

氏名	田川 淳平		
学位	博士		
専門分野の名称	歯学		
学位授与番号	博甲第4733号		
学位授与の日付	平成25年3月25日		
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)		
学位論文題目	電気穿孔法に適した <i>Porphyromonas gingivalis</i> 用新規プラスミドベクターの構築に関する研究		
学位論文審査委員	松尾 龍二 教授	久保田 聡 准教授	
	大原 直也 教授		

学位論文内容の要旨

【諸言】

歯周病の発症には多くの菌が関与するが、特に慢性歯周炎においては red complex と呼ばれる *Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* の3菌種が主たる起因菌とされ、中でも *P. gingivalis* は病態の形成において中心的な役割を果たしていると考えられている。*P. gingivalis* の病原性因子としてタンパク質分解酵素、線毛、莢膜、赤血球凝集素、ヘモグロビン結合タンパク質などが知られているが、これらの病原性因子の役割は遺伝学のおよび分子生物学的手法により明らかにされてきた。

プラスミドは、多くの遺伝子組換え実験に利用されている。細菌の遺伝学的解析において多用されている。*P. gingivalis* の遺伝子操作に用いられているプラスミドとして、*Bacteroides* 属固有のプラスミドを由来とした pVAL-1をはじめ、pT-COW, pNJR12, pYH400などが知られている。これらのプラスミドはいずれも10 kb以上とサイズが大きく、*P. gingivalis* への導入には接合伝達法が用いられている。接合伝達法は導入すべき菌株、すなわち受容菌に加え、特定の大腸菌株等の供与菌を必要とし、さらに両菌株の増殖相をそろえる必要があり、操作が煩雑である。それに対し電気穿孔法による形質転換法は受容菌のみを準備するのみであり、またその前処理も菌体を緩衝液で洗浄するのみであるため、操作が簡便である。

本研究では、*P. gingivalis* において操作が簡便な電気穿孔法により高効率に導入される、汎用性の高い、操作性の良いプラスミドを作製することを目的とした。

【方法】

接合伝達法で導入される大腸菌-*Bacteroides* のシャトルベクターpVAL-1をもとに以下の操作を行なった。

1. 塩基配列が未知である pVAL-1 の塩基配列を決定した。
2. pVAL-1 の配列の中で *Bacteroides* 属菌体内での複製起点および接合伝達に必要な mob 配列を含む領域、およびエリスロマイシン耐性遺伝子カセットを大腸菌クローニングベクター-pBluescript II SK(-)に挿入したプラスミドを作製し、接合伝達法を用いて、*P. gingivalis* 内で複製するために必要な pVAL-1 の最小領域を決定した。
3. pVAL-1 の必要最小領域を使用して最小化プラスミドを構築し、pTIO-1 と名付けた。

また本研究で作製した pTIO-1 について次のことを検証した。

1. 電気穿孔法による pTIO-1 の *P. gingivalis* への導入条件の最適化を図り、*P. gingivalis* への導入効率を求めた。
2. 定量 PCR 法により保持菌内で pTIO-1 のコピー数を求めた。
3. 保持菌を継代することにより pTIO-1 の安定性を調べた。
4. 電気穿孔法により pTIO-1 の導入が可能な宿主域を求めた。

【結果】

1. pVAL-1 の塩基配列を決定した結果、10,822 bp であった。
2. pVAL-1 の中で *P. gingivalis* 菌体内での複製に必要な領域は 1,651 bp であった。
3. 最小化プラスミドとして大腸菌クローニングベクター pBluescript II SK(-) を骨格とし、*P. gingivalis* 菌体内での複製起点およびエリスロマイシン耐性遺伝子カセットを持つ 4,479 bp の pTIO-1 を構築した。
4. 電気穿孔法による pTIO-1 の *P. gingivalis* ATCC 33277 株への導入効率は、2.5kV/2mm の電気パルスをかけた場合、 $3.6 \times 10^{-7} \pm 6.3 \times 10^{-8}$ (transformants / μg DNA) であった。
5. *P. gingivalis* ATCC 33277 株内における pVAL-1 と pTIO-1 のコピー数はいずれも 1 であった。
6. *P. gingivalis* ATCC 33277 株内におけるプラスミドの保有率は pVAL-1 では 12 世代で 0.5%、24 世代以降は 0% であったのに対し、pTIO-1 では 12 世代で 7.4%、24 世代以降では 0% であった。
7. pTIO-1 は電気穿孔法により供試した *P. gingivalis* 6 菌株および 3 種類の *Bacteroides* 属菌種に高効率に導入された。

