

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19122

研究課題名(和文)ピロリ菌の病原性遺伝子塊に存在するsRNAの機能解明

研究課題名(英文)Functional elucidation of sRNA on the pathogenicity island of Helicobacter pylori.

研究代表者

氣駕 恒太郎 (Kiga, Kotaro)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：90738246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ピロリ菌の慢性感染は、胃炎、胃潰瘍、胃癌そしてMALTリンパ腫の発症に密接に関わっている。本研究を進めていくと、ピロリ菌は自身が保有するある小さなRNA(sRNA)を用いることで、酸化ストレスによる細胞障害を免れていることが明らかとなった。さらに本研究では、sRNA-X遺伝子の欠損ピロリ菌株を作製し、解析することで、sRNA-Xが酸化ストレス応答に重要な遺伝子であるチオレドキシン関連遺伝子の発現を安定化するという新規メカニズムを見つけた。sRNA-Xを欠損したピロリ菌は胃への定着能も著しく減少したことから、このような小さなRNAがピロリ菌感染による胃の疾患に関与していることも示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chronic infection of Helicobacter pylori is closely related to the onset of gastritis, gastric ulcer, gastric cancer and MALT lymphoma. In this study, we found that a small RNA (sRNA) contributes to resist cytotoxicity caused by oxidative stress in Helicobacter pylori. Furthermore, we revealed that the sRNA stabilizes the expression of thioredoxin-related genes, which is important for oxidative stress response, by analyzing the gene expression of sRNA-deficient strain of H. pylori. Since knockout strain of the sRNA remarkably decreased the ability of H. pylori to colonise to the stomach, it was suggested that the sRNA is involved in gastric disease caused by H. pylori infection.

研究分野：細菌学

キーワード：ピロリ菌 sRNA 酸化ストレス ノンコーディングRNA

1. 研究開始当初の背景

(1) ピロリ菌は胃に定着するグラム陰性の細菌で、世界の人口の実に半数が保有していることが知られる。本菌の慢性感染は、胃炎、胃潰瘍、胃癌そして MALT リンパ腫の誘導因子であることが多くの疫学・実験的成果から示されている。このため、本国での癌による死亡原因の第 2 位を占めている胃癌の克服には、ピロリ菌の感染機構を詳細に把握する必要がある。

(2) 2010 年に、ピロリ菌の第一次転写産物の網羅的な発現解析を行った研究が発表された (Sharma CM. et al., *Nature* 2010)。その結果、本菌には mRNA、rRNA、tRNA に加えて、多種多様な Bacterial small RNA (sRNA) も存在していることが明らかとなった。この報告までピロリ菌は、RNA による遺伝子発現制御等の高等なメカニズムを持ち合わせていないとさえ考えられていたため、それらの役割については全く研究されてこなかった。

(3) ピロリ菌の病原性遺伝子塊である cagPAI (cag pathogenicity island) は分泌装置とエフェクター病原タンパク質をコードし、これらの因子が宿主への定着や感染を可能とし、胃の疾患を引き起こしている。申請者の予備的研究から、ピロリ菌の cagPAI からは、これまで報告されていた病原性に関わるタンパク質の他にも、複数の Bacterial small RNA (sRNA) が作られていることが確認された。このため、ピロリ菌が持つ sRNA も本菌の病原性の発揮に重要な役割を果たしていることが推測された。

2. 研究の目的

ピロリ菌の病原因子は、胃の疾患に強く関わっている。ピロリ菌の病原性に関わる sRNA を同定し、その機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ピロリ菌が保有する小さな RNA の同定
ピロリ菌は、自身の持つ病原性遺伝子塊である cagPAI に分泌装置とエフェクター病原タンパク質をコードすることで、宿主への定着や感染を容易にし、胃の疾患を引き起こしている。申請者が、ピロリ菌の sRNA の発現をディープシーケンシングで網羅的に解析したところ、多数の sRNA が転写されていることが明らかになった。さらに、リアルタイム PCR とノーザンブロット、サンガーシーケンシングを用いてこれら sRNA の同定を行った。

(2) 候補 sRNA の欠損株の作製と標的探索

まず初めに、(1) で同定され、酸化ストレス下でも発現が維持されていたピロリ菌の sRNA (sRNA-X) の相同組換えを行い、sRNA-X 欠損株を作製した。細菌の sRNA の多くは、標的

mRNA に配列相補的に結合することで、標的遺伝子の発現制御を行っていることが確認されている。そのため、sRNA-X 欠損株と野生株の転写産物をディープシーケンサーにより発現比較解析し、sRNA-X の標的遺伝子候補を探索した。

