

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月16日現在

機関番号：32665
 研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2010～2012
 課題番号：22592320
 研究課題名（和文） 細菌 non-coding RNA のカタログ化とカスタムアレイの開発
 研究課題名（英文） Categorization of the bacterial non-coding RNAs and development of the custom array
 研究代表者
 平塚 浩一（HIRATSUKA KOICHI）
 日本大学・松戸歯学部・准教授
 研究者番号：80246917

研究成果の概要（和文）：

歯周病進行の危険度を予測する診断用カスタムアレイの開発を進めるために、細菌の病原性発現に関連し、かつ、分解されにくい細菌 small non-coding RNA を新たな診断プローブのターゲットとして着目した。*P. gingivalis* の発現 RNA を次世代高速シーケンサーにより網羅的に解析した結果、*in cilico* で予測されていた Non-coding RNA を含め、数百種類確認することができた。今後はこれらをマイクロアレイプローブとして活用する予定である。

研究成果の概要（英文）：

For the purpose of development of the custom array for diagnoses to predict a risk of the periodontal disease, we paid attention the bacteria small non-coding RNAs as new targets of the diagnosis probes because they are associated with the bacterial pathogenic expressions and are hard to be disintegrated. Expressed RNAs in *P. gingivalis* were analyzed by a next-generation DNA sequencer cyclopedically. Several hundred kinds could be confirmed including predicted non-coding RNA *in cilico*. They are going to be utilized as microarrays probe in future.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：歯周病、細菌、non-coding RNA, マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

(1) 患者個々の歯周病が、将来どの程度重篤化する危険性を含んでいるかを、歯周病病原性細菌 (*Porphyromonas gingivalis* 等) の原核生物用遺伝子発現アレイから推測する診断法を開発する研究 [基盤研究 (C) ; 平成19年度-21年度「歯周病進行の危険度を予測する診断用カスタムアレイの開発」]を現在行なっている。ところが、臨床サンプルとして、唾液や歯肉溝滲出液、および歯周外科手術から得られた試料から実際に細菌RNAを抽出してみると、細菌RNAの分解が進んでいるものが少なくない。できる限り迅速にRNA安定化液と試料の混合を試みてはいるものの、現状では、カスタムアレイを使った遺伝子発現解析結果に、RNA試料の分解量が大きく左右される問題が生ずる。原核生物は染色体が核膜に囲まれておらず「転写」と「翻訳」が同時に行なわれる「共役」を示すため、mRNAのturn overが15分程度と極めて早く分解されやすい事が昔から知られている。このようにmRNA分解速度の早い原核生物、かつ、すぐにRNAの安定化を行なえない臨床サンプルを用いる場合には、原核生物RNAの分解は避けることのできない問題なのかもしれない。従って、原核生物のmRNA発現情報は極めて有用な疾患マーカーであるのは疑いが無いが、mRNAに代わり得る分解されにくい標的プローブを新たに考える事ができれば、より質の高い診断用カスタムアレイが開発できるかもしれない。

(2) micro RNA やsmall 干渉RNA (siRNA) として知られているsmall non-coding RNA は、ここ数年間の真核細胞研究で話題の中心となっている。non-coding RNA は、真核生物では成熟化・細胞死・染色体サイレンシングの新しい制御因子として作用する事がわかっており、特異的なメッセージを失活させる事がで

きる非常に有用なツールである。また様々な疾患にnon-coding RNAの発現が関与することが分かってきた。最近の研究で、大腸菌を含め他の多くの細菌において、多数のサイズの小さい調節性RNAが同定されており、60種類以上のnon-coding RNAが次々と大腸菌で確認されている (<http://eclipse.nichd.nih.gov/nichd/cbmb/segr/e.coli.html>)。実際、これら細菌性non-coding RNAが、複製と原核生物の細胞質因子の維持を調整することは昔から知られていたが [Trends Biochem. Sci. 23, 451-454, 1998]、最近では、多くの細菌性non-coding RNAが、細菌のストレス応答や細菌の病原性に対する重要な調節因子として鍵となる役割を行うことが次々に証明されている [Annul. Rev. Biochem. 74, 199-217]。またこれらは真核細胞と同様に、small RNAが主に標的mRNAと対形成することで、結果的にmRNAの安定性や翻訳の制御を行なっている。原核生物のnon-coding RNAの発現は非常に良く制御されており、周知のストレス応答調節系の一部としてしばしば発現される。現在知られている大腸菌でのnon-coding RNAの機能としては、A) Shine-Dalgarno 配列 (SD配列, 翻訳開始シグナル) に結合し、翻訳を負に制御する。B) DsrA RNA, RprA RNA : rpoSのmRNA配列と相同配列を持ち被覆的二次構造を解除し、翻訳を正に制御する。C) CsrB RNA : CsrAタンパクを結合し、CsrAタンパクがglg mRNAのSD配列をふさぐのを妨げ、翻訳を正に制御する。D) RyhB RNA : SD配列近傍の二次構造を変化させるとともに、RNA複合体によりRNA分解酵素作用を誘導、mRNAの安定性を低下。E) DsrA RNA : hns mRNAの5'領域の翻訳開始コドン、3'領域の終止コドンを含む領域に相補的に相互作用、mRNAの分解速度増加などが知られている。真核生物の

