

財団法人日中医学協会
2008年度共同研究等助成金－調査・共同研究－報告書

2009年3月9日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料：研究報告書

受給者氏名：三宅 洋一郎



所属機関名：徳島大学大学院ヘルスサイエンス研究部

所属部署：口腔微生物学分野 職名：教授
〒 770-8504

所在地：徳島市蔵本町3丁目18-15

電話：088-633-7329 内線：直通

1. 助成金額：1,000,000円

2. 研究テーマ

アテロームplaque形成の初期段階における*Porphyromonas gingivalis* HUの役割についての解析

3. 成果の概要（100字程度）

歯周病原因菌*Porphyromonas gingivalis*の病原因子の解明を目指し、ヒストン様タンパク質と関連の深いDnaKについて検討を行った。同菌の*dnaK*遺伝子を大腸菌で発現し、DnaKタンパク質を得ることができた。また、同遺伝子ノックアウト株を得た。これらを用いることによってDnaKの病原性における役割の解析が可能となった。

※発表論文等

Purification of recombinant *Porphyromonas gingivalis* DnaK and creation of its mutant
第82回日本細菌学会総会、2009年3月12日、名古屋国際会議場

4. 研究組織

日本側研究者氏名：三宅 洋一郎 職名：教授

所属機関：徳島大学大学院ヘルスサイエンス研究部 部署：口腔微生物学分野

中国側研究者氏名：束 蓉 職名：教授

所属機関：上海交通大学附属第九人民医院口腔医学院 部署：牙周病科

一日中医学協会助成事業－
アテローム plaque 形成の初期段階における *Porphyromonas gingivalis* HU の役割
についての解析

研究者氏名	教授 三宅 洋一郎
日本研究機関	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 口腔微生物学分野
中国側研究代表者	教授 束 蓉
中国所属機関	上海交通大学附属第九人民医院口腔医学院 牙周病科
共同研究者	梁 景平, 劉 大力, 湯本浩通

要 旨

Porphyromonas gingivalis は歯周病の原因とされている細菌であり、それが産生する毒素や酵素などの病原因子がいくつか明らかにされてきた。しかし、未だに不明な病原因子が多く残されている。細菌 DNA の複製、転写、などに重要な役割を果たしているヒストン様タンパク質は病原性発揮にも役割を果たしていることがあり、この菌での役割は興味深い。その解明の端緒として、関連の深い DnaK について検討をすることとした。*P. gingivalis* W83 株の *dnaK* 遺伝子をクローニングし、大腸菌を用いて発現し、生成したものを得ることができた。また、エリスロマイシン耐性を持った同遺伝子を *P. gingivalis* に形質転換することができた。これらを用いることによって DnaK の病原性における役割の解析が可能となった。

Key Words *Porphyromonas gingivalis*, ヒストン様タンパク質, DnaK, 歯周病

緒 言 :

細菌細胞においては一群の nucleoid-associated proteins (NAPs) により核酸は効率よくコンパクトにされており、それらのタンパク質は真核細胞のヒストンに機能が似ていることから、ヒストン様タンパク質 (histone-like DNA binding proteins, HLPs) と呼ばれている。その中でも HU はもっとも一般的なものである。大腸菌の HU は最もよく研究されており、DNA に結合しシャペロンとして DNA をコンパクトな構造とし、さらに DNA の複製、転写、翻訳、組み替え、修復などで重要な働きをしている。他の菌種でも HU に似た構造は見出されているが、それらの HLPs の生理学的及び分子生物学的な解析は行われていない。溶血性レンサ球菌やミュータンスレンサ球菌の HLP は心臓組織や腎臓組織への結合に関与し、これらの菌による炎症の病原性に関与していることが示唆されている。そのメカニズムは明らかではなかったが、我々は近年 *Streptococcus intermedius* の HLP がヒト単球からのサイトカインの産生に関与していることを報告した¹⁾。

Porphyromonas gingivalis は歯周病の原因とされている細菌であり、その HU の働きは興味深い。しかし、この菌の HU は大腸菌やレンサ球菌のそれと異なっているようで、10 の遺伝子が DNA 結合タンパク質をコードしているといわれている。したがって、この複雑な HU システムがこの菌の HU の研究の妨げとなっている。そこでまず HU との関連も示唆される DnaK のクローニングを行い、その働きについての検討から始めることとした。

