

氏 名 須藤 直樹

学 位 の 種 類 博士 (理学)

報 告 番 号 甲第370号

学 位 授 与 年 月 日 2014年 3月31日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則 (昭和28年4月1日文部省令第9号)
第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 腸管出血性大腸菌 O157:H7 Sakai 株に存在する Small
Regulatory RNA Esr41 の機能解析

審 査 委 員 (主査) 松山 伸一

岡 敏彦

関根 靖彦

I. 論文の内容要旨

トランスファーRNA やリボソーム RNA 以外の遺伝子発現制御を担う RNA は真正細菌において広く保存されており、Small regulatory RNA (以下、sRNA) と呼ばれている。多くの sRNA は様々な環境変化に応じて転写誘導され、標的遺伝子の発現を制御し、それを通して細胞の環境への順化などに寄与することが知られている。腸管出血性大腸菌 0157:H7 Sakai 株 (0157 株) に存在する sRNA の網羅的探索が行われ、新規 sRNA である Esr41 (enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157 small RNA #41) が同定された。*esr41* 遺伝子の過剰発現は、宿主細胞への接着性の低下、及び細胞接着に関与する III 型分泌装置の構成タンパク質や分泌タンパク質の量の減少を引き起こすことが既に見いだされていた。III 型分泌装置とその分泌タンパク質は LEE (locus of enterocyte effacement) 遺伝子群にコードされていることから、Esr41 は LEE 遺伝子群の発現を抑制していることが予想された。本論文研究では、Esr41 の機能解析を行い、病原性大腸菌の遺伝子発現制御系における役割を明らかにした。

esr41 過剰発現時の LEE 遺伝子群の発現の変動を解析した結果、LEE 遺伝子群全体の mRNA 量の低下と、LEE 遺伝子群の発現を制御する転写因子 *ler* の mRNA 量の低下が見られた。次に Esr41 の標的遺伝子の同定を行ったところ、Esr41 は *ler* を標的とし、その翻訳を抑制すること、この抑制には RNA シャペロン Hfq が必要であることがわかった。Hfq は、sRNA と標的遺伝子 mRNA との塩基対形成を介して翻訳効率の低下、及び標的 mRNA の分解促進を引き起こすことが知られている。そこで、*in vitro* 反応系を用いた解析を行ったところ、Hfq 存在下でのみ、Esr41 と *ler* mRNA が複合体を形成することを見出した。一般的な sRNA による翻訳制御においては、sRNA は標的 mRNA と塩基対形成を介して結合する。そのため Esr41 と *ler* mRNA 間の塩基対形成領域の同定を行った結果、Esr41 の +16 ~ +28 領域、及び *ler* mRNA の SD 配列が塩基対形成に重要であることが示唆された。

sRNA による翻訳制御における Hfq の役割の一つとして、sRNA の安定化が挙げられる。そこで、Esr41 の安定化における Hfq の寄与、及び Hfq による sRNA の安定化に必要な Esr41 の構造的特徴を以下のように解析した。*in vitro* において Hfq が Esr41 と結合することを確認した。また、Esr41 の細胞内安定性は、野生株と比して *hfq* 欠損株では著しく低下することが分かった。これらの結果は、Esr41 は Hfq と結合することで安定化することを示す。次に、Esr41 の配列内に 5 または 6 塩基の欠失を系統的に導入した一連の Esr41 部分欠失体を野生株と *hfq* 欠損株で産生させ、細胞内の各 Esr41 部分欠失体の RNA 量を解析した。その結果、Esr41 の +11 ~ +15 欠失体の量は野生株において著しく低下し、それは *hfq*

欠損株での RNA 量と同程度であった。また、+31~+35 欠失体においても同様の結果が得られた。この 2 種の Esr41 部分欠失体と Hfq の結合をゲルシフト法で解析したところ、どちらの欠失体も Hfq と結合し難いことが示され、これらの欠失体の RNA 量の低下は、Hfq との結合能の低下に起因すると考えられた。野生型 Esr41 には Rho 非依存性ターミネーターの直上流にステムループが存在するが、これら 2 種の欠失体では、このステムループが形成されないことが予想された。以上の結果から、Hfq との結合において、Esr41 の Rho 非依存性ターミネーターの直上流のステムループが重要であることが強く示唆された。

0157 株において *esr41* を過剰に発現させると、細胞の遊走性の上昇、及び遊走性を司るべん毛の主要構成タンパク質 FliC (フラジェリン) の量の増加が起こることを見出した。0157 株において、べん毛遺伝子群は LEE 遺伝子群と協調的な発現制御を受けることが報告されているため、この遊走性の上昇は Esr41 による *ler* の発現抑制を介して引き起こされたと考えられた。しかしながら、LEE 遺伝子群が存在しない K-12 株で Esr41 を発現させた場合でも、遊走性の上昇が見られ、さらにべん毛遺伝子群の最上流転写因子の一つ FliH タンパク質量の増加も見られた。これらの結果から、Esr41 は *fliH* の発現を促進することが予想された。この機構の解明を目指して解析したところ、Esr41 の発現による *fliH* プロモーター活性の変動は見られなかった一方で、*fliH* プロモーターをアラビノースプロモーターに置換した *fliH* 遺伝子を用いても、Esr41 の発現により FliH タンパク質量の増加が見られた。この結果は、Esr41 が *fliH* の翻訳を促進することを示す。

