

令和 2 年 5 月 21 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11618

研究課題名(和文) A.actinomycescomitansの産生する生理活性ペプチドの探索

研究課題名(英文) Identification of bioactive peptides producing by A. actinomycescomitans

研究代表者

大貝 悠一 (Oogai, Yuichi)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教

研究者番号：40511259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病原菌の一つであるAggregatibacter actinomycescomitans (Aa)における新規small ORF (sORF)及びsmall RNA (sRNA)の網羅的同定をRNAseqにより行った。結果18のsORF候補及び120のsRNAが同定された。得られたsORFのうち、既知の生理活性ペプチドと相同性を示すものは認められなかった。臨床分離株を含むAa菌株の培養上清中に含まれるペプチド画分を用いた解析より、細胞への毒性や他細菌に対する抗菌活性を示すものは得られなかった。一方、Aaの病原性因子を制御しうる新規sRNAを本研究により複数見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

過去に行われたsORF解析の多くはバイオインフォマティクス手法によるものである。本研究はsORFの同定を次世代シーケンサーを用いたRNA-seq解析によって行うことにおいて学術的な意義をも有する。また、Aaにおいて、sRNAの同定は一部なされているが、多くの菌株においては不明である。遺伝子発現制御を担う因子として注目されているsRNAの解析は、Aaの病原性への理解においても有意義な情報となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Aggregatibacter actinomycescomitans (Aa) is a periodontal pathogen. To identify new small ORF and small RNA in Aa, we performed a systematic search using RNAseq and identified 18 sORF and 120 sRNA. None of the sORFs exhibited the homology with known bioactive-peptides. The cytotoxicity and antimicrobial activity of the fractions extracted from supernatants of Aa strains containing clinically isolates were not detected. The target prediction of sRNAs showed the potential to regulate several virulence genes containing leukotoxin and cytolethal distending toxin.

研究分野：細菌学

キーワード：歯周病原菌 生理活性ペプチド

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病は細菌感染症であり、これまでに多くの歯周病原菌が報告されている。*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa)は限局性侵襲性歯周炎や慢性歯周炎の起炎菌として知られており、ロイコトキシン、細胞膨化致死毒素、リポ多糖、線毛などの病原性因子が報告されている。しかし、本菌の歯周病発症との関連性や歯周組織への定着メカニズムに関しては不明な点が多く残されている。

近年、細菌の産生するペプチドが、好中球走化性、炎症性サイトカイン誘導性、抗菌活性など種々の生理活性を有することが報告され、細菌感染症の病態解明につながっている。新規病原性ペプチドの候補遺伝子として small ORF(sORF)の存在が考えられる。sORFとは、過去のゲノム解析において遺伝子として同定されなかった短いORFのことを指す。近年、sORFがペプチドをコードし、生理活性を有する報告がなされている。一例を挙げると、*Staphylococcus aureus*のPSMsは細胞毒性、炎症誘発性、抗菌活性などの多様な活性を有するペプチドであることが報告されている。また、過去のゲノム解析においてsORFと共に未同定な因子として、non-coding RNAのひとつであるsmall RNA (sRNA)が知られている。sRNAは遺伝子間領域や遺伝子の逆鎖に存在し、様々な遺伝子の転写後調節に関与することが報告されている。

近年、次世代シーケンサーを用いたRNA-seqにより、様々な生物種で全転写産物の解読が行われており、sORFやsRNAの新規同定がなされている。

2. 研究の目的

本研究では、AaにおけるsORFの網羅的同定から、炎症誘導、傷害性など宿主細胞に影響を及ぼす因子及び他細菌種の増殖に影響を及ぼすペプチドを同定し、口腔内定着及び歯周病発症に関与する新たな病原性因子を明らかにする。また、AaからsRNAを新規同定し、病原性などへの関与を明らかにする。

その他の口腔及び鼻腔常在細菌においても、菌体外産生性ペプチドに着目した解析を併せて行う。

3. 研究の方法

Aa HK1651株を用い、Total RNAをターゲットとしたRNA-seqを行い、sORF及びsRNAの同定を行った。ライブラリー作成の際に、プロセッシングを受けないsORFやsRNAをターゲットするためTotal RNAに5' poly phosphatase処理を行った。シーケンスライブラリーは600 bp以下のRNAを対象に作成し、塩基配列の決定を次世代シーケンサーMiseqにて決定した。遺伝子間及び遺伝子逆鎖において発現を認める領域を抽出し、塩基配列内にRBSとORFを有するものをsORF、それ以外をsRNAとした。

Aaを含む各種口腔及び鼻腔常在細菌の培養上清を用い、新規病原性ペプチド及び抗菌性ペプチドの単離を試みた。

4. 研究成果

Aa HK1651株におけるsORF及びsRNAの同定

RNA-seqによりHK1651株のゲノム情報において遺伝子間領域や遺伝子の逆鎖である領域に認められるRNA発現を解析した。遺伝子間領域において認められた発現領域のうち、18領域はタンパクをコードするORFを内部に有していた。予想されるアミノ酸配列は既知の病原性ペプチドとの相同性は示さなかった。

sRNA の同定結果より、遺伝子間領域において 90 の sRNA (IGR-sRNA)、遺伝子の逆鎖において 30 の sRNA (asRNA) が同定された(Fig.1)。sRNA の発現検証のため、RNAseq の結果により高発現を示す 10 の sRNA を用いてノーザンブロット解析を行った(Fig.2)。

