

平成 21 年 4 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 B

研究期間：2007～2008

課題番号：19390468

研究課題名（和文） タイリングアレイを用いたレンサ球菌転写制御因子の解析

研究課題名（英文） Tiling array analysis of transcriptional regulators in genus *Streptococcus*

研究代表者

浜田 茂幸 (HAMADA SHIGEYUKI)

日本大学・大学院総合科学研究科・教授

研究者番号：60028777

研究成果の概要：

A 群レンサ球菌 (Group A *Streptococcus*: GAS) は初発感染として咽頭炎や扁桃炎、さらに続発性疾患として猩紅熱やリウマチ熱、糸球体腎炎を引き起こす病原菌である。A 群レンサ球菌は、上皮細胞に侵入した後、エンドソームによる分解を回避し細胞質へと移行する。一部は、新たな自然免疫として機能することが示されたオートファジーにより除去される。このように細胞内の宿主の防御系から逃避することが、A 群レンサ球菌の多彩な臨床像を示す 1 つの理由となるのではないかと考えられる。そこで、本研究では A 群レンサ球菌が、宿主の防御機構を回避し、細胞内で生存する機構を明らかにすることを目的として、感染時における A 群レンサ球菌の全ゲノムレベルでの発現解析を経時的に行った。その結果、真核細胞内に存在している A 群レンサ球菌の RNA を抽出・増幅した後に、マイクロアレイ解析を行った結果と定量的 PCR との間に相関があるプロトコールを確立することが出来た。次に、A 群レンサ球菌の発現変化に着目して、発現解析を行った。感染前の A 群レンサ球菌と比較して、感染後 1 時間目においてその発現を 1.5 倍以上変化させていた遺伝子数は全 ORF の 43% (1861 個のうちの約 800 個) に及んでおり、オートファジーによる作用を受けていると考えられる 3, 4 時間目においても 10% 程度の遺伝子が発現を変化させていた。興味深いことに、細胞のオートファジーの有無が、同じ感染時間の A 群レンサ球菌の遺伝子発現パターンの変化に影響を与えており、全 ORF の 8% の遺伝子発現に差が生じていることがわかった。また、オートファジー欠損型細胞での比較により、オートファジーの存在下でのみ発現が上昇する遺伝子が 26 個見られた。このうちの 7 個の遺伝子 (一本鎖結合タンパク質、インテグラゼ、プラスミド安定化タンパク質、リボソームタンパク質 S21、透過酵素及び未知のタンパク質) は、オートファジー欠損型の宿主に感染した場合は発現が 1.5 倍以上減少していたため、オートファジーに対応して発現を増加させている可能性が考えられた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	9,400,000	2,820,000	12,220,000
2008年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
年度			
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：レンサ球菌、マイクロアレイ、タイリングアレイ、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

広範かつ多種にわたる病原細菌のゲノム計画が世界的規模で推進されている。当初、これらのプロジェクトでは遺伝子情報の解読に重点がおかれてきた。最近ではこれらの情報を基にした機能解析あるいは病原性の解析といった機能ゲノム研究に移行しつつある。口腔の2大疾患の1つである齲蝕は、感染性的色彩の強い疾患であり、その原因が *Streptococcus mutans* を中心とするレンサ球菌によることは多くの報告から明らかであるが、その機能発現メカニズムについては未だ不明な点が多い。また、レンサ球菌種の分類学上の Type species (代表種/分類基準種) であり、かつ咽頭部粘膜が初発感染部位と考えられる A 群レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) は、近年、劇症型 A 群レンサ球菌感染症 (TSLS) の起原因菌として注目を集めている。TSLS は A 群レンサ球菌による重度の敗血症、DIC 様の病態を特徴とし、病態の進行が急激で死亡率も高いため、有効な治療法や予防法の確立が求められている。しかし、A 群レンサ球菌のゲノム解析の結果では、咽頭炎分離株と劇症型分離株では染色体上に存在する遺伝子にはほとんどバリエーションは認められず (Nakagawa et al., 2004)、ファージ由来などの機能未知の遺伝子あるいはレギュレーター遺伝子による既知の病原因子の発現の変化が病態の発現に関わっていると考えられる。マイクロアレイを用いた遺伝子発現系は国内外のグループで既知の病原遺伝子やレギュレーター遺伝子について解析がされているが、それらの研究ではあくまで既知の遺伝子についての報告に限られている (Miyoshi-Akiyama et al, 2006, Beyer-Sehlmeyer et al. 2005, Graham et al, 2002)。そこで、本研究では、既に申請者が作成している cDNA アレイによる発現プロファイルを元に、培養細胞あるいはマウス感染系を用いて、感染時の遺伝子発現プロファイルを作成し、発現制御系、特に既知の2成分制御系だけでなく、RNA による遺伝子発現制御系を、全染色体を網羅するタイリング・アレイを作成することにより明らかとすることを目的とする

