

平成22年4月2日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008～2009

課題番号：20790111

研究課題名（和文） タイリングアレイを用いたレンサ球菌感染症の発症機構の解明

研究課題名（英文） Mechanisms of streptococcal infection investigated by whole genomic tiling array

研究代表者

丸山 史人（MARUYAMA FUMITO）

東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号：30423122

研究成果の概要（和文）：

A群レンサ球菌のゲノムは、GC含量が低いために、転写因子・転写に関わる遺伝子領域の特定が容易ではない。本研究では、cDNAアレイおよびタイリングアレイを用いて、宿主細胞内に侵入した本菌RNAの網羅的な発現解析法の確立を行った。その結果、non-coding RNAは58個にも及んでいた。また、宿主の免疫に対抗して生存するために必要な遺伝子を抽出することができた。その結果、本菌は新規non-coding RNAや機能未知の遺伝子群を利用することにより、多彩な病原性を発揮しているものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Genomic contents of group A streptococci is rich in A or T nucleotides. This causes problem in determination of transcription factors and/or prediction of open reading regions. Firstly, we have established the method to analyze the transcriptome of streptococcal cells inside host eukaryotic cells with cDNA microarray and tiling array. The data obtained from the arrays revealed the existence of 58 novel non-coding RNA and importance of unknown genes to combat with host immune system. These things suggests various pathogenicities of group A streptococci are resulted from these non-coding RNA and hypothetical genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：微生物・感染症学，タイリングアレイ

## 1. 研究開始当初の背景

A群レンサ球菌（Group A Streptococci, GAS）は、ヒトに感染し、咽頭炎、扁桃炎の他、猩紅熱やリウマチ熱、糸球体腎炎を引き

起こす病原菌である。1980年代中期より、劇症型A群レンサ球菌感染症として、非常に侵襲性の強く死亡率の高い疾患を引き起こすことが報告されている。A群レンサ球菌の

ゲノム解析は、現在世界的に積極的に行われており、多くの病原因子の機能が明らかとなりつつあるが、臨床的に非常に多彩な疾患を引き起こすにもかかわらず、GAS のどの因子がどのような機構で同疾患を引き起こすのかについては、明らかとなっていない。また、この GAS と宿主との相互作用に関する分子機構についても未知の部分が多く、これを明らかにしていくことが本細菌の病原性の解明に加えて、本感染症にたいする新たな診断方法や、予防法を開発する上で非常に重要であると考えられる。しかし、A 群レンサ球菌のゲノム解析の結果では、咽頭炎分離株と劇症型分離株では染色体上に存在する遺伝子にはほとんどバリエーションは認められないことから (Nakagawa et al., 2003)、ファージ由来などの機能未知の遺伝子あるいはレギュレーター遺伝子による既知の病原因子の発現の変化が病態の発現に関わっていると考えられる。マイクロアレイを用いた遺伝子発現系は国内外のグループで既知の病原遺伝子やレギュレーター遺伝子について解析がされているが、それらの研究では既知の遺伝子についての報告に限られている (Miyoshi-Akiyama et al., 2006, Beyer-Sehlmeyer et al. 2005, Graham et al., 2002)。

そこで、本研究では、既に申請者らが作成している cDNA アレイによる発現プロファイルを元に、培養細胞あるいはマウス感染系を用いて、感染時の遺伝子発現プロファイルを作成し、発現制御系、特に既知の 2 成分制御系だけでなく、RNA による遺伝子発現制御系を、全染色体を網羅する高密度タイリングアレイを作成することにより明らかとすることを目的とした。

