

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15129

研究課題名(和文)ヘリコバクターピロリ新規エフェクターRNAの探索

研究課題名(英文)Exploratory research of Helicobacter pylori effector RNAs

研究代表者

三室 仁美(Mimuro, Hitomi)

東京大学・医科学研究所・准教授

研究者番号：80396887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、Helicobacter pyloriの新規RNAエフェクター分子を明らかにする目的で、H. pyloriがコードするBacterial small RNA (sRNA)を同定し、宿主細胞へ注入される可能性のあるRNAを精査した。次世代シーケンサー解析により、H. pyloriのsRNAを同定し、菌体内発現量を定量的PCRにより精査した。さらに、同定したsRNAのいくつかは、菌体細胞外分泌外膜小胞(OMV)に特異的に濃縮され、宿主細胞へ移行する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：To discover novel effector RNAs of Helicobacter pylori, we analyzed H. pylori-coding small RNAs (sRNAs) and identified RNAs having potential to be translocated from bacteria to host cells. Comprehensive RNA-seq data of H. pylori were generated by next generation sequencers, and the expression levels of sRNA were determined by quantitative PCR to identify sRNA candidates. Moreover, some of the sRNAs were specifically condensed in bacterial outer membrane vesicles, indicating that the particular sRNAs possess capacity to be translocated from H. pylori into the host cells.

研究分野：細菌学

キーワード：細菌 感染症

1. 研究開始当初の背景

H. pylori は、ヒトの胃粘膜に持続感染を引き起こす病原細菌であり、胃炎、消化性潰瘍、胃 MALT リンパ腫、胃ガンの発病と関連する。本菌の *cag* pathogenicity island (*cag* PAI) 遺伝子群にコードされている IV 型分泌装置 (Type IV secretion system, TFSS) 構成成分と、この装置を介して感染宿主細胞内に直接分泌される唯一の菌体エフェクタータンパク質 CagA は本菌の病原性に重要であることが基礎および臨床的知見から示唆されている。申請者らは以前から、感染時の CagA の作用に着目して研究を行っており、CagA が宿主細胞内で結合する多様な分子群と下流シグナルカスケード (Mimuro, H. et al., 2002, Mol Cell; Suzuki, M, Mimuro, H., et al., 2005, JEM; 2009, Cell Host & Microbe)、さらには感染宿主生体内での CagA 活性として重要な、感染胃上皮細胞のターンオーバー破綻による長期感染メカニズム (Mimuro, H. et al., 2007, Cell Host & Microbe; 2009, Bioessays) を解明し、CagA の宿主転写活性の攪乱が、本菌の病原性を制御していることを明らかにしてきた。

しかしながら、感染による NF- κ B などの転写活性変動に関する報告は多数あるが、CagA やその他の既知病原因子だけでは活性の全てを説明できないことから、未知のエフェクターの存在が想定されている。申請者らを含め多くの研究者がこれまでに宿主に移行する菌体タンパク質や DNA の網羅的解析を試みているものの、本菌の病巣形成の一端を担うに値する活性を持つ新規エフェクターの報告は未だない。さらに、TFSS は、植物病原細菌アグロバクテリウムによる T-DNA の宿主細胞への注入装置として同定されていることから、TFSS はタンパク質のみならず、核酸成分の注入装置としての機能が想定された。しかしながらこれまでに RNA の細胞内注入の報告はない。

近年のゲノム科学進歩により、高等生物から *H. pylori* などの細菌に至るあらゆる生物のゲノムから転写された RNA には、mRNA, rRNA, tRNA のみではなく、膨大な種類のタンパク質をコードしない non-coding RNA (ncRNA) が存在することが明らかになった。特にヒト ncRNA のうち 20-25nt の一本鎖 RNA である microRNA (miRNA) は、全ゲノムの 6

割程度の発現を制御していると考えられている。申請者らは *H. pylori* の慢性感染が宿主の microRNA (miRNA) の発現に影響を及ぼし、発がんリスクとなることを見出している (Kiga K., Mimuro, H. et al., 2014, *Nature commun*)。

ヒト miRNA の活性責任領域は 7nt 程度と極小さいために、相同配列を含む菌体 ncRNA が存在する可能性が十分予想されること、また、今まで菌体の RNA が宿主に移行するか否かの報告はないことから、*H. pylori* の新規 RNA エフェクターの同定を発意した。

2. 研究の目的

本研究では、感染時に宿主応答を攪乱させる作用を有する、未知の *H. pylori* エフェクター分子を明らかにする目的で、次の研究を実施した。

- (1) *H. pylori* small RNA (sRNA) 候補分子の同定。
- (2) 候補 RNA の菌体外分泌機構の解明。

3. 研究の方法

(1) sRNA の同定

ATCC43504 株の RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いたディープシーケンシング解析に供した。同定した sRNA 候補は、さらに、予測された sRNA 配列をもとに、ノーザンブロッティングおよびリアルタイム PCR 法を行い、ATCC43504 株に発現する sRNA を確認した。

(2) ジギトニン溶解法による RNA 抽出

宿主細胞に注入される菌体 RNA を同定するために、*H. pylori* 感染胃上皮細胞株 AGS をジギトニン含有緩衝液で処理し、内在する RNA を抽出した。

