

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19390478
 研究課題名（和文）
 歯周病における非翻訳RNAの統合的機能解析—細菌と宿主細胞との相互作用を中心に
 研究課題名（英文）
 Integrated functional analysis of non-coding RNA in periodontal diseases
 -Focusing on interaction between bacteria and host
 研究代表者
 苔口 進 (KOKEGUCHI SUSUMU)
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
 研究者番号：10144776

研究成果の概要（和文）：歯周病細菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* と *Porphyromonas gingivalis* における非翻訳 RNA および RNA シャペロン蛋白である Hfq もしくは CsrA/RsmA をコンピューター予想分析と分子生物学的実験アプローチであるショットガンクローニング法で同定した。またマイクロアレイで細菌リポ多糖を作用させた際のヒト線維芽細胞における ncRNAs の発現様態についても分析した。

研究成果の概要（英文）：Non-coding RNAs and RNA chaperone proteins such as Hfq or CsrA/RsmA in periodontopathic bacteria, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* were identified using computational prediction analysis and molecular experimental-based approaches, shotgun cloning. The expression patterns of ncRNAs in human gingival fibroblasts with bacterial lipopolysaccharide were also analyzed by microarray.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	14,700,000	4,410,000	19,110,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：免疫・感染・炎症，非翻訳RNA，歯周病細菌，*Aggregatibacter actinomycetemcomitans*，*Porphyromonas gingivalis*，宿主細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、真核細胞や原核細胞のゲノム解析の結果、RNAに転写されるが蛋白をコードしない数多くの非翻訳RNA (non coding RNA: ncRNA)の存在が明らかになった。ncRNAについては転写後のRNAの安定性やRNAシャペロン蛋白と共に遺伝子発現制御に関わることなどが報告されているが、未だその機能については不明の部分が多い。病原細菌ではncRNAが毒素産生や鉄取り込みをはじめ増殖環境適応や薬剤感受性に関わるのが次第に明らかにされ注目されている。

2. 研究の目的

歯周病における歯周病細菌の病原性発現におけるncRNAの機能を解析するために、まず、歯周病細菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* や *Porphyromonas gingivalis* におけるncRNAおよびRNAシャペロン蛋白候補分子をバイオインフォマティクス手法で大腸菌ゲノムデータと比較分析して、またショットガンクローニング法などの分子生物学手法を駆使して見出す。併せてヒト歯肉線維芽細胞にリポ多糖体 (LPS) を作用させた際のncRNAの発現様態をマイクロアレイで解析し、歯周病病因におけるncRNAの機能や役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) バイオインフォマティクス手法によるncRNAおよびRNAシャペロン分子の探索: *A. actinomycetemcomitans* (Aa)ならびに *P. gingivalis* (Pg)のゲノムデータベースと大腸菌の80種のncRNA,そしてRNAシャペロンである *hfq* と *rsmA* (*csrA*) 遺伝子の同源性分子を検索した。検索にはNCBIのblastプログラムならびにGenetyx softwareを用いた。

(2) ショットガンクローニング法によるncRNA分子の探索: PgW83株から全RNA画

分を抽出し、15%変性アクリルアミドゲルを用いて電気泳動した。鎖長が30-300ntに相当する画分をゲルから切り出し、RNAを精製後逆転写とPCR反応を行ない増幅した。増幅した遺伝子断片をTAクローニングベクターに組み込んでライブラリーを作成した、このライブラリーをランダムに選択してその塩基配列を決定し、Pgのゲノム上での位置を特定した。

(3) ncRNA候補遺伝子の検出: 同源性検索で大腸菌ncRNA配列と高い同源性を示した歯周病細菌のncRNA候補遺伝子をRT-PCR法あるいはノーザンブロット法で検出した。

(4) *hfq*ならびに *rsm*様遺伝子欠損株の作製: 同源性組換え法によってAa(ATCC29523)染色体遺伝子中の *hfq*ならびに *rsm*様遺伝子にスペクチノマイシン耐性カセットを挿入して両遺伝子欠損株を作成した。