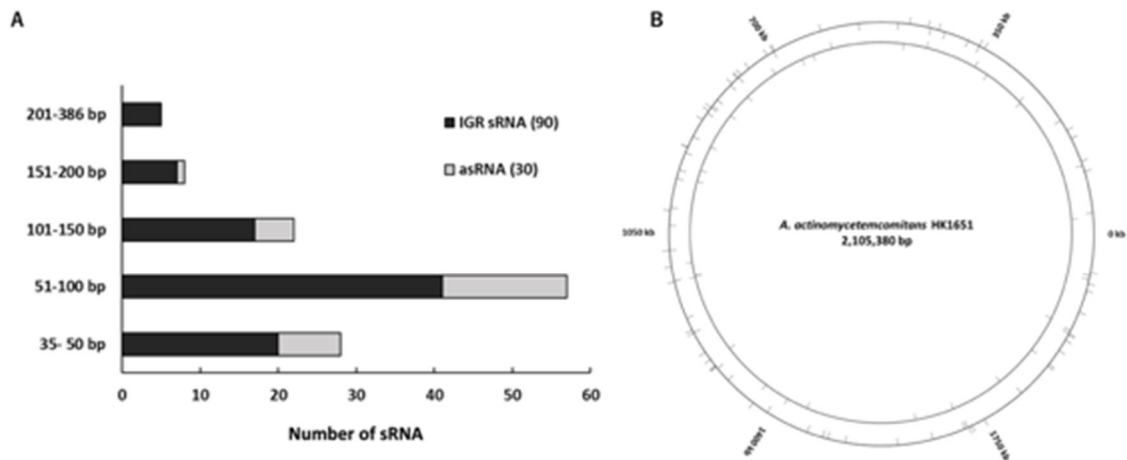


Fig.1 Aa HK1651より同定されたsRNA
(A) sRNAサイズの分布 (B) sRNAの環状ゲノムマップ。外環：IGR-sRNA, 内環：asRNA

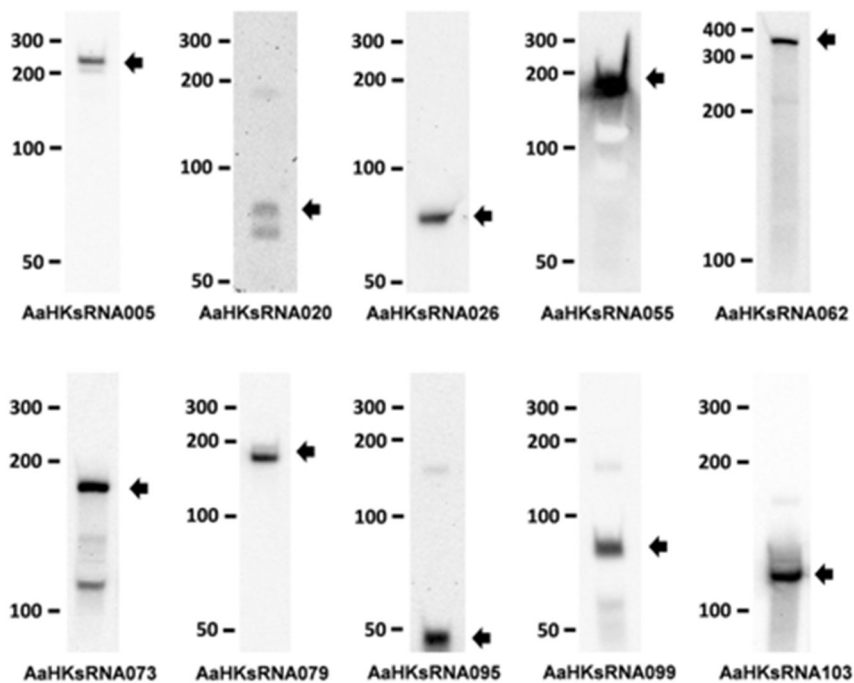


Fig.2 sRNAのノーザンブロット解析
矢印がsRNAを示す。

IGR-sRNAの一部は異所性に発現するRNAと塩基対結合し、RNAの安定性やタンパク翻訳制御に影響することが知られている。当解析で行われたIGR-sRNAにより発現制御されるmRNAの予測をIntaRNAにより行った。結果、Aaの主要な病原性因子として知られるロイコトキシンや細胞致死膨化毒素、線毛の構造遺伝子などのmRNAと塩基対結合しうるIGR-sRNAが予測された。本研究結果によりAaの病原性の調節においてsRNAの関与が示唆された。