対象と方法：

Porphyromonas gingivalis W83 は BHI 寒天平板培地で培養し、嫌気ボックス内で保存した。*Escherichia coli* DH-5 α を DNA クローニングおよびプラスミドの組み換えに、*E. coli* BL21 を組み替えタンパク質発現に使用した。これら大腸菌は LB broth 中で培養を行った。

組み換えプラスミドの作成は図 1 で示すように行った。*Pg-dnaK* 遺伝子を *P. gingivalis* W83 株の染色体 DNA から *Sma* I および *Hind* III サイトを含む範囲で PCR 増幅した。増幅した PCR 産物は *Sma* I および *Hind* III で処理し、pQE-1 を *Pvu* II および *Hind* III で処理したものとの His タグ下流に T4 リガーゼで組み込み、pQEK83 を作成した。エリスロマイシン耐性を付与するために pQE-hlp-orf-erm を鋳型として 2425bp のフラグメントを増幅し、pQEK83 に組み込み、pQEK83::Em^r を作成した。

His-*Pg-DnaK* タンパク質を発現させるために、pQEK83 を組み込んだ *E. coli* BL21 の培養液 400ml に isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を 0.5 mM, 1 mM, 2 mM の各最終濃度で加えた。37°Cにて 8 時間培養後、菌体を遠心により集菌し、10ml の溶菌バッファーに懸濁した。懸濁液を超音波処理し、Triton X-100 を加えることによりタンパク質を溶出した。タンパク質を含む上清を溶菌バッファーで平衡化した Ni-agarose カラムに添加した。洗浄後、イミダゾールを含む溶出バッファーによりタンパク質の溶出を行った。

作成した組み替え *Pg-DnaK* タンパク質を確認するために、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動およびウェスタン分析を行った。変性させた標品を 15% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて泳動し、CBB で染色すると共にフッ化ポリビニリデン膜に electrotransfer によって転写した。膜はスキムミルクでブロッキング後、抗 His タグ抗体と室温で 1 時間反応させた。洗浄後ペルオキシダーゼ結合 2 次抗体と室温で 1 時間反応させ、ECL 検出キットを用いて発色させた。

P. gingivalis の 37°C一夜培養液 200ml を遠心により集菌し、100ml の electroporation バッファーで洗浄後、同バッファー 2ml に懸濁しコンピメントセルとした。100 μl ずつに分注し、使用するまで -40°C で保存した。100 μl のコンピメントセルに 2 μg の pQEK83::Em^r を加えたものをキュベットに入れ、2,500V で electroporation を行った。直ちに 1ml の BHI 培地を加え、37°Cで 16 時間培養を行った。得られた菌株はエリスロマイシン含有 BHI 寒天培地上で選択を行った。

結果：

P. gingivalis の DnaK タンパクを得るために *Pg-dnaK* 遺伝子を pQE-1 プラスミドに挿入（図 1）、*E. coli* BL-21 に形質転換し、IPTG による誘導で発現させた。図 2 に示すように菌株 A が抗 His タグ抗体と反応する単一のバンドを呈し、またその分子サイズが 72kDa と予測する数値と近似していたため、この菌株を *E. coli* BLQEK83 と命名し、以後の実験に使用した。

次に *E. coli* BLQEK83 による His-rPg-DnaK 產生に与える IPTG 誘導の影響について検討を行った。図 3 に示すとおり、培養時間 8 時間で IPTG 濃度 0.5mM 以上の条件で効率的に発現が観察されたため、以降 IPTG 濃度 1mM で 8 時間培養を行うこととした。

上記条件で培養した *E. coli* BLQEK83 の菌体を集め、超音波により破碎し、その上清を用いて His-rPg-DnaK の精製を行った。精製はニッケル吸着カラムを用いて行った。図 4 に示すように、イミダゾールによる溶出画分に、ウェスタン分析による小さい分子サイズのバンド一本が見られるものの予想された分子サイズのタンパクが得られていることが明らかになった。CBB 染色ではまだ多くの夾雜物は含んでいるが、今後の精製に使用できるものと思われる。

Pg-DnaK をノックアウトした変異株を作成するために、この遺伝子中にエリスロマイシン・カセットを組み込んだプラスミド pQEK83::Em^r を作成した（図 1）。この遺伝子を *P. gingivalis* に形質転換し、エリスロマイシン耐性株を得ることができた。現在得られた菌株の中から、目的の遺伝子との組み換えが生じている菌株を選択している。

