および PGN_1740 により 8 個の σ 因子がコードされている⁹⁾。PGN_0638 の転写産物は主要シグマ因子 RpoD (σ^D, σ^{70}) であり, PGN_1202 の転写産物は RpoN (σ^N, σ^{54}) である。PGN_0274, PGN_0319, PGN_0450 (RpoE, σ^{24} をコード), PGN_0970, PGN_1108, および PGN_1740 の転写産物はすべて ECF シグマ因子である。これまでにゲノムが解読された他の 3 株を含め, *P. gingivalis* には RpoS (σ^S, σ^{38}) は存在しない。さらにアメリカの国立生物工学情報センター (National Center for Biotechnology Information, NCBI) のデータベース (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/>) では, *Bacteroides* 門に属する菌種に RpoS は検索されない。

大腸菌では RpoN と RpoS の間に調節機構があり, RpoN の量を減少させると RpoS の量が増加すること²³⁾, また, *Borrelia burgdorferi* では約 50 個の遺伝子が RpoN と RpoS の両方の支配を受けていること²⁴⁾から, *P. gingivalis* においては RpoN が RpoS の機能を担っている可能性がある。我々が調べた限り, これまでに *P. gingivalis* の RpoN の機能を明らかにした報告は無く, 本研究において, *P. gingivalis* では RpoN がストレスに対する抵抗性を担っているのかという点を明

らかにすることを目的とし、RpoN 欠損株および RpoN 低度産生株の作製とその解析を試みた。

材料と方法

1. 供試菌株, 使用プラスミド, および培養条件

本研究で使用した菌株とプラスミドを表1に, オリゴヌクレオチドを表2にそれぞれ記した。プラスミドの作製には大腸菌 DH5 α 株を使用した。大腸菌の培養にはLuria-Bertani (LB)培地 (ナカライテスク, 京都) を用い, 必要に応じ, アンピシリン (Amp; 100 μ g/mL) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) と Kanamycin (Km; 10 μ g/mL) (Sigma Aldrich) を培地に添加して用いた。

*P. gingivalis*の培養には, 変法BHI培地 {Brain Heart Infusion (BHI) (Becton, Dickinson and Company (BD), Franklin Lakes, NJ, USA), Yeast Extract (BD), ヘミン (和光純薬工業, 大阪), メナジオン (和光純薬工業), および L-システイン塩酸塩 1 水和物 (Sigma Aldrich)}²⁵⁾, 変法Tryptic soy (TS) 寒天培地 {Tryptic soy agar (BD), BHI, ヘミン, メナジオン, およびL-システイン塩酸塩 1 水和物}²⁵⁾, および血液寒天培地 {綿羊脱繊維血液 (日本バイオテスト研究所, 東京), ヘミン, メナジオン, およびL-システイン塩酸塩 1 水和物} を用いた。必要な場合に応じ, エリスロマイシン (Em; 10 μ g/mL) (Sigma Aldrich) とテトラサイクリン (Tc; 5 μ g/mL) (Sigma Aldrich) を培地に添加して用いた。*P. gingivalis*の培養には嫌気ボックス (Whitley Workstation DG250,

Microbiology International, Frederick, MD, USA) を用い、36 °Cの嫌気条件下で行った。

2. 遺伝子操作

特に記述が無い場合には Sambrook らの方法²⁶⁾に従った。*P. gingivalis* のゲノム DNA は Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA) を用いて抽出した。

3. Polymerase Chain Reaction (PCR) 法

PCR による DNA の増幅は DNA ポリメラーゼ PCR 酵素 KOD-Plus-Neo (TOYOBO, 大阪) を用い、MJ Mini[™] Personal Thermal Cycler (BIO RAD, Hercules, CA, USA) を使用して反応を行った。PCR の条件は添付の指示書に従って設定した。

4. 電気穿孔法

変法 BHI 培地で 12 時間嫌気培養した *P. gingivalis* を新鮮な BHI 培地に継代し、18 時間程度培養することで対数増殖期後期になった菌を用いた。対数増殖期後期まで培養した *P. gingivalis* を、0.3M スクロース液で 2 回洗浄後、菌液 400

μL (4.0×10^8 cell) に対してプラスミド DNA を $1 \mu\text{g}$ 加え、氷上に静置した。5 分間後に菌液を 2 mm ギャップキュベット (ネッパジーン, 千葉) に入れ, 遺伝子導入装置 ECM399 (BTX, Holliston, MA, USA) を用いて 1.25 kV/mm の電気パルスを与えた。その直後, 変法 BHI 培地を用いて 12 時間嫌気培養を行い, Em のみ含有, Tc のみ含有, または Em と Tc を含有する血液寒天培地に播種し, 嫌気培養を行った。