(5) 欠損株の蛋白質発現プロファイルの解析: 両欠損株ならびに親株であるATCC29523株の菌体蛋白を2次元電気泳動法で分離して蛋白発現パターンを比較した。

(6) LPS刺激によるヒト歯肉線維芽細胞のncRNA発現の検出: 培養ヒト歯肉線維芽細胞に大腸菌LPSあるいはPgLPSを添加し、全RNA画分を抽出した。陰性対照試料のRNA画分は蛍光色素Cy3で、また一方LPS添加試料のRNA画分はCy5で標識し、その発現様態をmicroRNAアレイで比較した。

3. 研究成果

(1) バイオインフォマティクス手法によるncRNAおよびRNAシャペロン分子の探索: Aaのゲノム上に大腸菌ncRNAと高い同源性(60%以上)を示す8つのncRNA候補配列ならびに *hfq* と *rsmA* 様遺伝子を同定した(表1)。Pgのゲノム上には大腸菌ncRNAおよびRNAシャ

ペロンとの相同性分子は見出せなかった。

表1. Aaのゲノム上に同定された大腸菌ncRNAの相同性遺伝子

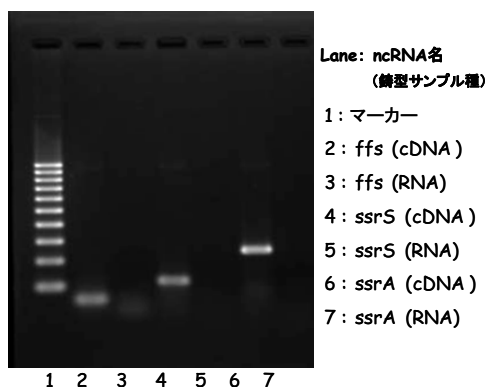
Name	Identity (%)	Size (nt)	Function
<i>ssrA</i>	82.20	363	tmRNA
<i>ffs</i>	72.60	114	Component of SRP
<i>ssrS</i>	68.90	183	RNAP antagonist
<i>Rybc/SroB</i>	63.80	82	antisense regulator
<i>RyjC</i>	63.20	77	antisense regulator
<i>DsrA</i>	60.70	87	antisense regulator
<i>DicF</i>	60.40	53	antisense regulator
<i>RdIC</i>	60.00	68	antisense regulator

(2) ショットガンクローニング法による

ncRNA 分子の探索：クローン化した 155 個の Pg 遺伝子断片の塩基配列解析の結果、78 クローンは Pg のゲノム上の遺伝子間領域に、34 クローンは遺伝子上のセンス鎖に、そして 16 クローンは遺伝子のアンチセンス鎖に位置していた。また、残り 27 クローンはリボソーム RNA 遺伝子の混入であった。重複してクローン化された 10 遺伝子を Pg の ncRNA 候補遺伝子として選択した。

(3) ncRNA 候補遺伝子の検出：Aa では 8 つの ncRNA 候補配列のうち、特に高い相同性を示した 3 候補 (*ssrA*, *ffs*, *ssrS*) について、RT-PCR 法による検出を試みた結果、3 つの候補すべての遺伝子発現を確認することができた (図 1)。

図1. Aa ncRNA候補遺伝子の発現確認(RT-PCR法)



また、Pg の ncRNA 候補遺伝子についてノーザンブロット解析の結果、5 遺伝子の発現を確認した。これらは Aa や Pg の ncRNA として機能している可能性が高く、歯周病細菌における病原遺伝子発現や増殖制御に ncRNA がどの

ように関わっているのかが興味深い。

(4) *hfq* ならびに *rsm* 欠損株の作製：大腸菌 *hfq* ならびに *rsm* と相同性を示した Aa の遺伝子を PCR 法で Aa ATCC29523 株から増幅し、増幅した遺伝子中にスペクチノマイシン耐性遺伝子を組み込んだ。この薬剤耐性カセットを相同性組換え法によって Aa ATCC29523 株のゲノム中に挿入して *hfq* ならびに *rsm* 遺伝子の欠損株を作製した。

