

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19027

研究課題名(和文) 歯周病原細菌におけるRNA結合蛋白質Hfqによる病原因子制御機構の解明

研究課題名(英文) The role of RNA binding protein Hfq on the virulence factor of periodontal pathogen

研究代表者

平井 公人(Hirai, Kimito)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：10710171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：感染性心内膜炎の原因にもなる歯周病原細菌Aggregatibacter actinomycetemcomitans (A.a)はRNA結合タンパク質であるHfqにより、病原性に関わる遺伝子の発現制御を受けているかを、ATCC株とそのhfq遺伝子欠損株を用いて検討した。hfq遺伝子欠損株においてバイオフィーム形成や上皮細胞への侵入効率が低下しさらに細胞接着や細胞内侵入に関わるflp1, rcpA, rcpB, tadAなどの遺伝子発現が低下した。これらの結果からHfqはA. aが感染、定着する過程において、バイオフィームの成熟や宿主細胞への付着、侵入といった病原因子の発現調節を行っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の成果はA. actinomycetemcomitansが口腔の局所から血管内へ侵入する過程において、巧みに環境ストレスに適応しながら遺伝子の発現を制御するメカニズムの一端を解明した。本研究対象のA. actinomycetemcomitansは、感染性心内膜炎やアテローム性動脈硬化症に関与していることは疫学的研究で明らかとなっているが、本研究はその発症の詳細なメカニズムの解明に挑戦するものであり、研究成果は今後、心臓・血管疾患の予防につながる可能性のある、社会への波及効果が大きい。

研究成果の概要(英文)：Aggregatibacter actinomycetemcomitans is one of the pathobiont causing periodontal disease that is involved in infectious endocarditis. Hfq is a member of RNA binding protein and is best known for its function in post-transcriptional gene regulation by small regulatory RNA. We investigated the role of Hfq on the virulence factors of A. actinomycetemcomitans using hfq deletion mutant. On the present study, hfq deletion attenuated biofilm formation on cell culture plate coated with extra-cellular matrix and reduced invasion efficiency into epithelium cell. Furthermore, the genes expression of flp1, rcpA, rcpB, tadA that relating cell adhesion or invasion were down regulated on hfq deletion mutant compared with parent strain ATCC29523. Taken together, this present study indicated that Hfq regulate virulence factor of A. actinomycetemcomitans in the course of the bacterial adhesion and invasion into the host cell.

研究分野：歯周病

キーワード：Hfq small RNA A. actinomycetemcomitans 歯周病 感染性心内膜炎

歯周病原細菌における RNA 結合蛋白質 Hfq による病原因子制御機構の解明

The role of RNA binding protein Hfq on the virulence factor of periodontal pathogen

1. 研究開始当初の背景

歯周病は口腔の歯周組織にグラム陰性嫌気性桿菌を主体として起こる慢性の炎症性疾患であるが、口腔の健康維持が全身的な慢性炎症や感染症のコントロールに非常に重要であることが明らかとなってきた。歯周病は心血管系疾患（感染性心内膜炎やアテローム性動脈硬化症）にも関わっている。特に歯周病原細菌の中でも急速に歯周組織の破壊を起こす侵襲性歯周炎と関連の深い *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* はアテローム性動脈硬化症のプラーク中から同菌の DNA が同定、分離され、また心臓の弁膜や内膜に細菌が感染して発症する感染性心内膜炎の起炎菌でもある。*A. actinomycetemcomitans* は細胞侵入能を有する細菌であるため、歯周組織の炎症によって脆弱化した歯肉上皮からは容易に血管内に侵入することができる。さらに *A. actinomycetemcomitans* は通性嫌気性菌であり、外毒素であるロイコトキシン（白血球毒素）を産生するので白血球に容易に殺菌されず、血中でも長く生存できると考えられる。これらの知見は、*A. actinomycetemcomitans* が歯周ポケットから血流に頻繁に入り込んで心内膜や動脈血管内壁のプラーク形成に関与していることを示している。

A. actinomycetemcomitans が宿主の細胞に接着もしくは侵入する際に関与する分子は複数報告されているが、実際にはそれらの複数の分子が協調して機能しているはずであり、さらに周囲の環境によって必要な分子の発現をコントロールする必要がある。RNA 分子の中でも、特に、タンパク質に翻訳されない非翻訳 RNA (non-coding small RNA: sRNA) が遺伝子発現制御の重要な役割を担い、細菌の病原因子の発現や代謝制御に関与していることが明らかにされている。sRNA はターゲットの mRNA と塩基対を形成して遺伝子の転写後発現を制御するが、多くの場合は仲介に RNA 結合タンパク質 (RNA シャペロン) である Hfq を必要とする。sRNA の機能は Hfq (細菌種の約半数に保存されている) によって制御されており、さらに Hfq は温度や浸透圧のような環境の変化やストレスに応じて活性化し、細菌の病原遺伝子の転写、翻訳を制御する、病原因子のスイッチのような役割を担っている。

