

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K11627

研究課題名(和文) 低分子RNAによる細菌病原性調節機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the regulatory mechanisms for bacterial virulence with small RNAs.

研究代表者

森崎 弘史 (Morisaki, Hirobumi)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：30317581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：感染性心内膜炎の主要な原因菌であるStreptococcus sanguinisを対象とし、その発症に関わる細菌の病原性調節機構について低分子RNA(sRNA)に着目して解析した。S. sanguinisのsRNAの一種であるcsRNAの欠損株を作製して調べたところ、型線毛オペロンを構成する遺伝子のひとつであるpilTの発現がcsRNAによって負に制御されることが明らかになった。さらにcsRNA欠損株ではバイオフィーム形成能が上昇していた。以上の結果はS. sanguinisのcsRNAが外部環境の変化などに対応してpilT等を制御し病原性の発現を調節するという可能性を示唆した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、様々な薬剤耐性菌の増加が報告されており、新たな感染症治療法の開発は重要な課題である。しかし、従来の病原菌の殺滅を目的とするような方法では耐性菌の出現は避けられず、新たな視点に立った治療法の開発が必要である。本研究は細菌の排除ではなく病原性の発現を抑制する方法の開発を目指し、細菌の病原性発現機構の解析を行った。口腔常在菌の一種で、血流中では病原性を発揮するStreptococcus sanguinisにおける解析の結果、低分子RNAが病原性の発現に重要な働きをすることが明らかとなった。この研究成果は低分子RNAを標的とした新たな感染症治療法の開発の基盤となり、きわめて意義深いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We targeted Streptococcus sanguinis, which is the main causative agent of infective endocarditis, and analyzed the regulatory mechanism of pathogenicity of the bacteria, focusing on small RNA (sRNA). We constructed a strain lacking csRNA, which is a type of sRNA of S. sanguinis, to examine the function of csRNA, and it became clear that the expression of pilT, which is one of the genes constituting the type IV pili operon, is suppressed by csRNA. Furthermore, the biofilm-forming ability was increased in the csRNA-deficient strain. These results suggest that the csRNA of S. sanguinis may regulate pilT in response to the changes in the external environment and regulate the expression of pathogenicity of the bacteria.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：Streptococcus sanguinis csRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、多剤耐性緑膿菌、バンコマイシン耐性黄色ブドウ球菌、多剤耐性アシネトバクターなど様々な薬剤耐性菌の増加が報告されており、薬剤耐性菌増加への対策は喫緊の課題となっている。そのため、政府は2016年4月に抗菌薬の使用量を2020年度までに現在の3分の2へと減らす数値目標を盛り込んだ行動計画を公表した。このような状況から、新たな感染症治療法を開発することはきわめて重要な課題である。しかし、従来の抗菌薬のように病原菌の殺滅を目的とするような方法では、突然変異や外来遺伝子の獲得による耐性菌の出現や、薬剤の使用による耐性菌の選択と増加を避けることは不可能である。また、メタゲノム解析の結果などからも常在微生物叢の様々な機能が示唆されるようになり、常在微生物叢を温存しながら感染症を治療できるような新しい視点に立った感染症治療法の開発が必要と考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では細菌を排除するのではなく、細菌の病原性の発現を抑制する方法の開発を目指すこととした。細菌が体外から体内に感染する際には、菌体表層の構造、エネルギー代謝や宿主の免疫に抵抗する因子など、様々な遺伝子の発現を変化させることで環境変化に適応すると考えられている。細菌の環境適応メカニズムについては、細菌の情報伝達システムである二成分制御系に関するものを中心として様々な研究がなされてきたが、その理解が十分に進んだとは言えない状況である。近年、細菌の環境適応メカニズムの1つとして低分子RNA (small RNA; sRNA) による調節方法が注目され始めている。sRNAは標的配列と塩基対を形成することでmRNAの安定性やタンパク質合成を制御するなど、多様な機能を持ち、新規創薬の標的分子としてきわめて有用と考えられる(図1)。本研究課題では口腔常在菌が主な起因菌となる感染性心内膜炎を対象とし、その発症に関わる細菌の病原性調節機構についてsRNAに着目して解析し、新たな治療法開発の基盤となる知見を得ることを目的とした。