Aa 培養上清に含まれる因子の生理活性

Aa の実験室株(HK1651, ATCC29523, Y4, IDH781, NCTC9710 及び 10 株の臨床分離株を用い、培養上清に含まれるペプチドの抗菌活性を解析した。培養上清の濾過滅菌物を透析後濃縮し、各種口腔常在菌に対する抗菌活性を spot on lawn 法により解析したが、抗菌力を示す画分は得られなかった。また、各種培養上清からペプチド画分を粗精製し、ヒト上皮培養細胞における炎症性サイトカインの誘導性解析を定量性 PCR により行った。一部の画分では IL-6, IL-8 などの発現誘導が認められたが、それらは混入した LPS に由来する可能性が考えられ、新規の炎症惹起ペプチドの同定はなされなかった。

Aa の挿入因子 (IS)

当解析においてなされた Aa のゲノム解析から目新しい IS3 ファミリーが認められた (Fig.3)。当 IS は一部のコピーにおいては遺伝子の崩壊が見られない(Table 1)ことから、可動性を保持している可能性が考えられた。可動性を保持する IS は IS のランダム挿入による遺伝子欠損株作成に有用なツールとなりうるため、Aa のペプチド産生に影響を及ぼす遺伝子の網羅的同定を行う目的で IS の可動性を確認した。

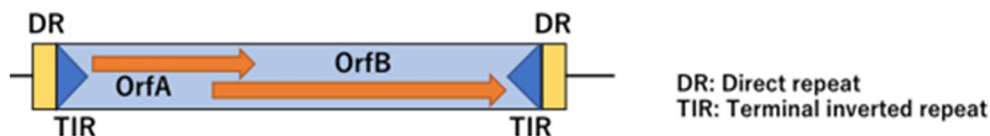


Fig.3 Aaにおける新規ISの模式図

Strain	Location	Length	Comment	
HK1651	5138	6394	1257	Pseudogene
	745715	746965	1251	Pseudogene
	862347	863296	950	Partial ORF
	871674	872924	1251	Pseudogene
	969249	970196	948	Partial ORF
	1444591	1445778	1188	Pseudogene
	1598946	1600195	1250	Pseudogene
IDH781	30474	31728	1255	Pseudogene
	56742	57995	1254	Pseudogene
	958638	959895	1258	Pseudogene
	1098055	1099312	1258	Pseudogene
	1287804	1289063	1260	Complete
	1533779	1535030	1252	Pseudogene
	1855276	1856534	1259	Pseudogene
	1979776	1981028	1253	Pseudogene

Table 1 Aa HK1651及びIDH781におけるIS3

IS の構造を保持したコピーにおいて、IS の転移活性解析用プラスミドおよび菌株を用いた転移活性試験を行った結果、該当の IS 特異的な転移活性は認められなかった。IS3 の ORFA のリコンビナントタンパクに対する抗血清を用い、Aa におけるタンパク発現を解析した結果、ORFA の発現は認められなかった。当解析より Aa の IS3 は厳しい発現抑制を受けている可能性が考えられた。

Fusobacterium nucleatum の分離・同定

生理活性ペプチド解析の対象を広げる目的で、健康人ボランティアより分離された *Fusobacterium nucleatum* を 15 株得た。これまでに、16S rRNA の PCR 法による菌種同定、各種抗菌薬への感受性試験を行った。今後、ゲノム解析及び菌体外産生性ペプチドの性状解析を行う予定である。

Staphylococcus epidermidis のバクテリオシン産生性

当教室により以前分離された *Staphylococcus epidermidis* の培養上清を用いた鼻腔常在細菌に対する抗菌活性を解析したところ、*Staphylococcus aureus* に対して抗菌力を示す菌株が認められたため、当研究課題の解析対象とした。抗菌性を示す画分は HPLC により単離され、生成物は各種鼻腔常在菌に対して抗菌力を認めた。生成物のエドマン分解等により、当抗菌物質は新規バクテリオシンである可能性が示唆されている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yuichi Oogai, Yasuhiro Gotoh, Yoshitoshi Ogura, Miki Kawada-Matsuo, Tetsuya Hayashi, Hitoshi Komatsuzawa	4. 巻 25
2. 論文標題 Small RNA Repertoires and Their Intraspecies Variation in <i>Aggregatibacter Actinomycetemcomitans</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 DNA research	6. 最初と最後の頁 207-215
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/dnares/dsx050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大貝悠一、渡邊温子、松尾美樹、小松澤均
2. 発表標題 Novel bacteriocin producing <i>Staphylococcus epidermidis</i> active against nasal commensals
3. 学会等名 第93回 細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大貝悠一、小松澤均
2. 発表標題 Distribution and expression of insertion sequence in <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>
3. 学会等名 第92回 細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大貝悠一
2. 発表標題 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> におけるsmall RNAレパートリーとその種内多様性
3. 学会等名 題91回 細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	松尾 美樹 (Kawada-Matuso Miki) (20527048)	広島大学・医系科学研究科・准教授 (15401)	
研究 分担者	小松澤 均 (Komatsuzawa Hitoshi) (90253088)	広島大学・医系科学研究科・教授 (15401)	