

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893046

研究課題名(和文)ピロリ菌が分泌するエフェクター様RNAの探索と解析

研究課題名(英文)Exploration and analysis of effector-like RNAs secreted by Helicobacter pylori

研究代表者

氣駕 恒太郎(Kiga, Kotaro)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：90738246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：胃がん発症の原因の一つとして、ピロリ菌がCagAと呼ばれる病原タンパク質を胃の細胞に打ち込むことが知られている。そこで、ピロリ菌がCagA以外にも機能性RNAを宿主細胞に打ち込み、病態の促進に寄与しているのではないかと考えた。本研究では、菌由来のRNAが、ピロリ菌が持つ針状の分泌装置を介してではなく、菌体表面から多数分泌されている小胞に含まれる形で、宿主細胞に到達していることを確認した。

研究成果の概要(英文)：Injection of virulence protein CagA of Helicobacter pylori into the host gastric cells is associated with the progression of stomach cancer. It was supposed that, in addition to CagA protein, other functional RNAs were injected into the host cells. Some bacterial RNAs were observed to be included in the host cells not via a needle-shaped secretion apparatus of H. pylori but via vesicles secreted from bacterial membrane.

研究分野：細菌学

キーワード：ピロリ菌 sRNA 機能性RNA 胃がん

1. 研究開始当初の背景

(1) ピロリ菌は胃に定着するグラム陰性の細菌で、世界の人口の実に半数が保有していることが知られる。本菌の慢性感染は、胃炎、胃潰瘍、胃癌そして MALT リンパ腫の誘導因子であることが多くの疫学・実験的成果から示されている。このため、本国での癌による死亡原因の第2位を占めている胃癌の克服には、ピロリ菌の感染機構を詳細に把握する必要がある。

(2) 研究開始当初から数年前、ピロリ菌の第一次転写産物の網羅的な発現解析を行った研究が発表された (Sharma CM. et al., *Nature* 2010)。その結果、本菌には mRNA、rRNA、tRNA に加えて、多種多様な Bacterial small RNA (sRNA) も存在していることが明らかとなった。この報告までピロリ菌は、RNA による遺伝子発現制御等の高等なメカニズムを持ち合わせていないとさえ考えられていたため、それらの役割については全く研究されてこなかった。

(3) 病原細菌は、宿主細胞にエフェクター蛋白質 (機能性分泌蛋白質) を注入するための分泌装置を有することで、感染を成立させ、病原性を発揮することが知られている。ピロリ菌においては、型分泌装置を介した細胞空胞化毒素関連タンパク (CagA, cytotoxin-associated protein) の注入が、胃癌のリスク因子であることが明らかになってきている。しかしながら、本菌のエフェクター因子は現在 CagA とペプチドグリカンしか見つかっていない。ピロリ菌と同じ型分泌装置を持つグラム陰性細菌のアグロバクテリウムにおいては、植物に感染することで、T-DNA (transfer DNA) と呼ばれる DNA を宿主に注入することが知られていた。このことから、RNA もまた型分泌装置によって輸送されるエフェクター分子になり得るのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

ピロリ菌が産生する RNA が、宿主細胞に注入されるエフェクター分子になり得るのではないかと考え、その RNA の検出並びに機能解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) ピロリ菌 ATCC43504 株に発現している小さな RNA の同定。ATCC43504 株の RNA を抽出し、小さな RNA 特異的なディープシーケンシングを行うことによって、ピロリ菌に発現している sRNA を探索した。予測された sRNA の配列を元に、ノーザンプロットングやリアルタイム PCR を行い、ATCC43504 株に発現している sRNA の存在を実証した。

(2) ピロリ菌の持つ型分泌装置によって分泌されるものに、CagA とペプチドグリカンの他に、RNA が含まれているか調べた。ピロリ菌の型分泌装置欠損株 (virB7) を作製し、本菌を感染させた胃上皮由来細胞株 AGS に内在する RNA を、ジギトニン溶解法により抽出し、菌由来の RNA をリアルタイム PCR 法にて検出を試みた。しかしながら本手法では RNA が型分泌装置依存的に宿主細胞に注入されていることが確認できなかった。

(3) RNA の型分泌装置依存的な分泌が確認できなかったため、RNA の輸送経路のもう一つの候補に挙げていた外膜小胞に着目した。ピロリ菌の外膜小胞を精製し、含まれる RNA をリアルタイム PCR 法により検出した。

(3) 宿主細胞に取り込まれる細菌の RNA (sRNA-X) の確認。外膜小胞による宿主への RNA 輸送を検討した。精製した外膜小胞を、胃上皮由来の細胞株や単球系の細胞株に添加し、宿主細胞内に sRNA-X が存在するか、リアルタイム PCR 法を用いて確認した。

4. 研究成果

(1) ピロリ菌 ATCC43504 株に発現している小さな RNA の同定を行うために、ディープシーケンシングを行った。その結果、80 種類ほどの sRNA を見出すことができた (図1)。そのうち 20 種類ほどはこれまでに報告がなかった sRNA であった。また、センス鎖特異的リアルタイム PCR 法にて、これらの sRNA が発現していることを確認した。特に発現量が高かった sRNA については、LNA (Locked nucleic acid) を用いたノーザンプロットングを実施し、発現を確認した (図2)。