Hfq は様々な細菌種において、その欠損株で病原性が低下することから、Hfq による遺伝子の発現制御が病原因子の発現に大きく関与することが報告されている。これまでに我々は *A. actinomycetemcomitans* の hfq 欠損株を作成したところ親株と比較して、タンパク質の発現に大きく差が出るものがいくつか存在し、さらに HeLa 細胞に対して細胞内への侵入能が有意に低下したことが、我々は Hfq が *A. actinomycetemcomitans* においても歯肉上皮への侵入、そして遠隔の血管内上皮へ付着など病原性に関わる因子を sRNA を介して制御していると仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は歯肉上皮細胞への付着、侵入そして宿主の免疫応答や食菌作用からの回避、さらには遠隔の血管内皮細胞への再付着、プラーク形成に至るまでに *A. actinomycetemcomitans* がどのように Hfq を介して sRNA を利用した病原遺伝子の制御を行っているのかを解明することである。

3. 研究の方法

使用菌株および培養環境

本研究には、岡山大学歯周病態学分野に -80°C で保存されている *A. actinomycetemcomitans* ATCC29523 株を、また同菌を親株として、遺伝子相同性組み換え法によって作成された hfq 遺伝子欠損株 (Δ hfq 株) を用いた。培養には、tryptic soy broth に 0.5% の Yeast Extract を添加した培地を用いて、37°C、酸素濃度 1% 以下、炭酸濃度 5% の環境で培養した。ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の培養は EBM-2 培地を用いて 37°C、CO₂ 濃度 5% 存在下で培養した。

バイオフィルムの染色

一般的な細胞培養用の 96well プラスチックプレート、もしくは細胞外マトリックス (ECM) である I 型コラーゲン、IV 型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンをコーティングしたプレートを用いて *A. actinomycetemcomitans* ATCC29523 株ならびに Δ hfq 株のバイオフィルムを作成した。培養条件は上記の環境下で

8時間培養を行った後に、菌液を新しい培養培地で10倍希釈し、150 μ Lを96wellプレートに播種した。上記嫌気条件下で48時間静置培養し、プレート底面に付着した菌体をバイオフィームとして評価を行った。バイオフィームの定量的な評価にはクリスタルバイオレット染色を用いて、吸光度(595nm)を測定した。

HUVCへの細胞内侵入効率

コンフルエントになるまで培養したHUVECに親株及び Δhfq 株をMOI 1000で播種し3時間共培養をおこなった。その後、PBSで2回洗った後、細胞表面に残存している菌を殺菌するために100IU/mLペニシリン・100 μ g/mLストレプトマイシン含有のEBM-2培地で1時間さらに培養した。PBSで3回洗った後に、スクレイパーで遊離させた細胞懸濁液をTSBY寒天培地上に播種し48時間培養した。寒天培地上に生育した細菌のコロニー数をカウントし親株、 Δhfq 株間で比較した。

Real time RT PCR

A. *actinomycetemcomitans* ATCC29523株ならびに Δhfq 株の上記HUVECへの細胞内侵入時の遺伝子発現の違いをReal time RT PCRで評価した。HUVECが細胞培養用ディッシュ(100mm)上で70-80%のコンフルエントとなった状態で、 2×10^8 cfuに調整した菌液を播種した。2時間後と、24時間後に細胞と菌体をスクレイパーでディッシュから遊離させて回収した。RNAの回収はTRIzol(Thermo Fisher)とRNAの純度を上げるためにRNeasy Plus mini kit(Qiagen)を用いてRNAを精製した。17の遺伝子についてreal-time polymerase chain reaction(qPCR)法を用いて評価を行った。qPCRはPower SYBR Green master mixを用い、Applied Biosystems 7300C Real Time PCR systemを用いて目的遺伝子の増幅を行った。目的遺伝子の発現量は比較Ct法を用いてコントロールである親株ATCC29523株に対する比で評価した。