5. PGN_1202 遺伝子 (*rpoN*) 破壊株の作製

RpoN 破壊用プラスミドは次のように作製した (図 1)。まず *P. gingivalis* ATCC 33277 株 (以下 33277 株) のゲノム DNA を鋳型として, PCR 法により *rpoN* の上流領域と *rpoN* の下流領域をそれぞれ, プライマーセット PGN_1202-UpF2-Eco と PGN_1202-UpR2-Bgl, および PGN_1202-dnF2-Bgl と PGN_1202-dnR2-Xba を用いて増幅した。*rpoN* の上流領域と下流領域の PCR 産物をそれぞれ EcoRI と BglIII, および BglIII と XbaI で消化し, pUC19 の EcoRI-XbaI サイトに同時に挿入した。これを pUR001 と命名した。pUR001 を BglIII で消化し, 脱リン酸化処理を行った後, Tc 耐性遺伝子が挿入された pKD375²⁷⁾ から BamHI と BglIII で消化することにより得た Tc 耐性遺伝子である *tetQ* 断片を挿入した。これを pUR001::*tetQ* と命名した。さらに *tetQ* を Em 耐性遺伝子である *ermF* に置換するた

め、pUR001::*tetQ* と Em 耐性遺伝子が挿入された pKD355²⁸⁾を鋳型として、それぞれプライマーセット PGN_1202del-Fwd-318 と PGN_1202del-Rev-331, および *ermF*-Fw0318 と *ermF*-Rv0318 を用いて増幅し、それぞれの増幅産物をライゲーションした。ただし、pKD355 を鋳型として得られた Em 耐性遺伝である *ermF* 断片にはリン酸基を付与した後、ライゲーションを行った。得られたプラスミドを pUR001::*ermF* とした。ScaI で線形化した pUR001::*tetQ* あるいは pUR001::*ermF* を、*P. gingivalis* 細胞に電気穿孔法により導入した。その後、変法 BHI 培地を加えて 12 時間の嫌気培養を行った後、Tc あるいは Em 含有血液寒天培地に塗抹した。

6. RpoN 発現プラスミド保持株の作製

親株のゲノム DNA を鋳型として、PGN_1203 のプロモーターを含む PGN_1203 と *rpoN* のオペロン領域をプライマーセット 1203-1202-Fwd-Eco と 1203-1202-Rev-Xba を用いて PCR 法により増幅した (図 2)。PCR 産物を EcoRI と XbaI を用いて消化後、pTIO-1²⁹⁾の EcoRI-XbaI サイトに挿入することにより pTE001 を得た。電気穿孔法により *P. gingivalis* 細胞に pTE001 を導入することで RpoN 発現プラスミド保持株を得た。

7. RpoN 低度産生株の作製

rpoN が必須遺伝子であることが示唆され、欠損株の作製が困難であったため、RpoN の機能を解析することを目的として RpoN 低度産生株を作製した。RpoN 低度産生株は、*rpoN* のオープンリーディングフレーム (open reading frame ORF) を発現レベルの低い PGN_0160 遺伝子のプロモーター直下に置いた構築を、*P. gingivalis* のゲノム上にある PGN_1045 遺伝子座に挿入することで得た (図 2)。

はじめに親株のゲノム DNA を鋳型として、PGN_0160 プロモーター領域と *rpoN* 遺伝子の ORF をそれぞれ、プライマーセット GN_0160-Fwd-Eco と PGN_0160-Rev-Xba、および PGN_1202-Fwd-Xba と PGN_1202-Rev-Not を用いて PCR 法により増幅した。それぞれの PCR 産物を EcoRI と NotI、および XbaI と NotI で消化後、pTIO-1 の EcoRI - NotI サイトに挿入して pTR0160 を得た。

次に PGN_1045 領域の DNA 断片を得るため、親株のゲノム DNA を鋳型として、プライマーセット PGN_1045-upF-Xho と PGN_1045-upR-Hind、あるいは PGN_1045-dnF-Bam と PGN_1045-dnR-Not を用いた PCR 法により PGN_1045 の上流領域と下流領域をそれぞれ増幅した。上流領域の PCR 産物を XhoI と HindIII で消化し、pBluescript II SK(-) (Agilent Technologies, CA, USA) の XhoI - HindIII サイトに挿入することで pBL1043 を得た。次に下流領域の増幅産物を BamHI と NotI で消化した後、pBL1043 の BglII - NotI サイトに挿入することで pBL1044

