

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09922

研究課題名(和文) 歯周病原菌の病原性因子及び挿入配列を制御するsmall RNAの解析

研究課題名(英文) Analysis of small RNAs associated with the expression of virulence genes and insertional sequence in periodontal pathogen

研究代表者

大貝 悠一 (Oogai, Yuichi)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・講師

研究者番号：40511259

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：歯周病原菌Aggregatibacter actinomycetemcomitansのsmall RNAによる遺伝子発現制御に関与すると考えられるHfqタンパク質の病原性に着目した解析を行った。本菌はhfqの欠損により著しいバイオフィルム量の減少を示した。また、hfqの欠損は付着因子emaAの発現を減少させた。emaA欠損株のバイオフィルム形成能は著しく低下した。よって、A. actinomycetemcomitansはsmall RNAを用いてhfqを介したバイオフィルム関連遺伝子の発現制御を行っている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周病原菌において、病原性への関与が示唆されているsRNAの研究成果は少ない。本研究結果により、歯周病原菌であるA. actinomycetemcomitansにおいて重要な病原性のひとつであるバイオフィルム形成性にHfq及びEmaAが関与することを明らかにした。HfqによるEmaAの発現制御にはsmall RNAが介在する可能性が考えられる。よって、small RNAによるA. actinomycetemcomitansの病原性の制御に関し重要な知見をもたらしたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Aggregatibacter actinomycetemcomitans is one of the periodontal pathogens. We analyzed the regulation of virulence genes by Hfq, which is an RNA chaperon associated with the genes regulation via small RNA, in A. actinomycetemcomitans. The inactivated mutant of hfq showed significantly reduced biofilm and decreased expression of emaA encoding extracellular adhesin. The inactivated mutant of emaA showed significantly reduced biofilm. These results suggested that the A. actinomycetemcomitans regulates the expression of genes associates with the biofilm formation using small RNA and hfq.

研究分野：口腔微生物学

キーワード：歯周病原菌 Hfq

1. 研究開始当初の背景

Small RNA (sRNA) は短い機能性 RNA の総称であり、細菌の有する sRNA の多くはタンパクをコードする領域をもたず、sRNA と mRNA の結合を介して様々な遺伝子発現制御に関与すると考えられている。sRNA は遺伝子間領域に発現する intergenic region sRNA と遺伝子領域の反対鎖に発現する antisense sRNA に大別される。かつては coding sequence を持たない sRNA をゲノムから同定することは困難であったが、次世代シーケンサーの発展・普及により RNA sequence (RNAseq) 解析を用いた新規 sRNA の同定報告が増えている (Kröger *et al.*, 2018, *Nucleic Acids Res.*, 46:9684-9698. Sinel *et al.*, 2017, *Sci Rep.*, 7:11067)。

以前に行われた研究により、私たちは歯周病原菌のひとつである *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) において RNAseq による sRNA の網羅的同定を行い、120 の sRNA を報告した (Oogai *et al.*, 2018, *DNA Res.*, 25:207-215)。それらの一部は、Aa において代表的な病原性因子である細胞致死膨化毒素やロイコトキシン遺伝子を含む複数の mRNA 等と結合しうることを示した。

2. 研究の目的

Aa HK1651 株において同定された sRNA により制御される可能性がある遺伝子の発現性を検討する。細菌の sRNA を介した遺伝子発現制御には RNA シャペロンの一つである Hfq の関与が知られている。よって、まず Aa における *hfq* 遺伝子欠損株を解析し、発現変動を示す遺伝子の同定を行い、ひいてはその制御に関与する sRNA を解析する。また、AaHK1651 株において、ゲノム内に見られる一部の Insertion sequence (IS) と塩基対形成しうる sRNA が同定されているため、sRNA による IS の発現制御の可能性を検討する。

3. 研究の方法

遺伝子欠損株の作製

スペクチノマイシン耐性遺伝子 *aad9* の上流及び下流側に欠損させり遺伝子上流及び下流のおよそ 2kbp の DNA 断片を PCR 法を用いて結合させた。得られた組換え DNA 断片を Aa の各種菌株内に導入し、相同性組換えによる欠損株の作製を行った。

遺伝子の発現性解析

hfq の欠損株を用いて、RNAseq による網羅的遺伝子発現解析を行った。Hfq 制御下にあることが判明した遺伝子のうち、病原性との関連が考えられる遺伝子においては定量性 PCR による詳細な発現変動の解析や欠損株を用いた病原性解析を行った。

sRNA を介した IS の転移制御解析

hfq の欠損株を用いて、sRNA による負の発現制御を受けている可能性が考えられる IS (IS3) のトランスポゼースのタンパク質発現をウエスタンブロットティングにより解析した。

