トランスポゾンの *Porphyromonas gingivalis* への応用

林 潤一郎¹・野 口 俊 英¹・吉 村 文 信²

¹ 愛知学院大学歯学部歯科保存学第三講座, ² 愛知学院大学歯学部微生物学講座
〒464-8650 名古屋市千種区楠元町1-100

〔受理：1998年10月30日〕

はじめに

歯周炎は、歯科領域でう蝕と並ぶ二大疾患の一つであり、歯を支持している歯周組織に炎症が生じ、歯槽骨の吸収を起こす疾患である。歯周炎は病状の違いにより、いくつかのタイプに分類することができる。そのうち、最も罹患率が高いのは成人性歯周炎である。これは一般に35歳以上の成人に多く、慢性的に進行するが時に急性に転化し、静止期と活動期を繰り返しながら歯周組織の破壊をもたらす疾患である。

黒色色素産生性の偏性嫌気性桿菌である *Porphyromonas gingivalis* は成人性歯周炎の発症と進行に密接に関わっている細菌として、口腔微生物の分野で注目を集めている。本誌にも1993年から3編の論文・微生物学の進歩として扱われている。*P. gingivalis* は歯周病原性因子と思われる様々な因子を持っている。*P. gingivalis* の定着と生育に関与しているとされるのが、線毛や血球凝集素、共凝集因子などである。これらの因子により、他の菌種と共に歯周炎患者にみられるような歯周細菌叢を形成し、嫌気的で各菌の栄養要求性を満たすような環境を歯周局所に作り出している。

また、*P. gingivalis* はトリプシン様プロテアーゼやコラゲナーゼ等、多彩なプロテアーゼを産生する。他の菌体成分等も含め、これらの物質による直接的な組織破壊が歯周炎の進行に重大な影響を与えている。さらに、これらの因子やLPSが歯周組織に作用することで、組織由来のプロテアーゼを活性化したり、免疫担当細胞を刺激し多くの炎症性メディエーターを分泌させたりして、宿主応答による歯周組織の破壊も惹起していると思われる。

しかし、*P. gingivalis* の持つこれらの病原性因子の多くは、生体に対する影響が *in vivo* でははっきりとは確かめられていない。その理由として、歯周炎が複雑な混合感染の結果引き起こされるものであること、適切な歯周疾患モデルによる動物実験系が確立されていないこと等が挙げられる。また、それぞれの病原性因子に対して、自然変異によって生じた変異株を分離してくることも困難であった。これらの様々な要因すべてが *P. gingivalis* の病原性を明らかにする上で問題となっている。*P. gingivalis* が無芽胞の偏性嫌気性で増殖の遅いことも、病原因子の遺伝学的な研究が他の病原性細菌に比べ進みにくい原因の一つである。

そういった問題点を解決していく上で、トランスポゾンの応用は有効な方法の一つである。トランスポゾンがランダムに染色体DNA中に挿入されるかぎり、ある形質に着目しスクリーニングすれば、その形質に関わる様々な遺伝領域に障害を

Jun-ichiro HAYASHI¹, Toshihide NOGUCHI¹ and Fuminobu YOSHIMURA²

The Application of a Transposon, Tn4351, to an Oral Anaerobe, *Porphyromonas gingivalis*
Departments of ¹Periodontology and ²Microbiology, School of Dentistry, Aichi-Gakuin University, Nagoya 464-8650

持つ変異株を分離することができる。近年になって、トランスポゾンに *P. gingivalis* へ導入することが可能となり、それを用いた変異株を分離して、菌の性状分析を行ったという報告が見られはじめた。そこで、*P. gingivalis* に応用されるトランスポゾンと、それを用いた研究の現状についてまとめてみた。

1. *P. gingivalis* に応用できるトランスポゾン

P. gingivalis に応用されるトランスポゾンは *Bacteroides fragilis* で見つかった Tn4351 (9) である。Tn4351 の研究はクリンダマイシン、エリスロマイシンの耐性がヒトを宿主とする *Bacteroides* 間で、接合により伝達されることから始まった。3種類の接合プラスミドがこの薬剤耐性の伝達に関係があり、そのうちの一つである pBF4 の耐性は 3.8kbp の *EcoRI* 断片に存在するとされていた。この断片をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションなどの実験の結果、この断片を含むある特定の断片がこの薬剤耐性に関与することが判明し、その断片はトランスポゾンではないかと考えられ始めた。