を得た。その後、BglII と BamHI で消化した *tetQ* 断片を、pBL1044 の BamHI サイトに挿入することで pBL1045 を得た。

最後に pTR0160 の PGN_0160 プロモーター - *rpoN* 領域を、プライマーセット PGN_0160-Fwd-401 と PGN_1202-Rv0319 を使用した PCR 法で増幅した。PCR 産物を BamHI で消化後、pBL1045 の BamHI サイトに挿入することで pBL0160 を得た。XhoI と SacII で線形化した pBL0160 を、*P. gingivalis* 細胞に電気穿孔法により導入し、その後、変法 BHI 培地を加えて 12 時間の嫌気培養を行った後、Tc 含有血液寒天培地に塗抹した。

8. RpoN 相補株の作製

上記と同様の理由で、RpoN の機能を解析することを目的として RpoN 相補株を作製した。pTE001 から PGN_1203 を除去するために、pTE001 を鋳型にしてプライマーセット PGN_1202exp-Fwd318 と PGN_1202exp-Rev318 を使用した PCR 法を行い、PCR 産物にリン酸化処理を行った後、セルフライゲーションさせることにより pTE002 を得た。次に pTE002 の PGN_1203 プロモーター - *rpoN* 領域を、プライマーセット PGN_1202-Fw-Bam と PGN_1202-Rv-Bam を使用した PCR にて増幅した。PCR 産物を BamHI で消化後、pBL1045 の BamHI サイトに挿入することで pBL1202 を得た。XhoI と SacII で線形化した pBL1202 を、*P.*

gingivalis 細胞に電気穿孔法により導入し、その後、変法 BHI 培地を加えて 12 時間の嫌気培養を行った後、Tc 含有血液寒天培地に塗抹した。

9. プラスミド保持率の算出法

プラスミドを保持した *P. gingivalis* 細胞を継代することによりプラスミド保持率を求めた。はじめに、電気穿孔後に播種した Em 含有血液寒天培地上に形成された集落を、Em 含有変法 BHI 培地に継代培養した。継代後、波長 600 nm における吸光度 (optimum density) 1.0 ($OD_{600}=1.0$) まで培養した菌液を 0 世代目とした。0 世代目の菌液を $OD_{600}=0.1$ になるように継代し、 $OD_{600}=0.8$ に達した時点で新鮮な変法 BHI 培地に継代することを繰り返した。次に 0 世代および 24 世代の菌液 100 μ L を段階希釈し、各希釈段階の菌液 100 μ L を Em 非添加および Em 含有 (最終濃度 30 μ g/mL) 血液寒天培地に播種し、嫌気培養した。培養後、血液寒天培地上に形成された集落数を計測し、各世代での Em 非添加血液寒天培地上と Em 含有血液寒天培地上にそれぞれ形成された集落数の比率からプラスミド保持率を求めた。プラスミド保持率の計算は、0 世代目の Em 非添加血液寒天培地上と Em 含有血液寒天培地上の集落数の比率を、安定性が 100% のときの値とし、この比率をもとに補正した 24 世代後の比率をプラスミド保持率とした。

1 0. 遺伝子発現解析

P. gingivalis 細胞の全 RNA は、OD₆₀₀=0.1 に希釈した後、37°C の嫌気状態で 24 時間培養した菌体から得た。全 RNA の抽出および精製は RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) を用いて行った。得られた全 RNA 2 µg を Superscript III First Strand Synthesis Supermix (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) と逆転写反応プライマー-Random Primers (Invitrogen) を用いて、逆転写することにより、cDNA を合成した。*rpoN* と DNA gyrase をコードしている遺伝子 *gyrA* の発現量は、それぞれプライマーセット *rpoN*-RT-FWD-916 と *rpoN*-RT-REV-916、および PGN_0875-*gyrA*-Fw と PGN_0875-*gyrA*-Rv-2 を用い、cDNA を鋳型とした定量 PCR (Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR) 法で定量解析した。定量 PCR 法は、SYBR Premix ExTaq (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ) を用いて反応させ、その際に PCR 産物が発する蛍光量を LightCycler 1.5 (ver. 3.5, Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany) にて測定し、標準曲線、遺伝子増幅曲線を作製後、各サンプルごとに threshold cycle (Ct) 値と標的遺伝子量を算出した。なお、*gyrA* を内部標準として用い、*rpoN* の発現量は *gyrA* に対する相対量として示した。

1 1. 酸素暴露ストレス

P. gingivalis を変法 BHI 液体培地を用いて 37°C の嫌気状態で指数対数期まで培養した。この培養菌液を OD₆₀₀=0.2 に希釈した後、径 18 mm の容量 15 mL の蓋付試験管に 10 mL 入れ、好気状態になるように試験管の蓋を緩め、37°C で 150 回/分の振盪培養を行った。菌数変化の測定は菌液の濁度を測定することによった。