4. 研究成果

当初、sRNA の網羅的同定が行われた HK1651 株を用い、病原性因子の遺伝子を制御する sRNA の欠損株の作製を試みた。しかしながら、HK1651 株の遺伝子欠損株を得ることは当研究課題の手法においては困難であった。よって、ゲノム情報が公開されており、遺伝子欠損株の作製が比較的容易である NUM4039 株を主に用い本研究課題は行われた。Aa における sRNA の塩基配列や発現性は菌株間で多様性を有することが示唆されているため (Oogai *et al.*, 2018, DNA Res., 25:207-215)、sRNA を介した多くの遺伝子発現制御に関与すると考えられる Hfq に着目し研究を進めた。*hfq* 欠損株を用い各種病原性を検討した結果、当欠損株はポリスチレンプレート上におけるバイオフィーム形成の減少を認めた (図 1)。

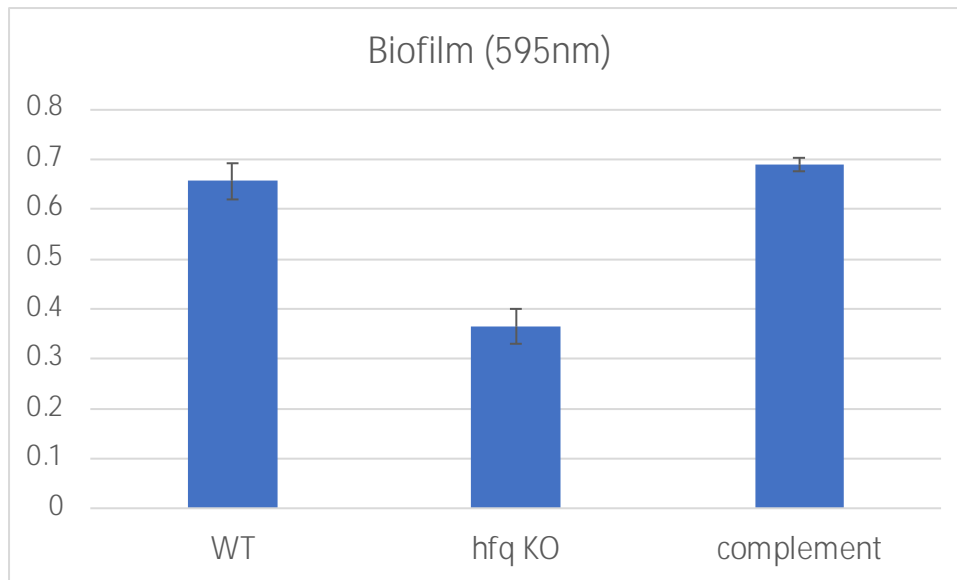


図 1 Aa NUM4039 野生株、*hfq* 欠損株及び相補株のバイオフィーム形成量。各菌株を 96 ウェルポリスチレンプレート上で 24 時間培養後、PBS 洗浄を行い、付着細胞をクリスタルバイオレットで染色した。定量は染色後のバイオフィームに 100 μ l のエタノールを加え、遊離させた色素の吸光度 (595 nm) を測定することにより行った。

Aa NUM4039 野生株及び *hfq* 欠損株を対数増殖期中期まで液体培地 (*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* growth medium: AAGM) で培養し、網羅的な遺伝子発現変動を RNAseq により解析した。結果、多様な遺伝子の発現変動が認められた (表 1)。バイオフィーム形成への関与が考えられる遺伝子としては、オートトランスポート様付着因子(*emaA*)、バイオフィームの分解を促進すると考えられる Dispersin B (*dspB*) の発現変動が認められた。定量性 PCR により Aa NUM4039 野生株及び *hfq* 欠損株の対数増殖期初期における *emaA* 及び *dspB* の発現性を検証した結果、RNAseq の結果と同様の傾向を示した (図 2)。

