

博士論文

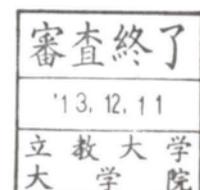
腸管出血性大腸菌 O157:H7 Sakai 株に存在する

Small Regulatory RNA Esr41 の機能解析

2013 年

立教大学大学院 理学研究科 生命理学専攻

須藤 直樹



参考論文

Naoki Sudo, Akiko Soma, Akira Muto, Sunao Iyoda, Mayumi Suh, Nanako Kurihara, Hiroyuki Abe, Toru Tobe, Yoshitoshi Ogura, Tetsuya Hayashi, Ken Kurokawa, Makoto Ohnishi, Yasuhiko Sekine

A novel small regulatory RNA enhances cell motility in enterohemorrhagic *Escherichia coli*.

Journal of General and Applied Microbiology 2014 in press

目次

論文要旨	1
第1章 序論	4
第2章 Esr41 による LEE 遺伝子群発現の抑制機構の解析	
1. 要旨	15
2. 結果	16
3. 考察	37
第3章 Hfq による Esr41 安定化機構の解析	
1. 要旨	41
2. 結果	43
3. 考察	54
第4章 Esr41 によるべん毛遺伝子群発現の促進機構の解析	
1. 要旨	57
2. 結果	59
3. 考察	71

第5章 総合考察	74
材料と方法	79
表	95
参考図	102
参考文献	104
謝辞	112

論文要旨

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る。

第1章 序論

(1) 低分子 RNA と Hfq

遺伝子発現制御を担う低分子 RNA (以下、sRNA と表記する) は、真正細菌において広く保存されており、その多く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することが知られている (Gottesman, 2004; Papanfort and Vogel, 2010; Wassarman, 2002; Waters and Storz, 2009)。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、また例は少ないものの、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 (Lease et al., 1998; Majdalani et al., 1998; Večerek et al., 2010)。このような sRNA による翻訳制御には RNA シャペロン活性を持つ Hfq が必須の因子として機能する (Aiba, 2007; Vogel and Luisi, 2011)。Hfq は N 末端側の Sm ドメインを介してドーナツ型のホモ 6 量体の環構造を形成する (Møller et al., 2002a; Schumacher et al., 2002; Zhang et al., 2002)。また、Hfq は RNA 結合タンパク質であり、RNA シャペロン活性が確認されている。sRNA の作用における Hfq の役割として、sRNA の安定化 (Gottesman, 2004)、sRNA と標的 mRNA の間の塩基対形成の促進 (Kawamoto et al., 2006)、sRNA-mRNA 複合体にエンドリボヌクレアーゼである RNase E をリクルートすることが挙げられる (Morita et al., 2005)。しかしながら、Hfq の sRNA/標的 mRNA 間の塩基対形成促進機構や sRNA の安定化機構の詳細については未解明である。

sRNA の網羅的な探索は、多くの真正細菌で行われており、特に大腸菌では様々な方法を用いて行われている (Kawano et al., 2005; Huang et al., 2009;

Sharma and Vogel, 2009; Sittka et al., 2008; Zhang et al., 2003)。それらの解析の結果、現在までに約 110 種の sRNA が大腸菌遺伝子発現ネットワーク統合データベース RegulonDB に登録されている (Salgado et al., 2013)。しかしながら、これらの解析は主に非病原性大腸菌 K-12 株を用いて行われたものであり、腸管出血性大腸菌を含む病原性大腸菌に存在する sRNA の網羅的探索はあまり行われていないが、当研究室では腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *Escherichia coli* : EHEC と表記する) O157:H7 Sakai 株 (O157 Sakai 株と表記する) に存在する sRNA を複数種、同定している (Sudo et al., 2014)。

(2) O157 Sakai 株

O157 Sakai は、1996 年に大阪・堺市で起きた集団感染時に単離された EHEC である。EHEC がヒトに感染すると出血性大腸炎を引き起こし、重篤な場合は溶血性尿毒症や脳症といった疾患を合併する (Frankel et al., 1998; Nataro and Kaper, 1998)。EHEC の病原性は腸管上皮細胞に接着することにより発揮される。この腸管上皮細胞への接着には、III 型分泌装置とそこから分泌される分泌タンパク質が重要な働きをすることが知られており、EHEC はこの III 型分泌装置を介して腸管上皮細胞に接着し、病原性を発揮する (Elliott et al., 1998; Frankel et al., 1998; Nataro and Kaper, 1998)。III 型分泌装置や多くの分泌タンパク質は、5 つオペロン (LEE1~5) から構成される LEE (locus of enterocyte effacement) 遺伝子群にコードされている (Frankel et al., 1998; Nataro and Kaper, 1998)。また、LEE 遺伝子群は、LEE1 オペロンの先頭にコードされている転写因子 *ler* によって正に制御されており (Elliott et al., 2000; Mellies et al., 1999)、*ler* は転写因子 *pchA*、*B*、

Cによって正に制御されている。*pchA*、*B*、*C*の使い分けについては未解明な点が多いが、*pchA*の重要度が高いことが報告されている (Iyoda and Watanabe, 2004)。

病原性発現の際、べん毛遺伝子群は GrlRA システムを介して、発現が抑制される (Iyoda et al., 2006)。その意義は、宿主細胞への感染の際、べん毛は宿主側の抗体の標的となるため、それを避けるためだと考えられている (Hayashi et al., 2001a)。加えて、べん毛遺伝子群を構成的に発現させた EHEC では、宿主細胞への接着性が減少することも報告されており (Iyoda et al., 2006)、このような LEE 遺伝子群とべん毛遺伝子群の相関的な発現制御は、EHEC の病原性発現において重要だと考えられる。