2. 研究の目的

病態に関わる細菌種の遺伝子発現制御システムの解明は、病原微生物の病原性解明への重要な糸口となる。様々な菌種のゲノム情報が明らかとなり情報処理により比較ゲノムが可能となった現在では、これらの比較ゲノ

ム情報から属として保存されている遺伝子領域あるいは発現機構を解析することが可能となっている。しかし、申請者が対象としているレンサ球菌属 (genus *Streptococcus*) では病原性細菌の中でも比較的 GC 含量が低いために、大腸菌や枯草菌のゲノム解析から得られる様々な転写因子・転写に関わる遺伝子領域の特定が容易ではなく、それ故にゲノム解析以前の情報から得られている転写因子を中心に解析が進められている。そのため、本研究では、タイリングアレイを用いて、ゲノム上にコードされる遺伝子の発現領域を決定すると同時に、既存の cDNA アレイを用いた解析から感染状態で得られる発現プロファイルを元に、病態の発現に関わる転写因子群を解明するという点に特色がある。この研究で得られる結果は、レンサ球菌属の発現様式を明らかとするだけでなく、創薬標的の同定、新規遺伝子の発見、発症メカニズムの解明につながると考えられる。

3. 研究の方法

タイリング・アレイの設計と製作

A 群レンサ球菌・ミュータンスレンサ球菌について、既知のゲノム配列 (A 群レンサ球菌は、分担研究者である中川が明らかとした SSI-1 株および6株) について、タイリング・アレイの設計を行う。特に遺伝子間領域での翻訳されない RNA 領域やプロモーター領域の解析を行うために、遺伝子間領域については、全領域をカバーする 20 塩基のオリゴ、および遺伝子領域では ORF の3カ所についてオリゴを設計して、1ゲノムにつき約 14 万プローブで全ゲノムを網羅する。マイナス鎖の配列についても RNA の発現を確認するために、20 塩基ごとに全領域をカバーするオリゴを設計する。このオリゴチップの設計およびアレイの作成はアフィメトリックス社にて委託する予定である。

ミュータンスレンサ球菌の cDNA アレイの作成

S. mutans のゲノム情報は現在データベースに登録されている UA159 株および現在申請者が解析を進めている日本由来株の配列情報を元に作成する。上記で得られた ORF 情報を基に全 ORF (*S. mutans* 2200 個) のクローニングを PCR 法で行う。得られた PCR クロームを用いて全 ORF をカバーするマイクロアレイを作製する。

3. cDNA アレイを用いた細胞培養感染系での遺伝子発現プロファイリング

A群レンサ球菌では既にcDNAアレイを作成済みのため、このアレイを使用して発現プロファイリングを行う。口腔や咽頭から感染するレンサ球菌は、初発は上皮細胞に付着することにより感染が成立する。そのため、培養上皮細胞あるいは咽頭粘膜由来の初代培養系を用いての感染実験を行う。この感染実験では、培養細胞に菌を感染させ、経時的にRNAを抽出するが、レンサ球菌属からのRNAの抽出は技術的には細胞壁の破壊と宿主細胞のRNAのコンタミネーションの除去が必要である。具体的には、感染細胞を低張液で破碎したのちに、すぐにRNA保護剤を用いて分解を防いだ後に、酵素により菌体の細胞壁を溶解・ガラスビーズを用いた細胞壁の破壊をおこなう。さらに、宿主RNAの除去を行った後に、菌由来のRNAをCy3(非感染細胞)およびCy5(感染細胞)でラベルした後に競合的にハイブリダイゼーションを行ってスキャナーを用いて検出し、解析する。