1 2. 酸化ストレス

P. gingivalis を変法 BHI 液体培地を用いて 37°C の嫌気状態で指数対数期まで培養した。この培養菌液を OD₆₀₀=0.2 に希釈した後、径 18 mm の容量 15 mL の蓋付試験管に 10 mL 入れた。菌液に最終濃度が 0.25 mM になるように過酸化水素 (H₂O₂) を加え、37°C の嫌気状態で培養し、一定時間後に濁度を測定した。

1 3. 統計処理

各実験系における統計解析には、対応のない群間の Student's *t* test を用いた。なお、*p* 値が 0.05 以下をもって有意差ありと判定した。

結果

1. RpoN 欠損株の作製

ScaI で線形化した pUR001::*tetQ* を親株に電気穿孔法により導入した。電気穿孔とそれに引き続くアウトグロース後に Tc 含有血液寒天培地に播種した。この操作を複数回行ったが、集落を生じることはなかった。そのため、親株に RpoN を発現するプラスミドを保持させた上で、ゲノム上の *rpoN* 破壊操作を行った。このため RpoN 発現プラスミド pTE001 を作製し、電気穿孔法にて親株に導入することで WT-pTE 株を得ることができた。WT-pTE 株に ScaI で線形化した pUR001::*tetQ* を電気穿孔法により導入したところ、ゲノム上の *rpoN* は破壊され pTE001 を保持した $\Delta rpoN$ -pTE 株を得ることができた（データは示していない、概略図を図 3 に示す）。

2. RpoN 欠損株における RpoN 発現プラスミドの安定性

rpoN 遺伝子が必須遺伝子である可能性を検討するため、pTIO-1 を保持した WT-pT 株, pTE001 を保持した WT-pTE 株, および pTE001 を保持した $\Delta rpoN$ -pTE 株の 3 株を変法 BHI 培地で継代培養した。24 世代培養後のプラスミド保持率を調べたところ、WT-pT 株, WT-pTE 株, および $\Delta rpoN$ -pTE 株でそれぞれ 1.54%,

77.50%, および 100 %であった (図 4)。

3. RpoN 低度産生株と RpoN 相補株の作製

rpoN の欠損株を作製することは困難であったため、RpoN の機能を解析することを目的として RpoN 低度産生株と RpoN 相補株を作製した。この目的のために親株において恒常的に発現の低い遺伝子 PGN_0160 (16S rRNA を基準とした発現レベル 3.15) を選択し、そのプロモーターを使用した。この選択に当たってはタイリングアレイを用いた親株発現アレイの結果を長崎大学 内藤真理子博士にご教示いただいた (内藤真理子, パーソナルコミュニケーション)。

pBL0160 の DNA 断片を親株に電気穿孔法で導入したところ、ゲノム上の PGN_1045 遺伝子座に PGN_0160 プロモーター - *rpoN* が挿入された株が得られた (概略を図 3 B に示す)。次にこの株に pUR001::*ermF* の DNA 断片を電気穿孔法で導入することによりゲノム上の *rpoN* に *ermF* が挿入された変異株 *rpoN*-low が得られた。同様に pBL1202 の DNA 断片を用いることで、PGN_1045 遺伝子座に PGN_1203 プロモーター - *rpoN* が挿入され、ゲノム上の PGN_1202 遺伝子座の *rpoN* に *ermF* が挿入された相補株 *rpoN*-high が得られた。

リアルタイム定量 PCR 法にて、親株, *rpoN*-low 株, そして *rpoN*-high 株の *rpoN* 発現量を調べた。親株の *rpoN* 発現量を 1 とした場合, *rpoN*-low 株と *rpoN*-high

株における *rpoN* の相対発現量はそれぞれ 0.061 と 0.534 であった。

4. *rpoN* 発現量の酸素暴露ストレスに対する影響

嫌気条件下で培養した親株, *rpoN*-low 株, および *rpoN*-high 株を好気条件下に置いたところ, 6 時間後, 12 時間後, および 24 時間後のいずれの時点においても, *rpoN*-low 株の培養液の濃度は親株のものに対し, 有意に低い値を示した (図 6)。

5. *rpoN* 発現量の酸化ストレスに対する影響

rpoN 発現量の過酸化物質に対する抵抗性への影響を調べるために, 嫌気条件下で培養した親株, *rpoN*-low 株, および *rpoN*-high 株の培地中に最終濃度 0.25 mM の過酸化水素を添加し, さらに培養を続けた。その結果, 4 時間後と 6 時間後のいずれの時点においても, *rpoN*-low 株の培養液の濃度は親株のものに対し, 有意に低い値を示した (図 7)。