Shoemaker らはこの点に注目して、pBF4 の一部を含むプラスミドを作製し実験を行った (9)。これらのプラスミドは接合により単独で、あるいは R751 (*E. coli* の IncP プラスミド) と共に、*E. coli* 間でまたは *E. coli* から *B. uniformis*

へ移動した。その際、いくつかの株においては pBF4 由来の断片が R751 や *E. coli* 染色体中に挿入されるような現象が見られた。挿入される部位はまちまちであったが、この断片の大きさは常に一定で pBF4 のエリスロマイシン、クリンダマイシン耐性を持つ 3.8kbp 断片を含んでいた。このことからこの断片はトランスポゾンであるとされ、Tn4351 と名付けられた。

その後彼らは、Tn4351 の挿入した R751 (R751::Tn4351) や pSS-2 を用いて *E. coli* と *B. uniformis* の接合を行い、染色体中に Tn4351 を挿入した株を分離している (10)。

Tn4351 は図1に示すような構造をとっている。全長は約 5kbp で、両端のアームと中央領域からなる。両端のアームは 1.1kbp の IS4351_L と IS4351_R で、同一方向を向いている。両者はほとんど同一の塩基配列を示し、それぞれの両端には 25bp の逆方向繰り返し配列がみられる。中央領域には 2つの薬剤耐性遺伝子が存在している。一つは *Tc^r と表記される遺伝子で好氣的条件下で生育した *E. coli* にてテトラサイクリン耐性を示す。もう一つは *ermF* と記される遺伝子で、*Bacteroides* 中でエリスロマイシンおよびクリンダマイシンに対する耐性を示す。この *ermF* の発現は IS4351_R 内のプロモーター配列によって調整されていることが知られている。両方の IS が Tn4351 の転位に作用しているのかどうかは、ま

図1. Tn4351 の構造。Tn4351 は同方向を向いた、IS4351_L 及び IS4351_R からなるアーム部分と、テトラサイクリン耐性遺伝子 (*Tc^r)、エリスロマイシン・クリンダマイシン耐性遺伝子 (*ermF*) の2つの遺伝子を含む中央領域からなる。それぞれの IS の両端には 25bp の逆方向繰り返し配列が存在している。

だ明らかになっていないが、両者の塩基配列が酷似していることから、ほぼ同じ機能を有していると考えられる (8, 9)。

2. Hoover らの先駆的研究

Tn4351 の *P. gingivalis* への応用は Hoover ら (5), Dyer ら (2) によって報告された。Hoover らは *P. gingivalis* ヘトランスポゾンに応用するにあたって、*Bacteroides* で用いられた系を選んだ理由を次のように述べている。第一に、*P. gingivalis* は、*E. coli* に対してよりも *Bacteroides* に対して分類学的に高い近縁性を示す。第二に、*P. gingivalis* と *E. coli* の RNA ポリメラーゼはそれぞれ異なったサブユニット構造を示し、DNA テンプレート特異性も異なる。第三に、*E. coli* 中でも *Bacteroides* 中でも機能する抗生物質耐性遺伝子が他に知られていない。周知のごとく、かつて *P. gingivalis* が *Bacteroides* に分類されていたことを考えると、Tn4351 が *P. gingivalis* へ応用されたのは必然的であったといえる。二つの報告

とも、Tn4351 の供給源となるプラスミドとして R751::*Ω4 を使用している。R751::*Ω4 には Tn4351 が図 2 のように中心に IS 部分を共有した形で部分的に重複して存在している。Shoemaker ら (10) によると、多くの R751::Tn4351 の中で、R751::*Ω4 を用いて接合を行った場合、*B. uniformis* へ Tn4351 の転位する割合が最も高い。R751::*Ω4 を含めた R751::Tn4351 は *Bacteroides* 中では自己複製できないため、自殺ベクターとして機能し、得られたエリスロマイシン耐性接合体は染色体中に Tn4351 や R751 が組み込まれている。