4. 研究成果

A群レンサ球菌の感染率と細胞内での生存率
A群レンサ球菌の宿主細胞への感染率と、感染後の宿主細胞内での生存率を求めるために、細胞内の細菌数を計測した。その結果、本菌 *S. pyogenes* SSI-1 の細胞への侵入率はHeLa細胞に対しては10%程度、Kyse細胞、MEF細胞に対しては1%程度であった。本菌はKyse細胞と野生型のMEF-Atg5+/+細胞感染後では12時間、HeLa細胞に感染後は24時間まで細胞内に生菌が検出された。オートファジーが欠損しているMEF-Atg5-/-でも同様に時間経過とともに検出される菌数が減少し、12時間以降は検出されなかった。続いて、MEF細胞(Atg5+/+およびAtg5-/-)について、*S. pyogenes* SSI-1 感染後の時間経過による細胞数の変動を計測した。その結果、MEF-Atg5+/+細胞では、菌の感染により細胞数が著しく減少したが、オートファジーが起こらないMEF-Atg5-/-細胞では細胞数の変化が小さく、MEF-Atg5+/+細胞とは異なる結果が得られた ($p < 0.05$)。MEF-Atg5-/-細胞ではオートファジーによるA群レンサ球菌の除去が行われないうちにもかかわらず、宿主細胞内から回収できた菌の数が減少していたことから、*S. pyogenes* SSI-1 はオートファジーによる除去が行われるか否かに関わらず、宿主細胞から脱出していると考えられる。このようにレンサ球菌の細胞内生存率が宿主細胞によって異なる結果が得られることは、*Streptococcus agalactiae* (B群レンサ球菌)を用いた細胞内生存率の計測において、宿主細胞にマクロファージを用いた場合は感染後12時間の時点で感染前の菌数の15%が生きているが、脳血管内皮細胞を用いた場合には同じ時間で0.5%にまで減少するということが

報告されており (Quach, D. *et al.* 2008)、本菌でも同様の傾向が見られた。しかし、同じA群レンサ球菌であっても、本研究と同様に野生型と欠損型のMEF細胞を用いた細胞内生存数の実験を行った場合JRS4株ではその細胞内生存数は異なり、今回の結果ではMEF細胞に感染後3時間目では野生型の細胞を宿主に用いた場合においても、欠損型の細胞を用いた場合においても 1×10^6 cfu から 1×10^2 cfu 程度の菌が生きていたのみだったが、JRS4を用いた場合では 1×10^6 cfu が生存しており (Nakagawa, I. *et al.* 2004)、株によって宿主内における菌の生存率が大きく異なることが明らかとなった。そして、オートファジーが起こる条件下においても、オートファゴソームが確認される感染3時間目以降、24時間程度16まで細胞内において存在が確認されたことから、本菌はオートファジーに対抗して生存するための機構を有していると考えられた。同じA群レンサ球菌のSF310株において、周囲の温度変化やpHに反応してそのゲノムレベルで大きく遺伝子発現を変えることが報告されており (Smoot, L. M. *et al.* 2001; Barnett, T. C. *et al.* 2007)、A群レンサ球菌は、宿主細胞内で用いる遺伝子セットを変えることで適応しているものと考えられる。これまでに結核菌や大腸菌を用いた解析で、菌のmRNA発現量とタンパク質の発現量に相関があることが示され (Wang, R. *et al.* 2005; Cox, R. A. 2007; Sidders, B. *et al.* 2007)、A群レンサ球菌においてもmRNAの発現量を測定することでタンパク質レベルでの関係を調べることができている (Chausse M. A. *et al.* 2008)。すなわち、本菌の細胞内における生存機構を解明するためには、本菌が宿主細胞に侵入した後、経時的に変化する細胞内環境、及びオートファジーの有無によりゲノムレベルでの遺伝子発現の変化を解析することが必要となる。細胞内における本菌のゲノムレベルでの遺伝子発現変化については報告がないことから、特にマイクロアレイを用いた全ORFの発現解析が有効であると考えられる。しかし、本菌は、感染後細胞内の菌数が減少してしまうことから、これまでの方法では困難であった (data not shown)。そこで、本研究では、宿主細胞内に存在する少数の菌からRNAを抽出し、マイクロアレイを行う系の確立を行った。