O157 Sakai 株の全ゲノム配列は 2001 年に決定された (Hayashi et al., 2001b)。既知の非病原性大腸菌 K12 株の染色体ゲノム配列と比較すると、O157 Sakai 株 (染色体ゲノム約 5.5 Mbp と 2 つのプラスミド約 0.1 Mbp) と K-12 株 (約 4.6 Mbp) の間で 4.1 Mbp にわたる領域が非常によく保存されており、この領域内での遺伝子の配置はほぼ同じである。この高度に保存されたゲノムの基本骨格に、各菌株に特異的な様々な大きさの DNA 断片がさまざまな箇所に多数挿入されており、O157 Sakai 株に特異的な配列は S ループ、K-12 株に特異的な配列は K ループと呼ばれている。S ループのうち、大きなループの約 60% はプロファージあるいはファージ様エレメントであり、明らかにプロファージと判定できる領域が 18 ヶ所 (Sakai prophage ; Sp1 - 18) 存在する。またプロファージ様の可動性遺伝因子と考えられるものが 6 ヶ所ある (Sakai prophage like elements ; SpLE1 - 6)。K ループも同様であり、外来性遺伝子の獲得においてファージあるいはファージ様の遺伝因子が大きな役割を果たしていると考えられる (Hayashi

et al., 2001b)。S ループには 2 種類の *stx* など多数の病原性関連遺伝子がコードされている (Tobe et al., 2006)。しかしながら、O157 Sakai 株における病原性発現の制御機構は未だ不明な点が多く、病原性発現制御に関わる未知の因子が S ループ上にコードされている可能性は極めて高い。

(3) O157 Sakai 株に存在する新規 sRNA の同定 (Sudo et al., 2014)

当研究室では、O157 Sakai 株に存在する新規 sRNA の同定を目的に、S ループの遺伝子間領域 (intergenic region : IGR) に着目して解析を行った。つまり、ここで同定される sRNA は O157 Sakai 株に存在し、K-12 株には存在しないことを意味する。情報学的解析により、S ループには 400 bp 以上の IGR が 115 カ所存在することがわかり、各 IGR を IGR1 - IGR115 とした。この IGR の中で、「シグマ 70 型のプロモーター配列」と「Rho 非依存性ターミネーター配列」の両方を有する IGR を探索した結果、27 カ所を同定した (図 1)。このうち、IGR41 の予想転写領域に特異的なプローブを用いてノーザンブロットィングを行った結果、特異的なバンドを検出した (図 2A)。また、プライマー伸長法により同定した 5'末端の位置、Rho 非依存性ターミネーターの位置、及びノーザンブロットィングの結果から、検出した転写産物は 66 - 74 nt であることが予想され、これを Esr41 (enterohemorrhagic Escherichia coli O157 small RNA #41) と名付けた (図 2)。O157 Sakai 株において *esr41* 遺伝子は SpLE1 の内部に存在する (図 3A)。*esr41* は O157 Sakai 株以外の EHEC や赤痢菌のゲノムにも存在する (図 3B)。これらの *esr41* の配列はプロモーター配列からコード領域まで高度に保存されている。O157 Sakai 株だけでなく、O157:H7 EDL933 株、O26:H11 株、O111:H-

株の EHEC は SpLE1、もしくは SpLE1 様エレメントを持ち (Kusumoto et al., 2009)、この上に *esr41* が存在している。O157:H7 EDL933 株は *esr41* を 2 コピー持ち、1 つは SpLE1 上に存在する。一方、赤痢菌 (*Shigella*) には SpLE1 様エレメントは存在しないため、赤痢菌における *esr41* 獲得過程は単純なファージによる水平伝播ではないことが予想される。

(4) *esr41* 過剰発現株の表現型

Esr41 の機能を解明する目的で、*esr41* の転写領域と予想される転写制御領域 (Esr41 の 5'末端を+1 とした場合の-483 から+114) を運ぶ pBR タイプのプラスミド pRS-Esr41 を構築した。pRS-Esr41 を保持する O157 Sakai 株は、保持しない株と比べ *esr41* を過剰に発現することが確認されている。この *esr41* 過剰発現株を用いて宿主細胞への接着性を解析した結果、*esr41* の過剰発現により細胞接着性が低下することを見出した (図 4)。また、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が減少することを見出した (図 5)。III 型分泌装置とその分泌タンパク質は LEE 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示唆された。一方、*esr41* 欠損による表現型への影響は見られなかった。

(5) 本研究の目的

本研究は、以上の知見を基に、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することを新たに見出した。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。

