

論文要約

研究題目 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

須藤 直樹

第1章 序論

tRNA 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 は様々なストレス条件下で転写誘導され、標的遺伝子の発現を制御し、それを通して細胞のストレス環境への順化や病原性発現に寄与する。

sRNA による遺伝子発現制御は、多くの場合、翻訳制御であり、sRNA は標的遺伝子の mRNA と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、または mRNA の二次構造を変化に伴う翻訳効率の上昇を引き起こす。このような sRNA による翻訳制御において RNA シャペロン Hfq は必須の因子であることが知られている。

近年、様々な細菌で sRNA の網羅的同定が行われており、非病原性大腸菌 K-12 株（以下、K-12 株）では 100 種を超える sRNA が同定されている。しかしながらその多くは機能未知である。当研究室では、腸管出血性大腸菌 O157:H7 Sakai 株（O157 Sakai 株）に存在する sRNA の網羅的探索を行い、新規 sRNA である Esr41 (enterohemorrhagic Escherichia coli O157 small RNA #41) を同定した。*esr41* の過剰発現により、宿主細胞への接着性の低下、及び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の量の減少が起こることが見出された。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。

以上の結果を基に、本研究では、Esr41 による LEE 遺伝子群発現の抑制機構（第2章）、Hfq による Esr41 安定化機構（第3章）の解明を目指した。また *esr41* 過剰発現株において、遊走性の上昇、及び遊走性を司るべん毛の構成因子 FliC タンパク質量の増加を新たに見出した。そのため、Esr41 によるべん毛遺伝子群発現の促進機構（第4章）の解明を目指した。

第2章 Esr41 による LEE 遺伝子群発現の抑制機構の解析

Esr41 による LEE 遺伝子群の発現抑制を定量的 PCR により検証した結果、*esr41* の過剰発現により、LEE 遺伝子群全体の発現を制御する転写因子 *ler* と *ler* の発現を制御する *pchA* の mRNA 量が減少した。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が示唆された。バクテリア sRNA による標的 mRNA との塩基対形成を介した翻訳制御では RNA シャペロン活性を持つ RNA 結合タンパク質 Hfq が重要な役割を果たすことが知られており、Esr41 による *ler* 抑制は Hfq に依存することから、Esr41 は、*ler* mRNA と塩基対形成することが示唆された。そこで、*in vitro* での Esr41 と *ler* mRNA の結合をゲルシフト法により解析したところ、Hfq 存在下でのみ Esr41/*ler* mRNA/Hfq の三者複合体が形成された。次に Esr41/*ler* mRNA 間の塩基対形成領域を同定するために、*ler* mRNA、もしくは Esr41 に変異を導入し、その効果を解析した。その結果、*ler* mRNA の SD 配列、及び Esr41 の 16 - 28 塩基領域が Esr41 による *ler* 抑制に重要であることが示された。

第3章 Hfq による Esr41 安定化機構の解析

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。本研究では、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。加えて、Esr41 の安定性を野生株と *hfq* 欠損株で解析した結果、*hfq* 欠損株では Esr41 の安定性が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 の転写開始点から Rho 非依存性ターミネーターの手前までの範囲に系統的に 5、または 6 塩基の欠失を導入した一連の Esr41 部分欠失体を、野生株と *hfq* 欠損株で産生させ、各 Esr41 部分欠失体の RNA 量を解析した。その結果、Esr41 の 11 - 15 塩基領域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 塩基領域欠失体においても、同様の結果を得た。この 2 つの Esr41 部分欠失体と Hfq の結合をゲルシフト法で解析した結果、この 2 つの欠失体は Hfq と結合し難いことが示された。このことから、11 - 15 塩基、及び 31 - 35 領域欠失体の RNA 量の低下は、Hfq との結合能の低下に起因すると思われた。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、11 - 15 塩

基、及び 31 - 35 塩基領域欠失体では、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示唆された。

第 4 章 Esr41 によるべん毛遺伝子群発現の促進機構の解析

O157 Sakai 株において *esr41* を過剰に発現させると、遊走性の上昇、及び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。O157 Sakai 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、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 FlhD タンパク質量の増加も見られた。これらの結果から、Esr41 は *flhD* 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 *flhD* プロモーター活性の変動は見られなかった一方で、*flhD* プロモーターをアラビノースプロモーターに置換した *flhD* 遺伝子を用いても、*esr41* の発現により FlhD タンパク質量の増加が見られた。この結果は、Esr41 が *flhD* の翻訳を促進することを示す。

第 5 章 総合考察

O157 Sakai 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の意義は、宿主細胞への接着後では運動性を司るべん毛は不必要であるため、また、べん毛は宿主側の免疫の対象となるので感染後は、宿主の自然免疫系の応答を回避するためだと考えられている。Esr41 は、現在報告されている協調的発現制御とは逆の制御、つまり LEE 遺伝子群の発現を抑制し、べん毛遺伝子群の発現を促進する新因子であることから、O157 Sakai 株の病原性発現制御機構の一端を担っていると考えられる。*esr41* の発現制御機構は未解明であるが、何らかの環境条件下で *esr41* は転写誘導され、O157 株の感染戦略・生存戦略において重要な働きをすることが予想される。そのため、Esr41 の生理学的意義を追求するためには、*esr41* の発現制御機構を理解することが重要であると考えられる。