

指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
印	研究結果の評価
印	論文の総括指導
印	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野 矯正歯科学	身分 大学院生	氏名 加野 小奈美
論文題名 <i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277株 RpoN 低度産生株の性状解析		
論文内容の要旨 (2000 字程度)		
<p>【緒言】</p> <p>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 <i>Porphyromonas gingivalis</i> (<i>P. g.</i>) 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因子が他菌種のホモログと異なる機能を持つことが予測される。<i>P. g.</i>における RpoN の機能に関する報告はなく, 本研究では, <i>P. g.</i>の RpoN の機能を明らかにすることを目的とし, <i>P. g.</i>の RpoN 変異株を作製し, その解析を行うことを試みた。</p> <p>【材料・方法】</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. RpoN 欠損株作製 RpoN 欠損株の作製は, <i>P. g.</i> ATCC 33277 株 (33277 株) を親株とし, 相同組換え法により行った。<i>P. g.</i>への遺伝子導入は電気穿孔法によった。 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, <i>rpoN</i> を <i>P. g.</i>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 <i>rpoN</i> 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 <i>rpoN</i> をテトラサイクリン耐性遺伝子 <i>tetQ</i> 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 (<i>rpoN</i>-low) と RpoN 相補株 (<i>rpoN</i>-high) は, <i>P. g.</i>内での発現量の低い PGN_0160 プロモーターと <i>rpoN</i> 読み枠 (ORF) の融合遺伝子, あるいは <i>rpoN</i> を支配している PGN_1203 プロモーターと <i>rpoN</i> 読み枠 (ORF) の融合遺伝子を, それぞれ <i>P. g.</i>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 <i>rpoN</i> はエリスロマイシン耐性遺伝子 <i>ermF</i> を挿入することで破壊した。 6. 定量 PCR 法 (RT-PCR) <i>P. g.</i>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, <i>rpoN</i> の発現量を調べた。なお, <i>gyrA</i> 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。