以下に Hoover ら (5) の方法を簡単に述べる。供与体となる *E. coli* は HB101 で R751::*Ω4 を含んでいる。一方、受容体となる *P. gingivalis* は ATCC33277 株を使用している。この 2 種菌体をほぼ等量 ($10^9 \sim 10^{10}$ cells) 一つのマイクロチューブに集め、sTSB (イースト・エキストラクト、ヘミン、メナジオン、ジチオスレイトールを加えた Trypticase Soy Broth) 200 μ l にて懸濁し、こ

図 2. R751::*Ω4 の構造。IS の部分が重複した 2 重の Tn4351 が R751 上に挿入されている。

れを血液平板の中央に滴下する。2～4時間 37℃ で好氣的に接合させた後、嫌氣下に移し 36～48時間培養する。それを綿棒にてかきとり再び 1 ml の sTSB に懸濁して 20 µg/ml エリスロマイシン、100 µg/ml ゲンタマイシン添加 (*P. gingivalis* はゲンタマイシンに自然耐性を持つ) の血液平板に拡げる。37℃ 嫌氣で 5～7 日間培養するとエリスロマイシン耐性の接合体が得られる。

Dyer ら (2) は接合を好氣的に行ったほうが、嫌氣的に行うよりも得られる接合体の数が多いと言う。彼らは *P. gingivalis* の株の違いによる転位の割合も調べている (表 1)。それによると 381 株で最も効率がよい。Hoover らは ATCC33277 株で $8.2 \times 10^{-7} \sim 9.8 \times 10^{-9}$ (平均 1.6×10^{-7}) という効率を得ており、直接比較はできないが、Dyer らの 381 株での結果とほぼ同程度の効率だと言える。接合の条件、方法などについて、さらに改良の余地がある。

Tn4351 が *P. gingivalis* の染色体中に挿入される場合、トランスポゾン単独の挿入である転位 (transposition) 以外に、R751 が同時に入り込む共挿入 (cointegration) と呼ばれる現象が見られる。*Bacteroides* と同様に *P. gingivalis* でも接合体の約半数に共挿入体が見られる。この現象はトランスポゾンによって変異株を作製する上での問題点である。複雑な変異は遺伝学的な解析を非常に難しくするからである。しかしながら、これらの多少の問題点はあるものの、*P. gingivalis* の遺伝学的な研究において、トランスポゾンの応用はかなり有効であると思われる。

表 1. Tn4351 の転位効率*

受容体株	接合時の条件	
	+O ₂	-O ₂
381	2.7×10^{-7}	1.3×10^{-8}
A7A1-28	2.0×10^{-9}	5.8×10^{-10}
RB22D-1	7.8×10^{-8}	1.3×10^{-9}
W50	3.6×10^{-8}	4.0×10^{-9}
9-14-K-1	6.4×10^{-9}	2.2×10^{-10}