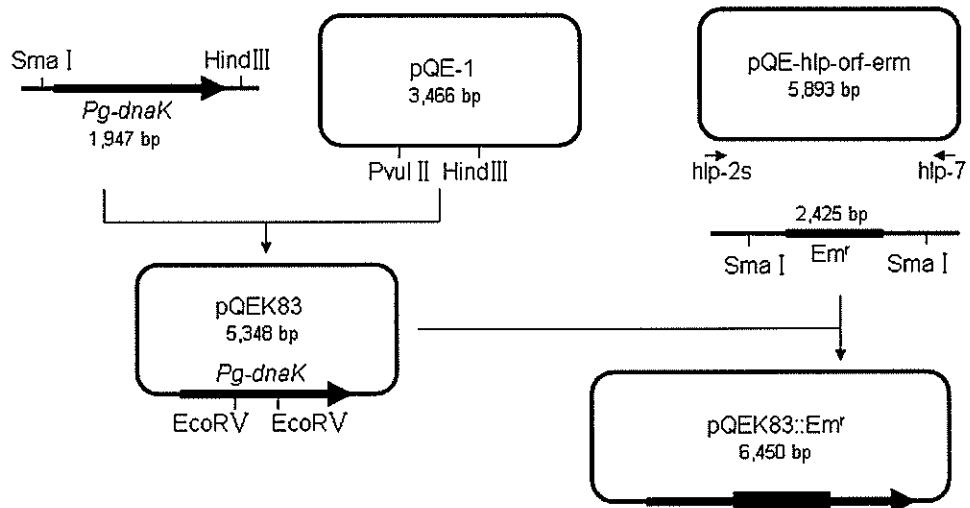


図1 プラスミド pQEK83 および pQEK83::Em^r の構築法

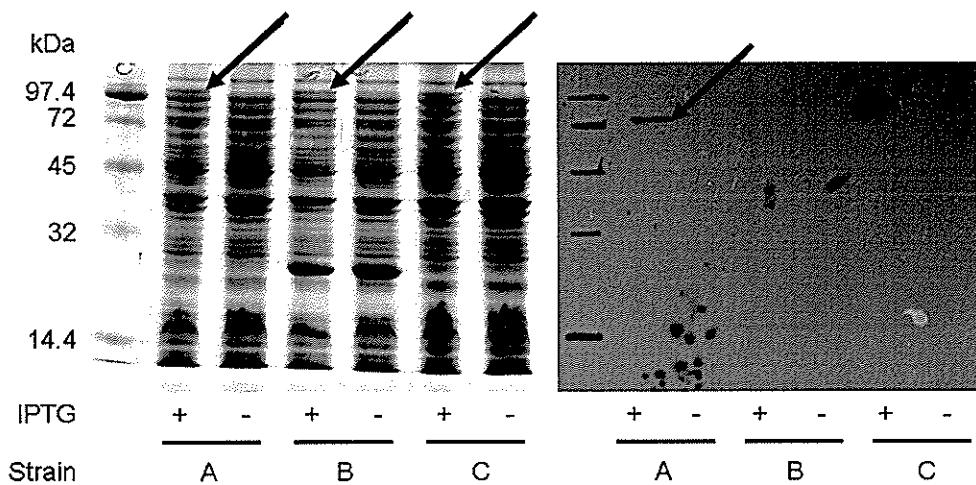


図2 菌株による His-rPg-DnaK 発現の違い

(左) CBB 染色, (右) ウェスタン分析 A, B, C : 菌株名

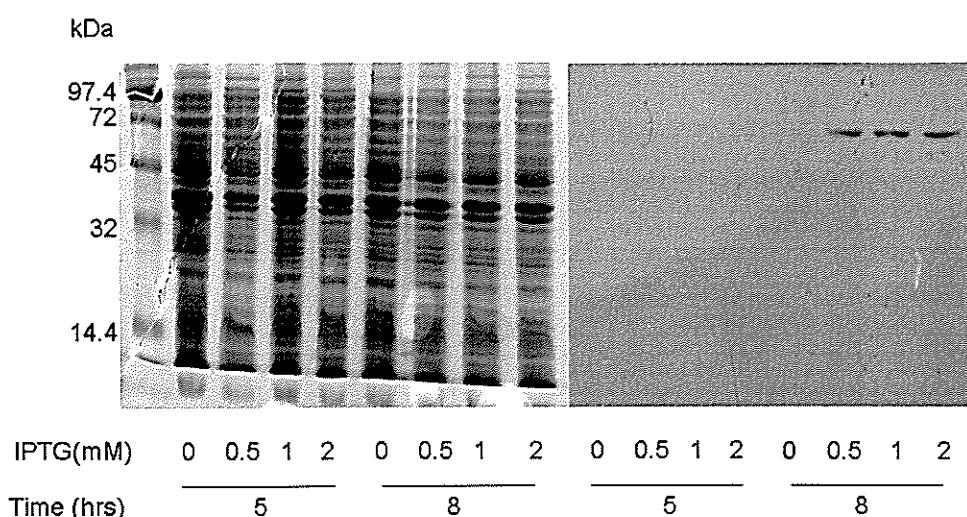


図3 E. coli BLQEK83 による His-rPg-DnaK 発現への IPTG 濃度および培養時間の影響

(左) CBB 染色, (右) ウェスタン分析

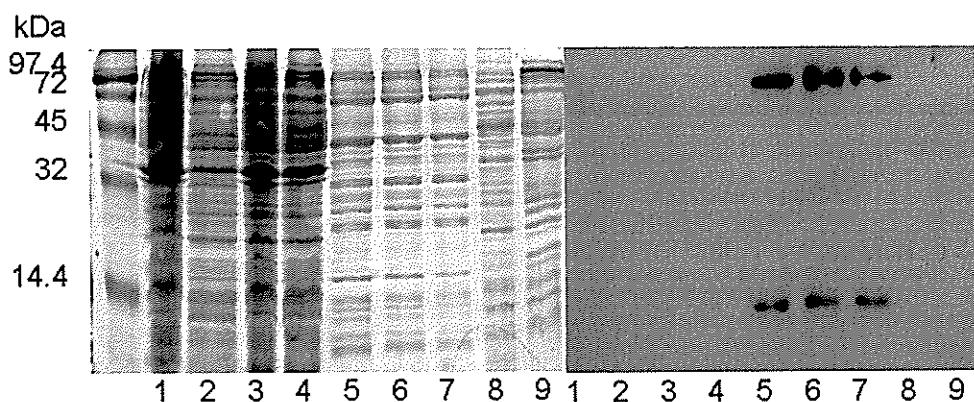


図4 His-rPg-DnaKの精製

(左) CBB染色、(右) ウェスタン分析 各レーン 1:細胞画分, 2:粗抽出液, 3, 4:超音波処理前の上清, 5, 6, 7:イミダゾールによる溶出画分, 8, 9:洗浄画分

考 察 :

P. gingivalis は歯周病の原因とされている細菌であり、その病原因子の解明はこの菌による歯周病の予防や治療に役立つと思われる。細菌 DNA の複製、転写、などに重要な役割を果たしているヒストン様タンパク質は病原性発揮にも役割を果たしていることがあり、レンサ球菌などでそのことが示されている¹⁾。歯周病原菌である *P. gingivalis* でも同様の役割を果たしているかは興味深い。その解明の端緒として、まず関連の深い DnaK について検討をすることとした。*P. gingivalis* W83 株の *dnaK* 遺伝子をクローニングし、大腸菌を用いて発現し、付与した His タグを用いた精製を行った画分を得ることができた。