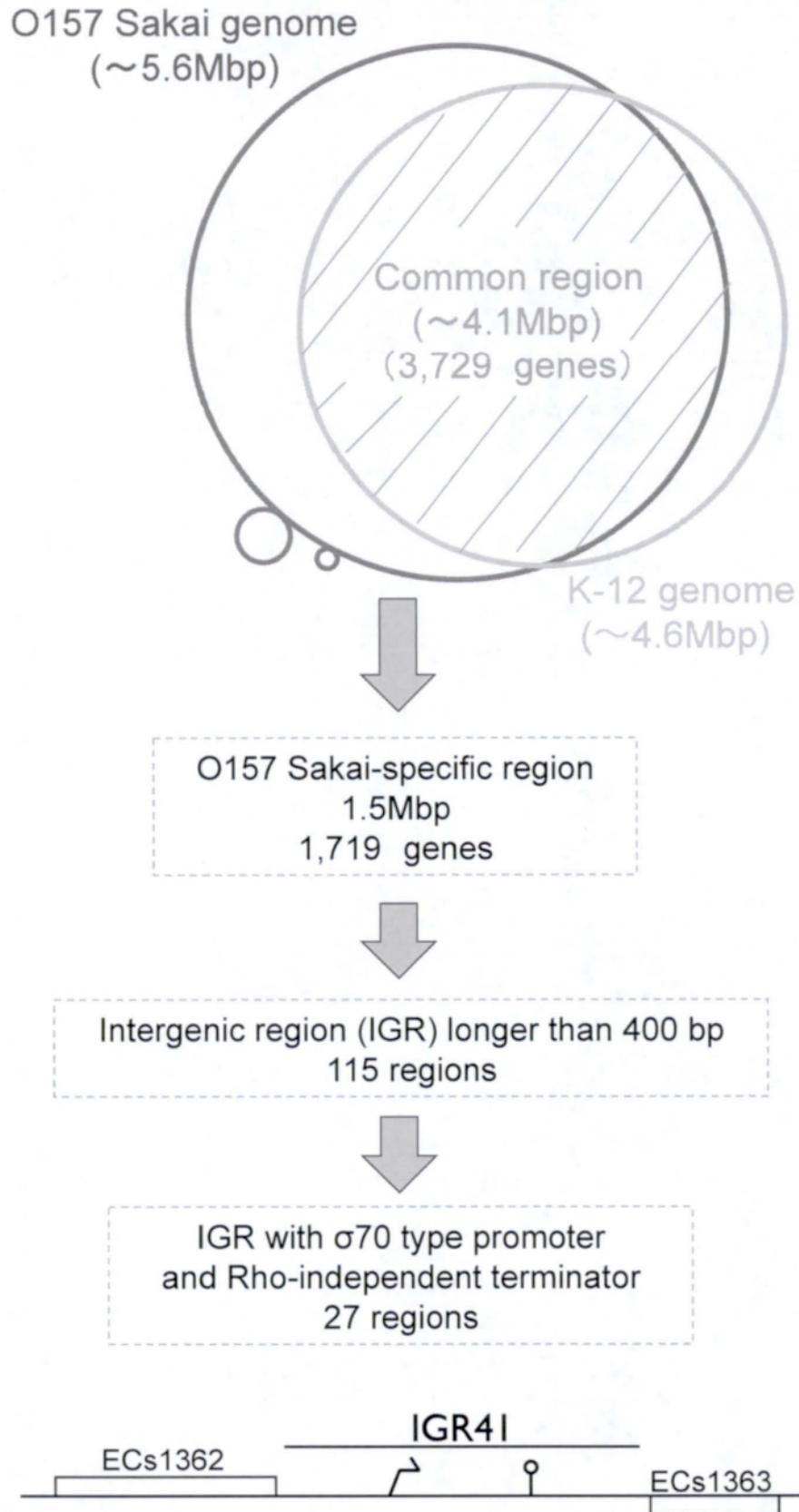


図1 O157 Sakai株とK-12株のゲノム比較と転写単位を持つ遺伝子間領域の同定

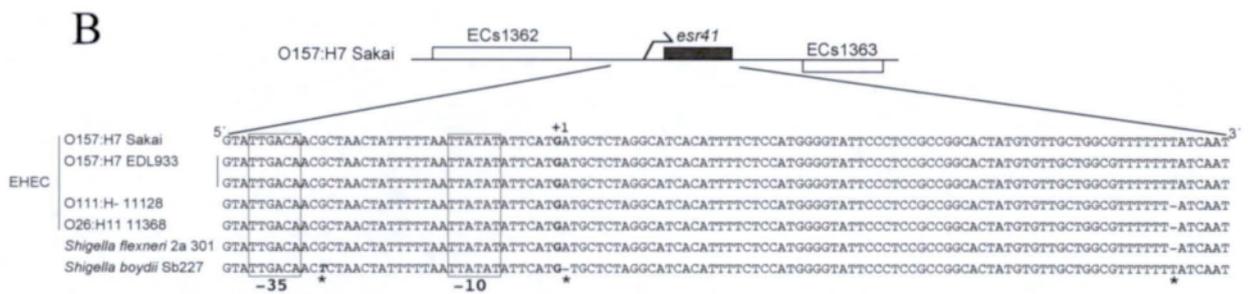
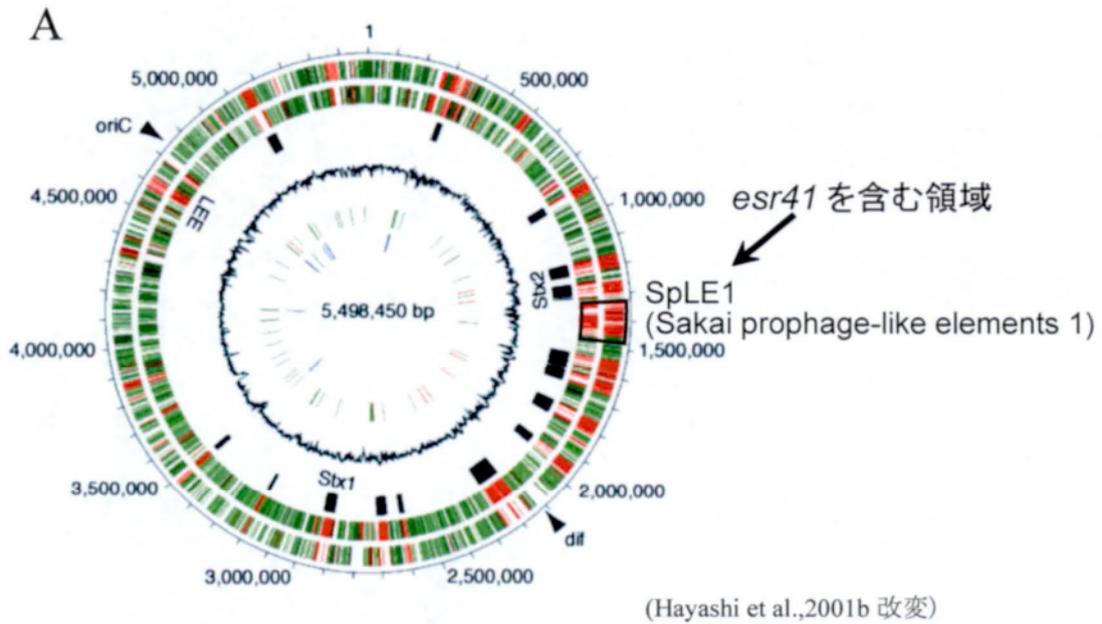


図3 *Esr41*の同定II

A. *esr41*遺伝子の染色体上における位置。

B. *esr41*遺伝子を保持する細菌。

EHECは腸管出血性大腸菌を表す。太文字は*esr41*遺伝子の5'末端を、アスタリスクはO157:H7 Sakai株の配列と塩基配列が異なる部位を、太文字斜体はO157:H7 Sakai株の配列と異なる塩基を示す。