マイクロアレイ実験系の確立

細胞内に侵入した本菌の遺伝子発現を解析するには、宿主細胞内から本菌のRNAを効果的に抽出する必要がある。しかし、細胞内に少数のみ存在している本菌からRNA抽出し、マイクロアレイ解析を行う方法はこれまでに報告されていない。そこで、本菌と同様に細胞内侵入能を持つ *Mycobacterium tuberculosis* を用いて、宿主細胞に感染している状態の菌

からRNAを回収しているRohde *et al.* (2007)に従ってGTC bufferによる真核細胞由来のRNAを除去する方法を検討した。このGTC bufferは細胞膜、及びRNaseを失活させる作用を持っているが、本菌のようなグラム陽性菌の細胞壁には作用しない (Mangan, J. A. *et al.*

2002)。このbufferを処理させた後に各細胞(4 x 10⁴ cells)と本菌(4 x 10⁶ cfu)の混合試料からRNAを抽出したところ、宿主にHeLa細胞を用いた場合では7.5 mlを、MEF細胞とKyse細胞を用いた場合では15 mlを用いた処理により宿主由来17のRNAをほぼ除くことが出来るとが分かった。そこで、以降は上記のGTC bufferを処理した感染サンプルから、RNAを抽出することとした。本研究においては、上記方法で各サンプルからRNAを抽出し、増幅させた後に逆転写、蛍光標識を行い、マイクロアレイ上のプローブにハイブリダイゼーションを行った。また、本研究におけるマイクロアレイ用サンプルの調製を保証するために、本菌から抽出したRNAを逆転写したサンプルに対してreal time PCRを行った結果と、同じRNAを他のサンプルと同様に増幅させた後逆転写を行い、マイクロアレイプローブにハイブリダイゼーションを行って得られた結果とを比較した。その結果、これらの結果に相関が得られたため (r = 0.76)、今回用いたマイクロアレイ用試料の調製方法および解析方法は (Sidders, B. *et al.* 2007)、抽出したRNAにおける各mRNAの存在比を反映していると考えられる。予備実験として、真核細胞を破碎した後、真核細胞と原核細胞の混合試料からRNAを抽出し、そこから更に真核細胞由来のRNAであるpoly(A) RNAとribosomal RNAを除去することで、本菌のみのmRNAを得る方法も試行した (Miura K. *et al.* 2008)。しかし実際に行った所、原核細胞由来のRNAが、真核細胞のRNAと比較すると少量しか回収できなかったため、採用しなかった (Data not shown)。そのため、RNAを抽出後ではなく、抽出前に宿主と細菌を分取することが、A群レンサ球菌では重要であると考えられる。

今回検討を行った方法、すなわちGTC bufferを用いてRNAを回収し、増幅する定量的なマイクロアレイ解析法は、*Listeria monocytogenes* や *Staphylococcus aureus* のような細胞侵入能を持つグラム陽性菌 (Rich, K. A. *et al.* 2003; Bigham, R. J. *et al.* 2008) においても容易に適用が可能であると考えられることから、幅広い細胞内侵入性のグラム陽性細菌の細胞内動態解析への応用が期待される。

A群レンサ球菌の真核細胞内での遺伝子発現
A群レンサ球菌の宿主細胞内におけるゲノムレベルでの遺伝子発現から生存機構を解明す

るために、*S. pyogenes* SSI-1の宿主細胞内での経時的な応答をマイクロアレイで解析した。そのために感染後1時間から4時間まで1時間おきに、宿主細胞に感染した本菌からRNAを回収し解析した。宿主にはヒト由来の培養細胞 (HeLa, Kyse) を用いた。コントロールには、感染前の対数増殖期 (OD600 = 0.6) に増殖した本菌を用い、感染0時間のサンプルとした。感染1時間目から4時間目まで1時間毎に回収した本菌の遺伝子のうち、各時間において高い発現