Dyer ら (1992) より改変

*: 受容体株に対する接合体株の出現数から算出

3. Tn4351 による *P. gingivalis* 線毛欠損変異株の作製

1) *P. gingivalis* 線毛と歯周炎

P. gingivalis が、どのような様式で歯周組織に定着し、破壊を起こすのかについては、多くの研究者が様々な試みにより検討を重ねているが、現在のところほとんど明らかになっていない。*P. gingivalis* の歯周局所への定着に関して、健康な歯周組織からは *P. gingivalis* がほとんど分離されないことから、*P. gingivalis* 定着の前段階として歯周環境の変化が必要であると考えられる。細菌叢変化に伴う各菌種間の相互作用や嫌氣的環境の確立といった因子が *P. gingivalis* 定着とそれによる歯周組織の破壊を促進させるのであろう。こういった、*P. gingivalis* の歯周組織への付着、定着を担う因子として様々な菌体構造物が研究の対象となっている。*P. gingivalis* は菌体表面にユニークな線毛を有している。多くの病原性細菌にとって線毛が付着過程を担う重要な構造物であることから、*P. gingivalis* においてもその線毛はおのずと付着因子としての役割が注目されるようになった。線毛に対するモノクローナル抗体が *P. gingivalis* の細胞への付着を阻害するとの報告や、線毛がコラーゲンビーズや唾液で被覆したハイドロキシアパタイトビーズ、あるいは上皮細胞への付着を示したと報告され、その重要性が強く示唆されている。現在、線毛と細胞間の付着の機構が種々の角度から調べられているが、同時に線毛の付着を受けた細胞が炎症に対して引き起こす作用についても検討が加えられている。すなわち、線毛が組織中の細胞に結合することによって、細胞から何らかの炎症性サイトカインが放出され、それによる免疫応答が歯周疾患の進行を促進する一因となっているのではないかという議論である。これまでに、線毛により IL-1 や IL-6, TNF-α などのサイトカインの放出が増加すると報告されている。また、線毛は強い抗原性を示すことも知られている。線毛抗原は極めて種特異性が強く、グループ I, グループ II と、少なくとも 2 種類の血清型が存在すると考えられている。この強い抗原性をもとに、*P. gingivalis* に対するワクチンとして線毛を利用しようとする試みもなされてい

る。

このように *P. gingivalis* 線毛は宿主細胞への *P. gingivalis* の付着に重要な役割を果たすだけでなく、宿主の免疫系に作用し、防御機構の成立に関与する一方で、炎症の進行過程を促進するといった側面を持つのかもしれない。こう考えると、*P. gingivalis* 線毛は慢性的な進展をみせる歯周疾患の消長に関わる重要な因子とすることに異論はない。

2) 線毛の構造とその遺伝子

P. gingivalis の線毛は長さ 0.3~1.6 μm 、直径約 5 nm の一本鎖の繊維状構造物である。ねじれた構造をしており菌体表面全体にわたり多数存在している。線毛の主要構成成分はフィンブリリン (fimbriin) と呼ばれ、電気泳動にて分子量 43kDa、等電点 6.0 を示す蛋白質である。フィンブリリンをコードしている遺伝子 *fimA* は既にクローニングされ (1)、いくつかの株で塩基配列が決定されている。また、381株については *fimA* を中心とした約 10kbp の領域がクローニングされ、*fimA* の両側にいくつかの ORF (open reading frame) が存在していることが判明している (図3)。

線毛はその形態形成を考えると、フィンブリリンのみで構成されているとは考えられず、これ以外の成分が形態形成に関与することは想像に難く

ない。*E. coli* の P 線毛に代表されるように、他の線毛を有する菌の多くが線毛の形態形成に複数の遺伝子を必要としている。このことから *fimA* の周囲に存在する ORF が *P. gingivalis* 線毛に関与した成分をコードしていることは十分に考えられることである。事実、*fimA* 下流の2つの ORF (ORF2, ORF3) から発現ベクター系を用いて得られた産物は、イムノブロットにて精製線毛の微量成分であることが確認されている (12)。図中の ORF5, ORF1, ORF4 に関しては塩基配列が決定され、発現ベクター系を用いて蛋白質の合成がなされているが (11)、現在のところ線毛との関係は明らかになっていない。

これらの ORF に関しては、相同組み換えによる遺伝子欠損株を用いて線毛の形態形成の変化を観察することは可能で、いずれ結果が明らかになるであろう。しかし、*E. coli* の P 線毛が11個の遺伝子から構成されるように、これら5つの ORF 以外にも *P. gingivalis* 線毛の形成に関与する遺伝子が存在するという可能性は極めて高い。そこで我々は、既にクローニングされている 10kbp の領域以外の部位に線毛の形成に必要な遺伝子を探索するため、また *fimA* の周囲の ORF が線毛の形成に関与するかどうか調べるために、トランスポゾンを用いて線毛欠損変異株を分離し、検討を行った (7)。その内容につい

図3. *fimA* を中心とした線毛関連領域。10.4kbp のクローニングされた領域に *fimA* とその他5つの ORF が存在している。() 内はそれぞれの遺伝子産物を示す。そのうち ORF2, ORF3 がコードしている 50K, 80K は線毛の微量成分であることが確認されている。63K, 15K, 19K に関しては線毛との関係が明らかになっていない。

