

令和元年6月24日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19551

研究課題名(和文)細菌外膜小胞への選択的物質導入機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanisms of substance-selective introduction into bacterial outer membrane vesicles

研究代表者

三室 仁美(Mimuro, Hitomi)

大阪大学・微生物病研究所・准教授

研究者番号：80396887

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ピロリ菌実験株のゲノム解析とRNA-seq解析、および菌体内と外膜小胞(OMV)中に含まれる菌体small RNA(sRNA)の定量解析から、OMVと菌体ではsRNA発現パターンが異なることを見出し、OMVに多く存在するsRNAを同定した。さらに当該sRNAに直接結合する菌体タンパク質を同定した。欠損変異株の解析から、当該sRNAはOMV量を制御する可能性を見出した。また、当該sRNAに結合するガイド分子候補タンパク質は、菌体の生存に必須のタンパク質であ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

本研究の結果、菌体sRNAを選択的にOMV内へ封入するメカニズムの存在が明らかとなり、OMV量の制御に関与するsRNAを同定した。今後、菌体がその生理的目的に応じてOMV内容物を能動的に変動させる分子機構が明らかになれば、新たな細菌生理学や細菌病原性研究の展開が可能となる。さらには、選択的OMV封入機構を利用した、新たな画期的ドラッグデリバリー技術への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have analyzed whole genome sequence and RNA-seq of the experimental strain of *Helicobacter pylori* and found that *H. pylori* showed different expression patterns of bacterial small RNA (sRNA) in the outer membrane vesicles (OMVs) compared with that in whole bacterial cells. We identified an sRNA, which presented in relatively large amounts in OMV compared with whole bacterial cells. Furthermore, we identified a bacterial protein directly bound to the sRNA. Based on the analysis of the phenotype of the sRNA-deletion mutant, we found possibilities that the sRNA controlled the amounts of OMV. Moreover, we found the protein, which directly bound to the sRNA, was essential for the existence of the bacteria.

研究分野：細菌学

キーワード：細菌外膜小胞 sRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Helicobacter pylori (*H. pylori*, ピロリ菌)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。しかし既知病原因子だけではピロリ菌感染で誘導される活性の全てを説明できないことから、RNA の移行など未知のエフェクターの存在が考えられる。

グラム陰性細菌の多くは外膜小胞 (Outer membrane vesicles, OMV) と呼ばれる、細胞外もしくは細胞表面に付着したコンポーネントを産生することが近年明らかにされている。OMV は、直径約 50-200 nm の膜に囲まれた球状体であり、膜タンパク質、LPS、リン酸化脂質、いくらかのペリプラズム構成成分などから構成され、菌体表面から生育とともに放出され、哺乳動物細胞の分泌小胞であるエクソソーム (exosome) との共通性が明らかになりつつある。

エクソソームは機能的分子群を距離の離れた細胞外コンパートメントや組織に伝達することから、類似する細菌 OMV も、細菌から別の細菌や宿主真核細胞へ伝達する一般的な分泌経路と認識されつつある。エクソソーム中には RNA も安定的に含まれることが知られていることから、ピロリ菌の OMV にも菌体 *small* RNA (sRNA) が含まれる可能性が考えられる。しかしながら、菌体 OMV が機能的 RNA を選択的に内包する分子機構の存在はまったく未知である。

2. 研究の目的

本研究では、ピロリ菌の細胞外膜小胞 (OMV) へ、特異的菌体 sRNA を選択的に導入する菌体ガイド分子の同定を目指し、次の研究を実施することを目的とした。

(1) OMV 特異的 sRNA の同定

OMV および菌体全体の sRNA 量を定量的 PCR により比較定量する。

(2) OMV 特異的 sRNA に結合するガイド分子候補の選定

当該 sRNA と結合する OMV 中のタンパク質を、MS2 aptamer 結合によるプルダウン法により同定する。

(3) 当該 sRNA とガイド分子候補の機能評価

sRNA およびガイド分子候補を欠失するピロリ菌を作出し、作出した菌体の一般的性状を確認する。さらに、OMV 中の標的 sRNA 封入効率を精査する。

3. 研究の方法

(1) OMV の調製

ピロリ菌培養上清を 2,500 × g、20 分間遠心分離を行い、上清を孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターにて濾過後、100,000 × g、2 時間、4 °C にて超遠心分離を行った。得られた沈殿を懸濁して OMV 画分とした。