考察

本研究において、野生株（33277 株）では通常のダブルクロスオーバーによるゲノム上の *rpoN* の破壊が行われなかったこと、RpoN 発現プラスミド pTE001 保持菌 WT-pTE ではゲノム上の *rpoN* の破壊が行われたこと、そしてゲノム上の *rpoN* が破壊された pTE001 保持菌 $\Delta rpoN$ -pTE では pTE001 が脱落しなかったことから、*P. gingivalis* では *rpoN* は必須遺伝子であることが推測された。

pTE001 の骨格になっている pTIO-1 は、*Bacteroides* 属由来のプラスミドの複製起点を持ち³⁰⁾、*P. gingivalis* に導入しても脱落しやすく、選択薬剤の非存在下における 24 世代後の保持率は 1%以下である²⁹⁾。これから考えると $\Delta rpoN$ -pTE における 24 世代後のプラスミドの保持率が 100%であったことは、この遺伝子が *P. gingivalis* にとって不可欠であることを強く示唆する。なお、これまでにプラスミドを保持した *P. gingivalis* を分離した報告は無く、このことが *P. gingivalis* のプラスミドの易脱落性に関係している可能性がある。また、WT-pTE 株はゲノム上に操作されていない *rpoN* が存在するため、pTE001 の存在は必須ではないと考えられるが、24 世代後のプラスミド保持率が 77.50%と高く、大変興味深い結果が得られた。WT-pTE 株のプラスミド保持率が高く保たれた理由として、*rpoN* のコピー数が多い方が生存に有利であることが考えられるが、今後明らかにしていく必要がある。

Klein らはトランスポゾンを用いたゲノムワイドなスクリーニングにより、33277 株の全遺伝子にあたる 2091 遺伝子の内、463 遺伝子を必須遺伝子として推測しており³¹⁾, *rpoN* もこの中に含まれており、今回の我々の結果と一致する。また、ライム病スピロヘータの起因菌である *Borrelia burgdorferi* や金属還元菌の *Geobacter sulfurreducens* においても *rpoN* が必須遺伝子であると報告されている^{32) 33)}。

rpoN 低発現である *rpoN*-low 株を作製し、酸素暴露と過酸化水素ストレスに対する感受性を調べたところ、いずれのストレスに対しても *rpoN*-low 株の増殖が低下したことから、*rpoN* が酸素や過酸化物の抵抗性を担っているタンパク質をコードする遺伝子を支配していることが示唆された。しかし、親株との差は劇的なものではなく、これらの遺伝子群は他のシグマ因子によっても支配を受けていることが推測される。*rpoN* が過酸化物抵抗性に関与することを示した報告としては、*Lactobacillus plantarum* において *rpoN* を消失させると過酸化物に対する感受性が 100 倍に増強されることや³⁴⁾, *Edwardsiella tarda* では過酸化水素抵抗性に必須であり、*rpoN* は *rpoS* を支配していることが示されている³⁵⁾。ストレス抵抗性ということでは、腸管出血性大腸菌 O157 Sakai 株において、*rpoN* の破壊によりグルタミン依存性の酸抵抗性が増すことが報告されており³⁶⁾, この酸抵抗性には *rpoS* も関与している。

RpoS は増殖定常期遺伝子発現のセントラルレギュレーターとして機能しており¹⁸⁾、支配している遺伝子にはストレス耐性を担っている遺伝子も含まれている¹⁸⁾。*P. gingivalis* には *rpoS* が無いため、他の菌種では RpoS が持っている機能の一部を、*P. gingivalis* では RpoN が担っている可能性も否定できない。

P. gingivalis は口腔内に生存する嫌気性菌であるが、口腔は環境の変化が激しく、微小環境における酸素分圧が常に変化しているため、常に酸素暴露ストレスや酸化ストレスを受けていると考えられる。ところで多くの細菌は、ペルオキシドを感知して正に働くレギュレーターとして OxyR を、またスーパーオキシドを感知して正に働くレギュレーターとして SoxR を利用している³⁷⁾。しかし、*P. gingivalis* は SoxR を保有しておらず、多くの菌種で SoxRS レギュロンによって支配されている *sod* が OxyR によって支配されている。このことから、*P. gingivalis* の OxyR はペルオキシドのセンサーとしてではなく、細胞内のレッドックスセンサーとして機能していることが推測されている³⁸⁾。

このように、*P. gingivalis* は酸素暴露ストレスや酸化ストレスに対して特徴的な制御システムを持っており、RpoN との関連性を今後明らかにしていく必要がある。

以上のように、本研究において *P. gingivalis* の RpoN が酸素暴露ストレスや酸化ストレスに対する抵抗性を担っていることは示されたが、酸素暴露や酸化

ストレスによる *rpoN* 低度産生株 *rpoN-low* の増殖抑制効果は大きなものではなく、*rpoN* が必須である理由がこれらのストレスに対する抵抗性と密接に関連しているとは考えにくい。大腸菌をはじめとしたいくつかの菌種では、RpoN は窒素代謝や炭素源の獲得、また発酵にも関与していることが明らかになっていることから²⁰⁾、*P. gingivalis* における必須性を代謝系の解析を含めて今後解明していく必要がある。

結論

P. gingivalis では, *rpoN* が必須遺伝子であることが示された。*P. gingivalis* の *rpoN* は酸素暴露ストレス下における生存や酸化ストレスに対する抵抗性に関与していることが示された。

謝辞

稿を終えるにあたり，本研究を行う貴重な機会を与えて頂き，終始懇篤なる御指導と御高覧を賜りました，岡山大学大学院医歯薬学総合研究科歯科矯正学分野 上岡寛教授，口腔微生物学分野 大原直也教授に謹んで感謝の意を表します。また，本研究の遂行に際し，終始懇切なる御指導，御鞭撻を頂きました，同口腔微生物学分野の先生方に深く感謝致します。さらに，プラスミドおよびマイクロアレイ分析結果を提供して下さった長崎大学大学院医歯薬学総合研究科口腔病原微生物学分野 中山浩次教授，内藤真理子准教授に謹んで感謝の意を表します。最後に様々な面で御協力，御援助頂きました歯科矯正学分野の諸先生方に深く御礼申し上げます。

参考文献

- 1)平成 17 年歯科疾患実態調査結果 : <http://www.mhlw.go.jp/topics/2007/01/tp0129-1b.html>
- 2) Hernández, M., Dutzan, N., García-Sesnich, J., Abusleme, L., Dezerega, A., Silva, N., González, F.E., Vernal, R., Sorsa, T. and Gamonal, J.: Host-pathogen interactions in progressive chronic periodontitis, *J. Dent. Res.*, **90**, 1164-1170, 2011.
- 3) Lakschevitz, F., Aboodi, G., Tenenbaum, H., and Glogauer, M.: Diabetes and periodontal diseases: interplay and links. *Curr. Diabetes Rev.*, **7**, 433-439, 2011.
- 4) Paju, S., and Scannapieco, F.A.: Oral biofilms, periodontitis, and pulmonary infections, *Oral Dis.*, **13**, 508-512, 2007.
- 5) Holt, S.C. and Ebersole, J.L.: *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, and *Tannerella forsythia*: the "red complex", a prototype polybacterial pathogenic consortium in periodontitis, *Periodontol. 2000*, **38**, 72-122, 2005.
- 6) Lamont, R.J. and Lewis, J.P. and Potempa, J.: Virulence factors of periodontal bacteria. In Lamont, R.J., Hajishengallis, G.N. and Jenkinson, H.F. (ed.), *Oral microbiology and immunology*. 2nd ed. ASM Press, Washington, DC, USA, pp273-286, 2014.
- 7) Shah, H.N. and Collins, M.D.: Proposal for reclassification of *Bacteroides*

- asaccharolyticus*, *Bacteroides gingivalis*, and *Bacteroides endodontalis* in a new genus, *Porphyromonas*, *Int. J. Sys. Bac.*, **38**, 128-131, 1988.
- 8) Nelson, K.E, Fleischmann, R.D, DeBoy, R.T, Paulsen, I.T, Fouts, D.E, Eisen, J.A, Daugherty, S.C, Dodson, R.J, Durkin, A.S, Gwinn, M, Haft, D.H, Kolonay, J.F, Nelson, W.C, Mason, T, Tallon, L, Gray, J, Granger, D, Tettelin, H, Dong, H, Galvin, J.L, Duncan, M.J, Dewhirst, F.E, Fraser, C.M.: Complete genome sequence of the oral pathogenic bacterium *Porphyromonas gingivalis* strain W83, *J. Bacteriol.*, **185**, 5591–5601, 2003.
- 9) 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 ATCC33277 and genomic comparison with strain W83 revealed extensive genome rearrangements in *P. gingivalis*, *DNA Res.*, **15**, 215–225, 2008.
- 10) Watanabe, T., Maruyama, F., Nozawa, T., Aoki, A., Okano, S., Shibata, Y., Oshima, K., Kurokawa, K., Hattori, M., Nakagawa, I. and Abiko Y.: Complete genome sequence of the bacterium *Porphyromonas gingivalis* TDC60, which causes periodontal disease. *J Bacteriol.*, **193**, 4259–4260, 2011.