micro RNA は、より長いヘアピン構造を含んだ転写産物として最初に合成され、細胞質でヘアピンは活性22 nt RNA を生成するために、Dicerヌクレアーゼで処理される [Trends Genet. 20, 617-624, 2004] が、細菌non-coding RNA 転写産物は一般的にサイズが80-100 nt で、Dicer のようなタンパク質で分解されない。また、このようなsmall non-coding RNA は分解されにくく、長い間保存されていたパラフィン包埋から切出された組織切片からでもsmall RNA が抽出可能なキットも市販されている。

2. 研究の目的

常在する口腔内細菌を標的とした歯周病診断用遺伝子発現カスタムアレイの解析 [平成19年度-21年度 基盤研究C ; 歯周病進行の危険度を予測する診断用カスタムアレイの開発]を進めるにあたり、臨床サンプル、しかも非常に分解し易い細菌RNA を解析対象にするために、採取からRNA 処理までの時間差で、検体のmRNA 保存状態に大きな差が生じて解析結果に影響を与えた。そこで本研究は、細菌の病原性に極めて高く関連し、分解されにくいbacterial small non-coding RNA に着目し、それらをカタログ化する。また、現在進行中の病態診断用病原性遺伝子発現プローブとして新たに加え、RNAを総合的に解析し、分解されやすい臨床サンプルにおいても、安定して解析可能な歯周病病態・診断予測マーカーの探索を行えること目的とする。

3. 研究の方法

(1) Bacterial sample に対するストレス付加とtotal RNA 抽出

代表的な歯周病病原細菌である *Porphyromonas gingivalis* に対して、口腔内で起こりえる様々なストレス負荷(hemin 制限、酸化ストレス、温度ストレス、pH ストレス等)をか

けたのち、経時的にサンプルを抽出し、Trizol/column法 (Invitrogen) でtotal RNA を抽出した。

(2) 品質検査

Nanodrop (分光光度計) を用いた濃度測定と Agilent 2100 Bioanalyzer を用いた濃度、RNA 品質の確認を行った。ここでRNA 分解が進んでいるサンプルは使用しない。

(3) 16S および23S rRNA の除去

Total RNA から BICROB Express Bacterial mRNA purification Kit (Ambion) を用いて、主要なrRNA の除去を行い、mRNA-rich 試料の精製を行った。これにより total RNA の20-40%がmRNA-rich sample として残る。

(4) 5S rRNA およびtRNA の除去

MEGAClear (Ambion)により、5S rRNA および70bp 前後のサイズをもつtRNA の除去を行い、non-coding RNA (total RNA の10%ほど)をさらに濃縮した。

(5) 品質検査

Nanodrop (分光光度計) を用いた濃度測定と Agilent 2100 Bioanalyzer を用いた濃度、RNA 品質の確認を行った。ここでRNA 分解が進んでいるサンプル、およびrRNA やtRNA の除去が不十分なサンプルは使用しない。

(6) シークエンス用ライブラリ調整

イルミナ社TruSeq RNA Sample Prep Kit を用いて、RNA 断片化、逆転写反応、2nd 鎖 cDNA 合成、末端修復 (3' A 付加) を行い、サンプル識別用インデックスタグを含むアダプターライゲーションを行った。PCR 増幅を施した後、AMPureXP ビーズによる精製・低分子除去 (約150bp) を行い、シークエンス用のサンプルを完成させた。

(7) Illumina HiSeqによる次世代シーケンス解析

次世代シーケンサHiSeq2000 を使用し、サンプル1 種類あたり下記の要領でシーケンス解析を行った。

- A. 解析方法： Paired-End
- B. 読み取り塩基長： 100 塩基／1 リード
- C. 参考取得リード数：2000 万リード

(8) 出力データの解析・カタログ化

次世代シーケンサで出力されたデータに関して情報処理を実施した。

- A. ベースコール：出力された解析生データ (画像データ) より、塩基配列のテキストデータを取得した。
- B. フィルタリング：所定のフィルタリングによるリードデータの選別を行った。
- C. ゲノム配列へのマッピング：Bのデータを基になっている細菌のゲノム上塩基配列へマッピング処理を行った。

D. Non-coding RNA 予測：Cで得られたデータを基に Sanger Institute データベースRfam (<http://rfam.sanger.ac.uk/>) にて様々な細菌を含めたnon-coding RNA 予測を行い、また、Los Alamos データベースでの [Oral pathogens non-coding small RNA prediction] を用いて口腔内細菌に特化したnon-coding RNA の独自PC 予測を行った。

