

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658255

研究課題名(和文) オウム病クラミジアの増殖環を制御する ncRNA のトランスクリプトーム解析

研究課題名(英文) Transcriptional analysis of Chlamydia psittaci in host cells.

研究代表者

大屋 賢司 (OHYA, Kenji)

岐阜大学・応用生物科学部・准教授

研究者番号：50402219

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円

研究成果の概要(和文)：クラミジアは偏性細胞内寄生性を示し、宿主細胞中で性状転換を伴う増殖環を有する。申請課題ではクラミジアの増殖環の制御機構を明らかにすることを目的とし、感染細胞中におけるクラミジアのトランスクリプトーム解析(RNAseq)を行った。偏性細胞内寄生細菌のRNAseqに関する報告は殆ど無かったため、クラミジアRNAの濃縮、rRNAの酵素による分解を行い解析に供したが、ncRNAを含む新規の発現領域は認められなかった。ncRNAの同定という目標達成は出来なかったが、困難であった偏性細胞内寄生細菌のRNA抽出に関して重要な情報を得ることができた。RNAseqは他のプロジェクトで引き続き進行中である。

研究成果の概要(英文)：Chlamydia, an obligate intracellular pathogen, possesses the peculiar developmental cycle involving biological conversion in host cells. In this study, aiming at revealing the regulatory mechanism of Chlamydial developmental cycle, transcriptional analysis (RNAseq) of Chlamydia in host cells was performed. There were few reports about RNA-seq analysis of obligate intracellular pathogens at that time. Prior to the RNA-seq analysis, we attempted enrichment of Chlamydial mRNA and depletion of host/Chlamydial rRNA in samples. Although novel transcribed regions including ncRNA were not identified, we obtained important information regarding about dealing with RNA of obligate intracellular pathogens toward RNA-seq. The RNA-seq of Chlamydia is ongoing in the continuous project.

研究分野：獣医微生物学

キーワード：獣医学 病原細菌 偏性細胞内寄生細菌 クラミジア 細胞内増殖 トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

クラミジアには、医・獣医領域において重要な菌種が多い。しかしながら、サルモネラ等の他種病原細菌に比べ基礎的研究の進展は乏しく、獣医領域において特に重要なオウム病クラミジア *Chlamydia psittaci* に関しては世界的にも研究者が少なく、特に顕著である。その理由として、遺伝子操作系が適応できないこと、及びバイオハザードの問題が挙げられる。そのため、クラミジアにおいては、ゲノム解読及び DNA アレイを用いた遺伝子発現プロファイル解析の有用性が高く他種細菌に先駆けて発表されてきた (Science 282: 754, 1998; PNAS 100: 8478, 2003)。ncRNA による転写制御の概念が生まれ、近年の技術革新により次世代シーケンサー (NGS) を用いたトランスクリプトームにより発現している RNA を網羅的に解析することが可能となった。NGS を用いた細菌のトランスクリプトーム解析に関しては、研究開始当初すでに、リステリア菌、ピロリ菌の報告があった (Nature, 459: 950, 2009; Nature 464: 250, 2010)。早速クラミジアに関してもピロリ菌と同一グループから性器クラミジア *C. trachomatis* トランスクリプトームに関する報告がなされた (Nucleic Acids Res. 38: 868, 2010)が、まだまだ世界の最先端グループによる萌芽期の研究分野であった。

クラミジアは、代謝活性をもたない EB が宿主細胞に侵入後、封入体中で RB へと転換し分裂増殖するという独特の増殖環を有する (図 1)。この増殖環において、EB から RB への転換はクラミジア共通の特徴であるが、RB へ転換するタイミング、封入体の形態などは属・種間において多様である。この多様性は、本菌の多様な宿主域や病態にも関連すると考えられる。近年、真核生物では、蛋白質をコードしない ncRNA による遺伝子発現制御機構の存在が明らかとなってきた。細菌においても、様々な場面における ncRNA の関与が報告され始めている (Nature, 459: 950, 2009; Nature 464: 250, 2010)。そこで、クラミジア増殖環の属・種間における多様性が、ncRNA による遺伝子発現制御機構の違いによるのではと仮定した。

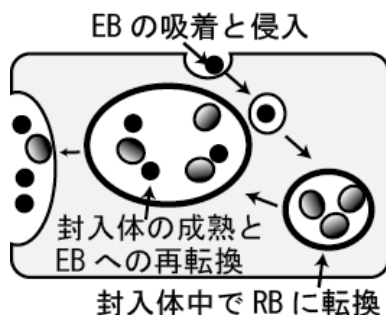


図 1 クラミジアの増殖環

2. 研究の目的

人や動物の病原クラミジアは、人にのみ病原性を示す *C. trachomatis*、人獣共通感染症の原因となる *C. psittaci*、など属・種間で宿主域・病態が異なる。クラミジアは偏性細胞内寄生性を示し、宿主細胞中で感染性粒子である基本小体 (EB) から増殖能を示す網様体 (RB) への性状転換を伴うユニークな増殖環を有する。増殖環は属・種間で多様性が認められ、多様な宿主域や病原性にも関連すると考えられる。申請課題では、クラミジアの増殖環の制御機構を明らかにすることを目的とする。特に non-coding RNA (ncRNA) による遺伝子制御機構に着目した。具体的には、1) 次世代シーケンサー (NGS) を用いたトランスクリプトーム解析によるクラミジア ncRNA の網羅的な同定、2) 同定した ncRNA の標的 RNA 探索や *in vitro* における機能解析、を行う。ncRNA によるクラミジア宿主域決定や病原性制御という新たな概念を創出することを目指した。