【考察】

これまでに *P. gingivalis* に使用できる電気穿孔法用の有用なプラスミドはほとんど報告がなく、現在汎用されているものは無い。今回作製した pTIO-1 は電気穿孔法で導入可能であったこと、そのサイズは従来のものに対して大幅に減少されたことから今後の遺伝子操作に有用であると考えられる。そのコピー数は元にした pVAL-1 と同じであり、また安定性も改善したこと、臨床分離株を含め供試したすべての株に導入可能であったことから有用性が示唆された。

【総括】

P. gingivalis の遺伝子操作に有用と考えられる電気穿孔法により同菌に導入可能なプラスミドベクター pTIO-1 を構築し、その有用性が示された。

学位論文審査結果の要旨

Porphyromonas gingivalis の遺伝子操作に用いられるプラスミドとして、*Bacteroides* 属固有のプラスミドを由来とした pVAL-1 などが知られている。これらのプラスミドの *P. gingivalis* への導入には操作が煩雑な接合伝達法が用いられている。それに対し電気穿孔法は操作が簡便である。本研究では、*P. gingivalis* に電気穿孔法により高効率に導入される、汎用性の高いプラスミドを作製することを目的とした。また作製したプラスミドの生物学的性状を明らかにすることを目的とした。

目的とするプラスミドの作製にあたって、接合伝達法で導入される大腸菌-*Bacteroides* 属のシャトルベクター pVAL-1 から出発した。まず pVAL-1 の全塩基配列と *Bacteroides* 属菌体内での複製起点を明らかにした。次に複製起点およびエリスロマイシン耐性遺伝子カセットを大腸菌クローニングベクター pBluescript II SK(-) に挿入したプラスミドを作製し、これを最小化することによりプラスミド pTIO-1 を構築した。また pTIO-1 について、電気穿孔法での導入効率、宿主域、コピー数、および安定性を検討した。

本研究で明らかになったことは、以下の通りである。

- 1) pVAL-1 は 10,822 bp からなるプラスミドであった。
- 2) pVAL-1 の中で *P. gingivalis* 菌体内での複製に必要な領域は約 1.6 kb であった。
- 3) 本研究において作製した pTIO-1 は pBluescript II SK(-) を骨格とし、*P. gingivalis* 菌体内での複製起点および *ErnR* を持ち、大きさは 4,479 bp であった。
- 4) 電気穿孔法による pTIO-1 の *P. gingivalis* ATCC 33277 株への導入効率は、1.25kV/mm の電気パルスをかかけた場合、 $3.6 \times 10^{-7} \pm 6.3 \times 10^{-8}$ (/ μg DNA \cdot CFU) であった。
- 5) *P. gingivalis* ATCC 33277 株内における pVAL-1 と pTIO-1 のコピー数はいずれも 1 であった。
- 6) *P. gingivalis* ATCC 33277 株内におけるプラスミド保有率は pVAL-1 では 12 世代で 0.5%、24 世代以降は 0% であったのに対し、pTIO-1 では 12 世代で 7.4%、24 世代以降では 0% であった。
- 7) pTIO-1 は供試した *P. gingivalis* 6 菌株および 3 種類の *Bacteroides* 属菌種すべてに電気穿孔法により高効率に導入された。

pTIO-1 は電気穿孔法で導入可能であったこと、サイズは従来のものに対して大幅に縮小されたことから今後の遺伝子操作に有用であると考えられる。また、菌体内コピー数は pVAL-1 と同じであり、安定性も改善したこと、臨床分離株を含め供試したすべての株に導入可能であったことから、その有用性が重ねて示唆された。

本論文では、*P. gingivalis* の分子生物学的研究を進展させる上で重要なツールを構築しており、これは今後 *P. gingivalis* の病原性を解明する研究を加速しうる重要な貢献である。よって、審査委員会は本論文に博士(歯学)の学位論文としての価値を認める。