(9) マイクロアレイの作成

予測されたnon-coding RNA に加えcoding RNA (遺伝子) の両方に対する発現解析用マイクロアレイを作製した。

4. 研究成果

(1) 代表的な歯周病病原細菌である *P. gingivalis* に対して口腔内で起こりえる種々のストレス等のかけた後、全RNAを抽出し、Bioanalyzerにて精製した全RNAのクオリティを確認した。RIN値9.0未満の場合には、断片化されたmRNAが多量にnon-coding RNAサイズ領域に混入している可能性が高いと判断してRNA抽出をやり直した。それ以外は同機器用の

small RNA診断チップを用いて試料中に推定されるnon-coding RNAの全RNAに対する比率を測定した。その結果、150 nt以下のsmall non-coding RNA 領域が全RNA の10%程度占めることが推定された。

(2) 全RNA からその中の90%以上を占める16S および23S rRNA を除去し、細菌 mRNA およびnon-coding RNA-rich サンプルを作成した。flashPAGE Fractionator を用いて、サンプルの電気泳動を行い、20-150 nt サイズ程の small RNA 領域をゲルから抽出・精製し、micro RNA Cloning Kit を用いて、各実験系500~1,000 程度のクローンを拾い上げ、シーケンスを行って、non-coding RNA を探索した。しかしながらこの方法は、予想されていたとはいえ、得られたデータの多くが60-70 nt 程度の tRNA が極めて多く、効率的な面から大きな課題が生じた。

(3) 近年、遺伝子の発現量を網羅的に観測する技術の1つとして、マイクロアレイとは別に高速シーケンサーによる解読が進んでいる。本申請当時は企業ベースで行うところが無く、クローニングを選択するしかなかったが、課題であったより効率的な方法の1つとして、高速シーケンサーによるnon-coding RNA配列のカタログ化を試みた。

P. gingivalis W83株をCold shock stress (15°C)、Heat shock stress (45°C)、アルカリストレス (pH 9.5)、酸性ストレス (pH 5.0)、および酸素ストレス下に30分間曝した後、全RNAを抽出した。各全RNAを等量ずつ取り、1つに混合したのち、約85%を占める23S rRNA と16S rRNA、および5S rRNAやtRNAを含む100 bp以下のRNAを除去し、mRNA-rich 試料を作成した。この試料中に存在する全てのRNAの塩基配列を解読する事で、結果的に100bp以上の様々なストレス下で発現するnon-coding RNA を網羅的に解析することとした。本試料を高

速シーケンサー (illumina HiSeq 2000, イルミナ社製) にて、100 塩基 / 1 リードを 2000 万リードペアで解読した。得られた塩基配列をバブリックデータベースのW83株の染色体DNA上の塩基配列に対応させ、高速シーケンサーで得られた塩基配列の染色体上での位置とその数量を解析した。また、その配列がnon-coding RNAである可能性を探るため、様々な細菌を含めたnon-coding RNA 予測が可能なSanger Institute データベース Rfam と、口腔内細菌に特化しnon-coding RNA の独自予測を行っている Los Alamos の「Oral pathogens non-coding small RNA prediction」に照合し、得られたNon-coding RNA データをゲノム上にマッピングすることで、既知のNon-coding RNAの発現量、および新規のNon-coding RNAの塩基配列と発現量を解析した。その結果、Los Alamosで予測したNon-coding RNA (650種) の塩基配列の70%以上カバーする配列が438種見つかった。一方、Cufflinksを用いて発現量を算出した結果、全く発現が認められないものが262種認められた。これら解析された多くのnon-coding RNAは通常は口腔内環境の変化で発現し、細菌の病原性を制御する重要な因子も数多く含まれると推定される。現在、菌体にストレス付加をかけた試料を用いて解析を行い、環境変化と遺伝子発現および発現するnon-coding RNAの種類とその量を検討している。また、今後は他の口腔内細菌でも同様の情報を揃え、歯周病診断アレイとして、より精度の高い解析ができるアレイを作製する予定である。

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1件)

(1)Hiratsuka K, Abiko Y: Gene expression profiling during growth *in vitro* using a custom-made *Porphyromonas gingivalis* gene array. 査読有, Int J Oral-Med Sci, **11(3)**:

2012, 141-150. DOI; 10.5466.

〔学会発表〕 (計1件)

(1)Hiratsuka K, Abiko Y: A study of 16S rRNA for bacterial gene expression analysis. 第91回国際歯科学会, 2013. 3. 22, アメリカ・シアトル.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平塚 浩一 (HIRATSUKA KOICHI)

日本大学・松戸歯学部・准教授

研究者番号: 80246917