

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15143

研究課題名(和文) リボヌクレアーゼによるRNA分解・切断を介した病原性の制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of pathogenicity through RNA degradation and processing by ribonuclease

研究代表者

尾花 望 (Nozomu, Obana)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号：00722688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：RNAを介した制御は素早い環境適応に重要な役割を果たすと考えられるが、本属菌の病原性との関連や、RNA切断・分解の詳細な分子機構の知見は少ない。本研究では、ウェルシュ菌のバイオフィルムの形態変化にはmRNA切断を介した転写後制御が重要であることを見出した。本菌では高ストレス耐性を有するバイオフィルム形成に必須である細胞外マトリクスの生産は温度によって制御される。細胞外マトリクス遺伝子は集団中に不均一に発現しており、また、温度に応答したマトリクス遺伝子の不均一な発現にはリボヌクレアーゼYを介した転写後mRNA切断が必要であることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウェルシュ菌は国内での患者数第3位の食中毒細菌であり、本菌が環境中に生残するメカニズムの解明は重要である。本菌は宿主の体温より低い温度に応答して自らを繊維状タンパク質(細胞外マトリクス)で覆い、強固な集団(バイオフィルム)を形成することで、酸素および抗生物質に対する耐性を向上させることを発見した。このバイオフィルム形成にはRNAの切断を介した遺伝子発現制御機構が必須であることを見出した。バイオフィルムマトリクスやRNA制御に着目したバイオフィルム除去法および食中毒や感染症の予防・治療法の開発が期待される。

研究成果の概要(英文)：Cells in biofilms dynamically adapt to surrounding environmental conditions, which alters biofilm architecture. The obligate anaerobic pathogen *Clostridium perfringens* shows different biofilm structures in different temperatures. Here we find that the temperature-regulated production of extracellular polymeric substance (EPS) is necessary for morphological changes in biofilms. We identify BsaA proteins as an EPS matrix necessary for pellicle biofilm formation at lower temperature. We show that bsaA operon is bimodal, and the bsaA-ON population size is increased at a lower temperature. We find that bsaA-ON cells cover bsaA-OFF cells attaching to the bottom surface. This heterogeneity is regulated by the cleavage of the pila2 mRNA by RNase Y. As temperature is an environmental cue, *C. perfringens* may modulate EPS expression to induce morphological changes in biofilm structure as a strategy for adapting to interhost and external environments.

研究分野：分子微生物学

キーワード：RNA リボヌクレアーゼ バイオフィルム 温度応答 細胞外マトリクス ウェルシュ菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

RNA を介した制御は素早い環境適応に重要な役割を果たすと考えられるが、本属菌の病原性との関連や、RNA 切断・分解の詳細な分子機構の知見は少ない。研究代表者はウェルシュ菌においてリボヌクレアーゼによる RNA の切断・分解が付着活性やバイオフィーム形成、毒素遺伝子発現に重要であることと、感染シグナルである温度変化 (25°C→37°C) に応答した付着因子 (IV 型線毛) の発現上昇に必要であることを示した。つまり、RNA 切断・分解制御は本属菌における感染時の付着・病原性調節に寄与すると示唆される。

2. 研究の目的

本研究は「RNA 切断・分解」に着目して、病原性関連遺伝子発現調節の分子機構の解明を目指す。本研究によって本属菌の温度依存的な宿主細胞への付着の制御や病原性発揮機構の理解につながる。

3. 研究の方法

(1) ウェルシュ菌のバイオフィーム形態変化機構の解明

37°C 及び 25°C 条件下におけるバイオフィーム形態及び構造を解析した。バイオフィーム構造観察には共焦点レーザー顕微鏡を用いることによってバイオフィームの 3 次元構造を観察した。さらに、トランスクリプトーム解析によって、温度に応答した遺伝子発現変化を解析した。また、トランスポゾンミュータントライブラリを用いて、バイオフィーム形態変化に必要な遺伝子をスクリーニングした。

bsaA 遺伝子発現の 1 細胞レベルの温度応答性解析には嫌気蛍光タンパク質を用いたプロモーターレポーター株を作製した。レポーター遺伝子の 5'UTR を安定な構造に置き換えることで、蛍光タンパク質発現を向上させることにより、嫌気環境下での安定したイメージングが可能となった。