(5) *hfq* ならびに *rsm(csra)* 遺伝子欠損株の蛋白質発現プロファイル：親株 ATCC29523 株ならびに *hfq* と *rsm* の遺伝子欠損株を 2 次元電気泳動で展開し、蛋白質の発現パターンを比較した (*hfq* 遺伝子欠損株の 2 次元電気泳動像を図 2 に示す)。*hfq* 遺伝子欠損株では 6 つの蛋白スポットと *rsmA(csra)* 遺伝子欠損株では 5 つの蛋白スポットで蛋白発現量が増加していた。ncRNA が RNA シャペロンを介しての mRNA サイレンシングに関与し、Aa においても他の病原細菌と同様に ncRNA による遺伝子制御機構の存在が示唆された。



(6) LPS 刺激によるヒト歯肉線維芽細胞の ncRNA 発現の検出：LPS 刺激によってヒト歯肉線維芽細胞において ncRNA 発現の変動が認められた。PgLPS 刺激によってその発現が上昇するものは miR-187、miR-290、miR-203 をはじめ 7 種類、一方抑制されるものは miR-6058 と miR-12902 の 2 種類であった。ま

た大腸菌 LPS 刺激では、mi-R8027 や mi-R26b、mi-R378 などの 10 種類の ncRNA 発現が上昇し、また mi-R10594、mi-R8488、mi-R494 など 11 種類の ncRNA 発現が抑制されていた。LPS の種類によってヒト歯肉線維芽細胞からの ncRNA 発現は異なっていた。さらにマクロファージを大腸菌 LPS 刺激した際や様々な炎症部位やガン細胞で見出されている既報の mi-R155 の変動はヒト歯肉線維芽細胞では認められなかった。

(7)まとめ： Aa では大腸菌と同様に RNA シャペロンを介した ncRNA による遺伝子発現調節機構の存在する可能性が示唆された。また Pg にも ncRNA の存在が確認され、歯周病細菌での病原因子発現制御や増殖環境適応における ncRNA の機能解析が今後の課題である。ヒト歯肉線維芽細胞ではマクロファージとは異なる ncRNA 発現変動が認められ、歯周病感染炎症病態に発現する ncRNA の役割や機序について宿主と病原体の両面からこの研究成果を基に今後も検討して行きたい。

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 14 件)

- ①Koide Y, Maeda H, Yamabe K, Naruishi K, Yamamoto T, Kokeguchi S, Takashiba S: Rapid detection of *mecA* and *spa* by the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method. *Lett Appl Microbiol.* 50(4):386-92, 2010 (査読有)
- ②Yamabe K, Maeda H, Kokeguchi S, Soga Y, Meguro M, Naruishi K, Asakawa S, Takashiba S. Antigenic group II chaperonin in *Methanobrevibacter oralis* may cross-react with human chaperonin CCT. *Mol Oral Microbiol.* 25(2):112-22, 2010 (査読有)
- ③Maeda T, Maeda H, Yamabe K, Mineshiba J,

Tanimoto I, Yamamoto T, Naruishi K, Kokeguchi S, Takashiba S: Highly expressed genes in a rough-colony-forming phenotype of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*: implication of a *mip*-like gene for the invasion of host tissue. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 58(2):226-36, 2010 (査読有)

④Wada K, Kariyama R, Mitsuhashi R, Uehara S, Watanabe T, Monden K, Kumon H. Experimental and clinical studies on fluoroquinolone-insusceptible *Escherichia coli* isolated from patients with urinary tract infections from 1994 to 2007. *Acta Med Okayama.* 63(5):263-72, 2009 (査読有)

⑤Tomofuji T, Yamamoto T, Tamaki N, Ekuni D, Azuma T, Sanbe T, Irie K, Kasuyama K, Umakoshi M, Murakami J, Kokeguchi S, Morita M: Effects of obesity on gingival oxidative stress in a rat model. *J Periodontol.* 80(8):1324-9, 2009 (査読有)

