

氏名 谷 本 一 郎

授与した学位 博 士 学  
専攻分野の名称 歯 学

学位授与の番号 博 乙 第 号

学位授与の日付 平 成 1 4 年 3 月 2 5 日

学位授与の要件 博士の学位論文提出者(学位規則第4条第2項該当)

学位論文題名 歯周病原性細菌*Actinobacillus actinomycetemcomitans*の線毛発現に関する研究

論文審査委員 教授 滝川 正春 教授 福井 一博 教授 渡邊 達夫

## 学 位 論 文 内 容 の 要 旨

## 緒言

*Actinobacillus actinomycetemcomitans*と歯周病との関わりは、白血球毒素やリポ多糖等の病原因子から研究され、*A. actinomycetemcomitans*の歯周病の発症と進行に果たす役割は明確になってきている。しかし、本菌の歯周組織への定着機構はほとんどわかっていない。これは、本菌の定着に大きな役割を果たす線毛の発現機構が不明であることに依拠する。

最近、*A. actinomycetemcomitans*の線毛構成主要タンパクFLPの遺伝子がクローニングされ、その下流の線毛関連遺伝子群を含めて、線毛の分子レベルでの解析が始まっているところである。本研究は、*A. actinomycetemcomitans*の線毛のFLPタンパク質をコードする*flp*遺伝子の発現に焦点を当て、線毛発現株と非発現株において、①その遺伝子のプロモーター領域を含めた塩基配列ならびに②転写様態を比較すること、さらに③*flp*とその下流に続く線毛遺伝子群の転写単位を調べることを目的とした。

## 材料及び方法

菌株および培養条件：*A. actinomycetemcomitans*の線毛発現株として304-a株を、またこの菌株を継代培養して線毛を発現しなくなった304-b株を用いた。*A. actinomycetemcomitans*は、tryptic soy broth (0.4% NaHCO<sub>3</sub>含有)を用い、好気条件下37℃で静置培養した。遺伝子クローニング用のホストとしては、*Escherichia coli* XL-1 Blue株、あるいはTOP10F'株を用いた。

304-b株の*flp*領域の塩基配列の決定：304-bは一夜培養の後、染色体DNAを抽出、精製した。304-a株の塩基配列から*flp*とその予想プロモーター領域を含む遺伝子断片を増幅できるプライマーを設計し、304-b株染色体DNAをテンプレートとして用いPCRを行い、ダイレクトシーケンシングによって*flp*の塩基配列を決定した。

*flp*転写産物の解析：304-a株と304-b株の全RNAを抽出し、以下の実験に用いた。*flp*をプローブとしてノーザンハイブリダイゼーションを行い、*flp*遺伝子の転写の有無、転写産物の長さを調べた。さらに*flp*の転写開始点、転写終結点については、プライマーエクステンションおよびリボヌクレ-

スプロテクションアッセイによって解析した。ノーザンハイブリダイゼーションとribonuclease protection assayにはdigoxigenin標識したRNAプローブを用い、プライマーエクステンションにはbiotin標識したプライマーを用いて、それぞれ常法に従った。

## 結果および考察

### 1) *flp*構造遺伝子およびプロモーターの塩基配列の比較

304-b株染色体DNAから約820 bpの*flp*遺伝子を含む断片を増幅できた。このDNA断片をダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定できた671 bpの塩基配列をDNA Data Bank of Japanに登録した (Accession No. AB071176)。すでに塩基配列を決定している304-a株と比較したところ、両者の塩基配列は今回調べた*flp*とその前後を含む671 bp領域で完全に一致していた。両株の線毛発現の違いにおいて、*flp*構造遺伝子とそのプロモーター領域の塩基配列には変異が存在しないことが明らかになった。

### 2) *flp*転写産物の解析

#### i) *flp*転写産物の検出

ノーザンハイブリダイゼーションの結果、*flp*の転写産物は304-a株でのみ検出し、304-b株では検出できなかった。304-a株では約400 baseの長さのバンドが強く検出され、約1500 baseと2000 baseの長さのバンドが弱いながらも検出された

#### ii) 転写開始点の決定

プライマーエクステンションの結果から、304-a株の*flp*転写開始点が、開始コドンから102 bp上流のグアニン塩基であると決定した。転写開始点の上流に、大腸菌の $\sigma 70$ と $\sigma 54$ がそれぞれ認識するプロモーター配列が存在していた。304-b株では、プライマーエクステンションでもバンドが検出されず、mRNAへの転写開始をしておらず、転写開始の時点で線毛発現の制御を受けている可能性が示唆された

#### iii) 転写終結点の決定

*flp*の開始コドンから下流に499 baseの長さを持つプローブを用い、リボヌクレースプロテクションアッセイを行った結果、304-a株では約300 baseと500 baseの2つの長さのバンドが検出された。すなわち*flp*の転写産物には少なくとも2つの転写終結点が存在することが明らかになった。300 baseのバンドは開始コドンから約300 bpの部分に存在するステムループ配列で転写が終結するものが存在することを示唆している。500 baseのバンドは、用いたプローブの範囲を全てカバーする転写産物が存在することを示している。ノーザンハイブリダイゼーションでの結果をあわせて考えると、*flp*の転写産物には、下流に存在するステムループ配列で転写が終結する*flp*遺伝子のみをコードしているモノシストロニックなもの、更に下流に存在する*orfA*まで転写しているポリシストロニックのものが存在することが判明した。*flp*と*orfA*の間に存在するステムループ配列は、同じプロモーターで制御される線毛遺伝子群の発現を、線毛構築において至適なタンパク分子構成比に保つための転写減衰因子として機能している可能性が考えられた。

## 結論

線毛発現株と非発現株について*flp*の遺伝子構造と転写レベルで比較し、線毛発現の違いは*flp*遺伝子のmRNAの蓄積量に由来することを明らかにした。

また、*flp*の下流のステムループ配列が転写減衰因子として働き、オペロンとなっている*flp*遺伝子とその下流の遺伝子の転写量を変えている可能性が示唆された。

## 論文審査結果の要旨

歯周病原性細菌 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* の線毛は、本菌の歯周組織への定着に関わる非常に重要な病原因子である。申請者らの線毛構成主要タンパク FLP の遺伝子のクローニングは、線毛の分子レベル発現調節の解析を可能とした。本研究は、このクローニングした *flp* 遺伝子の発現に焦点を当て、線毛発現株と非発現株において、①その遺伝子のプロモーター領域を含めた塩基配列ならびに②転写様態を比較すること、さらに③ *flp* とその下流に続く線毛遺伝子群の転写単位を調べることを目的に設定された。

結果として、①両株の間で塩基配列は *flp* とその前後を含む 671 bp 領域で完全に一致しており変異が存在しないこと、②線毛発現株にのみ *flp* の転写産物の蓄積があること、③発現株での転写開始点を同定し、*flp* 単独で転写されるモノシストロニックな転写産物と下流の遺伝子とともに転写されるポリシストロニックな転写産物が存在する、ことを明らかにした。

転写開始点の上流に RNA ポリメラーゼの $\sigma$ 因子コンセンサス配列 (*Escherichia coli* の $\sigma^{70}$ ,  $\sigma^{54}$ ) が存在することから、栄養状態などの環境因子が *flp* の転写開始をコントロールしている可能性を示唆した。このことは、*A. actinomycetemcomitans* の線毛の発現を人為的にコントロールして本菌の除去をよりたやすく達成できる治療方法の開発につながる可能性があり、臨床的に応用できるものと評価される。

以上より、本申請論文は学位論文としての価値を有すると認めた。