

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06494

研究課題名(和文)細菌の病原性獲得に対するArgonauteの関与

研究課題名(英文) Association between acquisition of virulence factors and Argonaute protein in bacteria

研究代表者

三好 智博 (Miyoshi, Tomohiro)

松本歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60534550

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、まだ未解明である原核型Argonauteの機能解析を行った。大腸菌にArgonauteを発現させると一部のバクテリオファージの感染効率に変化を生じた。さらに、Argonauteの発現は、大腸菌の細胞形態を細長くすることが示された。この結果は、DNA増幅反応を薬剤で阻害したときの結果と類似していることから、Argonauteが原核細胞においてDNA増幅反応に関与することが示唆された。また、Argonauteと常在/病原菌との関連性を調査するために不可欠である健康に寄与する細菌の同定にも成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、世界的に感染性微生物の病原性や薬剤耐性獲得の問題が大きくなりつつある。この微生物の病原性や薬剤耐性獲得は、外来遺伝子の獲得によって行われている。本研究では、外来遺伝子の獲得とArgonauteの機能に着目したものである。本研究結果は、Argonauteに結合した小分子RNAの機能を調べ、微生物の病原性獲得との関連性を示した研究のため、医学的な観点から学術的及び社会的意義が大きい成果が得られた。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we performed a functional analysis of the prokaryotic Argonaute, which has not been clarified yet. Expression of Argonaute in *E. coli* caused changes in the infectivity of some bacteriophages. Furthermore, the expression of Argonaute was shown to elongate the cell morphology of *E. coli*. This result is similar to the result when the DNA amplification reaction was inhibited by a drug, suggesting that Argonaute is involved in the DNA amplification reaction in prokaryotic cells. We have also succeeded in identifying health-contributing bacteria that are essential for investigating the association between Argonaute and indigenous/pathogens.

研究分野：RNA生物学

キーワード：small RNA Argonaute DNA silencing

## 1. 研究開始当初の背景

真核細胞において Argonaute タンパク質は、siRNA と呼ばれる短鎖 RNA が結合しており、この塩基配列に相補性を持つ RNA に結合して分解する機能がある。この機能は、RNA 干渉や RNAi と呼ばれ、トランスポゾンの抑制やウイルス感染防御として機能することが知られている。さらに、この生体メカニズムを応用して、特異的な遺伝子のノックダウンのツールとして、医学・生命科学分野で広く使われている。その一方で、原核細胞における Argonaute の機能は、まだ明らかになっていない。申請者らの研究により、*R. sphaeroides* Argonaute (RsAgo) は、ガイド鎖は真核型 Argonaute と同じ RNA であるが、標的となる分子が真核 Argonaute では RNA であるのに対して、原核 Argonaute では DNA であり、核酸成分が異なることを明らかにした (Miyoshi T. *et al.*, *Nature Communications*, 2016)。この「標的が DNA」であることと真核 Argonaute がウイルスに対して抑制的に機能することが可能なことから、原核型 Argonaute もバクテリオファージやプラスミドなどの外来 DNA に対する自己防衛システムで機能するのではないかと予想できた。実際に、Argonaute を持たない大腸菌内で Argonaute を発現させた時、プラスミド量の減少やファージ感染抑制効果があるというデータが得られている。以上のことから、原核型 Argonaute の機能は、外来性遺伝子から細菌ゲノムを守るはたらきがあると予想した。病原性細菌は、一般的にプラスミドやファージ DNA を介して外来性 DNA を取り込み薬剤耐性や病原性遺伝子の獲得を行うことから、細菌の病原性獲得と Argonaute の機能の関連性があるのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の最大の特色は、申請者自身が RNA-guided DNA interference の中枢で機能する RsAgo のユニークな機能メカニズムを世界に先駆けて生化学的解析と構造解析に成功している点である (*Nature Commun*, 2016)。この結果から予測した反応機構モデルを本研究において実証する事で、他の追随を許さない独創的な研究が可能である。申請者が研究を進めてきた RsAgo タンパク質は、短鎖 RNA をガイド分子として標的 DNA に塩基配列特異的に結合することが可能であり、さらにこの短鎖 RNA の配列には、ファージ由来の配列も存在していることから、RsAgo がファージに対して抑制的に作用することが考えられる。さらに、興味深いことに、すべての細菌のゲノムに Argonaute がコードされているわけではなく、現在までに約 1000 種類以上の細菌で Argonaute は見つかったが、多くの病原性を有する大腸菌や黄色ブドウ球菌などでは、どちらも Argonaute 遺伝子がコードされていないことも明らかになってきた。以上のことから、外来遺伝子の取り込み、すなわち薬剤耐性や病原性の出現と Argonaute の有無と関連性が示唆される。しかしながら、その詳細については明らかになっていない。本研究では、下記の①と②を明らかにしようと試みた。① Argonaute の機能と細菌の外来遺伝子の取り込み機構との関連性を分子レベルで明確にする。② 細菌の病原性と Argonaute の有無との関連性を明らかにする。これらの研究結果は、細菌感染症分野における医学・創薬研究にイノベーションを与えると予想される。