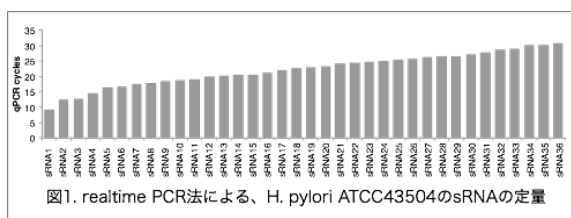
(3) 菌体細胞外分泌外膜小胞 OMV (outer membrane vesicle) に含まれる sRNA の検出

H. pylori の培養上清を既報 (Irving, Mimuro et al., Cell Host Microbe, 2014) に従い超遠心分離により OMV 画分を調製した。リアルタイム PCR 法を行い、OMV で濃縮されている sRNA を同定した。

4. 研究成果

(1) *H. pylori* small RNA (sRNA) 候補分子の同定

当初は *H. pylori* の RNA の宿主細胞移送を網羅的に調べるために、*H. pylori* を感染させた胃上皮由来細胞株に内在する RNA を、ジギトニン溶解法により抽出し、RNA のディープシーケンシングを行い、宿主に注入されている RNA 群を特定することを予定していた。しかしながら、ジギトニン溶解法の際には細胞に付着した菌体由来の RNA の混入が多く、さらには注入される菌体 RNA が少量であることから、宿主細胞の RNA も混在するサンプルから、細胞内に注入された菌体由来 RNA を網羅的手法により検出することは困難であった。そこでまず、菌体そのものの sRNA の発現を網羅的にディープシーケンシングにより解析することとした。次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンス解析の結果、*H. pylori* ATCC43504 株において、約 20 種類の新規 sRNA を含む 86 種類の sRNA を検出・同定することができた。そのうち、intergenic region から転写される 36 の sRNA について、菌体内発現量を、定量的 PCR により精査して、発現量の多い sRNA を同定した (図 1)。



(2) 菌体細胞外分泌外膜小胞 OMV (outer membrane vesicle) に含まれる sRNA の検出

同定した候補菌体 sRNA の菌体外分泌様式を同定するために、菌体細胞外分泌外膜小胞 OMV (outer membrane vesicle) に含まれる sRNA の検出を行った結果、候補 sRNA のうちのいくつかは OMV に高濃度に含まれることが明らかになった。そこで菌体培養液から調製した OMV を、各種ヒト胃上皮細胞株やマクロファージと共培養したのちに、細胞画分中に含まれる sRNA を定量的 PCR により定量した結果、目的の菌体 sRNA はいくつかの細胞株に取り込まれることが判明した。現在、候補菌体 sRNA の欠損変異株作製を完了したため、当該 sRNA が感染時に宿主細胞に及ぼす影響を解析予定である。

(3) sRNA-X 結合タンパク質の同定

同定した sRNA が OMV に濃縮される機構を解明するために、当該 sRNA に MS2 tag を結合させた分子を作製し、結合する菌体タンパク質をプロテオーム解析に供した結果、特異的に結合する菌体分子を同定した (図 2)。今後これらの分子の作用機序を解析する。

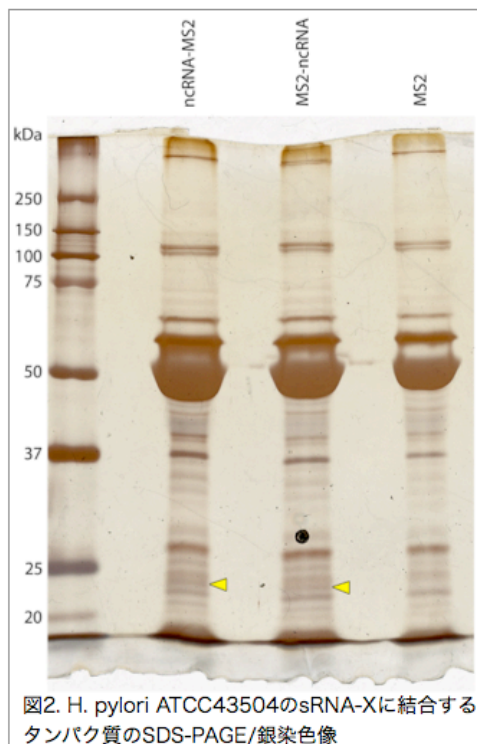


図2. *H. pylori* ATCC43504のsRNA-Xに結合するタンパク質のSDS-PAGE/銀染色像

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 1 件)

- ① Kubota-Aizawa S, Ohno K, Kanemoto H, Nakashima K, Fukushima K, Uchida K, Chambers JK, Goto-Koshino Y, Mimuro H, Watanabe T, Sekizaki T, Tsujimoto H. Epidemiological study on feline gastric *Helicobacter* spp. in Japan. J Vet Med Sci.、査読有、2017 May 18;79(5):876-880. doi: 10.1292/jvms.16-0567. Epub 2017 Mar 26.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 氣賀恒太郎、朱勃、木下遼、真田貴人、

三室仁美：“小さなRNAによるピロリ菌生存戦略”第90回日本細菌学会総会.
2017年3月19-21日. 仙台国際センター
展示棟 (仙台)

- ② 氣 駕 恒 太 朗、朱 勃、三 室 仁 美：
“Identification of sRNAs controlling
respiratory chain in *Helicobacter
pylori*” 第89回日本細菌学会総会. 2016
年3月23-25日. 大阪国際交流センター
(大阪)

[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

三室 仁美 (MIMURO, Hitomi)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号：80396887

(2) 研究分担者

氣 駕 恒 太 朗 (KIGA, Kotaro)
自治医科大学・医学部・講師
研究者番号：90738246

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし