

The Novel Stationary-Phase-Upregulated Protein of *Porphyromonas gingivalis* Influences the Production of Superoxide Dismutase, Thiol Peroxidase and Thioredoxin

氏名 菊池 有一郎

【緒言】

口腔偏性嫌気性細菌 *Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*)は、成人性歯周炎の発症・増悪に関わる最重要細菌であり、血液寒天培地上での黒色集落形成、赤血球凝集性、ヘモグロビン吸着性、糖非発酵性、強力な菌体表面および菌体外プロテアーゼ産生性など興味深い性状を示す細菌である。増殖環境の温度、酸素分圧などの変化は本菌の病原因子の発現に影響を与えるという報告があるが、対数増殖期から静止期への移行が本菌の遺伝子発現にどのように影響するかについての報告はほとんどない。そこで本研究では、*P. gingivalis* の環境ストレス回避機構を解明する目的で、対数増殖期と静止期における全蛋白を二次元ゲル電気泳動法にて展開し、それぞれの蛋白の発現を比較検討した。

【実験方法】

P. gingivalis 33277 株を嫌気培養し、対数増殖期、静止期における蛋白の発現量を二次元ゲル電気泳動法により解析した。対数増殖期に比べ、静止期において顕著に発現量が増加した蛋白 UstA の遺伝子について、プライマー伸長法にて転写開始点を同定し、さらにノーザンプロット解析にて転写物の大きさを解析した。さらに、UstA に対する抗血清を得て、細胞分画法にて、UstA の局在を検討した。また、*ustA* 遺伝子挿入変異株およびその相補株を構築し、嫌気培養下における増殖曲線の作成および二次元ゲル電気泳動法にて蛋白の発現量を比較検討した。野生株と比較すると *ustA* 遺伝子挿入変異株において発現量が顕著に増加する蛋白のうち、Superoxide Dismutase については *sod'*-*'lacZ* 融合遺伝子を作製し、その発現を調べた。最後に、野生株、*ustA* 遺伝子挿入変異株および相補株、*oxyR* 遺伝子挿入変異株、*ustA oxyR* 二重挿入変異株を用い、ディスク法にて種々の薬剤 (H_2O_2 , t-butyl hydroperoxide, cumene hydroperoxide, diamide, metronidazole, mitomycin C) に対する感受性試験を行った。

【結果】

P. gingivalis 33277 株を嫌気培養し、対数増殖期、静止期における蛋白の発現量を二次元ゲル電気泳動法により比較検討すると、対数増殖期に比べ、静止期において発現量が顕著に増加する蛋白が認められた。その蛋白について、プロテインシーケンサーにより N 末端アミノ酸配列を決定し、TIGR の *P. gingivalis*

W83 株ゲノムデータベース上にて、BLAST 検索を行ったところ、その配列を N 末端領域にもつ open reading frame(ORF)を発見した。この ORF がコードする蛋白は分子量 9.2 kDa、等電点 4.7 であり、二次元ゲル電気泳動法の結果とほぼ一致した。我々は、その蛋白を静止期において発現量が顕著に増加するという意味で UstA (upregulated in stationary phase) と名付けた。他の生物種にて *ustA* 類似遺伝子が存在するか検索したところ、*P. gingivalis* と近縁の *Bacteroides thetaiotaomicron* と *Bacteroides fragilis* に類似遺伝子を認めた。次にプライマー伸長法にて転写開始点の同定を行い、さらにノーザンブロット解析にて転写物の大きさを解析をしたところ、*ustA* はモノシストロニックな遺伝子であることが判明した。また、*ustA* は酸素の存在により転写量が増加することがわかった。UstA の抗血清を得て、細胞分画法にて局在を調べたところ、UstA は細胞質中の蛋白であることがわかった。*ustA* 遺伝子挿入変異株および相補株を構築し、増殖曲線を作成すると、変異株は野生株に比べ静止期において濁度(O.D. 600nm)が約 0.3 減少した。また、その減少は相補株では顕著に抑制された。野生株、変異株、相補株の静止期における嫌気または好気培養下の全蛋白を二次元ゲル電気泳動法にて展開してみると、酸化ストレスにより発現が誘導される蛋白である Superoxide Dismutase (Sod)、Thiol Peroxidase (Tpx)、Thioredoxin (Trx) の発現量の顕著な増加が変異株においてみられた。この蛋白の対数増殖期における発現は、変異株は野生株に比べ酸化ストレスによる誘導を顕著に受けていた。対数増殖期における Sod の発現を、*lacZ* をリポーター遺伝子として調べたところ、野生株に比べ変異株では酸化ストレスにより顕著に発現が誘導されており、二次元ゲル電気泳動法の結果とほぼ一致した。ディスク法による感受性試験の結果では、野生株に比べ変異株では diamide に対し耐性を示した。さらに、diamide, metronidazole, mitomycin C に対して、*ustA oxyR* 二重挿入変異株は *oxyR* 単独挿入変異株より耐性を示した。

【考察】

対数増殖期から静止期への移行による遺伝子発現の変化については、大腸菌をはじめ種々の菌で解析が行われている。しかし、*P. gingivalis* においては未解明であった。本研究で我々は、対数増殖期より静止期において顕著に発現量が増加する蛋白 UstA を発見した。*ustA* 変異株では、静止期における菌数は野生株に比べ減少していることから、静止期におけるストレスに対し何らかの防御作用を与えている可能性が示唆された。また、*ustA* 変異株では Sod、Tpx、Trx などの酸化ストレス応答蛋白の発現量が顕著に増加していることより、UstA は酸化ストレス応答蛋白の発現を制御する可能性も示唆された。