この画分にはまだ夾雜物があるものの、更なる精製を行うことにより、組み換えタンパク質を得ることができる。それを用いることにより、DnaK タンパク質の宿主への影響、あるいは菌体内での生理的役割の解明に役立つものと考える。また、エリスロマイシン耐性を持った同遺伝子を *P. gingivalis* に形質転換することができた。現在これらの菌株の中から *dnaK* 遺伝子をノックアウトした株の検索を行っており、それが得られればこの遺伝子の病原性への関与、また関連の深い HU 系とのかかわりについての検索が可能となる。

この後行うべきことが多く残されているが、本実験により得られた組み換えタンパク質及びノックアウト変異株は、歯周病原菌 *P. gingivalis* の病原性解明に役立つものといえ、今後の研究の発展に寄与できると信じている。

参考文献 :

- 1) Dali Liu, Hiromichi Yumoto, Katsuhiko Hirota, Keiji Murakami, Kanako Takahashi, Kouji Hirao, Matsuo Takashi, Kazuto Ohkura, Hideaki Nagamune, Yoichiro Miyake: Histone-like DNA binding protein of *Streptococcus intermedius* induces the expression of pro-inflammatory cytokines in human monocytes via activation of ERK1/2 and JNK pathways. *Cell. Microbiol.* 10(1): 262-276, 2008.

注：本研究は、2009年3月12日「日本細菌学会総会」においてポスター発表。