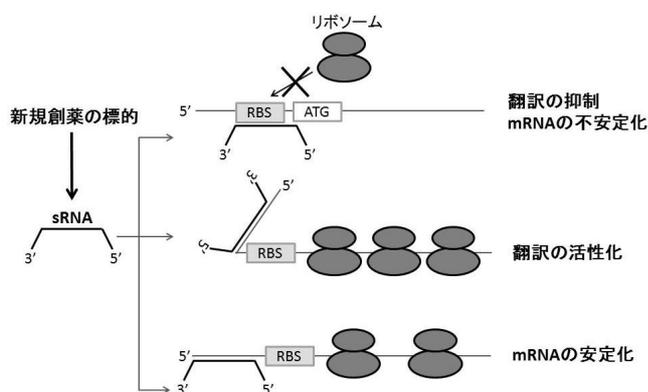


図1 sRNAの機能の多様性

### 3. 研究の方法

#### (1) *Streptococcus sanguinis* 変異株の作製

*S. sanguinis* ATCC10556株のCiaRH欠損株(ciaRH株)及びcsRNA1-1, 1-2欠損株(csRNA1-1, 2株)はスペクチノマイシン耐性遺伝子カセットを用いた相同組換えにより作製した。CiaRH相補株(ciaRH + pCiaRH) csRNA相補株(csRNA1-1, 2 + pVA1-1, 2)及び、変異型csRNA発現株(csRNA1-1, 2 + pVA1-1 mut-1, 2, 3)は当該遺伝子を組み込んだシャトルベクター(pVA838)を用いて作製した。

#### (2) csRNAの標的遺伝子の検索

csRNAの標的遺伝子は、*S. sanguinis* SK36株のゲノムデータベースをもとに、TargetRNA2 (<http://cs.wellesley.edu/~btjaden/TargetRNA2/>)を用いて検索した。

#### (3) リアルタイム RT-PCR

*S. sanguinis* の菌体をビーズ破碎後、RNA 抽出、cDNA 合成を行い、リアルタイム PCR で各遺伝子の発現量を定量した。

#### (4) レポーターアッセイ

*S. sanguinis* の *piIT* 遺伝子のレポーター株はルシフェラーゼ (NanoLuc) 遺伝子とテトラサイクリン耐性遺伝子カセット (Tet<sup>r</sup>) で *piIT* 遺伝子を置換することで作製した (図 2)。

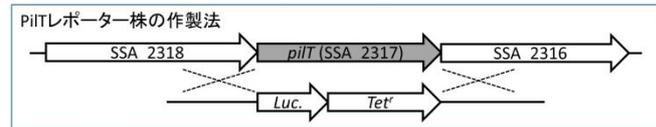


図 2 *piIT* レポーター株の作製法

ルシフェラーゼ活性はレポーター株の培養液に発光基質を添加し、Glomax-Multi+Detection System で測定した。

#### (5) ゲルシフトアッセイ

*piIT* mRNA (WT, mut) と DIG 標識 csRNA1-1 (WT, mut-2) は試験管内転写反応で作製した。RNA 結合反応の後、ゲル電気泳動で分離し、メンブレンに転写した。DIG 標識 RNA のシグナルは抗 DIG 抗体を用いて検出した。

#### (6) バイオフィーム形成能

*S. sanguinis* の野生株及び変異株を 1% ショ糖含有 BHI 液体培地に接種し、24 well プレートで培養した。培養後、プレートの底面に付着した菌と培養液中の浮遊菌をそれぞれ回収して濁度を測定し、以下の式で付着率を算出した。

$$\text{付着率 (\%)} = 100 \times \frac{\text{付着菌の濁度}}{(\text{付着菌の濁度} + \text{浮遊菌の濁度})}$$

### 4. 研究成果

*S. sanguinis* の *ciaRH* 株を用いて調べたところ、csRNA1-1, 1-2 はいずれも *ciaRH* による発現制御を受けることが明らかになった。*S. sanguinis* の csRNA1-1, 1-2 の標的分子を TargetRNA2 で検索したところ、

型線毛オペロンを構成する遺伝子のひとつである *piIT* が最上位でヒットした。

このことから *piIT* の mRNA が csRNA1-1, 1-2

による調節を受けることが強く示唆された。そこで、この *piIT* の発現と csRNA1-1 との関係を検討したところ、csRNA1-1, 2 株では *piIT* mRNA 量が有意に上昇し、*piIT* の代わりにルシフェラーゼを発現するレポーター株を用いたレポーターアッセイでも同様の結果であった (図 3)。

これらの結果から csRNA1-1, 1-2 は *piIT* mRNA の発現を負に制御すると考えられた。また、変異型 csRNA1-1 発現株を用いたレポーターアッセイの結果、*piIT* mRNA のリボソーム結合領域 (SD 配列) 周辺の配列と相補性のある塩基を変異させた場合 (csRNA mut-1, 2) csRNA1-1, 2 株と同程度までルシフェラーゼ活性が上昇した (図 4)。この結果を基にゲルシフトアッセイを行ったところ、csRNA1-1 と *piIT* mRNA とが特異的に結合すること、また csRNA mut-1, 2 では結合能がほぼ消失することが明ら