(3) sRNA-X の標的遺伝子の同定

sRNA-X を欠損させたピロリ菌の実験から、チオレドキシソキシソ関連遺伝子が sRNA-X の標的遺伝子候補として挙がってきた。sRNA-X と mRNA の配列とをバイオインフォマティクスを用いて比較した。さらに、*in vitro* で合成した sRNA-X にチオレドキシソの mRNA が結合するか、MS-2 tag を用いたビーズによるプルダウン法により調べた。

(4) 候補 sRNA の機能解析 (*in vitro*, *in vivo*)

sRNA-X の標的遺伝子であるチオレドキシソは酸化還元能を保有することが知られている。そのため、sRNA-X はピロリ菌の酸化ストレスに対する防御に関与している可能性が示唆された。sRNA-X 欠損株に酸化ストレスを与え、その後の生菌数をカウントした。また、sRNA-X 欠損株をマウスに感染させ、3 週間後に胃内に存在するピロリ菌数をカウントした。

4. 研究成果

(1) ピロリ菌が保有する小さな RNA の同定
ピロリ菌 ATCC43504 株の sRNA の発現をディープシーケンシングで網羅的に解析した。その結果、約 100 種類の sRNA が確認できた。これらの中には新規 sRNA も含まれていた。さらに、発現量が比較的高く、ピロリ菌間で保存性の高い sRNA に関して、リアルタイム PCR を用いてその発現を確認した。これにより、ディープシーケンシングの再現性が取れ、ピロリ菌体内で実際に sRNA が発現していることがわかった。また、酸化ストレス下でも発現が維持されている sRNA (sRNA-X) を同定し、ノーザンブロット、サンガーシーケンシングを用いてさらなる確認を行った。

(2) 候補 sRNA の欠損株の作製と標的探索

まず初めに、sRNA-X 欠損株を作製した。その後、sRNA-X 欠損株と野生株の転写産物をディープシーケンサーにより発現比較解析し、sRNA-X の標的遺伝子候補を探索した (図 1)。sRNA-X 欠損株ではチオレドキシソ関連遺伝子の mRNA の発現が顕著に下がっていることが確認された。他にも幾つかの遺伝子の発現が変動していた。これらの遺伝子の配列を調べてみると、sRNA-X のループ領域に相補的な配列を保有するものが多かった。sRNA-X は標的遺伝子に配列相補的に結合することで標的遺伝子を制御していることがわかった。チオレドキシソの mRNA も例外ではなく、sRNA-X に認識されそうな配列を 5' 末端に保有していた。また、sRNA の標的が mRNA のみではなくタ

ンパク質にまで及んでいるかを確認するために、sRNA 欠損株の mass 解析を行った。タンパク質量が変動していた遺伝子は、基本的に mRNA 量も変動していた。すなわち、sRNA の有無により直接的に量が制御されるタンパク質はあまりないのではないかと考えられた。

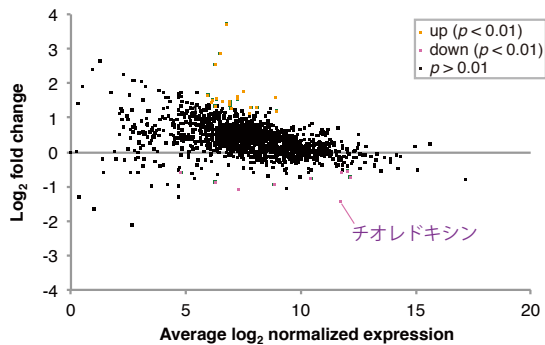


図1. sRNA-X 欠損株と野生株の転写量比較

(3) sRNA-X の標的遺伝子の同定
sRNA-X を欠損させたピロリ菌の実験から、チオレドキシシン関連遺伝子が sRNA-X の標的遺伝子候補として挙がってきた。チオレドキシシン関連遺伝子の mRNA の 5' 末端に予測された sRNA-X の標的サイトに、実際に sRNA-X が結合することをプルダウンアッセイにより確認した (図2)。さらに、この標的サイトに変異を入れたピロリ菌では sRNA-X によるチオレドキシシンの遺伝子制御が見られなくなった。また、sRNA-X の標的認識サイトに変異を導入した株においても sRNA-X によるチオレドキシシン制御がなくなった。これらの結果から、sRNA-X はチオレドキシシン mRNA の 5' 末端を標的とすることでチオレドキシシンの mRNA の安定化を行っていることが示唆された。

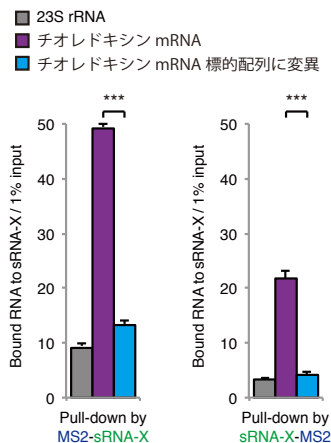


図2. sRNA-X 欠損株と野生株の転写量比較

(4) 候補 sRNA の機能解析 (*in vitro*, *in vivo*)

チオレドキシシンは抗酸化活性を持つ。そのため、sRNA-X はピロリ菌の酸化ストレスに対する防御に関与している可能性が示唆された。sRNA-X 欠損株に酸化ストレスを与え、その後の生菌数をカウントしたところ、sRNA-X 欠損

株は生菌数が有意に減少していた (図3)。また、sRNA-X 欠損株をマウスに感染させた実験では、sRNA-X 欠損株は野生株と比較し、定着菌数がおおよそ 1/100 に減少していた。同様の減少はチオレドキシシン関連遺伝子欠損株でも確認された。このことから、sRNA-X はチオレドキシシンを安定化させることにより、抗酸化作用を調節し、定着に有利な状況を作り出していることが示唆された (Kiga K. *et al.* 投稿準備中)。

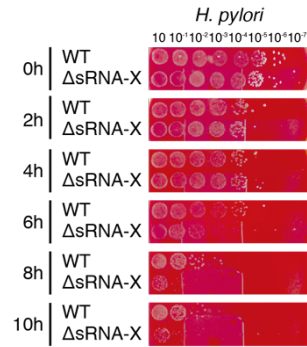


図3. sRNA-X 欠損株は酸化ストレスの影響を受けやすい

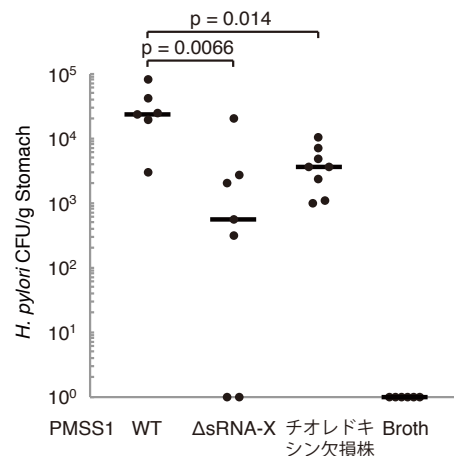


図4. sRNA-x 欠損株はマウスの胃に定着しにくい

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- Hirukawa S, Sagara H, Kaneto S, Kondo T, Kiga K, Sanada T, Kiyono H, Mimuro H. Characterization of morphological conversion of *Helicobacter pylori* under anaerobic conditions. *Microbiol Immunol.* 2018 Apr;62(4):221-228. doi: 10.1111/1348-0421.12582. 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

- 氣駕恒太郎、朱勃、木下遼、真田貴人、三室仁美
「小さな RNA によるピロリ菌の生存戦略」

第 90 回日本細菌学会 (口頭発表、ポ
スター発表) WS7-6、P-162
2017年 3月 宮城 仙台国際センター

()

研究者番号 :

- ② 木下遼、氣駕恒太朗、Arpana Sood、小椋
義俊、林哲也、三室仁美
「ハイパーミューターを用いたピ
ロリ菌持続感染メカニズムの解析」
第90回日本細菌学会 (ポスター発表)
P-215
2017年 3月 宮城 仙台国際センター

(4) 研究協力者
()

- ③ 氣駕恒太朗、三室仁美、崔龍洙
「細菌感染における機能性 RNA の役割」
第 11 回細菌学若手コロッセウム (ポ
スター発表) P34
2017年 8月 茨城 筑波山江戸屋

[図書] (計 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

氣駕 恒太朗 (Kiga, Kotaro)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 90738246

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者