0157 株において病原性発現時、LEE 遺伝子群の発現が上昇し、べん毛遺伝子群の発現が低下する協調的発現制御機構が報告されている。Esr41 は、現在報告されている協調的発現制御とは逆の制御を引き起こす新規因子であり、0157 株の病原性発現制御機構の一端を担う重要な分子であると考えられる。

II. 審査結果の要旨

タンパク質に翻訳されない RNA は非翻訳型 RNA (non-coding RNA) と呼ばれており、トランスファーRNA やリボソーム RNA がよく知られているが、それ以外の non-coding RNA が多種類存在していることが、様々な生物で知られるようになりつつある。バクテリアでは、そのような non-coding RNA の代表的なものは遺伝子発現を調節することが知られているため、Small regulatory RNA (sRNA) と呼ばれている。非病原性大腸菌では、現在のところ約 110 種類の sRNA が知られているが、その機能が分かっているものは 20 種類程度である。

腸管出血性大腸菌 0157:H7 Sakai 株 (0157 株) はしばしば食中毒の原因になる病原菌である。申請者の属する研究室において、0157 株に存在する sRNA の網羅的探索が行われ、新規 sRNA として *Esr41* が同定された。*esr41* 遺伝子の過剰発現により、宿主細胞への接着性の低下、及び LEE 遺伝子群がコードする細胞接着に直接関与する III 型分泌装置の構成タンパク質や分泌タンパク質などの病原性因子の量の減少が起こることが見出されたが、その機構は不明であった。申請者は、*Esr41* による病原性因子の減少は、LEE 遺伝子群全体の発現を制御する転写因子 *ler* の遺伝子発現の低下によりもたらされたことを突き止めた。さらに、*Esr41* は *ler* を標的とし、その翻訳を抑制することを示した。次に申請者は、*Esr41* による *ler* mRNA の翻訳抑制の分子機構を明らかにするために、*Esr41* と *ler* mRNA との相互作用に関して解析を行い、RNA シャペロン Hfq の存在下でのみ、両者は複合体を形成することを明らかにした。複合体中では両者は塩基対を形成していると考えられるため、*Esr41* と *ler* mRNA のそれぞれに系統的な変異を導入し、その効果を解析することにより、相互作用に重要な領域を特定することに成功した。多くの sRNA の存在は知られているが、その標的が特定された例は限られており、しかもその作用に重要な RNA 上の領域まで同定できた例は少なく、この研究成果は高く評価できる。また、*Esr41* は病原菌の病原性という医学的に重要な性質に影響を与える分子であり、その作用点を突き止めたことは科学的なインパクトが大きい成果である。

続いて申請者は、*Esr41* が Hfq により安定化することを示し、その安定化に重要な *Esr41* 上の領域を同定した。Hfq は様々な sRNA が機能するために必須のタンパク質であるが、どのようにして多様な sRNA に作用できるのか等、sRNA との相互作用の機構については不明な点が多い。申請者が得た知見は、sRNA によるグローバルな遺伝子発現に関わる Hfq の作用機構を解明する上での重要な足がかりになると期待される。最後に申請者は、*Esr41* が大腸菌の遊走性の上昇を引き起こすことを発見し、さらに、この上昇が、*Esr41* によりべん毛遺伝子群の最上流転写因子遺伝子 *flhD* の翻訳が促進されることに起因することを示した。

0157 株において LEE 遺伝子群の発現が上昇する場合には、べん毛遺伝子群の発現は抑制されることが知られている。この 2 つの遺伝子群の協調的発現制御機構は、宿主への感染時においては、運動装置であるべん毛は不要であるため、また宿主側の免疫による攻撃を免れる必要があるために存在すると理解されている。Esr41 は、単一の分子で少なくとも *ler* と *flhDC* という 2 種の異なる標的 mRNA の翻訳を同時に調節することにより、この協調的発現制御とは逆の制御を行う、という極めて興味深い機能を持った sRNA であり、この点を明らかにした本研究が、未知の点がまだ多く残されている 0157 株の病原性発現調節機構の解明に果たした貢献は大きい。

以上の評価により、審査委員会は、本論文が博士学位論文として十分な学術的価値を有するものと結論した。

2014 年 1 月 8 日（水）午後 3 時より本論文についての公聴会を開き、論文の内容の説明と質疑応答を行なった。申請者は論文について明快に説明し、質疑に対する応答も満足すべきものであった。