## 2. 研究の目的

### (1) 平成 20 年度

A 群レンサ球菌については既に M3 型全 ORF を網羅する cDNA アレイを作製し、予備実験として通常の液体培地で培養した本菌を用いてマイクロアレイデータの解析方法を確立している。また、ゲノムデータベースから等間隔のタイル状に抜き出した塩基配列を検出用プローブとして搭載している DNA チップ、即ちタイリングアレイの設計・作製を行い、予備実験データを用いて膨大なデータの解析方法についてもほぼ確立した。そこで、さらに口腔レンサ球菌の代表的な菌であり、かつ GAS の近縁種である *Streptococcus mutans* (UA159 株に引き続き、現在大阪大学を中心としたグループにより新規に NN2025, NKN01 株についてゲノム解析が進められている) の情報を用いて cDNA マイクロアレイを設計し、遺伝子発現のプロファイリングを行った。これらの

cDNA アレイを用いた実験系では、ヒト口腔粘膜由来細胞を用いて感染時での遺伝子発現プロファイルおよびマウス感染系を用いたプロファイルを解析することにより、感染時に特異的に発現する遺伝子、特に遺伝子発現の転写に関わる遺伝子群を同定することを目標とした。また、転写発現調節遺伝子の ChIP-on-chip 解析を行うために、タグを付加した転写因子の共発現系を構築するとともに、病原性に大きく関与することが知られている two-component system の response regulator をノックアウトした株を構築した。

### (2) 平成 21 年度

平成 19 年度に作成したタイリングアレイを用いて cDNA アレイの結果から得られた遺伝子発現量の定量化を行い、real-time PCR で妥当性を評価した。特に、cDNA アレイでは検出のできない RNA による転写・発現制御システムの解析はタイリングアレイを使用しない限りは検出が不可能なために、遺伝子間領域の発現をタイリングアレイを用いた遺伝子発現量の定量化および ChIP-on-chip, two-component system のノックアウトした株の系を用いて感染系での評価を行い、感染状態での遺伝子発現に必要な因子の同定を試みた。

病態に関わる細菌種の遺伝子発現制御システムの解明は、病原微生物の病原性解明への重要な糸口となる。様々な菌種のゲノム情報が明らかとなり情報処理により比較ゲノムが可能となった現在では、これらの比較ゲノム情報から属として保存されている遺伝子領域あるいは発現機構を解析することが可能となっている。しかし、対象としているレンサ球菌属 (genus *Streptococcus*) では病原性細菌の中でも比較的 GC 含量が低いために、大腸菌や枯草菌のゲノム解析から得られる様々な転写因子・転写に関わる遺伝子領域の特定が容易ではなく、それ故にゲノム解析以前の情報から得られている転写因子を中心に解析が進められている。そのため、本研究では、タイリングアレイを用いて、ゲノム上にコードされる遺伝子の発現領域を決定すると同時に、既存の cDNA アレイを用いた解析から感染状態で得られる発現プロファイルを元に、病態の発現に関わる転写因子群を解明するという点に特色がある。この研究で得られる結果は、レンサ球菌属の発現様式を明らかとするだけでなく、創薬標的の同定、新規遺伝子の発見、発症メカニズムの解明につながると考えられる。

## 3. 研究の方法

### (1) 平成 20 年度

#### ① タイリングアレイの設計・製作

既に作製済みの A 群レンサ球菌 (当研究室

でゲノム解析を行った SSI-1 株)に加えて、ミュータンスレンサ球菌と、既知のゲノム配列について、タイリングアレイの設計を行った。特に遺伝子間領域での翻訳されない RNA 領域やプロモーター領域の解析についてもバイアスがかからないように、1ゲノムにつき約 14 万プローブで全領域をカバーする Tm 値の等しい 50-75 塩基のオリゴをおよびランダムオリゴをデザインした。マイナス鎖の配列についても RNA の発現を定量的に解析するために、30 塩基ごとに全領域をカバーするオリゴを設計する。このオリゴアレイの作製はニンプルジェン社に委託した。

## ② ミュータンスレンサ球菌の cDNA アレイの制作

*S. mutans* のゲノム情報は現在データベースに登録されている UA159 株および現在申請者らが解析を進めている日本由来 2 株の配列情報を元に作成した。上記で得られた ORF 情報を基に全 ORF (*S. mutans* 2200 個) のクローニングを PCR 法で行う。得られた PCR クローンを用いて全 ORF をカバーするマイクロアレイを作製した。