- 11) Siddiqui, H., Yoder-Himes, D.R., Mizgalska, D., Nguyen, K.A., Potempa, J., Olsen, I.: Genome Sequence of *Porphyromonas gingivalis* strain HG66 (DSM 28984). *Genome Announc.*, **2**, e00947-14, 2014.
- 12) Yura, T. and Ishihama, A.: Genetics of bacterial RNA polymerase. *Ann. Rev. Genet.*, **13**, 59-97, 1979.
- 13) Murakami, K.S. and Darst, S.A.: Bacterial RNA polymerases: the whole story. *Curr Opin. Struct. Biol.*, **13**, 31–39, 2003.
- 14) Campbell, E.A., Westblade, L.F. and Darst, S.A.: Regulation of bacterial RNA polymerase sigma factor activity: a structural perspective. *Curr. Opin. Microbiol.*, **11**, 121-127, 2008.
- 15) Österberg, S., del Peso-Santos, T. and Shingler, V.: Regulation of alternative sigma factor use, *Annu. Rev. Microbiol.*, **65**, 37-55, 2011.
- 16) Blattner, F.R., Plunkett 3rd, G., Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., Shao, Y.: The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12, *Science*, **277**, 1453-1462, 1997.

- 17) Kunst, F., Ogasawara, N., Moszer, I., Albertini, A.M., Alloni, G., Azevedo, V.: The complete genome sequence of the gram-positive bacterium *Bacillus subtilis*, *Nature*, **390**, 249-56, 1997.
- 18) Lange, R. and Hengge-Aronis, R.: Identification of a central regulator of stationary-phase gene expression in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, **5**, 49-59, 1991.
- 19) Yura, T., Nagai, H., Mori, H.: Regulation of the heat-shock response in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, **47**, 321-350, 1993.
- 20) Reitzer L, Schneider BL.: Metabolic context and possible physiological themes of sigma(54)-dependent genes in *Escherichia coli*., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **65**, 422-444, 2001.
- 21) Erickson, J.W. and Gross, C. A.: Identification of the sigma E subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase: a second alternate sigma factor involved in high-temperature gene expression, *Genes Dev.*, **3**, 1462-1471, 1989.
- 22) Lonetto, M.A., Brown, K.L., Rudd, K.E. and Buttner, M.J.: Analysis of the *Streptomyces coelicolor sigE* gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 7573-7577, 1994.

- 23) Dong, T., Yu, R. and Schellhorn, H.: Antagonistic regulation of motility and transcriptome expression by RpoN and RpoS in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, **79**, 375-386, 2011.
- 24) Ouyang, Z., Blevins, J.S. and Norgard, M.V.: Transcriptional interplay among the regulators Rrp2, RpoN and RpoS in *Borrelia burgdorferi*, *Microbiology* **154**, 2641-2658, 2008.
- 25) Nakayama, K., Kadowaki, T., Okamoto, K. and Yamamoto K. Construction and characterization of arginine-specific cysteine proteinase (Arg-gingipain)-deficient mutants of *Porphyromonas gingivalis*. Evidence for significant contribution of Arg-gingipain to virulence, *J. Biol. Chem.* **270**, 23619-23626, 1995.
- 26) Michael, R. and Sambrook, J.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 4th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA. 2012.
- 27) Shi, Y., Ratnayake, D.B., Okamoto, K., Abe, N., Yamamoto, K., Nakayama, K.: Genetic analyses of proteolysis, hemoglobin binding, and hemagglutination of *Porphyromonas gingivalis*. Construction of mutants with a combination of *rgpA*, *rgpB*, *kgp*, and *hagA*, *J. Biol. Chem.* **274**, 17955-17960, 1999.

- 28) Ueshima, J., Shoji, M., Ratnayake, D.B., Abe, K., Yoshida, S., Yamamoto, K., Nakayama, K.: Purification, gene cloning, gene expression, and mutants of Dps from the obligate anaerobe *Porphyromonas gingivalis*, *Infect. Immun.* **71**, 1170-1178, 2003.
- 29) Tagawa, J., Inoue, T., Naito, M., Sato, K., Kuwahara, T., Nakayama, M., Nakayama, K., Yamashiro, T., Ohara, N.: Development of a novel plasmid vector pTIO-1 adapted for electrotransformation of *Porphyromonas gingivalis*, *J. Microbiol. Methods.* **105**, 174-179, 2014.
- 30) Valentine, P.J., Shoemaker, N.B., Salyers, A.A.: Mobilization of Bacteroides plasmids by *Bacteroides* conjugal elements. *J. Bacteriol.* **170**, 1319–1324, 1988.
- 31) Klein, B.A., Tenorio, E.L, Lazinski, D.W., Camilli, A., Duncan, M.J. and Hu, L.T.: Identification of essential genes of the periodontal pathogen *Porphyromonas gingivalis*, *BMC Genomics* **13**, 578, 2012.
- 32) Groshong, A.M., Gibbons, N.E., Yang, X.F., Blevins, J.S.: Rrp2, a prokaryotic enhancer-like binding protein, is essential for viability of *Borrelia burgdorferi*, *J. Bacteriol.* **194**, 3336-3342, 2012.
- 33) Leang, C., Krushkal, J., Ueki, T., Puljic, M., Sun, J., Juárez, K., Núñez, C., Reguera, G., DiDonato, R., Postier, B., Adkins, R.M. and Lovley, D.R.: Genome-wide analysis