⑥Ekuni D, Tomofuji T, Sanbe T, Irie K, Azuma T, Maruyama T, Tamaki N, Murakami J, Kokeguchi S, Yamamoto T: Vitamin C intake attenuates the degree of experimental atherosclerosis induced by periodontitis in the rat by decreasing oxidative stress. *Arch Oral Biol.* 54(5):495-502, 2009 (査読有)

⑦Ekuni D, Tomofuji T, Sanbe T, Irie K, Azuma T, Maruyama T, Tamaki N, Murakami J, Kokeguchi S, Yamamoto T: Periodontitis-induced lipid peroxidation in rat descending aorta is involved in the initiation of atherosclerosis. *J Periodontol Res.* 44(4):434-42, 2009 (査読有)

⑧Tomofuji T, Ekuni D, Sanbe T, Irie K,

Azuma T, Maruyama T, Tamaki N, Murakami J, Kokeguchi S, Yamamoto T: Effects of vitamin C intake on gingival oxidative stress in rat periodontitis. *Free Radic Biol Med.* 46(2):163-8, 2009 (査読有)

⑨Tashiro Y, Nomura N, Nakao R, Senpuku H, Kariyama R, Kumon H, Kosono S, Watanabe H, Nakajima T, Uchiyama H. Opr86 is essential for viability and is a potential candidate for a protective antigen against biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 190(11):3969-78, 2008 (査読有)

⑩Yamabe K, Maeda H, Kokeguchi S, Tanimoto I, Sonoi N, Asakawa S, Takashiba S: Distribution of *Archaea* in Japanese patients with periodontitis and humoral immune response to the components. *FEMS Microbiol Lett.* 287(1):69-75, 2008 (査読有)

⑪ Yamashita A, Soga Y, Iwamoto Y, Yoshizawa S, Iwata H, Kokeguchi S, Takashiba S, Nishimura F: Macrophage-adipocyte interaction: marked interleukin-6 production by lipopolysaccharide. *Obesity (Silver Spring)*. 15(11):2549-52. 2007 (査読有)

⑫Yamazaki K, Honda T, Domon H, Okui T, Kajita K, Amanuma R, Kudoh C, Takashiba S, Kokeguchi S, Nishimura F, Kodama M, Aizawa Y, Oda H: Relationship of periodontal infection to serum antibody levels to periodontopathic bacteria and inflammatory markers in periodontitis patients with coronary heart disease. *Clin Exp Immunol.* 149(3):445-52, 2007 (査読有)

⑬ Murakami J, Lee YJ, Kokeguchi S, Tsujigiwa H, Asami J, Nagatsuka H, Fukui K, Kuroda M, Tanaka N, Matsubara N:

Depletion of O6-methylguanine-DNA methyltransferase by O6-benzylguanine enhances 5-FU cytotoxicity in colon and oral cancer cell lines. *Oncol Rep.* 17(6):1461-7, 2007 (査読有)

⑭Mikuniya T, Kato Y, Ida T, Maebashi K, Monden K, Kariyama R, Kumon H: Treatment of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms with a combination of fluoroquinolones and fosfomycin in a rat urinary tract infection model. *J Infect Chemother.* 13(5):285-90, 2007 (査読有)

[学会発表] (計9件)

①石井真由美, 前田博史, 山部こころ, 園井教裕, 平井公人, 谷本一郎, 荅口進, 高柴正悟: *Porphyromonas gingivalis*からのsmall non-coding RNAの同定. 第30回岡山歯学会総会・学術集会. 2009/11/8, 岡山市・岡山大学歯学部.

②山部こころ, 前田博史, 樋口彩子, 園井教裕, 目黒道生, 谷本一郎, 山本直史, 成石浩司, 荅口進, 高柴正悟: ショットガンクローニング法による *Porphyromonas gingivalis*からのsmall non-coding RNAの同定. 第52回秋季日本歯周病学会学術大会. 2009/10/11, 宮崎市・宮崎観光ホテル.