18を示したもの上位200個を比較した (200個でその時間に発現している遺伝子総発現量のおよそ60%に相当する発現量)。その結果、HeLa細胞を宿主に用いた際には128個の遺伝子が、Kyse細胞を宿主に用いた際には72個の遺伝子が感染後の全ての時間で共通に高い発現を示していた (表3, 4)。両細胞での結果に共通して発現が高かった遺伝子は52個であったが、特に細胞内での生存に重要な遺伝子を抽出するために、感染0時間でも発現の高かった遺伝子を除外すると19個であった (表5)。感染前後で共通して発現の高かった遺伝子には、リボソームタンパク質 [30Sリボソームタンパク質S17 (SPs0051), S14 (SPs0055), 及び50Sリボソームタンパク質L18 (SPs0058), B (SPs0065) など] や転写制御因子 [転写開始因子IF-1 (SPs0064), Cro/CIファミリーに属する転写制御因子 (SPs0411), DNAポリメラーゼIII (SPs0002) など] が多く見られた。感染後でのみ、高発現を示していた19個のうち、既知のものは酸化還元酵素 (SPs0481), 転写抑制因子 (SPs0601), RNA結合タンパク質 (SPs1286) などであり、14個 (74%) は未知のタンパク質であった。各細胞内で発現が高かった遺伝子についても、HeLa細胞を用いた際の128個中76個 (59.4%), Kyse細胞を用いた際の72個中42個 (58.3%) は未知のタンパク質であった。また、両細胞での結果に共通して細胞内で高い発現を続ける病原遺伝子はなかった。続いて、感染による発現変化を見てみると、感染0時間の本菌と比較して、感染後1時間目においてその発現を0時間と比べて1.5倍以上変化させていた遺伝子数は全ORFの43% (1861個のうちの約800個) に及んでおり、2時間目と比較すると、オートファジーによる作用を受けていると考えられる3時間目、および3時間目と比較して4時間目においても10%程度の遺伝子が発現を変化させていた。全ての感染時間に共通して高い発現を示した遺伝子は、本菌の生存において重要な遺伝子であると考えられる。本菌においては転写、翻訳に関わる遺伝子が他の遺伝子に比べて重要であることが分かった。また、細胞に侵入した後、初期応答段階にあると思われる感染1時間目と比べて2時間目で発現が上昇した遺

伝子を抽出したところ、HeLa 細胞とKyse 細胞を各々宿主とした本菌で共通して発現が増加した遺伝子は80 個であったが、転写・翻訳に関わるものが28 個 (35%) , 更にそのうちの16 個はリボソームタンパク質の遺伝子だった。COG による機能分類がなされている遺伝子 (55 個) に限れば、およそ半分(51%) は転写・翻訳に関するものであったことから、本菌の細胞内生存機構においては転写・翻訳に関わる遺伝子が重要であることが示された(表6)。A群レンサ球菌において、このように病原因子以外の遺伝子が感染に関与している例としては、最近になって炭水化物代謝に関わる遺伝子が知られるようになってきたが (Shelburne, S.A. *et al.* 2008), 今回の結果からも、本菌の感染及び細胞内における生存を理解するためには、これまで病原性への関与がないと考えられてきた細菌の生理機能をさらに解明していくことが重要だと考えられる。

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 8 件) 全て査読あり

1. Maruyama, F., Nozawa, T., Aikawa, C., Sakurai, A., Nakagawa, I. Cost effective DNA sequencing and template preparation from bacterial colonies and plasmids. *J. Biosci. Bioeng.* (2009) 107: 471-473.
2. Lapirattanakul, J., Nakano, K., Nomura, R., Hamada, S., Nakagawa, I., Ooshima, T. Demonstration of mother-to-child transmission of *Streptococcus mutans* using multilocus sequence typing. *Caries Res.* (2008). 42: 466-474.
3. Ogawa, M., Nakagawa, I., Yoshikawa Y., Chakraborty, T., Sasakawa S. *Streptococcus, Shigella* and *Listeria*-induced autophagy. *Method Enzymol.* (2008). In press.
4. Ishimaru A., Yamada, M., Nakagawa I., Sugano, S. Analysis of volatile metabolites from cultured bacteria by gas chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *J. Breath Res.* (2008). In press.
5. Sakurai A, Okahashi, N., Mayuyama, F., Ooshima T., Hamada S., Nakagawa I.

