

氏名	加野 小奈美
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第5126号
学位授与の日付	平成27年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合学研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277 株 RpoN 低度産生株の性状解析
論文審査委員	高柴 正悟 教授 仲野 道代 教授 大原 直也 教授

学位論文内容の要旨

【緒言】

細菌は RNA ポリメラーゼの σ 因子を複数保有しており, RpoD (σ^D), RpoS (σ^S), および RpoN (σ^N) はその主要なものである。RpoD は増殖期において最も多くの遺伝子発現を行っている。増殖定常期においては, RpoS が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。そして 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。主たる歯周病細菌であるグラム陰性嫌気性細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. g.*) は, 8 種類の σ 因子を保有するが, RpoS は持たない。そのため, 他の σ 因子が他菌種とのホモログと異なる機能を持つことが予測される。*P. g.* における RpoN の機能に関する報告はなく, 本研究では, *P. g.* の RpoN の機能を明らかにすることを目的とし, *P. g.* の RpoN 変異株を作製し, その解析を行うことを試みた。

【材料・方法】

1. RpoN 欠損株作製

RpoN 欠損株の作製は, *P. g.* ATCC 33277 株 (33277 株) を親株とし, 相同組換え法により行った。*P. g.* への遺伝子導入は電気穿孔法による。

2. RpoN 発現プラスミド(pTE001) を保持した野生株 (WT-pTE) の作製

WT-pTE は, *rpoN* を *P. g.* で複製可能な pTIO-1 に挿入した pTE001 を 33277 株に導入することで作製した。陰性対象として, pTIO-1 を 33277 株に導入した WT-pT 株を作製した。

3. pTE001 を保持した *rpoN* 欠損株 ($\Delta rpoN$ -pTE) の作製

$\Delta rpoN$ -pTE は相同組換え法により, WT-pTE のゲノム上の *rpoN* をテトラサイクリン耐性遺伝子 *tetQ* で置換することで作製した。

4. プラスミド保持率の算出法

変法 BHI 培地で継代培養した WT-pT, WT-pTE, および $\Delta rpoN$ -pTE の 3 株の菌液を, Em 添加および非添加の血液寒天培地に播種し, 両培地上に形成された集落数の比率から, プラスミドの保持率を求めた。

5. RpoN 低度産生株と RpoN 相補株の作製

RpoN 低度産生株 (*rpoN*-low) と RpoN 相補株 (*rpoN*-high) は, *P. g.* 内での発現量の低い PGN_0160

プロモーターと *rpoN* 読み枠 (ORF) の融合遺伝子, あるいは *rpoN* を支配している PGN_1203 プロモーターと *rpoN* 読み枠 (ORF) の融合遺伝子を, それぞれ *P. g.* のゲノム上に挿入することで作製した。なお, もともとゲノム上に存在する *rpoN* はエリスロマイシン耐性遺伝子 *ermF* を挿入することで破壊した。

6. 定量 PCR 法 (RT-PCR)

P. g. 細胞から RNeasy Mini Kit を用いて抽出した全 RNA を鋳型として cDNA を合成した。この cDNA を鋳型として PCR 法を行い, *rpoN* の発現量を調べた。なお, *gyrA* を比較対象とした。

7. 酸素暴露ストレス

酸素暴露ストレスは OD₆₀₀=0.2 の菌液を, 好気状態, 37°C で 150 回/分で振盪培養することで行った。菌数変化は濁度を測定することで評価した。

8. 酸化ストレス

酸化ストレスは OD₆₀₀=0.2 の菌液に H₂O₂ を加え, 嫌気状態, 37°C で培養することで行った。菌数変化は濁度を測定することで評価した。

【結果】

1. RpoN 欠損株の作製

33277 株の RpoN 欠損株は得られなかった。しかし, WT-pTE 株ではゲノム上の *rpoN* を破壊することができ, $\Delta rpoN$ -pTE 株が得られた。

2. プラスミドの安定性

24 世代後における WT-pT 株, WT-pTE 株, および $\Delta rpoN$ -pTE 株のプラスミドの保有率は, それぞれ 1.54%, 77.50%, および 100% であった。

3. *rpoN* の発現量

rpoN 発現量は 33277 株の *rpoN* の発現量を 1 とした場合, *rpoN*-low 株と *rpoN*-high 株の *rpoN* の発現量はそれぞれ 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