Product	WT	hfq_KO	KO / WT
YegP family protein	111.10	883.63	7.95
glycine zipper 2TM domain-containing protein	127.46	954.67	7.49
Fe(3+) dicitrate ABC transporter substrate-binding protein FecB	54.65	295.47	5.41
sigma-E factor negative regulatory protein	536.96	2753.66	5.13
transcriptional regulator	0.40	2.04	5.11
RNA polymerase sigma factor RpoE	757.37	3748.77	4.95
tRNA (adenosine(37)-N6)-dimethylallyltransferase MiaA	255.12	1204.70	4.72
Do family serine endopeptidase	667.21	2866.43	4.30
molybdenum cofactor guanylyltransferase MobA	52.66	225.73	4.29
YwiC-like family protein	91.75	393.22	4.29
uridine diphosphate-N-acetylglucosamine-binding protein YvcK	110.70	473.91	4.28
hydroxyisourate hydrolase	852.91	3585.17	4.20
NADP-specific glutamate dehydrogenase	78.99	330.34	4.18
sel1 repeat family protein	91.55	364.84	3.98
PRD domain-containing protein	18.35	71.97	3.92
helix-hairpin-helix domain-containing protein	76.59	294.92	3.85
NAD(+) diphosphatase	126.46	484.85	3.83
uroporphyrinogen decarboxylase	133.24	503.03	3.78
SoxR reducing system RseC family protein	112.90	407.32	3.61
NAD(P)H-dependent oxidoreductase	140.82	508.03	3.61
sigma-E factor regulatory protein RseB	310.57	1110.11	3.57
GNAT family N-acetyltransferase	155.38	516.20	3.32
porin OmpA	1317.06	4371.80	3.32
iron-dicitrate ABC transporter permease FecC	38.70	127.05	3.28
phospholipid-binding protein MlaC	400.72	1313.95	3.28
lipid asymmetry maintenance protein MlaB	73.00	239.09	3.27
5'/3'-nucleotidase SurE	109.51	354.08	3.23
RNA polymerase sigma factor RpoH	842.94	2675.57	3.17
SIMPL domain-containing protein	419.47	1328.79	3.17
lactoferrin/transferrin family TonB-dependent receptor	141.22	436.81	3.09
YtiB family periplasmic protein	62.03	191.05	3.08
6-carboxytetrahydropterin synthase QueD	17.95	55.09	3.07
D-alanine--D-alanine ligase	169.15	509.52	3.01
RNA-binding transcriptional accessory protein	347.07	1041.85	3.00
IS200/IS605 family transposase	10.77	31.72	2.94
thiol peroxidase	439.02	1282.98	2.92
phage N-6-adenine-methyltransferase	11.57	33.20	2.87
peptide-methionine (R)-S-oxide reductase MsrB	213.23	609.68	2.86
membrane-bound lytic murein transglycosylase MltF	173.73	479.66	2.76
2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidylyltransferase	101.93	279.34	2.74
shikimate 5-dehydrogenase	186.50	510.82	2.74
nucleoside-diphosphate kinase	56.85	153.95	2.71
bifunctional UDP-N-acetylglucosamine diphosphorylase/glucosaminidase	160.37	430.13	2.68
glycoside hydrolase dispersin B	180.71	483.55	2.68

Product	WT	hfq_KO	KO / WT
type VI secretion system tip protein VgrG	1.80	0.19	0.10
chaperone NapD	33.71	6.31	0.19
cytochrome bd oxidase small subunit, CydX/CbdX family	0.80	0.19	0.23
phospholipase	1.60	0.37	0.23
ABC transporter permease	196.07	51.56	0.26
GntP family permease	204.85	57.68	0.28
tyrosine phenol-lyase	579.05	184.55	0.32
hydrogenase 4 membrane subunit	3927.66	1268.32	0.32
4Fe-4S dicluster domain-containing protein	426.85	138.18	0.32
cobalt transporter CbiM	200.26	66.40	0.33
energy-coupling factor ABC transporter ATP-binding protein	172.34	62.51	0.36
hydrogenase 4 subunit F	2545.57	938.54	0.37
ABC transporter ATP-binding protein	310.77	114.81	0.37
type VI secretion system tip protein VgrG	1.00	0.37	0.37
respiratory chain complex I subunit 1 family protein	557.50	209.59	0.38
NAD(P)H-binding protein	7.38	2.78	0.38
hydrogenase maturation peptidase HycI	247.14	94.04	0.38
DUF4376 domain-containing protein	3.39	1.30	0.38
hydrogenase large subunit	2565.91	991.03	0.39
hydrogenase 4 subunit B	1197.79	462.78	0.39
hydrogenase nickel incorporation protein HypB	292.61	114.07	0.39
NapC/NirT family cytochrome c	308.57	121.30	0.39
formate hydrogenlyase complex iron-sulfur subunit	763.75	306.60	0.40
trimeric autotransporter adhesin EmaA	2650.88	1090.07	0.41

表1 *hfq* 欠損株において変動を示す遺伝子(一部抜粋)。Aa NUM4039 野生株及び *hfq* 欠損株を液体培地(AAGM)で対数増殖期中期まで培養した。差次的遺伝子発現性をRNAseqにより解析した。
(左) *hfq* 欠損により転写量の増加を示す遺伝子
(右) *hfq* 欠損により転写量の減少を示す遺伝子