Streptococcus pyogenes degrade extracellular matrix in chodrocyte via MMP-13. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373: 450-454. (2008).

6. Tamai, K., Tanaka, K., Nara A., Yamamoto, A., Nakagawa I., Yoshimori, T., Ueno Y., Shimosegawa T., Sugamura K. Involvement of Hrs in Destruction of Group A *Streptococcus* (GAS): Regulation of Autophagosome Maturation *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360:721-727. (2007).
7. Nakano, K., Lapirattanakul J, Nomura R, Nemoto H, Alaluuua S, Gronroos L, Vaara M, Hamada S. Ooshima T, Nakagawa I. *Streptococcus mutans* Exhibits Clonal Variation as Revealed by Multilocus Sequence Typing. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2616-2625. (2007).
8. Kato T, Kawai S., Nakano K, Inaba H., Kuboniwa M, Nakagawa I., Tsuda K., Omori H, Ooshima, T., Yoshimori T, Amano A. Virulence of *Porphyromonas gingivalis* is altered by substitution of fimbria gene with different genotype. *Cell Microbiol.* 9:753-65. (2007).

[学会発表] (計 11 件)

- 1.野澤孝志 他 A 群レンサ球菌感染時にオートファジーを誘導する NLR ファミリーと相互作用する宿主因子の機能解析
日本細菌学会総会 Mar 09 名古屋
- 2.相川知宏 他 オートファジー誘導による A 群レンサ球菌感染上皮細胞の細胞死制御機構の解析
日本細菌学会総会 Mar 09 名古屋
- 3.丸山史人 他 *Streptococcus mutans* および *S. pyogenes* ゲノム・トランスクリプトームからみた種分化機構の解明
日本細菌学会総会 Mar 09 名古屋

4.大野雅幸 他 A群レンサ球菌の全ゲノム
発現解析に基づく細胞内生存機構の解明
日本細菌学会総会 Mar 09 名古屋

5.丸山史人 他 *Streptococcus mutans* および
S. pyogenes ゲノム・トランスクリプトームから
みた種分化機構の解明
ゲノム微生物学会 Feb 09 東京

6.丸山史人 他 比較ゲノム・トランスクリ
プトーム解析に基づく *Streptococcus mutans* お
よび *S. pyogenes* ゲノム進化機能の解析
特定領域「ゲノム」4領域合同班会議 Sep. 08
兵庫

7.丸山史人 他 比較ゲノム・トランスクリ
プトーム解析に基づく *Streptococcus mutans* お
よび *S. pyogenes* ゲノム進化機能の解析
第2回細菌学若手コロッセウム Aug,
08 神奈川

8.中川一路 他 レンサ球菌のゲノム解析
に基づく進化と多様性獲得機構の解析
日本進化学会 Aug, 08 東京

9.大野雅幸 他 Group A *Streptococcus*
transcriptome dynamics inside human cell
reveals bacterial adaptation and survival against
innate immune system
The 8th Awaji International forum on infection
and immunity Aug, 08 兵庫

10.野澤孝志 他 Identification of minimum
structure of pathogen-associated molecular
pattern and the recognition mechanism in
autophagy induction against group A streptococci

The 8th Awaji International forum on infection
and immunity Aug, 08 兵庫

11.丸山史人 他 比較ゲノム解析に基づく
Streptococcus mutans の進化, 多様化機構の解
明
第81回日本細菌学会総会 2008. 3. 26 国立
京都国際会館

6. 研究組織

(1) 研究代表者

浜田 茂幸 (HAMADA SHIGEYUKI)
日本大学・大学院総合科学研究科・教授
研究者番号: 60028777

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

中川 一路 (NAKAGAWA ICHIRO)
東京大学・医科学研究所・准教授
研究者番号: 70294113