酸素暴露ストレス下では, *rpoN*-low 株の培養液の濃度は 33277 株のものに対し, いずれの時点においても, 統計学的に有意に低い値を示した。

5. *rpoN* 発現量の酸化ストレスに対する影響

酸化ストレス下では, *rpoN*-low 株の培養液の濃度は 33277 株のものに対し, いずれの時点においても, 有意に低い値を示した。

【考察】

33277株のゲノム上にある *rpoN* は破壊されず、一方で WT-pTE 株のゲノム上の *rpoN* は破壊されたこと、また $\Delta rpoN$ -pTE 株の pTE001 が脱落しなかったことから、*P. g.* では *rpoN* は必須遺伝子であることが示唆された。

酸素暴露や酸化ストレス下では *rpoN-low* 株の増殖は 33277 株よりも有意に抑制されたことから、*rpoN* が酸素や酸化物に対する抵抗性を担っていることが示唆された。しかし、その増殖抑制効果は部分的なものであり、これらストレスに対する抵抗性機能が、*rpoN* の必須性に密接に関連しているとは考えにくい。また、複数の菌種において、RpoN は窒素代謝や炭素源の獲得、また発酵に関与していることが示されており、*P. g.* における RpoN の必須性の理由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. g. では *rpoN* は必須遺伝子であることが強く示唆された。*P. g.* の *rpoN* は酸素暴露ストレス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。

論文審査結果の要旨

細菌は RNA ポリメラーゼの σ 因子を複数保有しており、RpoD (σ^D), RpoS (σ^S), そして RpoN (σ^N) はその主要なものである。RpoD は、増殖期において他の σ 因子と比べて最も多くの遺伝子の転写をつかさどっている。定常期においては、RpoS が定常期に必要な遺伝子群の転写を中心的につかさどっている。そして 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。歯周病細菌であるグラム陰性嫌気性球菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*) は、8 種類の σ 因子を保有するが、RpoS は保有していない。そのため、*P. gingivalis* の σ 因子は他菌種とのホモログとは異なる機能を持つことが推測される。これまでに *P. gingivalis* における RpoN の機能に言及した報告はなく、本研究では、*P. gingivalis* の RpoN の機能を明らかにすることを目的とし、*P. gingivalis* の RpoN 欠損株の作製を試みた。しかし、*rpoN* を欠損させた場合は致死的であったので、本来の位置とは異なる部位に低発現プロモーターと共に *rpoN* を挿入させた後に本来の *rpoN* を欠失させて作製した RpoN 低度発現株である「*rpoN*-low」と、RpoN 本来のプロモーターを用いた RpoN 相補株である「*rpoN*-high」を作製し、その解析を行った。

研究の結果は以下の内容であった。

1. *P. gingivalis* ATCC 33277 株 (33277 株) のゲノム上の *rpoN* は、相同組換え法によっては破壊されなかった。
2. *rpoN* が挿入されたプラスミド (pTE001) を保持した 33277 株 (WT-pTE 株) ではゲノム上の *rpoN* は破壊され、 $\Delta rpoN$ -pTE 株が得られた。
3. *rpoN* が挿入されていない陰性対照プラスミドを保持した 33277 株では、そのプラスミドが速やかに脱落したが、WT-pTE 株ではプラスミド脱落現象は生じなかった。
4. 33277 株の *rpoN* の RNA 量を 1 とした場合、*rpoN*-low 株と *rpoN*-high 株における *rpoN* の RNA 量はそれぞれ 0.061 と 0.534 であった。
5. 酸素暴露ストレス下での *rpoN*-low 株の増殖度は、33277 株に対して、6、12、そして 24 時間のいずれの時点においても、低かった ($p < 0.05$)。
6. 過酸化水素による酸化ストレス下での *rpoN*-low 株の増殖度は、33277 株に対して、4 および 6 時間のいずれの時点においても、低かった ($p < 0.05$)。

以上のことから、*P. gingivalis* の *rpoN* は必須遺伝子であることが強く示唆されるとともに、本研究で使用した方法が *P. gingivalis* の必須遺伝子を調べる有益な方法であることが示された。また、*P. gingivalis* の *rpoN* は、酸素暴露ストレスと酸化ストレス応答に関与することが示された。

これらの結果は、*P. gingivalis* の RpoN の機能の一部を明らかにした点で重要である。

よって、審査委員会は一致して、本論文に博士 (歯学) の学位論文としての価値を認める。