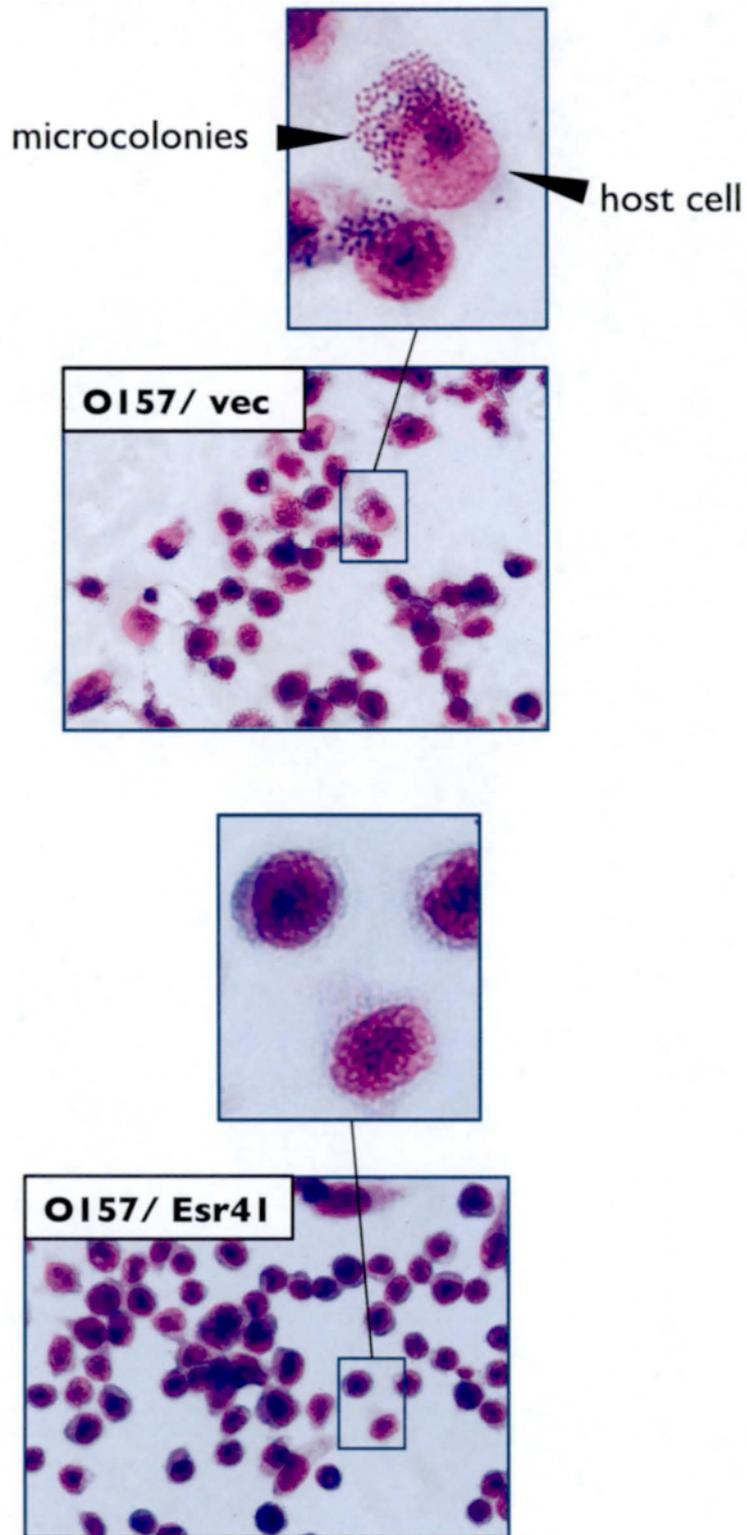


図4 *esr41*の過剰発現により、O157 Sakai株の細胞接着能が低下する。

*esr41*過剰発現株の*in vitro*細胞接着性解析。pRS414 (vec)、またはpRS-Esr41 (Esr41)を保持するSKI-5142株を宿主細胞 (HEp-2細胞)と共に培養し、洗浄後、bis-benzimide H33342により染色体DNAを染色し、顕微鏡により観察した。

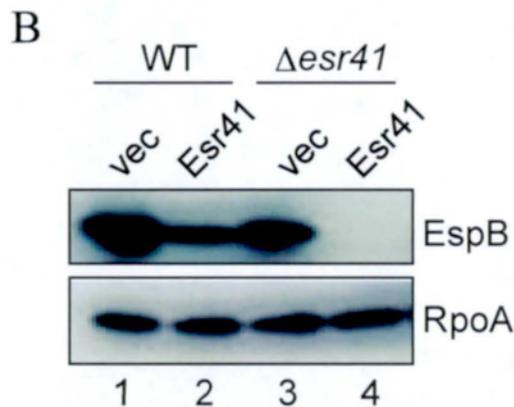
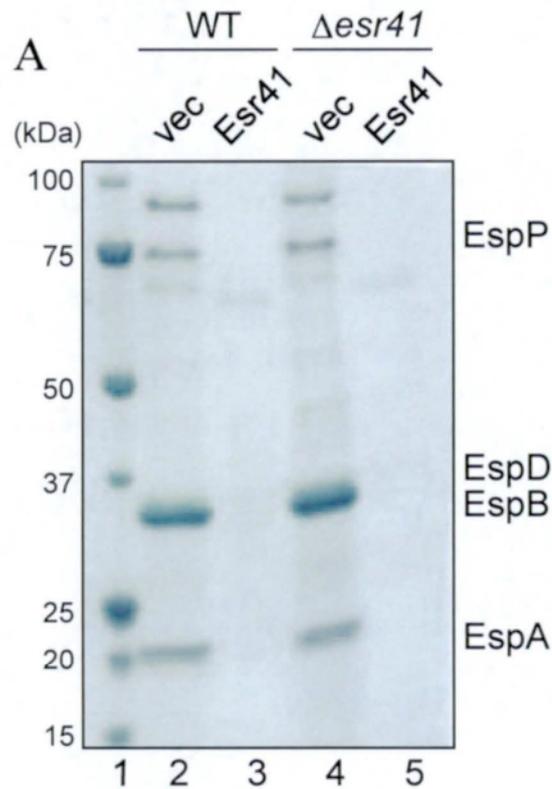