### 3. 研究の方法

①の実験方法:細菌には、Argonaute 遺伝子をコードしている細菌とコードしていない細菌が存在する。Argonaute の機能を明確にするために Argonaute をコードしない細菌(大腸菌)に Argonaute を強制発現させ、バクテリオファージなどの外来 DNA の感染実験を行う。pET プラスミドに光合成細菌(*Rhodobacter sphaeroides*)の Argonaute 遺伝子を組み込み、IPTG で発現誘導できるプラスミドを構築し、Argonaute 遺伝子がゲノムにコードされていない大腸菌に形質転換した。さらに、IPTG を培地に添加し、Argonaute タンパク質の発現誘導を行った。野生型 Argonaute を発現させた大腸菌の作成と同時に、比較対象として、タンパク質を発現しないプラスミドを形質転換させた大腸菌の作成と、機能欠損型 Argonaute を発現する大腸菌の作成も試みた。この機能欠損 Argonaute は、ガイド鎖 RNA の結合能を欠損させるための変異が導入されている。これら 3 種類の大腸菌を作成し、それぞれにバクテリオファージの感染実験を行った。感染効率の測定は、軟寒天培地を用いたプラークの検出によって行った。

原核細胞の中で Argonaute の発現が及ぼす影響は、未解明である。申請者は、大腸菌に Argonaute タンパク質を発現させたときの細胞形態への影響を調べるために、上述した Argonaute を発現させた大腸菌をクリスタルバイオレットで染色し、実体顕微鏡を用いて、微生物細胞の形態観察も行った。

②の実験方法:病原性細菌に関する研究は非常に進んでいるが、常在微生物の健康への関連性を調べる研究は、ほとんど進んでいない。申請者は、有用な常在細菌を探索する目的で、口腔内の細菌に着目した。口腔内の微生物が生育する環境は、非常に複雑なため、多種多様な微生物が存在している。口腔内の主要な疾病である歯周病は、歯周病細菌によって引き起こされる。申請者は、歯周病患者と健常者の唾液中の微生物を比較することで、口腔内の健康に関与する微生物の探索を行った。さらに、同定された微生物による歯周病細菌に対する影響(生育抑制能)を調査した。

### 4. 研究成果

#### 1. バクテリオファージの感染効率に与える Argonaute の影響

Argonaute はガイド RNA 鎖の配列依存的に DNA サイレンシングを引き起こすことが示されている。申請者は、この DNA サイレンシングが細菌のバクテリオファージ感染に対して影響があると考え、T2, T3, T4, T6, T7 ファージを用いて感染実験を行った。各ファージの感染効率は、軟寒天培地を使用した 2 層培地でプラークの対照サンプル(大腸菌に空のプラスミドを導入したもの)と比べ T2, T4, T6 ファージの感染効率は、Argonaute の発現によって大きく上昇した。その一方で、変異型 Argonaute を発現している大腸菌では、大きな変化は見られなかった。また、T3, T7 ファージでは、Argonaute の発現によるファージ感染効率の大きな変化は見られなかった(図 1)。この結果は、Argonaute の発現が一部のファージの感染効率に影響を与えていることが明らかとなった。