## ③ cDNA アレイを用いた細胞培養感染系での遺伝子発現プロファイリング

A 群レンサ球菌では既に cDNA アレイを作成し、予備実験で解析方法が確立済みのため、このアレイを使用して発現プロファイリングを行った。口腔や咽頭から感染するレンサ球菌は、初発は上皮細胞に付着することにより感染が成立する。そのため、培養上皮細胞あるいは咽頭粘膜由来の初代培養系を用いての感染実験を行った。この感染実験では、培養細胞に菌を感染させ、経時的に RNA を抽出するが、レンサ球菌属からの RNA の抽出は技術的には細胞壁の破壊と宿主細胞の RNA のコンタミネーションの除去が必要である。具体的には、感染細胞を低張液で破碎したのちに、すぐに RNA 保護剤を用いて分解を防いだ後に、酵素により菌体の細胞壁を溶解・ガラスビーズを用いた細胞壁の破壊をおこなった。さらに、宿主 RNA の除去を行った後に、菌由来の RNA を Cy3 (非感染細胞) および Cy5 (感染細胞) でラベルした後に競合的にハイブリダイゼーションを行ってスキャナーを用いて検出し、解析した。

## ④ 発現プロファイルから得られた同一転写遺伝子群の選定

得られた発現プロファイルより、感染時に同一の発現プロファイルの遺伝子群を選定した。これらの遺伝子群の転写部位の配列を抽出し、共通の配列パターンの有無、あるいは既知の転写因子の結合部位の有無、上下流の転写調節遺伝子の有無について解析した。

## ⑤ ChIP アッセイ

新たに転写因子あるいは調節遺伝子の候補となった遺伝子あるいは既知の遺伝子についてはリコンビナントタンパクを大腸菌発現系にて精製する。既知の遺伝子については ChIP アッセイにより結合の確認を、また新規の遺伝子については得られた配列情報を元に結合の有無について確認した。

## ⑥ タイリングアレイの評価

新たに作成したタイリングアレイは、細胞評価系ではなく、培養状態での菌から抽出した RNA を用いて cDNA アレイデータ、Northern hybridization との比較により、機能評価を行う。また定量性については real-time PCR との比較を行った。

## (2) 平成 21 年度

### ① タイリングアレイを用いた制御性 RNA の解析

レンサ球菌を含む低 GC 含量の微生物では、その配列の特異性から制御性 RNA が遺伝子発現の制御に関わっていることが予測される。しかし、現時点ではこれらの情報は得られていないために、遺伝子間領域の配列情報を中心に作成したタイリングアレイを用いてその有無について検討を加えた。遺伝子間領域でゲノムの + 鎖あるいは - 鎖で、特に発現が認められる領域であり、かつ ORF の存在がない領域については制御性 RNA が存在することが示唆されるため、その配列での RNA 状態の立体構造の予測を行い、これらをデータベース化した。さらに、この領域の欠失株を作成して、遺伝子発現を既存の cDNA アレイを用いて発現に変化のある遺伝子群を同定して、制御性 RNA によって発現が支配されている遺伝子群を網羅的に解析した。さらに、得られた遺伝子破壊株を用いて上記に示した細胞培養系を用いて、細胞への付着・侵入能、細胞内での増殖能について検討を行い、病原性の発現にどのように関わるのかについて検討を加えた。遺伝子破壊株の作成については、転写因子が必須遺伝子の発現にも関与している可能性があるために、場合によっては IPTG 誘導系の発現制御系を用いた遺伝子破壊株の作製を検討した。

### ② タイリングアレイを用いた Chip-on-chip 解析

平成 20 年度に得られた特徴的な結合をするタンパクについては、作成したタイリングアレイを用いての機能評価を行った。チップ上に固定されたオリゴに対して精製したタンパクを用いてその結合能を評価し、平成 20 年度に推測した配列以外の結合について、ChIP-on-chip 解析を用いて、その他の結合部

位についての解析を行った。

### ③ Two-component system の病原性への関与

レンサ球菌には病原性に大きく影響すると考えられている平均 13 個の two-component system が存在する。細胞感染状態でのこの欠失株と元株の遺伝子発現プロファイルを解析することにより、感染時に response regulator により制御される病原遺伝子群の探索を行った。

### ④ データベースの整備

平成 20 年度、および 21 年度で得られた情報は、(1) 制御性 RNA 情報、(2) ChIP-on-chip 情報による結合部位、(3) two-component system に制御される遺伝子群、の 3 つを中心にデータベースとして研究室での整備を行った。