図5 *esr41*の過剰発現により、
O157 Sakai株の分泌タンパク質とIII型分泌装置の構成因子の発現は減少する。

A. *esr41*過剰発現株の細胞上清中に含まれる全分泌タンパク質の解析。

図右にタンパク質サイズから予想される分泌タンパク質名を示す。

B. *esr41*過剰発現株の菌体中に含まれる分泌タンパク質(EspB)の解析。

pRS414 (vec)、またはpRS-Esr41 (Esr41)を保持するSKI-5142株(WT)、またはSKI-5142 Δ *esr41*株(Δ *esr41*)をDMEMで培養し、遠心分離により培養上清と菌体沈殿に分画した。培養上清中のタンパク質をTCA沈殿法により濃縮したタンパク質試料を、SDS-PAGEにより分離、CBB染色により解析した(A)。また、菌体沈殿からタンパク質試料を調製し、anti-EspB抗体、及びanti-RpoA抗体を用いたウェスタンブロットティングにより解析した(B)。

第2章 Esr41によるLEE遺伝子群発現の抑制機構の解析

1. 要旨

これまでの解析から、*esr41* 過剰発現株では、III型分泌装置が形成されず、そのため宿主細胞への接着能が低下することが示された。またIII型分泌装置と多くの分泌タンパク質はLEE遺伝子群にコードされていることから、Esr41はLEE遺伝子群全体の発現を抑制することが示唆された。そこで本章では、Esr41によるLEE遺伝子群の発現抑制機構の解明を目的とした解析を行った。

*esr41*の過剰発現によるLEE遺伝子群、及びその制御因子の発現の変動を、定量的PCRを用いて解析した結果、LEE遺伝子群のLEE5オペロン(*espB*)、及びLEE遺伝子群の発現を制御する転写因子*ler*を含むLEE1オペロン、*pchA*、及び*lrhA*のmRNA量の減少が見られた。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が示唆された。加えて、このEsr41による*ler*抑制は、RNA結合タンパク質Hfqに依存することが示された。Hfqは、sRNAによる標的mRNAとの塩基対形成を介した翻訳制御において重要な因子であることから、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。

2. 結果

(1) *esr41* の過剰発現により *pchA, B, C*、及び LEE 遺伝子群の mRNA 量が減少する。

III 型分泌装置、及び分泌タンパク質は、S ループにある LEE 遺伝子群にコードされている。LEE 遺伝子群は 5 つのオペロン (LEE1 - 5) から成るいわゆる pathogenic island であり、約 40 種の病原性関連遺伝子が存在する (Frankel et al., 1998; Nataro and Kaper, 1998)。LEE 遺伝子群の主要な発現制御は LEE1 オペロンの先頭にコードされている転写因子 Ler を介して行われている (Elliott et al., 2000; Mellies et al., 1999)。LEE1 オペロンの転写は様々な因子により制御されていることが報告されているが、その中でも転写因子 Pch が重要であり、その遺伝子は O157 株染色体上に 5 コピー (*pchA - E*) 存在し、各コピーは染色体上に散在している。各コピーの単独欠損株、及び多重欠失株の解析から、5 コピーのうち、実際に発現し、機能しているのは *pchA, B, C* と考えられており、特に病原性発現において *pchA* の寄与が大きい (Iyoda and Watanabe, 2004)。また、*pchA, B* の発現は LysR 型転写因子 LrhA によって正に制御されることも報告されている (Honda et al., 2009)。

esr41 の過剰発現によって LEE 遺伝子群にコードされているタンパク質量が減少していることから、LEE 遺伝子群の発現を制御する *ler* の発現も抑制されている可能性がある。この可能性の検証のため、O157 Sakai 株である SKI-5142 株に、*esr41* 遺伝子とその予想転写制御領域を運ぶプラスミド pRS-Esr41 (またはベクタープラスミド pRS414) を保持させ、これらを病原性遺伝子の発現上昇を引き起こす DMEM (Abe et al., 2002) で培養した。これらの細

胞における *lrhA*、*pchA*, *B*, *C*、LEE1 オペロン (*ler*)、LEE5 オペロン (*espB*) の mRNA 量を定量的 PCR によって解析した結果、pRS-Esr41 を保持する *esr41* 過剰発現株の *lrhA*、*pchA*, *B*, *C* (これらの遺伝子は相同性が高いため、各 mRNA 量を区別して測定することは難しい)、LEE1 オペロン (*ler*)、LEE5 オペロン (*espB*) の mRNA 量は、pRS414 を保持する株と比べて、それぞれ約 0.2 倍、0.5 倍、0.2 倍、0.1 倍と顕著に減少した (図 6A,B)。これらの結果は、*esr41* の過剰発現により LEE 遺伝子群の主要なレギュレーターである *lrhA*、*pchA*, *B*, *C*、及び *ler* の発現量が減少することで、LEE5 オペロンの発現量が減少したことを示し、同時に *Ler* の制御を受ける LEE2 - 4 の各オペロンの発現量も減少している可能性が高い。またこの結果は、*lrhA*、もしくは *lrhA* の発現制御因子が *Esr41* の標的の一つであることを示唆する。しかしながら、*lrhA* と比べその制御下にある *pchA*, *B*, *C* の方が *esr41* の過剰発現による影響が少ないという結果から、*pchA*, *B*, *C* の転写においては、*lrhA* より他の転写因子の寄与が大きいと考えられる。そのため、*Esr41* による LEE 遺伝子群の発現抑制において、*pchA*, *B*, *C*、及び *ler* の発現抑制が、*lrhA* の発現抑制より重要である可能性が高い。