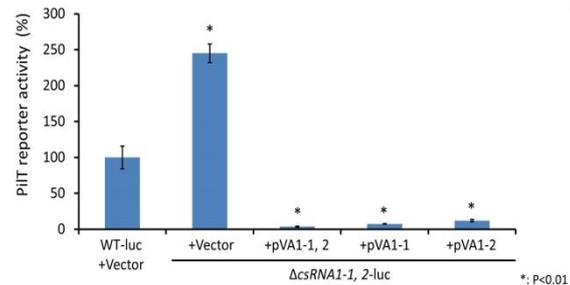


図 3 csRNA による *piIT* の発現抑制

*piIT* mRNA と csRNA1-1 との結合領域 (推定) と、その変異体の塩基配列

```

piIT mRNA          -14 -AGGGGAAGUUUAGGAUG- 3
                    | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
csRNA1-1 (WT)      47 -ACUUUUUCAAAUCCUAAA- 31
mutant-1 (mut-1)   -ACUUUUUUGGGUUUAAA-
mutant-2 (mut-2)   -ACUUUUUUGGGUCCUAAA-
mutant-3 (mut-3)   -ACUUUUUCAAAAUUUAAA-
  
```

\* 下線部はSD配列 (推定)、青字は *piIT* の開始コドン、赤字は変異させた塩基を示す。

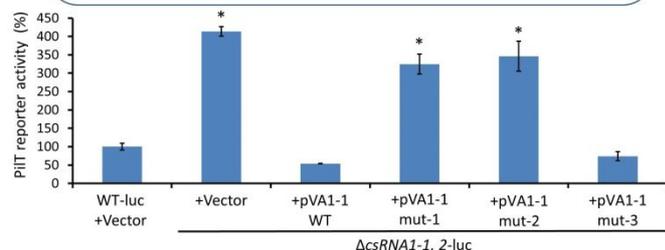


図 4 csRNA と *piIT* の結合配列

かとなった。これらの結果は csRNA1-1, 1-2 が piIT mRNA の SD 配列近傍に結合し、その結果として SD 配列へのリボソームの結合阻害と、それに伴う piIT mRNA の不安定化が起こり、PiIT の発現が抑制されるという可能性を示唆した。さらにレンサ球菌の病原性の重要な指標のひとつであるバイオフィーム形成能について検討したところ、csRNA1-1, 2 株では野生株と比較してバイオフィーム形成能が有意に上昇した(図5)。以上の結果から、CiaRH によって発現誘導された csRNA1-1, 1-2 は piIT mRNA の SD 配列近傍に結合し、その結果、リボソームの結合阻害とそれに伴う piIT mRNA の不安定化が起こり、PiIT の発現低下とバイオフィーム形成能の低下が引き起こされると考えられた。

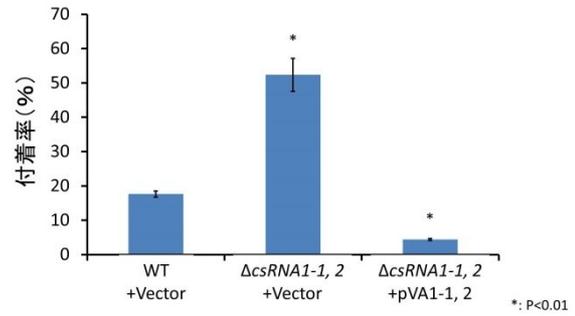


図5 csRNAによるバイオフィーム形成抑制

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 0件）

1. 著者名 Ota Chiaki, Morisaki Hirobumi, Nakata Masanobu, Arimoto Takafumi, Fukamachi Haruka, Kataoka Hideo, Masuda Yoshiko, Suzuki Noriyuki, Miyazaki Takashi, Okahashi Nobuo, Kuwata Hiroataka	4. 巻 86
2. 論文標題 Streptococcus sanguinis Noncoding cia-Dependent Small RNAs Negatively Regulate Expression of Type IV Pilus Retraction ATPase PilT and Biofilm Formation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 e00894 - 17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/IAI.00894-17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 森崎 弘史
2. 発表標題 Streptococcus sanguinisのcsRNAによる 型線毛pilT遺伝子の発現制御
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 大田 千明、森崎 弘史、有本 隆文、深町 はるか、片岡 嗣雄、増田 宜子、鈴木 規元、宮崎 隆、桑田 啓貴
2. 発表標題 Streptococcus sanguinisのノンコーディングcsRNAは 型線毛pilT遺伝子の発現を負に制御し、バイオフィルム形成を抑制する
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Chiaki Ota, Hirobumi Morisaki, Takafumi Arimoto, Haruka Fukamachi, Hideo Kataoka, Yoshiko Masuda, Noriyuki Suzuki, Takashi Miyazaki, Hiroataka Kuwata
2. 発表標題 Regulation of type IV pilus retraction ATPase pilT by small noncoding RNAs in Streptococcus sanguinis
3. 学会等名 第65回国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大田 千明、森崎弘史、有本隆文、深町はるか、片岡嗣雄、鈴木規元、増田宜子、宮崎隆、桑田啓貴
2. 発表標題 Streptococcus sanguinisのcsRNAの機能解析
3. 学会等名 第338回昭和大学学士会例会
4. 発表年 2017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	深町 はるか (Fukamachi Haruka)  (10433799)	昭和大学・歯学部・助教  (32622)	
研究分担者	桑田 啓貴 (Kuwata Hirotaka)  (60380523)	昭和大学・歯学部・教授  (32622)	

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
---------	---------