## 4. 研究成果

細胞内に感染している少数の A 群レンサ球菌の RNA を回収してマイクロアレイで定量的解析を行う系を確立した。そして、A 群レンサ球菌を種々の細胞に感染させ、マイクロアレイにより、オートファジーによる分解が起こる感染後 4 時間まで 1 時間おきに細胞内の A 群レンサ球菌の発現解析を行った。HeLa 細胞に感染した A 群レンサ球菌において、感染後、全ての時間で共通して高い発現を示した遺伝子数は 128 個、咽頭上皮由来の Kyse510 細胞に感染させた場合では 72 個であった。両方の細胞で共通かつ感染前の菌で発現が低かったのは、19 個の遺伝子で、転写制御因子や RNA 結合タンパク質がみられたが、60%程度が未知の遺伝子であった。また、オートファジー欠損細胞内での A 群レンサ球菌の遺伝子発現パターンと比較したところ、リボソームタンパク質のみが野生型の細胞に感染した場合に高い発現を示しており、A 群レンサ球菌のオートファジー存在下での生存に関わっていると考えられた。また、感染前と比較して、感染後 1 時間目に発現を 1.5 倍以上変化させていた遺伝子は全 ORF の 43%に及び、オートファジーによる作用を受けていると考えられる 3, 4 時間目には 10%程度の遺伝子が発現を変化させていた。そして細胞のオートファジーの有無が、同じ感染時間の A 群レンサ球菌の遺伝子発現パターンの変化に大きく影響し、全 ORF の 8%の遺伝子発現に差が生じていた。また、オートファジー欠損型細胞と比較し、オートファジー存在下でのみ発現が上昇する遺伝子が 26 個見られ、この 7 個の遺伝子は、オートファジー欠損型の宿主に感染した場合は発現が 1.5 倍以上減少していた。そのため、リボソームタンパク質を含む 8 個の遺伝子のうち 4 個

についてノックアウト株および plasmid complement 株の作製を行い、機能解析を行った結果、これらの遺伝子が A 群レンサ球菌の細胞内での生存関与していることを確かめることができた。

また、A 群レンサ球菌との比較を行うために、同じ属で同様の原因菌 *S. mutans* NN2025 株のゲノムを新たに解析した。本菌株間での比較、他のレンサ球菌でオーソログス遺伝子の synteny plot 解析およびファージに対する防御機構である CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) を解析した。その結果、NN2025 株のゲノムは、既存の UA159 株とサイズ、塩基配列ともに高く保存されていたが、数十カ所の相同性のない領域が存在し、IS, transposon とともに他菌種から様々な遺伝子を獲得していた。また *S. mutans* でも A 群レンサ球菌同様、複製軸に対するゲノムの大規模な再編成が認められたが、シンテニープロット解析により他種のレンサ球菌間でも 2 株間で X 型のプロットを示した。CRISPR には、*S. mutans* phage M102 の断片が多数取り込まれているだけでなく、他のレンサ球菌ファージ断片も取り込まれていた。さらに 97 株の単離株について CRISPR を調べたところ *mutans* 種内で、分布、repeat 数が大きく異なっていた。すなわち複製軸に対称なゲノムの再編成はレンサ球菌の進化の過程で頻繁に起きており、ニッチによってファージに対する免疫を進化させてきたものと考えられた。さらに A 群レンサ球菌については、発現タイリングアレイ解析を行ったところ、50 以上のもの non-coding RNA や antisense RNA が検出された。さらに CRISPR が A 群レンサ球菌では発現していないことが一因となり、毒素遺伝子をコードする多くのファージがゲノムに取り込まれたと考えられた。また細胞内での A 群レンサ球菌の動態をマイクロアレイでモニタリングした結果、ファージにコードされる未知遺伝子が本菌の細胞内での生存に関与していることが明らかになった。

## 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 3 件)

① C. Aikawa, T. Nozawa, F. Maruyama, K. Tsumoto, S. Hamada, and I. Nakagawa., Reactive oxygen species induced by fibronectin-mediated *Streptococcus pyogenes* invasion trigger apoptotic cell death in infected epithelial cells., Cellular Microbiology, in press., 査読有。

② F. Maruyama, M. Kobata, K. Kurokawa,

K. Nishida, A. Sakurai, K. Nakano, R. Nomura, S. Kawabata, T. Ooshima, K. Nakai, M. Hattori, S. Hamada and I. Nakagawa., Comparative genomic analyses of *Streptococcus mutans* provide insights into chromosomal shuffling and species-specific content., BMC Genomics, 10: 358. (2009), 査読有.