(2) 転写後制御を介したバイオフィーム形態制御

ウェルシュ菌ゲノム情報をもとに推定 RNase をコードする遺伝子を探索し、これらの遺伝子欠損株を作成した。生育に必須である RNase に関してはラクトース誘導型のプロモーターをゲノム中の標的遺伝子の上流に組み込むことでノックダウン株を作成した。これらの株を嫌気レポーターシステム、遺伝子発現解析および顕微鏡によるバイオフィーム形態観察に用いた。

4. 研究成果

(1) ウェルシュ菌のバイオフィーム形態変化機構の解明

ウェルシュ菌バイオフィーム形態は温度変化 (37°C から 25°C) に応答して【付着型: 37°C】から【ペリクル (膜) 型: 25°C】へと劇的に変化する (Obana *et al.*, 2014)。バイオフィームは細菌の抗生物質及び酸化ストレス耐性に関与することから、ウェルシュ菌バイオフィームの形態変化は本菌の病原性との深い関連が示唆される。温度依存的にバイオフィーム形態に関与する遺伝子を同定するために、温度依存的に変動する遺伝子群をトランスクリプトーム解析によって同定した。さらにトランスポゾンスクリーニングによって温度依存的なバイオフィーム形態変化に必要な遺伝子を同定した。上記の 2 つの解析で共通し、*bsaA* (CPE0515) が選抜された。*bsaA* 5 欠損株を作製し、バイオフィーム形態を観察したところ、*bsaA* 欠損株は「ペリクル型」バイオフィーム形成能を失い、温度に関わらず「付着型」バイオフィームを形成した。*bsaA* は細胞外タンパク質をコードしており、本タンパク質は細胞外で自己重合し多量体を形成することを明らかにした。以上のことから、CPE0515 タンパク質多量体は細胞外で繊維状の細胞外マトリクスとして機能し、バイオフィームの形状を付着型から薄膜型へと変化させることが示された。

bsaA 遺伝子発現の 1 細胞レベルの温度応答性を調べるために、蛍光レポーター株 (*P_{sipW}evoglow*) を作製した。GFP や DsRed など多くの蛍光タンパク質はその蛍光発色団の形成に酸素を必要とするため、嫌気環境下におけるイメージングにはこれらの蛍光タンパク質は使用することができない。我々は蛍光発色団形成に酸素を必要としない嫌気蛍光タンパク質の発現系を改変することで、バイオフィーム中のウェルシュ菌の 1 細胞レベルの遺伝子発現を解析することに成功した。共焦点レーザー顕微鏡の観察と FACS 解析の結果、集団中には *bsaA* 遺伝子発現細胞と非発現細胞の 2 種の亜集団が存在することが明らかとなった。集団中に占める *bsaA* 発現細胞数は温度が低下 (37°C→25°C) すると増加した。さらにバイオフィーム中における *bsaA* 遺伝子発現の空間分布を可視化したところ、*bsaA* 遺伝子“非”発現細胞は物質表面に付着し、*bsaA* 遺伝子発現細胞はその上部に局在していた。ウェルシュ菌が生産する *bsaA* タンパク質 (繊維状の細胞外マトリクス) は酸素や抗生物質耐性に寄与することから、EPS 遺伝子発現の不均一性は、集団中の役割分担を生み出すと考えられた。