③狩山玲子: 尿路由来メタローβ-ラクタマーゼ産生緑膿菌のバイオフィルム形成能および耐性遺伝子伝達性の検討. 第83回日本感染症学会総会. 2009/4/23, 東京都新宿区・京王プラザホテル・エミネンスホール.

④荅口進, 渡辺朱理, 佐藤法仁, 谷本一郎: 歯周病細菌におけるsmall non-coding RNAとRNAシャペロンの探索. 第82回日本細菌学会総会. 2009/03/12, 名古屋市・名古屋国際会議場.

⑤荅口進, 渡辺朱理, 佐藤法仁: 歯周病細菌におけるsmall non-coding RNAとRNAシャ

ペロンの探索. 第 61 回日本細菌学会中国・四国支部総会. 2008/10/08, 松山市・愛媛大学グリーンホール.

⑥ 苔口 進, 渡辺朱理, 佐藤法仁, 谷本一郎: 歯周病におけるsmall non-coding RNAの機能解析—歯周病細菌とヒト歯肉線維芽細胞での発現様態—. 第 50 回歯科基礎医学会総会. 2008/09/23, 東京都江東区・TOC有明コンベンションホール.

⑦ 狩山玲子: 緑膿菌性バイオフィルムに対するフルオロキノロン系薬とホスホマイシンの併用効果に関する新知見. 第 55 回日本化学療法学会西日本支部総会. 2007/10/31, 神戸市・神戸国際会議場.

⑧ 前田博史, 苔口 進, 谷本一郎, 小出康史, 山部こころ, 園井教裕, 新井英雄, 高柴正悟: *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans*からのsmall non-coding RNAならびにRNAシャペロンの同定. 第 50 回春季日本歯周病学会学術大会. 2007/05/18, 横須賀市・横須賀芸術劇場・横須賀市産業交流プラザ・ホテルトリニティ横須賀.

⑨ 山下明子, 西村英紀, 曾我賢彦, 岩本義博, 苔口 進, 高柴正悟: 低濃度LPSにより脂肪細胞・マクロファージ共培養系から産生される分子のサイトカインアレイ解析. 第 50 回春季日本歯周病学会学術大会. 2007/05/18, 横須賀市・横須賀芸術劇場・横須賀市産業交流プラザ・ホテルトリニティ横須賀.

[図書] (計 2 件)

① Murakami J, Asami J, Tsujigiwa H, Yamada M, Kokeguchi S, Nagatsuka H, Yamamoto T, Y-J Lee: Nova Science Publishers (Hauppauge, NY, USA), Drug Resistant Neoplasms: Role of O6-methylguanine-DNA methyl transferase and the effect of O6-benzylguanine in cancer chemotherapy. 2009, 254pp. (p33-71).

② 前田博史, 苔口 進, 高柴正悟: 医歯薬出版株式会社 (東京), Preventive Periodontology 臨床を支えるサイエンスを知る・唾液検査を活用する・生活習慣病を予防する. 第4章 歯周病の発生因子 (リスクファクター) 1-バイオフィルム—感染症の立場から (菌と菌のインターアクション). 2007, 373pp. (p165-173).

[その他] ホームページ等

http://www.geocities.jp/okayama_u_dent_saikin/result.html

<http://www.okayama-u.ac.jp/user/med/Gyoseki/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

苔口 進 (KOKEGUCHI SUSUMU)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 10144776

(2) 研究分担者

前田 博史 (MAEDA HIROSHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号: 00274001

山本 龍生 (YAMAMOTO TATSUO)

神奈川歯科大学・社会歯科学講座歯科医療社会学分野・講師

研究者番号: 20252984

村上 純 (MURAKAMI JUN)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 40362983

狩山 玲子 (KARIYAMA REIKO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 40112148

玉木 直文 (TAMAKI NAOFUMI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号: 20335615

西村 英紀 (NISHIMURA FUSANORI)

広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号: 80208222

(3) 研究協力者

渡辺 朱理 (WATANABE AKARI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・大学院生

谷内江 望 (YACHIE NOZOMI)

慶應義塾大学・先端生命科学研究所・博士研究員、日本学術振興会 特別研究員