3. 研究の方法

(1) クラミジア由来 RNA の調製

用いたクラミジア株は、鳥展示施設における人への集団発生時に分離した *C. psittaci* Mat116 株を用いた (Epidemiol. Infect. 136: 492, 2008)。全ゲノムを研究室で決定しており、ゲノム配列をそのままリファレンスとして用いることができる。*C. psittaci* EB は以下の様に調製した。*C. psittaci* Mat116 株を浮遊型 L 細胞に感染させ、72 時間旋回培養したものを出発材料とし、蔗糖密度勾配遠心法にして精製した。EB の精製度合いは、ギメネット染色により顕微鏡下で確認した。感染細胞由来 RNA は以下の様に調製した。*C. psittaci* Mat116 株を感染多重度 10 で、HeLa 細胞に感染させ、12 時間後に Trizol 試薬を用いて全 RNA を抽出し、感染細胞由来全 RNA とした。また、感染細胞をジルコニアビーズと破砕機 (multi beads shocker) を用いて破壊し、酒石酸カリウムナトリウム密度勾配遠心法により RB 調製を試みた。クラミジア mRNA の濃縮には、oligo dT と細菌 16S rRNA プローブ標識ビーズを用いた。

(2) クラミジア感染細胞の RNAseq 解析

RNA-seq ライブラリーの調製は TruSeq RNA Sample Preparation Kit を用いた。調製した RNA を物理的に断片化し、二本鎖 cDNA を合成した。その後、常法に従い、平滑化・リン酸化処理、アダプターの連結を行い、RNA-Seq ライブラリーとした。細菌および宿主の rRNA 由来ライブラリーの分解を目的として、二本鎖特異的 DNA 分解酵素 (DNS) を以下の様に用いた。RNA-seq ライブラリーを熱変性・再会合させ、再会合した DNA を DNS を用いて分解した。DNS によって分解されなかったものを PCR 増幅し、RNA-seq ライブラリーとした。シーケンスライブラリーは、HiSeq2000 シス

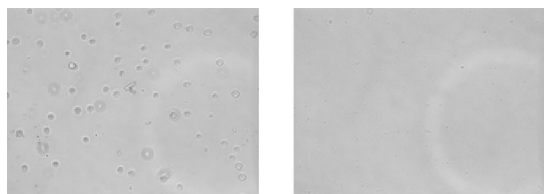
テムに供し、高速シーケンス解析を実施した。得られたリード配列は、Bowtie 0.12.7 を用いて、*C. psittaci* Mat116 株ゲノム配列をリファレンスとしてマッピングした。リード配列の発現量 (RPKM) と新規の発現領域は、ERANGE 3.2 を用いて検討した。新規遺伝子の発現領域の定義は以下の通りとした。1) 少なくとも 20 個以上のリードが含まれる、2) リード間の距離が 40 塩基以内である、3) 定義された遺伝子 (ORF) から 150 塩基以上離れている。

4. 研究成果

(1) クラミジア由来 RNA の調製法の検討

クラミジアは偏性細胞内寄生性細菌であるため、調製する RNA には宿主細胞由来の RNA が多く含まれ、以降の解析の障害となる。サルモネラ属菌や大腸菌のように人工培地上でコロニーを形成するような細菌の RNA-seq 解析は盛んに行われているが、偏性細胞内寄生細菌のものはクラミジアを含め、本報告書執筆時 (2015 年 5 月) においても、数本しかない (Nucleic Acids Res. 38: 868, 2010; Plos One 8: e80597, 2013)。当初より解析に供するサンプルの調製は難航が予想された。始めに感染細胞より全 RNA を抽出した。抽出した全 RNA を Agilent Bioanalyzer を用いて検定したところ、細菌の 16s/23s rRNA のピークは殆ど認められず、このまま RNA-seq 解析に供することができないことが明らかとなった。そこで、細菌由来 RNA を濃縮する市販キットを用いたが、顕著な 16s/23s rRNA ピークの増大は認められなかった。そこで、サンプル中に最も大量に存在する宿主 rRNA 除去を目的に、調製した RNA-seq ライブラリーに DSN 処理を行った。本法では細菌 rRNA も除去できるはずである。DSN 処理後再度調製したシーケンスライブラリーを NGS 解析に供した。

RNA-seq の結果 (2) にて後述) サンプルの調製法を改良することとし、以下の試みを行った。まず、感染細胞をジルコニアビーズを用いて破壊し (図 2)、そこから RB を調整する方法を検討したが、RB は物理的処理に極めて弱く、Agilent Bioanalyzer による検定の結果、解析に耐えうる品質の RNA が確保できなかった。