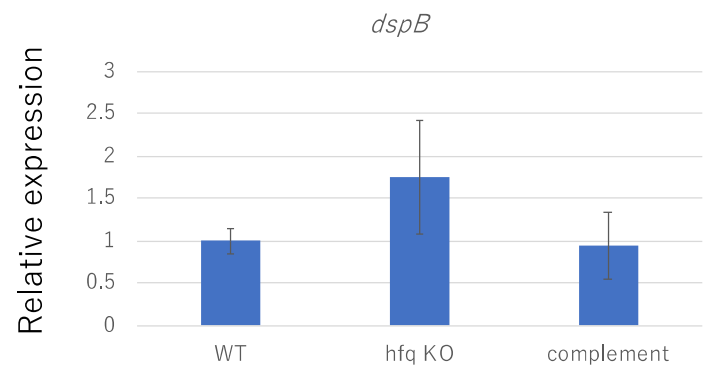
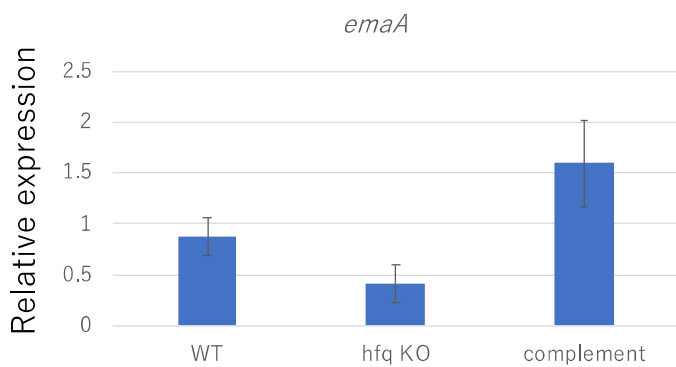


図2 Aa NUM4039 株野生株、*hfq* 欠損株及び相補株の *emaA* (左), *dspB* (右)の遺伝子発現性。各菌株を液体培地 (AAGM) で対数増殖期初期まで培養した。定量性 PCR は LightCycler96 (roche) にて行った。内在性コントロールとして *gapdh* を用い、キャリブレーターとして野生型の同一培養条件のサンプルを用いた。

hfq の欠損により、AaNUM4039 株のバイオフィーム形成量が減少し、付着因子 *emaA* の有意な発現抑制が認められた。そこで、EmaA のバイオフィーム形成への関与を解析するため、*emaA* 欠損株を作製した。結果、*emaA* 欠損株バイオフィーム形成能の著しい低下を認めた (図 3)。

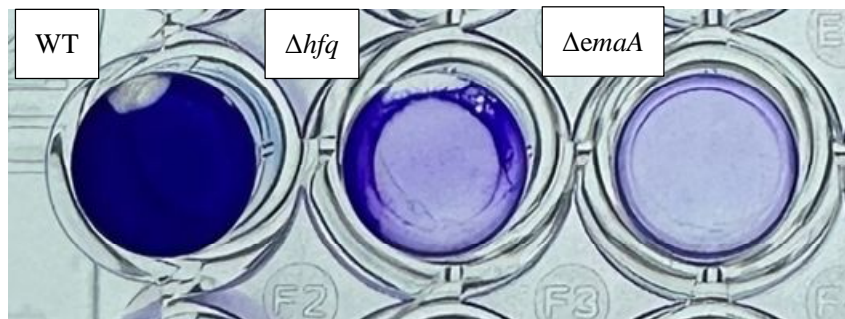


図 3 AaNUM4039 野生株、*hfq* 欠損株及び *emaA* 欠損株のバイオフィーム形成性。各菌株を 96 ウェルポリスチレンプレート上で 3 日間培養後、PBS 洗浄を行い、付着細胞をクリスタルバイオレットで染色した。

hfq 欠損株を用いて、野生株においては発現が制限されている IS3 のトランスポゼーゼスの発現性を IS3 トランスポゼーゼス *orfA* の抗血清を用い検討した。しかしながら、*hfq* を欠損させた場合においても IS3 トランスポゼーゼスの発現は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Yuichi Oogai and Masanobu Nakata	4. 巻 57
2. 論文標題 Small regulatory RNAs of oral streptococci and periodontal bacteria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Jpn Dent Sci Rev .	6. 最初と最後の頁 209-216
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdsr.2021.09.004	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 Fujita Ayumi, Oogai Yuichi, Kawada Matsuo Miki, Nakata Masanobu, Noguchi Kazuyuki, Komatsuzawa Hitoshi	4. 巻 65
2. 論文標題 Expression of virulence factors under different environmental conditions in <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 101 ~ 114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12864	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 田中 友三佳、大貝 悠一、松本 愛理、中田 匡宣
2. 発表標題 <i>Fusobacterium nucleatum</i> がFap2を介して <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> と共凝集する機構の解析
3. 学会等名 歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大貝悠一、藤田愛弓、中田匡宣、小松澤均
2. 発表標題 <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> は血清培養時に共凝集性を促進する
3. 学会等名 日本細菌学会総会
4. 発表年 2021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	中田 匡宣 (Nakata Masanobu) (90444497)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授 (17701)	
研究 分担者	小松澤 均 (Komatsuzawa Hitoshi) (90253088)	広島大学・医系科学研究科(歯)・教授 (15401)	

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