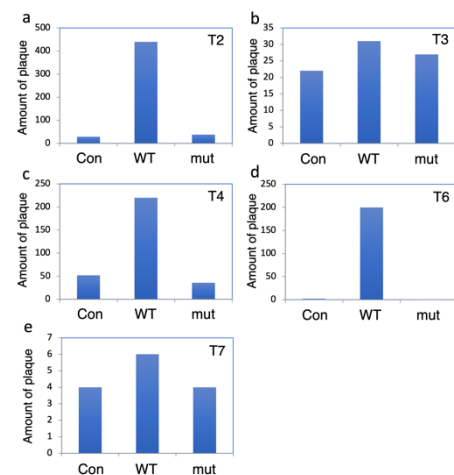


図 1. 大腸菌への各種バクテリオファージの感染に与える Argonaute 発現の影響

#### 2. Argonaute の発現が細菌の形態へ与える影響

Argonaute の発現による細胞形態への影響は、不明である。これまでの研究では、Argonaute の発現の有無によって、大腸菌の生育速度に大きな変化は見られなかった。本実験では、大腸菌の形態への Argonaute の影響を調査した。IPTG による Argonaute の発現誘導後、大腸菌を染色し、実体顕微鏡を用いて観察を行った。Argonaute を発現している細胞では、一つの細胞の長さが非常に長く変形していることが明らかとなった (図 2)。ニューキノロン系の Ciprofloxacin は、細菌の DNA ジャイレースとトポイソメラーゼ IV を標的として DNA 機能を障害することが知られている。好熱性細菌 *Thermus thermophilus* に Ciprofloxacin を添加すると形態が長くなり、細胞同士が繋がっているように見えることが示されており (Samson M. et al., Cell, 2020)、DNA 機能の障害によって、細胞が長くなることが知られている。本研究における Argonaute 発現による形態異常は、Argonaute がガイド鎖の配列依存的に標的 DNA に結合し、DNA 機能を阻害していることを示唆している。なお、細胞内で Argonaute に結合しているガイド鎖 RNA に大きな特異性は見られず、様々なゲノムの箇所から転写されている RNA から作られていることから、Argonaute は細胞の全体的な DNA 合成速度のコントロールを調節する機能があるのかもしれない。

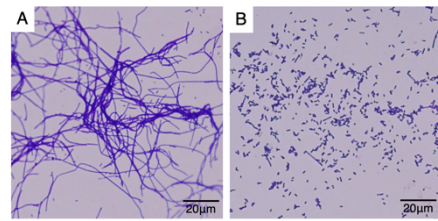


図 2. 大腸菌における Argonaute の発現による細胞の形態変化

### 3. 口腔内の健康に寄与する有用微生物の探索

歯周病は、歯周病原菌が歯茎に炎症を引き起こす疾患で、重篤化すると歯を支える骨が溶けて歯を失う原因となる。口腔内の常在菌には、歯周病細菌に対して負に制御する可能性のある細菌がいるのではないかと考え、溶血活性を持つ細菌に着目した。16S rRNA のシーケンス解析の結果から、ヒトの唾液中の溶血性細菌には、*Gemella* 属が多いということが示された。また、3 種類の *Gemella* 属細菌 (*G. sanguinis*, *G. haemolysans*, *G. morbillorum*) を同定することに成功した。これら細菌の歯周病との関連性を調べるために歯周病患者 10 名と健常者 5 名の唾液を回収し、それぞれの細菌特異的なプライマーを用いて PCR 法により定量を行った。その結果、*G. sanguinis* 及び *G. morbillorum* については、両者で優位な差はなかった。一方で、*G. haemolysans* は健常者に比べ歯周病患者の唾液中では減少していることが明らかとなった (図 3)。*G. haemolysans* が歯周病と関連していることを示唆している結果が得られたため、歯周病細菌に対する直接的な効果があるのではないかと考え、*G. haemolysans* による歯周病細菌の生育抑制効果を調べた。*G. haemolysans* を唾液から単離培養し、歯周病細菌として知られる *Porphyromonas gingivalis* の生育に及ぼす影響を寒天培地上で調査したところ、明