- of the RpoN regulon in *Geobacter sulfurreducens*, *BMC Genomics* **22**, 1471-2164, 2009.
- 34) Stevens, M.J., Molenaar, D., de Jong, A., de Vos, W.M. and Kleerebezem, M.: Involvement of the mannose phosphotransferase system of *Lactobacillus plantarum* WCFS1 in peroxide stress tolerance, *Appl. Environ. Microbiol.* **76**, 3748-2752, 2010.
- 35) Liu, E., Ye, J., Song, S., Wang, K., Zhang, Y. and Zhang, H.: Impact of co-deficiency of RpoN and RpoS on stress tolerance, virulence and gene regulation in *Edwardsiella tarda*, *J. Basic Microbiol.* **54**, 678-687, 2014.
- 36) Riordan, J.T., Tietjen, J.A., Walsh, C.W., Gustafson, J.E. and Whittam, T.S.: Inactivation of alternative sigma factor 54 (RpoN) leads to increased acid resistance, and alters locus of enterocyte effacement (LEE) expression in *Escherichia coli* O157:H7, *Microbiology* **156**, 719-730, 2010.
- 37) Straz, G. and Zheng, M.: Oxidative stress. In Straz, G. and Hengge-Aronis, R. (ed.), *Bacterial Stress Responses*. ASM Press, Washington, DC, USA, pp47-59, 2000.
- 38) Ohara, N., Kikuchi, Y., Shoji, M., Naito, M., Nakayama, K.: Superoxide dismutase-encoding gene of the obligate anaerobe *Porphyromonas gingivalis* is regulated by the redox-sensing transcription activator OxyR, *Microbiology* **152**, 955-66, 2006.

図の説明

図 1. pUR001::*ermF* と pUR001::*tetQ* の構築図

bla, β -ラクタマーゼ遺伝子 ; *ermF*, エリスロマイシン耐性遺伝子 ; *tetQ*, テトラサイクリン耐性遺伝子。

図 2. pBL0160 と pBL1202 の構築図

bla, β -ラクタマーゼ遺伝子 ; Ori(E), 大腸菌における複製起点 ; *rep(B)*, *Bacteroides* / *Porphyromonas* における複製起点 ; *tetQ*, テトラサイクリン耐性遺伝子。

図 3. *P. gingivalis* 変異株の作製

(A) $\Delta rpoN$ -pTE の作製手順を示す。(B) *rpoN*-high と *rpoN*-low の作製手順を示す。*ermF*, エリスロマイシン耐性遺伝子 ; *tetQ*, テトラサイクリン耐性遺伝子。

図 4. RpoN 欠損株における RpoN 発現プラスミドの安定性

pTIO-1 を保持した WT-pT 株, pTE001 を保持した WT-pTE 株, および pTE001 を保持した $\Delta rpoN$ -pTE 株を変法 BHI 培地で継代培養し, 24 世代培養後におけるプラスミドの保持率を示す。 ** P -value<0.01 ; * P -value<0.05。 n=3。

図 5. RpoN 低度産生株における *rpoN* 発現量

リアルタイム定量 PCR 法にて親株, RpoN 低度産生株 *rpoN*-low, および相補株 *rpoN*-high の *rpoN* 発現量を調べた。親株の *rpoN* 発現量を 1 とし, *rpoN*-low 株と *rpoN*-high 株における *rpoN* の発現量を相対値で示す。 ** P -value<0.01 ; * P -value<0.05。 n=3。

図 6. *rpoN* 発現量の酸素暴露ストレスに対する影響

嫌気条件下で培養した親株, *rpoN*-low 株, および *rpoN*-high 株を OD₆₀₀=0.2 に希釈後, 好気条件下に置き, 6 時間後, 12 時間後, および 24 時間後における菌液の濁度を測定した。 ** P -value<0.01 ; * P -value<0.05。 n=3。

図 7. *rpoN* 発現量の酸化ストレスに対する影響

嫌気条件下で培養した親株, rpoN-low 株, および rpoN-high 株の培地中に最終濃度 0.25 mM の過酸化水素を添加し, 4 時間後と 6 時間後における菌液の濁度を測定した。 ***P*-value<0.01。 n=3。