て以下に紹介する。

3) 線毛欠損変異株の分離と解析

トランスポゾンの導入は Hoover らの方法に従って行った。Tn4351 には前述したように抗生物質耐性遺伝子が存在するので、Tn4351 の転位した Tn 変異株はエリスロマイシン添加の血液平板にて容易に分離できる。約40回の接合実験を行った結果、得られた Tn 変異株は約15,000株であった。この中から線毛の形成が不完全な株を選択するためにコロニーイムノブロットを行った。まず、エリスロマイシン及びゲンタマイシンを添加した血液平板（ヘミン、メナジオン、DTT を含む）に Tn 変異株を爪楊枝でパッチする。一つのプレートに150～200株程度パッチすることができる。これを数日間 37°C にて嫌気培養し、パッチに沿ってコロニーが形成されるのを待つ。コロニーが成長したらニトロセルロースメンブレンにてコロニーリフトを行い、BSA を溶かした TBS バッファー中で過剰の菌体をおとす。つづけて、新たな同液にてブロッキングを行う。次に一次抗体を反応させるが、これには精製線毛に対するウ

サギ抗血清を用いた。6時間程度の反応の後、メンブレンを洗い、二次抗体と反応させる。二次抗体にはペルオキシダーゼの結合したヤギ抗ウサギ IgG 抗体を用いた。発色は4-クロロ-1-ナフトールと過酸化水素水にて行った。図4に示したように、発色しなかった株を線毛欠損変異株として選択した。最上段はコントロールで、プラスが線毛の存在が確認されている Tn 変異株、マイナスが相同組み換えにて *fimA* をノックアウトして作製した線毛欠損株（九州大学歯学部口腔細菌学教室 中山浩次先生より供与）である。最終的に、このように選択した株の全菌体を SDS-PAGE にかけて、イムノブロットによって線毛構成蛋白質の欠損を確認した。この検討には抗体にウサギ抗フィンブリリン血清を用いた。

次に、得られた線毛欠損変異株から DNA を抽出し、トランスポゾンの挿入形式（転位か共挿入か）について調べた。まず、染色体 DNA を *AvaI* で消化し、Tn4351 をプローブとしてサザンブロットを行った。転位を示す株の場合、3.8kbp の内部領域と両脇の染色体 DNA につな

図4. コロニーイムノブロットによる線毛欠損株のスクリーニング (7)。抗線毛ウサギ血清を使用。最上段の▲はコントロール。+: 線毛を有する Tn 変異株 (エリスロマイシン耐性) - : *fimA* 変異株 KPD98。中段に▲で示した様に発色していない株を線毛欠損株として選択した。

Transposition (転位)

Cointegration (共挿入)

図5. Tn4351 の挿入形式の分析。変異株の染色体 DNA を *AvaI* で消化し, Tn4351 特異プローブにてサザンブロットを行うと, 通常は転位 (transposition) の場合は 3 本のバンドが, 共挿入 (cointegration) の場合は 5 本のバンドが確認される。↓は *AvaI* による消化部位を示す。

がる二つの接続領域を表す 3 本のバンドが見られ, 共挿入を示す株の場合, 転位で見られるバンドに加え, R751 につながる二つの内部接続領域を表すバンドが見られる。この様な識別方法にて得られた株を分類したところ, 接続領域を示すバンドのサイズ等から姉妹細胞 (siblings) と思われる株を除いて, 10 株が転位, 12 株が共挿入と判定された。この結果は転位, 共挿入の比がおおよそ一対一になるという Shoemaker らの報告とも一致している。

続いて, この 22 株について, トランスポゾンの挿入領域を調べた。*PstI* で染色体 DNA を消化し, *fimA* 全体を含む 2.5kbp *SacI* 断片をプローブとしたサザンブロットを行ったところ, *fimA* を中心とした 10kbp *PstI* 領域に挿入の見られた株が 9 株, その領域に変化がなかった株が 13 株であるという結果が得られた。10kbp *PstI* 領域に挿入の見られた株が 9 株について, どの ORF がノックアウトされているのか興味あるところであったが, *SacI* で DNA を消化して同様のサザンブロットを行ったところ, 全ての株が *fimA* を含む 2.5kbp *SacI* 断片のサイズに変化を示した。つ