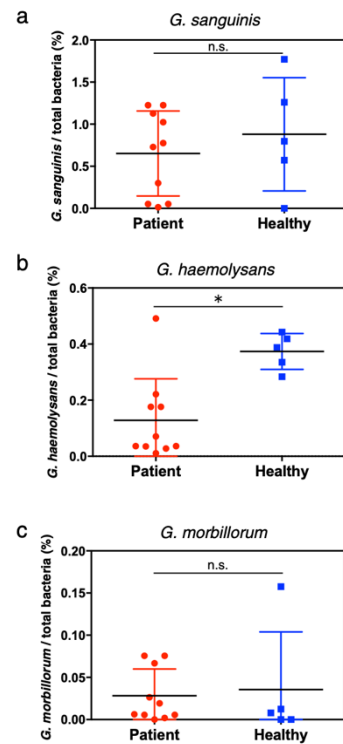


図 3. 歯周病患者と健常者の唾液中の *Gemella* 属細菌の割合

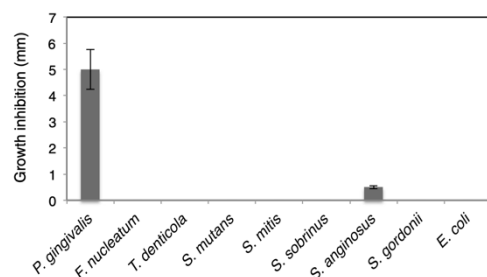


図 4. 各種細菌に対する *G. haemolysans* の生育抑制効果

確な生育抑制効果が観察された。この生育抑制効果が、*P. gingivalis* に対して特異的なものかどうかを調べるために他の口腔内細菌の生育に対して同様の調査を行った。その結果、*G. haemolysans* は *P. gingivalis* に対して特異的に生育を抑制できることが示された(図4)。次に、*P. gingivalis* の生育抑制に関わる成分を明らかにするために、*G. haemolysans* 培養上清成分を用いて、生育阻害実験を行ったところ、生育阻害が見られた。しかし、その培養上清に熱処理を行うと *P. gingivalis* に対する生育抑制作用は失われた。この結果から、*G. haemolysans* が産生する阻害因子は培養上清に存在する易熱性因子であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takahiro Suzuki, Kosuke Ito, Tomohiro Miyoshi, Ryo Murakami, and Toshio Uchiumi	4. 巻 433
2. 論文標題 Structural insights into the switching off of the interaction between the archaeal ribosomal stalk and aEF1A by nucleotide exchange factor aEF1B	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 167046
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jmb.2021.167046	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hiyoshi T, Domon H, Maekawa T, Nagai K, Tamura H, Takahashi N, Yonezawa D, Miyoshi T, Yoshida A, Tabeta K, Terao Y	4. 巻 63
2. 論文標題 Aggregatibacter actinomycetemcomitans induces detachment and death of human gingival epithelial cells and fibroblasts via elastase release following leukotoxin-dependent neutrophil lysis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 100-110
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12672	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miyoshi T, Oge S, Nakata S, Ueno Y, Ukita H, Kousaka R, Miura Y, Yoshinari N, Yoshida A.	4. 巻 11
2. 論文標題 Gemella haemolysans inhibits the growth of the periodontal pathogen Porphyromonas gingivalis.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 11742
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-91267-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tomohiro Miyoshi, Nobuo Yoshinari and Akihiro Yoshida
2. 発表標題 Gemella haemolysans specifically inhibits the growth of Porphyromonas gingivalis
3. 学会等名 International Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三好智博、吉成伸夫、吉田明弘
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisの生育を特異的に阻害するGemella haemolysans
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 伊東孝祐、丸山圭 今井大達 三好智博 内海利男
2. 発表標題 リボソームストークタンパク質の構造・機能研究
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomohiro Miyoshi, Satoshi Nakata, Shogo Oge, Yuji Ueno, Hidehiko Ukita, Reiko Kousaka, Nobuo Yoshinari, Akihiro Yoshida
2. 発表標題 Hemolytic Gemella is Associated with Suppression of Periodontal Disease
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三好智博、中田智是、大毛将吾、植野裕司、浮田英彦、高坂怜子、吉成伸夫、吉田明弘
2. 発表標題 Gemellaの口腔内における役割
3. 学会等名 第51回レンサ球菌研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三好智博、吉成伸夫、吉田明弘
2. 発表標題 口腔内における溶血性Gemellaと歯周病細菌P. gingivalisの関連性
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大堀 千郷, 三好 智博, 吉田 明弘
2. 発表標題 歯周病原菌と競合する微生物-その探索と発見
3. 学会等名 第91回松本歯科大学学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomohiro Miyoshi, Chisato Ohori, Yu Muto, Atsushi Ishihara, Kumiko Osaki-Oka, Akihiro Yoshida
2. 発表標題 The growth inhibitory effect of pathogenic bacteria by Serratia marcescens
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022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	石津 大嗣  (Ishizu Hirotsugu)  (40574588)	慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師    (32612)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------