浮遊型 L 細胞 破壊した
クラミジア感染細胞

図 2: クラミジア感染細胞の破壊
ジルコニアビーズを用いて破壊 (2000 rpm, 60 分) した細胞 (右) より RB 抽出を試みた。

次に、感染細胞から抽出した全 RNA より、oligo dT および真核・原核生物 rRNA プロブ標識ビーズを用いて、宿主 mRNA および宿主・細菌 rRNA を除去する方法が紹介された (Plos One 8: e80597, 2013)。結果、rRNA 画分の減少が認められた。また、幾つかの遺伝子の転写を検討したところ、良好な RNA が抽出できていることが確かめられた。本法により調製した RNA を用いて、他プロジェクトにおいて RNA-seq と ncRNA 同定を進行中である。

(2) クラミジア感染細胞の RNAseq 解析

DSN 処理を行ったシーケンスライブラリーを HiSeq2000 解析に供した。解析に供したのは、精製 EB および感染 12 時間後のサンプル (クラミジアは殆ど RB に転換している) である。得られたリードは、精製 EB、感染細胞共に約 61,000,000 であった。鏡顕下では、宿主細胞の認められなかった精製 EB

	感染細胞の total RNA	精製 EB
総リード数	61,069,109	62,186,708
<i>C. psittaci</i> ゲノムにマッピングされたリード数	7,825,804 (12.8%)	44,221,246 (71.1%)
16s/23s rRNA にマッピングされたリード数	7,689,641 (98.2%)	43,640,002 (98.6%)

表 1 クラミジアの RNA-seq 解析

サンプルであったが、解析の結果 *C. psittaci* ゲノムにマッピングされたリードは 71.1% であった。感染細胞より調製したサンプルでは、*C. psittaci* ゲノムにマッピングされたリードは 12.8% であった。しかしながら、両サンプルとも、マッピングされたリードの約 98% が 16s/23s rRNA にマッピングされた (表 1)。マッピング結果から、遺伝子毎の発現量 (RPKM) を算出した。発現増加 (もしくは減少) の認められた遺伝子 (群) は、既報および個々に遺伝子のリアルタイム PCR による検討と似通ったものであった。2. (2) に示した条件より、新規の発現領域 (ncRNA 領域候補) を検討したが、本解析では全く検出されなかった。

本研究では、最終目的としたクラミジア ncRNA の同定、およびそれによる細胞内増殖の制御機構解明は達成できなかった。しかしながら、世界的にも難航している偏性細胞内寄生細菌のトランスクリプトーム解析に関して、その最大の障壁であるサンプル調製について貴重な情報を得ることができた。現在改良した方法を用いて調製サンプルを用いて、別プロジェクトにてトランスクリプトーム解析を展開している。

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 4 件)

Ohtani A, Kubo M, Shimoda H, Ohya K,
Iribe T, Ohishi D, Endoh D, Omatsu T,
Mizutani T, Fukushi H, Maeda K, Genetic and
antigenic analysis of *Chlamydia pecorum*
strains isolated from calves with diarrhea,
J. Vet. Med. Sci., 査読有り、2015、e-pub
Feb 27、DOI: 10.1292/jvms.14-0585

福土秀人、オウム病、公衆衛生情報、査読
無し、Vol. 44、2014、pp.20-21

福土秀人、大屋賢司、オウム病、小児科、
査読無し、Vol. 54、2013、pp. 57-63

Fukushi H, Yamaguchi T, Yamada S, Complete
genome sequence of equine herpesvirus type
9、査読有り、J. Virol., Vol. 86、2012、
pp. 13822、DOI: 10.1128/JVI.02607-12

〔学会発表〕(計 3 件)

大屋賢司、福土秀人、オウム病の理解と制
御に向けたとりくみ～ゲノム情報を利用し
た診断法開発と実態調査。戦略的研究基盤形
成支援事業「人獣共通感染症の戦略的国際疫
学研究の推進と若手研究者の実践的育成」平
成 24 年度シンポジウム(招待講演)、2012
年 12 月、日本大学生物資源科学部(藤沢市・
神奈川県)

大屋賢司、黒田誠、関塚剛史、奥田秀子、
安藤秀二、福土秀人、動物クラミジアを検出
する LAMP 法の開発、第 154 回日本獣医学会、
2012 年 9 月、岩手大学(盛岡市・岩手県)

福土秀人、大屋賢司、奥田秀子、オウム病
クラミジアに関する現状と展望、第 30 回日
本クラミジア研究会、2012 年 9 月、国立感染
症研究所(新宿区・東京都)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大屋 賢司(OHYA Kenji)
岐阜大学・応用生物科学部・准教授
研究者番号: 50402219

(2) 研究分担者

福土 秀人(FUKUSHI Hideto)
岐阜大学・応用生物科学部・教授
研究者番号: 10156763

(3) 連携研究者

()