(2) RT-PCR 解析

ピロリ菌もしくは精製 OMV から、ISOGEN (NIPPON GENE) を用いて total RNA 画分を得た。miScript II RT kit (QIAGEN) により逆転写反応により得た cDNA を鋳型として、特異的プライマーを用いて THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) によりリアルタイム PCR を行った。それぞれの RNA の相対定量は、23S rRNA を内源性コントロールとして算出した。

(3) 欠損変異株作製

目的遺伝子のコード領域の上流および下流域約 500 bp 程度をカナマイシン耐性遺伝子カセットの 5' 端および 3' 端にそれぞれ結合した DNA 断片を構築し、ピロリ菌にエレクトロポレーションにて導入し、カナマイシン耐性により変異株を選定した。

4. 研究成果

(1) 細菌外膜小胞 (OMV) に多量に存在する sRNA-X の同定

我々はこれまでの研究で、ピロリ菌感染症のヒト類似症状を示すスナネズミに感染して高頻度に胃炎を惹起する ATCC43504 株のゲノム解析および RNA-seq 解析を行い、新規 sRNA を含む 80 以上の sRNA を見出している。ピロリ菌 OMV を分離し、画分内に含まれる sRNA を、定量的 PCR により定量した結果、菌体中よりも OMV に特に多量に存在する sRNA-X を

同定した。

- (2) 同定 sRNA-X の欠失組換えピロリ菌の作出
同定した sRNA-X の欠失組換えピロリ菌を、カナマイシン耐性遺伝子挿入により作出した。作製した菌株について、*in vitro* で以下に示す基本的性状を精査した結果、sRNA-X 欠損変異株は野生株と同様の結果を示した。菌体の *in vitro* 培養での増殖能を、培養液濁度の経時的測定により調べた。培養液中での鞭毛による運動能を、顕微鏡観察により確認した。胃上皮細胞株 AGS への菌体の付着能を、感染細胞の免疫染色像観察により確認した。AGS 細胞への菌体付着能を、感染細胞溶解液の菌体タンパク質 UreA の Western blot による検出で確認した。
- (3) sRNA-X 欠損変異株の OMV 量測定
作製した sRNA-X 欠損変異株を電子顕微鏡観察に供した結果、野生株よりも菌体外の OMV 量が增大している像が観察された。OMV 画分に含まれる OMV 量を、リポポリサッカライド (LPS) の定量により精査したところ、sRNA-X 欠損変異株由来 OMV 画分では野生株由来画分よりも多量の LPS が検出され、当該欠損変異株での OMV 量増大が明らかとなった。
- (4) sRNA-X 結合菌体タンパク質の同定
MS2 aptamer を結合させた標的 sRNA-X を *in vitro* translation 法により作製した。*In vitro* にてピロリ菌菌体溶解液と混合したのちに、MS2 aptamer と MS2 coat protein のアフィニティを利用した MS2 coat protein 結合 maltose binding protein を用いたビーズによるプルダウンアッセイに供し、SDS-PAGE にて展開後、sRNA-X に特異的に結合するタンパク質バンドを確認した。LC-MS/MS 解析の結果、MS2 aptamer 結合 sRNA-X に特異的に結合する、ガイド分子候補タンパク質 Y を同定した。
- (5) sRNA-X 結合 RNA の同定
作製した sRNA 欠損変異株等の RNA-seq 解析を行い、sRNA が特異的に結合する可能性のある sRNA を同定した。
- (6) ガイド分子候補タンパク質 Y の欠損変異株作製
同定したガイド分子候補タンパク質 Y の欠損変異株作製を試みたが、組換え欠損変異ピロリ菌は生育しないために欠損変異株を得ることができなかった。

これらの結果から、sRNA-X は、OMV に存在するのみならず、菌体の OMV 量を制御しうる可能性が示唆された。また、sRNA-X に結合するガイド分子候補タンパク質 Y は、菌体の生存に必須のタンパク質であることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10 件)

Morita N, Umemoto E, Fujita S, Hayashi A, Kikuta J, Kimura I, Haneda T, Imai T, Inoue A, Mimuro H, Maeda Y, Kayama H, Okumura R, Aoki J, Okada N, Kida T, Ishii M, Nabeshima R, Takeda K. GPR31-dependent dendrite protrusion of intestinal CX3CR1+ cells by bacterial metabolites. *Nature*. 566(7742):110-114, 2019, 査読有
doi: 10.1038/s41586-019-0884-1