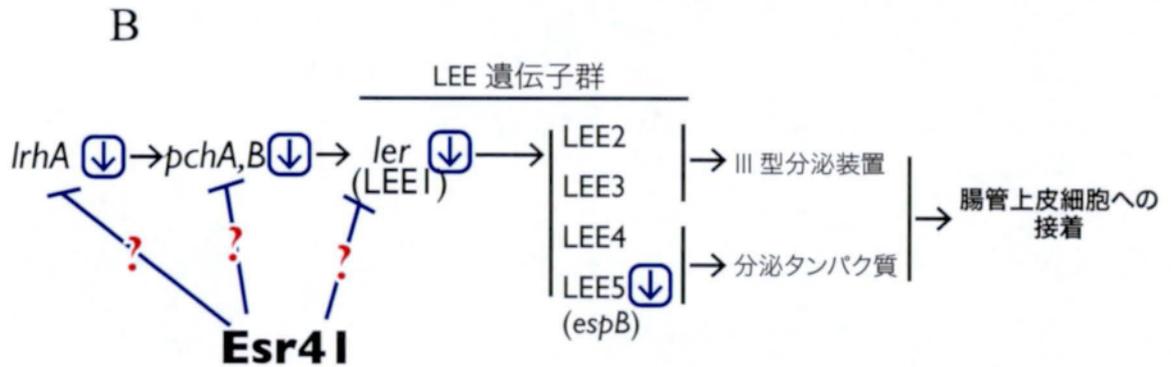
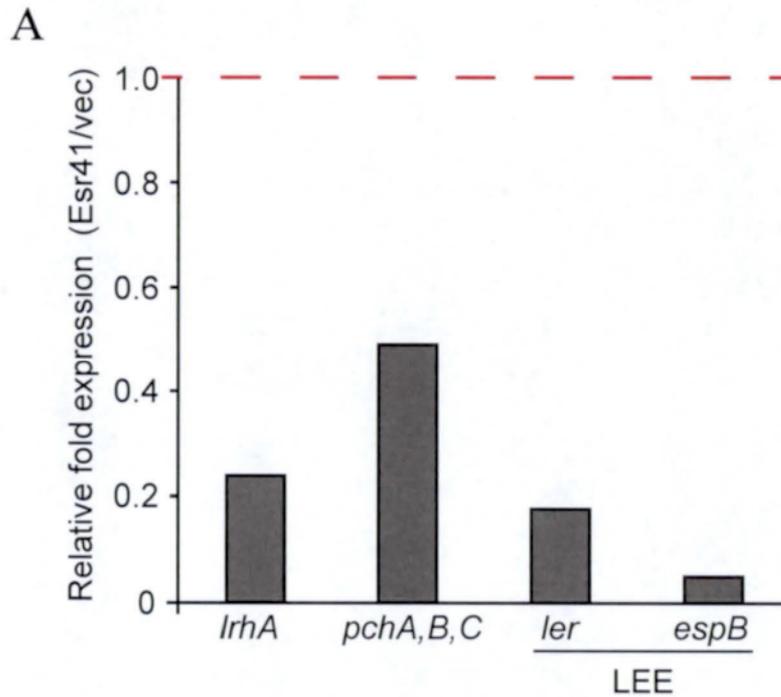


図6 *esr41*の過剰発現により、*lrhA*、*pchA*、及びLEE遺伝子群のmRNA量が減少する。

- A. *esr41*過剰発現株における*lrhA*、*pchA*、及びLEE遺伝子群の遺伝子発現解析。pRS414 (vec)、またはpRS-Esr41 (Esr41) を保持するSKI-5142株をDMEMで培養し、RNA試料を調製した。RNA試料からcDNA試料を調製し、*lrhA*、*pchA*、及びLEE遺伝子群(*ler*、及び*espB*)のmRNA量を定量的PCRにより解析した。
- B. 図6Aのまとめ、及び予想したEsr41の標的遺伝子。pRS414を保持するSKI-5142株と比べ、pRS-Esr41を保持するSKI-5142株の方が、mRNA量が減少している遺伝子を下矢印(青)で示す。

(2) Esr41 は *ler* を標的とし、その翻訳を抑制する。

Esr41 による LEE 遺伝子群の発現抑制は、*pchA*, *B*, *C*、及び *ler* の発現抑制に起因することが示唆された。そのため、*pchA*, *B*, *C*、または *ler* が Esr41 の標的であり、Esr41 がその発現を抑制する可能性が高い。これを検証する目的で、*pchA* 転写制御領域から開始コドンから 19 アミノ酸までの領域 (参考図 1) を、もしくは *ler* の 2 つあるプロモーター P1 と P2 (Islam et al., 2011; Sharp and Sperandio, 2007) のうち開始コドンに近い P2 プロモーターから、開始コドンから 13 アミノ酸までの領域 (参考図 1) を、SD 配列と開始コドンが欠損した *lacZ* 遺伝子にインフレームで結合させた *pchA'*-*lacZ*、*ler'*-*lacZ* を構築した (図 7A 左)。これらのコンストラクトを運ぶ pMW218 プラスミドで、pRS-Esr41 (もしくはコントロールとして pRS414) を保持する *lac* を欠損している O157 Sakai 株 (SKI-5142) を形質転換した。これらの形質転換体を DMEM で培養し、各形質転換体の β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。その結果、*pchA'*-*lacZ* の保持菌、*ler'*-*lacZ* の保持菌の両方で、pRS414 保持菌と比較して、pRS-Esr41 保持菌は β -ガラクトシダーゼ活性が低下した (図 7B)。これらの結果は、定量的 PCR で得られた結果 (図 6) と一致する。Esr41 による *ler'*-*lacZ* の活性の低下は上流因子である *pchA* の発現低下に依る可能性があり、同様に Esr41 による *pchA'*-*lacZ* の活性の低下は何らかの上流因子の発現の変動に依る可能性がある。次に *pchA'*-*lacZ*、*ler'*-*lacZ* を用いて同様の解析を K-12 株 (MG1655 Δ *lacZ*) でも行った結果、O157 Sakai 株の場合と同様に *esr41* の発現による β -ガラクトシダーゼ活性の低下が見られた (図 7B)。*pchA*、及び *ler* は K-12 株には存在しない遺伝子であるため、K-12 株における Esr41 による *ler'*-*lacZ* の活性の低下は少なくとも

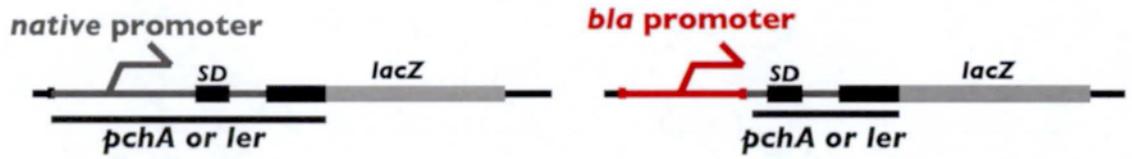
pchA に依存しないことを示し、したがって O157 Sakai 株における *ler'*-*lacZ* の活性の低下も *pchA* 非依存であることが示唆される。また K-12 株においても O157 Sakai 株同様に、Esr41 による *pchA'*-*lacZ* の活性の低下がみられることは、Esr41 の標的が *pchA* である可能性と、Esr41 の標的が、*pchA* の発現を制御する何らかの因子であり、かつその因子が O157 Sakai 株と K-12 株に共通に存在する可能性が考えられる。