図1 ディープシーケンシングによる sRNA の同定例

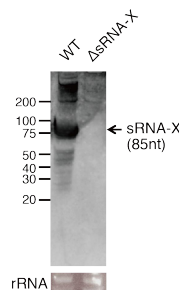


図2 ノーザンプロットによる sRNA の同定

(2) RNA が宿主細胞に型分泌装置依存的に取り込まれるのか、もしくは別の方法で取り込まれる可能性があるのか調べた。ピロリ菌の型分泌装置欠損株 (virB7) を作製し、本菌を感染させた胃上皮由来細胞株 AGS に内在する菌由来の RNA を、リアルタイム PCR 法にて検出した。しかしながら本手法では野生株と型分泌装置欠損株で RNA 量の差が無く、型分泌装置依存的な RNA の注入は確認できなかった。そこで、もう一つの可能性として考えていた、一度菌体外に出た後から宿主細胞に取り込まれる RNA がないか調べることにした。ピロリ菌の培養上清から RNA を抽出し、(1) で同定した sRNA で特に菌体内で発現量の高かったものの定量を行った。その結果、2 つの sRNA (sRNA-X-1、sRNA-X-2) の高い発現を確認した (図 3)。また、ピロリ菌の外膜小胞における RNA の検出を試みたところ、sRNA-X の発現が確認できた。外膜小胞を RNase で処理しても sRNA-X は分解されなかったため、2 つの sRNA-X は外膜小胞内で安定的に存在している sRNA であることがわかった。

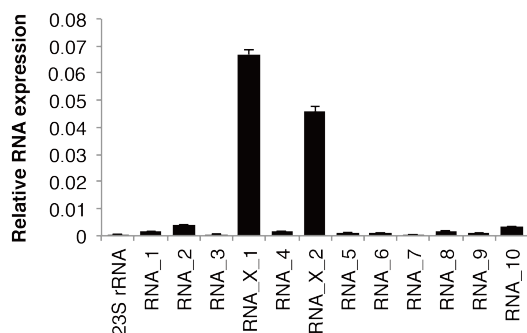


図 3 外膜小胞における sRNA の発現比較

(3) ピロリ菌外膜小胞に存在する sRNA が宿主細胞に取り込まれるか確認した。胃上皮由来の細胞株や単球系の細胞株での取り込みを検討したが、特に胃上皮由来の細胞株である AGS での取り込みが顕著であった (図 4)。また、取り込み量が多かった細胞株では、サイトカインの産生が亢進していた。これまで、宿主細胞に細菌由来の sRNA が取り込まれるという事象の報告はなかった。しかしながら、本研究でピロリ菌由来の sRNA が宿主細胞内に取り込まれることが明らかになった。この発見は既存の細菌感染症の理解を拡大・深化するうえで非常に有益な情報をもたらすと考えられる。また、RNA を標的とした新たな抗菌や癌治療の標的を生み出すなど、今まで治療が困難であった疾病の抑制にもつながる可能性もある。今後は、宿主細胞に取り込まれた RNA がどのような機能をしているのか検討していかなくてはならないが、外膜小胞が宿主のサイトカイン産生に寄与していたことを足がかりに研究を進める予定である。

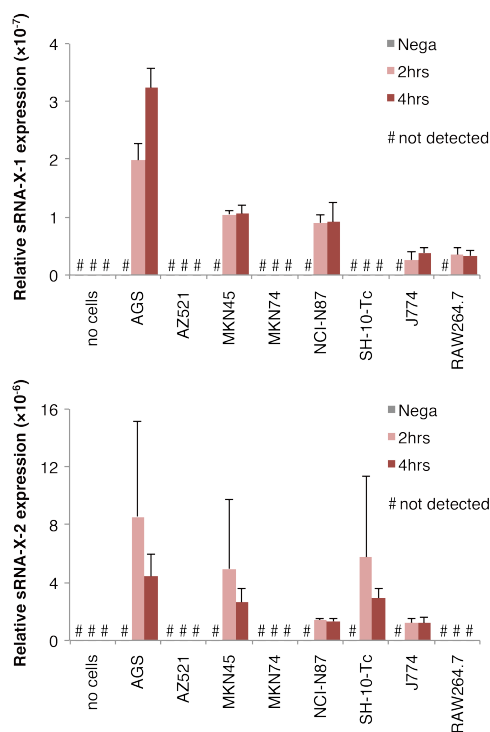


図 4 宿主細胞内に存在するピロリ菌外膜小胞由来の RNA

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 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

Kotaro Kiga, Zhu Bo and Hitomi Mimuro
 「 Identification of sRNAs controlling respiratory chain in Helicobacter pylori.」
 第 89 回 日本細菌学会総会 P1-041
 (ポスター発表)
 2016 年 3 月 大阪 大阪国際交流センター

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
 出願状況 (計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

氣駕 恒太朗 (Kiga, Kotaro)

東京大学・医科学研究所・特任助教

研究者番号：90738246

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：