(2) 転写後制御を介したバイオフィーム形態制御

ウェルシュ菌集団中では物質表面に付着した細胞は *bsaA* 遺伝子を発現していなかった。つまり、本菌では、表面へ付着することと、*bsaA* を生産することは逆相関している。これより、ウェルシュ菌で付着因子であることが報告されている IV 型線毛に着目することとした。研究代表者の先行研究の結果より、IV 型線毛遺伝子の発現は *bsaA* 遺伝子発現と逆相関していることが明らかとなっている。また、IV 型線毛遺伝子 *pilA2* を過剰発現させるとペリクル型バイオフィーム形成を阻害した。以上のことから、IV 型発現制御がバイオフィーム形態の決定に重要な因子であると考えられた。*pilA2* は IV 型線毛の繊維構造の主成分である pilin をコードしており、他の IV 型線毛生合成遺伝子とともにオペロンを形成している。先行研究の結果より、温度の上昇に反応して *pilA2* mRNA 5' UTR (非翻訳領域) の切断が誘導されることより mRNA が安定化し、発現量が上昇することを明らかにしている。またこの *pilA2* mRNA の切断と安定化にはエンド型リボヌクレアーゼである RNase Y を介することを見いだした。一般的に RNase は mRNA の分解に関与しているが、*pilA2* mRNA の場合は RNase Y よって切断されることによってその蓄積量が上昇し、PilA2 タンパク質量が増加する珍しい例であった。切断された *pilA2* mRNA の 5' 末端配列の二次構造予測の結果、ステムループ構造が予測されたことから、RNase Y による *pilA2* mRNA の切断はステムループ構造の形成を介して mRNA の安定化を引き起こしていると考えられる。RNase Y による *pilA2* mRNA の切断および安定化は感染シグナルである温度変化 (25 °C→37 °C) によって活性化される。つまり本菌は温度 (感染) 依存的に RNA 切断を制御し、IV 型線毛産生 (宿主への付着) を制御していることが明らかとなった。*pilA2* mRNA の切断と安定化を阻害したところ、*bsaA* 遺伝子発現細胞の亜集団の割合が温度に依存せず固定されたことから、このような *pilA2* の転写後制御は集団の不均一性の調節にも関与することが予想された。

以上の研究内容をまとめ、国際雑誌 *npj Biofilms and Microbiomes* に投稿し、受理された。

ウェルシュ菌はアミノ酸生合成遺伝子を持たないため、宿主細胞を毒素で破壊することによって生育に必要な栄養を獲得している。宿主体内温度である 37 °C では IV 型線毛を産生し、宿主細胞に付着する生き方を選択していると考えられる。一方で、25 °C は宿主外に排出された状況であると考えられ、細胞外マトリクスを産生することによって酸素などの環境ストレスから逃れていると予想される。ウェルシュ菌は外界の温度を通して周囲の環境を認識し、集団中の亜集団の割合をコントロールして、環境適応していると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nagasawa Ryo, Yamamoto Tatsuya, Utada Andrew S., Nomura Nobuhiko, Obana Nozomu	4. 巻 86
2. 論文標題 Competence-Stimulating-Peptide-Dependent Localized Cell Death and Extracellular DNA Production in <i>Streptococcus mutans</i> Biofilms	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e02080-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/AEM.02080-20	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 -

1. 著者名 Abeysinghe Gayan, Kuchira Momoka, Kudo Gamon, Masuo Shunsuke, Ninomiya Akihiro, Takahashi Kohei, Utada Andrew S, Hagiwara Daisuke, Nomura Nobuhiko, Takaya Naoki, Obana Nozomu, Takeshita Norio	4. 巻 3
2. 論文標題 Fungal mycelia and bacterial thiamine establish a mutualistic growth mechanism	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202000878
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lsa.202000878	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 -