ここまでの解析では、Esr41 が *pchA* や *ler* の転写に影響するのか、翻訳に影響するのかを区別できない。そこで、*pchA* や *ler* のプロモーターを、恒常的に機能する β -ラクタマーゼ遺伝子 (*bla*) プロモーターに置換したプラスミドを構築した。具体的には、*pchA* の転写開始点から開始コドンから 19 アミノ酸までの領域 (参考図 1) を、または、*ler* の開始コドンに近いプロモーターの転写開始点の下流から、開始コドンから 13 アミノ酸までの領域 (参考図 1) を、SD 配列と開始コドンが欠損した *lacZ* 遺伝子にインフレームで結合させたコンストラクトを *bla* プロモーターの制御下に置いた P_{bla} -*pchA'*-*lacZ*、 P_{bla} -*ler'*-*lacZ* を構築した。各コンストラクトを運ぶプラスミドで、pRS-Esr41 (または pRS414) を保持する SKI-5142 株を形質転換した。これら形質転換体を DMEM で培養し、各形質転換体の β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。その結果、 P_{bla} -*pchA'*-*lacZ* の活性は *esr41* の発現により変動しなかったが、 P_{bla} -*ler'*-*lacZ* の活性は *esr41* の発現により低下した (図 7B)。次に P_{bla} -*pchA'*-*lacZ*、 P_{bla} -*ler'*-*lacZ* を用いて、同様の解析を K-12 株 (MG1655 Δ *lacZ*) で行った結果、O157 Sakai 株の場合と同様の結果を得た。

以上の結果は、Esr41 が *ler* を標的とし、その翻訳を抑制することを示

す。一方、Esr41 は *pchA* の発現を転写段階で直接、又は間接的に抑制することが示された。Esr41 の作用が直接である場合は、*pchA* の転写制御に関わる DNA 配列に、Esr41 が特異的に結合することで転写を抑制するというモデルが考えられるが、そのような機能を持つ RNA の報告はない。一方、Esr41 の作用が間接的である場合は、前述したように *pchA* 抑制に係る因子は O157 Sakai 株と K-12 株に共通である可能性が高い。

A



B

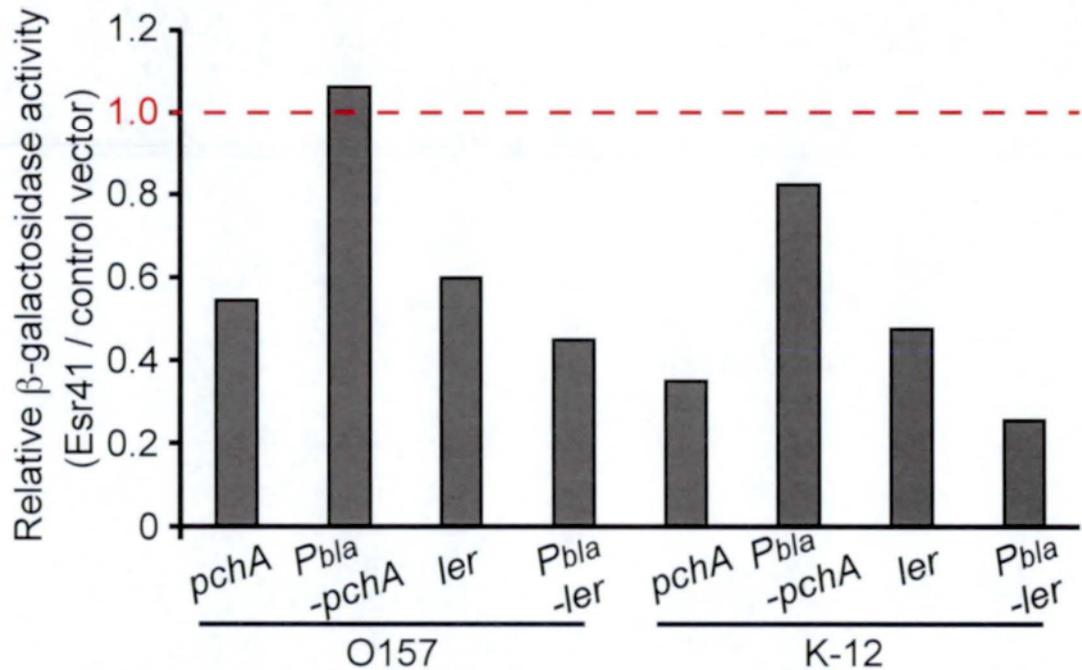


図7 Esr41は*ler*を標的とし、その翻訳を抑制する。

- A. 解析に用いたコンストラクトの略図。*pchA*、もしくは*ler*自身が持つプロモーター依存的に *pchA-lacZ*、または*ler-lacZ*遺伝子が転写されるコンストラクト(左図)。*bla*遺伝子のプロモーター依存的に *pchA-lacZ*、または*ler-lacZ*遺伝子が転写されるコンストラクト(右図)。
- B. Esr41の標的遺伝子の同定。*pchA*、もしくは*ler*自身が持つプロモーター依存的に *pchA-lacZ* (*pchA*)、または*ler-lacZ* (*ler*)遺伝子が転写されるコンストラクトを運ぶプラスミド(それぞれ pMW-*pchA*19aa、pMW-*ler*)または *bla*遺伝子のプロモーター依存的に *pchA-lacZ* (*P_{bla}-pchA*)、または*ler-lacZ* (*P_{bla}-ler*)遺伝子が転写されるコンストラクトを運ぶプラスミド(それぞれ pMW*bla-pchA*19aa、pMW*bla-ler*d1)で、pRS414 (control vector)、または pRS-Esr41 (Esr41)を保持するSKI-5142株(O157)、及びMG1655 Δ *lacZ*(K-12)株を形質転換した。各形質転換体をDMEMでOD₆₀₀ = 0.8まで培養し、培養液の β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。