Nosaka K, Uchiyama R, Tadano K, Endo Y, Hayashi M, Konno H, Mimuro H. Thiamin transport in *Helicobacter pylori* lacking the de novo synthesis of thiamin. *Microbiology*. 165(2):224-232, 2019, 査読有
doi: 10.1099/mic.0.000765

Otsubo R, Mimuro H, Ashida H, Hamazaki J, Murata S, Sasakawa C. Shigella effector IpaH4.5 targets 19S regulatory particle subunit RPN13 in the 26S proteasome to dampen cytotoxic T lymphocyte activation. *Cell Microbiol*. 21(3):e12974, 2019, 査読有
doi: 10.1111/cmi.12974

Tashima T, Nagatoishi S, Caaveiro JMM, Nakakido M, Sagara H, Kusano-Arai O, Iwanari H, Mimuro H, Hamakubo T, Ohnuma SI, Tsumoto K. Molecular basis for governing the morphology of type-I collagen fibrils by Osteomodulin. *Commun Biol*. 19;1:33, 2019, 査読有
doi: 10.1038/s42003-018-0038-2

Wada Y, Takemura K, Tummala P, Uchida K, Kitagaki K, Furukawa A, Ishige Y, Ito T, Hara Y, Suzuki T, Mimuro H, Board PG, Eishi Y. *Helicobacter pylori* induces somatic mutations in TP53 via overexpression of CHAC1 in infected gastric epithelial cells. *FEBS Open Bio*. 8(4):671-679, 2018, 査読有
doi: 10.1002/2211-5463.12402

Ohishi T, Masuda T, Abe H, Hayashi C, Adachi H, Ohba SI, Igarashi M, Watanabe T, Mimuro H, Amalia E, Inaoka DK, Mochizuki K, Kita K, Shibasaki M, Kawada M. Monotherapy with a novel intervenolin derivative, AS-1934, is an effective treatment for Helicobacter pylori infection. *Helicobacter*. 23(2):e12470, 2018, 査読有

doi: 10.1111/hel.12470

Hirukawa S, Sagara H, Kaneto S, Kondo T, Kiga K, Sanada T, Kiyono H, Mimuro H. Characterization of morphological conversion of Helicobacter pylori under anaerobic conditions. *Microbiol Immunol*. 62(4):221-228, 2018, 査読有

doi: 10.1111/1348-0421.12582

Suzuki S, Suzuki T, Mimuro H, Mizushima T, Sasakawa C. Shigella hijacks the glomulin-clAPs-inflammasome axis to promote inflammation. *EMBO Rep*. 19(1):89-101, 2017, 査読有

doi: 10.15252/embr.201643841

Kikuchi H, Mimuro H, Kuribayashi F. Resveratrol strongly enhances the retinoic acid-induced superoxide generating activity via up-regulation of gp91-phox gene expression in U937 cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 95(1):1195-1200, 2018, 査読有

doi: 10.1016/j.bbrc.2017.11.161.

Kubota-Aizawa S, Ohno K, Fukushima K, Kanemoto H, Nakashima K, Uchida K, Chambers JK, Goto-Koshino Y, Watanabe T, Sekizaki T, Mimuro H, Tsujimoto H. Epidemiological study of gastric Helicobacter spp. in dogs with gastrointestinal disease in Japan and diversity of Helicobacter heilmannii sensu stricto. *Vet J*. 225:56-62, 2017, 査読有

doi: 10.1016/j.tvjl.2017.04.004

〔学会発表〕(計4件)

三室仁美、ハイパーミューテーターを用いたピロリ菌持続感染メカニズムの解析、第24回日本ヘリコバクター学会学術集会、2018年

黒田英介、小椋義俊、林哲也、三室仁美、Helicobacter pylori 持続感染における菌体表面糖鎖変動メカニズムの解析、第91回日本細菌学会総会、2018年

Eisuke Kuroda, Hitomi Mimuro、Functional variation of BabA on persistent infection by Helicobacter pylori、第23回日本ヘリコバクター学会学術集会、2017年

Sayaka Hirukawa, Hitomi Mimuro、Implication for H. pylori anaerobic cultures as prophylactic vaccine antigens、第23回日本ヘリコバクター学会学術集会、2017年

〔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

<http://mimuro-lab.biken.osaka-u.ac.jp/>

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。