まり, この 9 株は全てこの 2.5kbp *SacI* 断片中に変異を生じていたのである。さらに領域を限定するため, この断片を *fimA* 上流, *fimA*, *fimA* 下流に分け, それぞれの PCR による増幅を試みた。その結果, この 9 株はどれも *fimA* がノックアウトされた線毛欠損株である事が判明した。トランスポゾンがランダムに転位すると仮定すると, この 10kbp *PstI* 領域内の *fimA* 以外の ORF に転位が生じた株も出現していると思われるが, 今回のスクリーニング方法では線毛欠損株として単離されてこないと推定できる。つまり, これらの ORF は線毛の形態形成に必須な因子ではない可能性もあり, この点については, さらに検討が必要である。

10kbp *PstI* 領域に変化がなかった 13 株は, この領域以外の部位の変異による線毛欠損株であると思われ, こういった株が得られたということは, トランスポゾンを用いるという方法ならではの結果である。このことから 10kbp 領域以外にも線毛形成に強く関係する遺伝領域が存在する可能性が示唆される。

NotI で消化した親株の染色体 DNA をパルス

フィールドゲル電気泳動にかけたとき、*fimA* は最も大きいサイズ (780kbp) のバンドに含まれる。さらに *fimA* は、この *NotI* 断片の一端から約 200kbp、あるいはもう一端から約 550kbp 内側に入ったところに位置していることが判明した。10kbp 領域に変化がなかった13株はいずれも、この 780kbp 断片とは異なる断片に Tn4351 の転位がみられた。従って、これらの株で転位が生じた部位は、少なくとも *fimA* から 200kbp は離れた領域であると推定される。

この13株の内、トランスポゾン単体の転位を示した9株について、Tn4351 をプローブとしてサザンブロットを行った。消化する制限酵素を数種変えて行ったところ、9株中の4株はそれぞれ同じサイズのバンドに反応した。すなわち、この4株は、ある限られた領域にトランスポゾンの転位が生じていると思われる。現在この領域のクローニングを進めている。この領域にどんな遺伝子が存在するのか、まだ全く不明である。例えば、線毛の根元の構造に関係した蛋白質の遺伝子であるのか、あるいは線毛形成を調節するような遺伝子であるのか、いずれにせよ、この領域が線毛形成に重要な働きを持っていると思われる。

4. Tn4351 による *P. gingivalis* 変異株に関する報告

これまでに、トランスポゾンを使って *P. gingivalis* の変異株を分離し性状分析を行った研究がいくつか報告されているので、それぞれ簡単に紹介する。Tn4351 を *P. gingivalis* に導入すると、まれに黒色のコロニーを形成しない変異株が血液平板上に観察されることがある。これまでに報告されている研究はいずれもこのような黒色素非産生株についてのものである。

最初の報告は Hoover らによるものである (6)。彼らは分離した非黒色株について性状分析を行った。*P. gingivalis* の病原因子の一つに挙げられているトリプシン様プロテアーゼの活性を調べたところ、親株 (ATCC33277) の 8.5~27% にまで低下していた。また血球凝集活性についても分析すると、親株の $0 \sim 10^{-6}$ の活性しか示していなかった。

SDS-PAGE にて膜画分の抽出物について蛋白

質パターンを比較したところ、親株でみられた 54kDa、50kDa のバンドが消失していた。イムノブロットによる結果から、54kDa 蛋白については Pike らが報告した 44kDa の血球凝集素で、50kDa 蛋白に関しては西方らの報告する 44kDa の血球凝集素/プロテアーゼ (HA/P) ではないかとしている。

彼らは、1つの Tn4351 の転位が、色素の産生あるいは蓄積、トリプシン様プロテアーゼ活性、血球凝集活性の低下を同時に引き起こしたことから、これらの性状が遺伝学的、生理学的に互いに密接に関連しているであろうと結論づけている。