③ F. Maruyama\*, T. Nozawa\*, C. Aikawa, A. Sakurai, and I. Nakagawa. Cost effective DNA sequencing and template preparation from bacterial colonies and plasmids., Journal of Bioscience and Bioengineering, 104: 471-473. (2009), 査読有.

[学会発表] (計 12 件)

① 丸山史人, レンサ球菌属ゲノム情報に基づく種特異的進化機構の解析, 第 83 回日本細菌学会総会, H22.3.27, 横浜.

② 丸山史人, 次世代シーケンサーの基礎と細菌学への応用, 第 3 回細菌学・若手コロセウム, H21.10.26, 宮崎.

③ F. Maruyama, H. Mori, C. Aikawa, T. Nozawa, K. Kurokawa, I. Nakagawa., Species-specific evolutionary strategies revealed from genome and transcriptome of *Streptococcus pyogenes* and *S. mutans*., ProkaGENOMICS 2009, H21.10.4, Goettingen, Germany.

④ H. Mori, F. Maruyama, K. Kurokawa., A visualization tool for comparative community analyses using nearest relatives., ProkaGENOMICS 2009, H21.10.4, Goettingen, Germany.

⑤ 野中里佐・丸山史人・宮本学・黒川顕・増田道明., ビブリオ科細菌における薬剤耐性プラスミド全塩基配列解析とその伝達機構., 日本微生物生態学会., H21.11.21, 広島.

⑥ 森 宙史, 加藤 広海, 堂園 亜由美, 大坪嘉行, 宮腰 昌利, 丸山史人, 豊田 敦, 藤山秋佐夫, 永田裕二, 黒川 顕, 津田 雅孝., 芳香族化合物による土壌攪乱に対するバクテリア群集の環境応答のメタゲノム解析., 細菌学若手コロッセウム., H21.10.26., 宮崎.

⑦ 桜井敦朗, 岡橋暢夫, 中田匡宣, 寺尾豊, 丸山史人, 川端重忠, 大嶋隆., 口腔領域レンサ球菌による宿主上皮細胞への付着侵入と炎症の誘導., 第 18 回 Lancefield レンサ球菌研究会., H21.6.26, 福岡.

⑧ 丸山史人, 大野雅幸, 相川知広, 野澤孝志, 桜井敦朗, 中川一路., *Streptococcus mutans* および *S. pyogenes* ゲノム・トランスクリプトームからみた種分化機構の解明., 日本細菌学会総会, H21.3.12, 名古屋.

⑨ 大野雅幸, 丸山史人, 相川知広, 野澤孝志, 桜井敦朗, 中川一路., A 群レンサ球菌の全ゲノム発現解析に基づく細胞内生存機構の解明, 日本細菌学会総会, H21.3.12, 名古屋.

⑩ 相川知広, 野澤孝志, 大野雅幸, 丸山史人, 中川一路. オートファジー誘導による A 群レンサ球菌感染上皮の細胞死制御機構の解析., 日本細菌学会総会, H21.3.12, 名古屋.

⑪ 野澤孝志, 桜井敦朗, 大野雅幸, 相川知広, 丸山史人, 中川一路, A 群レンサ球菌感染時にオートファジーを誘導する NLR ファミリーと相互作用する宿主因子の機能解析, 日本細菌学会総会, H21.3.12, 名古屋.

⑫ 丸山史人, 大野雅幸, 相川知広, 野澤孝志, 桜井敦朗, 中川一路, *Streptococcus mutans* および *S. pyogenes* ゲノム・トランスクリプトームからみた種分化機構の解明, ゲノム微生物学会, H21.3.5, 東京.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

丸山 史人 (MARUYAMA FUMITO)  
東京工業大学・大学院生命理工学研究科・助教

研究者番号 : 30423122