マウス背部皮下チャンパーモデルを用いた免疫細胞応答の比較解析

生体内の持続的な感染モデルでの宿主の免疫応答を比較するためにマウス背部皮下チャンパーモデルを用いる。これはマウスの背部皮下にステンレスワイヤーを用いて成型したコイルを埋入して、創部の治癒を待った後にコイル内に細菌の懸濁液を注入し免疫細胞との反応を観察する手法である。細菌注入後は2, 12, 24, 72, 168時間後にコイル内の体液を回収して生存している細菌量を寒天培地上で測定し、また免疫細胞の質的な変化をFlow cytometry(FACS)によって解析する。

4. 研究成果

hfq 遺伝子欠損によるバイオフィーム形成能の変化

ECM上に形成させたA. *actinomycetemcomitans* ATCC29523株ならびに Δhfq 株のバイオフィームを量的もしくは質的に比較した。親株であるATCC29523株と比較して、 Δhfq 株はバイオフィームが薄く、PBSなどの洗浄操作によって容易に剥がれやすい性状を呈した。図1Aに示すようにクリスタルバイオレットによって染色されたバイオフィーム量は明らかに Δhfq 株では少なく、図1Bに示すように、エタノールによって溶出されたクリスタルバイオレット量を吸光度で定量すると、 Δhfq 株のバイオフィーム量は優位に親株であるATCC29523株よりも少なかった。

hfq 遺伝子欠損による上皮細胞への細胞内侵入効率の変化

HUVECに対する細胞侵入能を比較したところ、図2に示すように、細胞内に侵入した細菌数を算出した結果、 Δhfq 株では親株と比較して有意にその数が減少していた。

hfq 遺伝子欠損による上皮細胞感染時の遺伝子発現の変化

A. *actinomycetemcomitans*における細胞接着や感染に関与している遺伝子として*flp1*, *rcpA*, *rcpB*, *omp29*, *omp100*, *aae*, *apaH*, *tadA*, *pgA*を、細胞毒性や免疫回避に関与する遺伝子として*ltxA*, *ltxB*, *ltxC*, *ltxD*, *cdtB*, *vapA*, *orf859*, *katA*について*hfq*遺伝子欠損による発現量の変化をReal time RT PCR法で評価した。親株と比較して Δhfq 株の各遺伝子の発現量の比を表1に示す。親株と比較して Δhfq 株では細胞接着や感染に関与している遺伝子の中で*flp1*, *rcpA*, *rcpB*, *tadA*は感染後2時間後と24時間後の両方で顕著に遺伝子の発現量が低下していた。細胞への付着、侵入に関与し、さらに抗原性があることでも知られている*omp29*, *omp100*は予想とは違い、2時間後で微増している傾向にあった。

hfq 遺伝子欠損による免疫応答の変化

マウス背部皮下に埋入したコイル内に注入したA. *actinomycetemcomitans* が予想外に長期間生

存したことから、今回の観察期間では *A. actinomycetemcomitans* のコイル内生存率は Δhfq 株で若干さがったものの、誘導されてきた免疫細胞の質的な変化も含めて *hfq* 遺伝子欠損による明らかな差はなかった。マウス腹腔内から採取したマクロファージに対する免疫反応に関しては図 3 に示したように、感染後 12 時間後の TNF の産生量を比較したところ、親株と比較して Δhfq 株を感染させた方が約 3 倍マクロファージからの TNF の産生量が多かった。

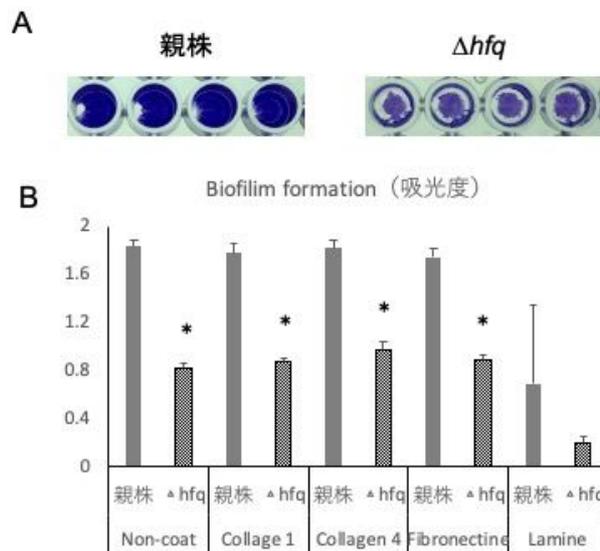


図 1 *hfq* 遺伝子欠損によるバイオフィーム形成能の変化。A) クリスタルバイオレットで染色した *A. actinomycetemcomitans* ATCC29523 株 (左) と Δhfq 株 (右) のバイオフィーム。B) バイオフィームの定量的評価 (吸光度; O.D 595nm)。* : $P < 0.05$