Genco らは、Tn4351 を *P. gingivalis* A7436 に導入してベージュ色のコロニーを分離し、性状分析を行っている (3)。変異株 MSM-1 を電子顕微鏡にて観察したところ、染色された多糖体層が親株の2倍に肥厚していた。また親水性については、MSM-1 のほうが親株よりも少し高い値を示した。次に、親株と MSM-1 から多糖体成分を粗抽出し、親株、MSM-1 それぞれの全菌体に対する抗血清を用いてイムノブロットを行ったところ、MSM-1 では親株でみられる 180kDa 以上の高分子の陰イオン性多糖成分と思われるバンドが消失していた。ヒトの多形核白血球 (PMN) のこの株に対する貪食作用と殺菌について調べた結果、MSM-1 は親株より高い抵抗性を示した。

これらの実験結果より彼女らは、Tn4351 の転位により多糖体を含む抗原が産生されにくくなったため、親水性の O 抗原を含む LPS の産生が増強され、その結果 PMN による貪食作用や殺菌に対する抵抗性を高めたのであろうと考察している。

彼女らはまた、同様にして得た白色コロニー (MSM-3) のヘミン利用能や輸送能についても分析を行っている (4)。MSM-3 は鉄の供給源としてヘミンのみを培地に添加したときには増殖が遅く、ヘミンの結合量や取り込み量も共に親株よりも低い値を示した。

この株を電子顕微鏡にて観察したところ膜小胞の過剰生産がみとめられた。また MSM-3 から分離した細胞外小胞は、親株から分離したものに比べ、溶血性やトリプシン様プロテアーゼ活性が上

昇していた。さらに、この株をマウス皮下に接種すると、親株よりも高い感染性、侵入性を示した。彼女らはこれらの結果から、ヘミンによって発現が制御される病原因子がいくつか存在し、この株に見られるようなヘミン輸送能の低下が菌体内のヘミンの含有量を減少させると、いくつかの病原因子の発現が増加するのであろうと考察している。

お わ り に

Tn4351 を *P. gingivalis* に導入するに際して、いくつかの問題点があるのも事実である。一つは前述した共挿入体の出現である。染色体 DNA 中に大きな R751 (51kbp) が挿入されるとその周辺の遺伝子の解析が困難になるためである。もう一つは IS による極性効果である。IS4351 内のプロモーター配列により Tn4351 のエリスロマイシン耐性遺伝子が発現するように、IS4351 内部にはいくつかのプロモーターが存在している。そのうち、外側に向いたプロモーター配列がその下流の遺伝子の発現を促すことは十分考えられることである。そのため、トランスポゾンや IS による変異は、それらが転位した遺伝子のノックアウトによるものだけでなく、そういった極性の影響も含めて考えなければならない。また、R751 が共挿入した場合にも、同様な効果を引き起こす可能性が考えられる。したがって、トランスポゾンを導入して得られた変異株は、再度親株の同一領域に構造のよく知られた小さな薬剤カセット等を導入して、同様な変異が見られるかどうかを最終的に確認する必要がある。

これらの問題点は多かれ少なかれトランスポゾンに共通に存在し、Tn4351 と *P. gingivalis* の系に限られた事ではない。問題点を考慮しつつ、Tn4351 を導入することによって多様な変異株を得ることは、*P. gingivalis* の性質を研究する上で、大変有用である。現時点では Tn4351 を用いた報告は少なく、いずれもコロニー性状で分離してきた変異株の性質を調べるといった比較的単純な方法によるものである。我々はスクリーニング方法を工夫し、線毛を欠損した変異株を意図的に分離した。系統的に Tn4351 誘導 *P. gingivalis* 変異株を単離・解析した初めての研究である。