1. 著者名 Obana Nozomu, Nakamura Kouji, Nomura Nobuhiko	4. 巻 6
2. 論文標題 Temperature-regulated heterogeneous extracellular matrix gene expression defines biofilm morphology in <i>Clostridium perfringens</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 npj Biofilms and Microbiomes	6. 最初と最後の頁 29
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41522-020-00139-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kikuchi Yousuke, Obana Nozomu, Toyofuku Masanori, Kodera Noriyuki, Soma Takamitsu, Ando Toshio, Fukumori Yoshihiro, Nomura Nobuhiko, Taoka Azuma	4. 巻 12
2. 論文標題 Diversity of physical properties of bacterial extracellular membrane vesicles revealed through atomic force microscopy phase imaging	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 7950 ~ 7959
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c9nr10850e	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 -

1. 著者名 Yang Jiayue, Yang Yongshou, Ishii Manami, Nagata Mayuko, Aw Wanping, Obana Nozomu, Tomita Masaru, Nomura Nobuhiko, Fukuda Shinji	4. 巻 35
2. 論文標題 Does the Gut Microbiota Modulate Host Physiology through Polymicrobial Biofilms?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME20037	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 -

1. 著者名 Inaba Tomohiro, Obana Nozomu, Habe Hiroshi, Nomura Nobuhiko	4. 巻 35
2. 論文標題 Biofilm Formation by <i>Streptococcus mutans</i> is Enhanced by Indole via the Quorum Sensing Pathway	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME19164	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 -

1. 著者名 Prasad Manoj, Obana Nozomu, Sakai Kaori, Nagakubo Toshiki, Miyazaki Shun, Toyofuku Masanori, Fattaccioli Jacques, Nomura Nobuhiko, Utada Andrew S.	4. 巻 34
2. 論文標題 Point Mutations Lead to Increased Levels of c-di-GMP and Phenotypic Changes to the Colony Biofilm Morphology in <i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 104 ~ 107
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME18151	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 -

1. 著者名 Nakanishi Yasuhiro, Yamamoto Tatsuya, Obana Nozomu, Toyofuku Masanori, Nomura Nobuhiko, Kaneko Akihiro	4. 巻 33
2. 論文標題 Spatial Distribution and Chemical Tolerance of <i>Streptococcus mutans</i> within Dual-Species Cariogenic Biofilms	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 455 ~ 458
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/jsme2.ME18113	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11件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nozomu Obana, Nobuhiko Nomura
2. 発表標題 Environmentally regulated cell fate shapes biofilm of <i>Clostridium perfringens</i>
3. 学会等名 Clostpath 11 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾花 望、中村幸治、野村暢彦
2. 発表標題 Temperature-dependent Type IV pili regulation via RNA processing
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾花 望
2. 発表標題 ウェルシュ菌のバイオフィルム中の役割分担
3. 学会等名 細菌学若手コロッセウム in Okayama 2018
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾花 望、田伏羲彦、野村暢彦
2. 発表標題 嫌気性食中毒細菌集団中の役割分担
3. 学会等名 第52回ビブリオシンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾花 望、野村暢彦
2. 発表標題 バイオフィルム（集団）形成が生み出す微生物活性
3. 学会等名 化学工学会第50回秋季大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾花 望
2. 発表標題 微生物の集団形成による環境適応
3. 学会等名 2018年度べん毛研究交流会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾花 望、中尾龍馬、泉福英信、野村暢彦
2. 発表標題 グラム陽性細菌による メンブレンヴェシクルの能動的な産生機構と ワクチンプラットフォームへの応用
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾花 望
2. 発表標題 腸内細菌が産生するメンブレンベシクルによる 免疫誘導とワクチンプラットフォームへの応用
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾花 望
2. 発表標題 細菌が能動的に産生する多様な細胞外膜小胞
3. 学会等名 第7回日本細胞外小胞学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾花 望
2. 発表標題 転写後制御を介した不均一性の制御
3. 学会等名 グラム陽性菌ゲノム機能会議
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nozomu Obana, Yoshihiko Tabushi, Nobuhiko Nomura
2. 発表標題 Cell fate determination and environmental adaptation in Clostridium perfringens biofilms
3. 学会等名 The 8th ASM Conference on Biofilms（国際学会）
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----

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