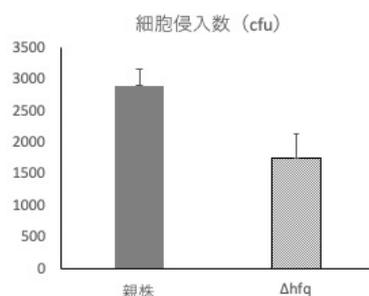


図 2 *hfq* 遺伝子欠損による上皮細胞への細胞内侵入効率の変化。HUVEC に親株及び Δhfq 株を MOI 1000 で播種し 3 時間共培養。その後、抗生剤で細胞外の細菌を除去、回収した細胞を TSBY 寒天培地上に播種し 48 時間培養した。図には寒天培地上に生育した細菌のコロニー数を示している。* : $P < 0.05$

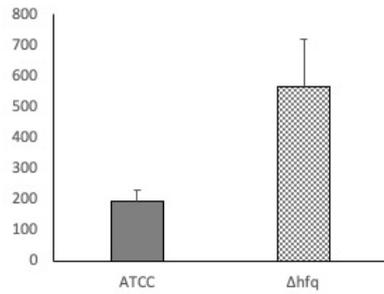


図3 *hfq* 遺伝子欠損による免疫応答の変化．マクロファージと親株及び Δhfq 株共培養時におけるサイトカイン産生量の違いを比較した．図には炎症性サイトカイン TNF の産生量 (pg/ml) を示している．* : $P < 0.05$

| Gene | 2h | | | 24h | | |
|---------------|-------|---------------|---------|-------|---------------|---------|
| | Ratio | 95% CI | P value | Ratio | 95% CI | P value |
| <i>flp1</i> | 0.02 | (0.021-0.022) | ** | 0.02 | (0.018-0.02) | ** |
| <i>rcpA</i> | 0.12 | (0.113-0.13) | ** | 0.13 | (0.13-0.131) | ** |
| <i>rcpB</i> | 0.11 | (0.108-0.113) | ** | 0.24 | (1.43-0.5) | ** |
| <i>Omp29</i> | 1.57 | (1.395-1.758) | * | 1.19 | (1.09-1.294) | NS |
| <i>Omp100</i> | 1.31 | (1.286-1.335) | ** | 0.81 | (0.572-1.151) | NS |
| <i>ase</i> | 1.38 | (1.349-1.406) | * | 1.06 | (1.02-1.1) | NS |
| <i>apsH</i> | 2.27 | (2.156-2.088) | ** | 0.60 | (0.575-0.633) | ** |
| <i>tadA</i> | 0.22 | (0.216-0.221) | ** | 0.40 | (0.3870.41) | ** |
| <i>pgA</i> | 2.09 | (2.041-2.133) | * | 1.09 | (1.067-1.115) | NS |
| <i>ltxA</i> | 3.33 | (3.023-3.424) | * | 0.77 | (0.637-0.926) | NS |
| <i>ltxB</i> | 3.35 | (3.235-3.459) | ** | 1.10 | (1.031-1.165) | NS |
| <i>ltxC</i> | 1.71 | (1.674-1.752) | ** | 0.71 | (0.667-0.759) | * |
| <i>ltxD</i> | 1.84 | (1.586-2.124) | * | 0.68 | (0.574-0.807) | NS |
| <i>cdtB</i> | 0.82 | (0.812-0.819) | * | 0.80 | (0.775-0.82) | * |
| <i>vapA</i> | 0.50 | (0.467-0.537) | ** | 0.70 | (0.642-0.768) | NS |
| <i>orf859</i> | 1.14 | (1.007-1.282) | NS | 0.50 | (0.445-0.570) | * |
| <i>katA</i> | 1.88 | (1.866-1.89) | ** | 1.51 | (0.909-2.518) | NS |

表1 *hfq* 遺伝子欠損による HUVEC 細胞感染時の遺伝子発現の変化．HUVEC へ *A. actinomycetemcomitans* の親株である ATCC29523 株と Δhfq 株を感染後，2 時間と 24 時間後の遺伝子発現の差を Real Time PCR 法で評価した．表は親株に対する発現量の比で表している．95%CI : 95%信頼区間．* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$

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 1件）

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Kimito Hirai, Tomoko Yamaguchi-Tomikawa, Toru Eguchi, Hiroshi Maeda and Shogo Takashiba | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Identification and modification of Porphyromonas gingivalis cysteine protease, gingipain, ideal for screening periodontitis. Running title RgpA for periodontitis screening | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in immunology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fimmu.2020.01017 | 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0件

〔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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|