アメリカの TIGR (The Institute for Genomic Research) は数十種類の病原性細菌の全塩基配列を解明するプロジェクトを進めている。この中には *P. gingivalis* も含まれており、数年以内にも *P. gingivalis* の全塩基配列が明らかにされると予想されている。その結果、今までの例から考えて、多数の機能未知の ORF が明らかにされる事になろう。もちろん、これまで蓄積されてきた各生物種の遺伝子との相同性から、その機能が類推される ORF もかなりにのぼるであろう。このようなゲノム研究の世界的潮流からも、Tn4351 を導入し、特定の形質に着目して変異株を分離・解析することは、機能未知の遺伝子を解明する上で、極めて重要な試みの一つになるであろう。*P. gingivalis* の遺伝学的な研究が新しい局面を迎えようとしている今、トランスポゾンの有用性は今後ますます高まっていくと考えている。

文 献

- 1) Dickinson, D.P., Kubiniec, M.A., Yoshimura, F., Genco, R.J. (1988): Molecular cloning and sequencing of the gene encoding the fimbrial subunit protein of *Bacteroides gingivalis*. J. Bacteriol. **173**, 1658-1665.
- 2) Dyer, D.W., Bilalis, G., Michel, J.H., Malek, R. (1992): Conjugal transfer of plasmid and transposon DNA from *Escherichia coli* into *Porphyromonas gingivalis*. Biochem. Biophys. Res. Commun. **186**, 1012-1019.
- 3) Genco, C.A., Schifferle, R.E., Njoroge, T., Forng, R.Y., Cutler, C.W. (1995): Resistance of a Tn4351-generated polysaccharide mutant of *Porphyromonas gingivalis* to polymorphonuclear leukocyte killing. Infect. Immun. **63**, 393-401.
- 4) Genco, C.A., Simpson, W., Forng, R.Y., Egal, M., Odusanya, B.M. (1995): Characterization of a Tn4351-generated hemin uptake mutant of *Porphyromonas gingivalis*: evidence for the coordinate regulation of virulence factors by hemin. Infect. Immun. **63**, 2459-2466.
- 5) Hoover, C.I., Abarbarchuk, E., Ng, C.Y., Felton, J.R. (1992): Transposition of Tn4351 in *Porphyromonas gingivalis*. Plasmid **27**, 246-250.
- 6) Hoover, C.I., Yoshimura, F. (1994): Transposon-induced pigment-deficient mutants of *Porphyromonas gingivalis*. FEMS Microbiol. Lett. **124**, 43-48.

- 7) Kato-Watanabe, T., Hayashi, J., Terazawa, Y., Hibi, E., Kawakami, N., Ikeda, T., Hoover, C.I., Nakayama, K., Nakamura, H., Noguchi, T., Yoshimura, F. (1998): Isolation and characterization of transposon-induced mutants of *Porphyromonas gingivalis* deficient in fimbriation. *Microbial Pathogen*. **24**, 25–35.
- 8) Rasmussen, J., Odelson, D.A., Macrina, F.L. (1987): Complete nucleotide sequence of insertion element IS4351 from *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.* **169**, 3573–3580.
- 9) Shoemaker, N.B., Guthrie, E.P., Salyers, A.A., Gardner, J.F. (1985): Evidence that the clindamycin-erythromycin resistance gene of *Bacteroides* plasmid pBF4 is on a transposable element. *J. Bacteriol.* **162**, 626–632.
- 10) Shoemaker, N.B., Getty, C., Gardner, J.F., Salyers, A.A. (1986): Tn4351 transposes in *Bacteroides* spp. and mediates the integration of plasmid R751 into *Bacteroides* chromosome. *J. Bacteriol.* **165**, 929–936.
- 11) Watanabe, K., Onoe, T., Ozeki, M., Simizu, Y., Sakayori, T., Nakamura, H., Yoshimura, F. (1996): Sequence and product analyses of the four genes downstream from the fimbriin gene (*fimA*) of the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *Microbiol. Immunol.* **40**, 725–734.
- 12) Yoshimura, F., Takahashi, Y., Hibi, E., Takasawa, T., Kato, H., Dickson, D.P. (1993): Proteins with molecular masses of 50 and 80 kilodaltons encoded by genes downstream from the fimbriin gene (*fimA*) are components associated with fimbriae in the oral anaerobe *Porphyromonas gingivalis*. *Infect. Immun.* **61**, 5181–5189.