(3) Esr41 は Hfq 依存的に *ler* の翻訳を抑制する。

Esr41 の *ler* 発現抑制機構として、sRNA と標的遺伝子の mRNA 間の塩基対形成を介した翻訳抑制を予想した (図 8A)。この作用機構では Hfq が必須の因子であることがわかっており、sRNA による翻訳制御における Hfq の役割は、①sRNA の安定化 (Gottesman, 2004)、②sRNA と標的 mRNA 間の塩基対形成の促進 (Kawamoto et al., 2006)、③sRNA-mRNA 複合体にエンドリボヌクレアーゼである RNase E をリクルートすること (Morita et al., 2005) である。そこで、Esr41 による *ler* 抑制効果が Hfq に依存しているかどうかを調べるために、*ler'-lacZ*、または *P_{bla}-ler'-lacZ* を保持する *hfq* 欠損株 (K-12 株) を用いて Esr41 の作用を解析した。その結果、*hfq* 欠損株では Esr41 による *ler* 抑制効果が見られなかった (図 8B)。この結果は、Esr41 は Hfq 依存的に *ler* の翻訳を抑制することを示す。

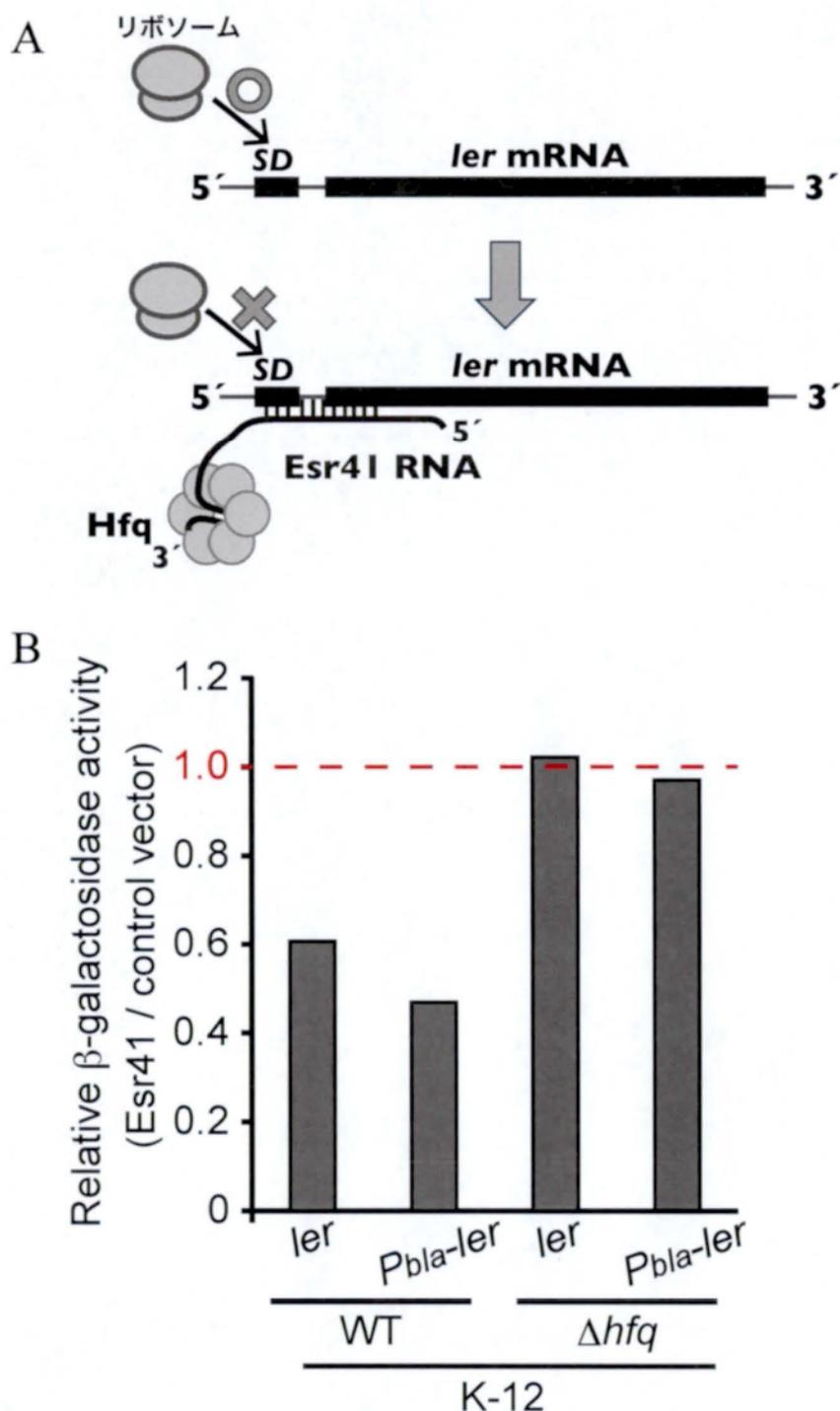


図8 Esr41はHfq依存的に*ler*の翻訳を抑制する。

- A. 予想されるEsr41による*ler*発現抑制機構。Esr41は*ler* mRNAのSD配列、開始コドン周辺と塩基対形成することにより、リボソームのエントリーを阻害し、翻訳が抑制されると予想した。
- B. Esr41の*ler*抑制効果におけるHfqの依存性解析。*ler*自身が持つプロモーター依存的に*ler'-lacZ* (*ler*)遺伝子が転写されるコンストラクトを運ぶpMW-*ler*、または*bla*遺伝子のプロモーター依存的に*ler'-lacZ* (*P_{bla}-ler*)遺伝子が転写されるコンストラクトを運ぶpMW*bla-ler*d1で、pRS414 (control vector)、またはpRS-Esr41 (Esr41)を保持するMG1655 Δ *lacZ*株 (WT)、及びNS1203株(Δ *hfq*)を形質転換した。各形質転換体をLB培地でOD₆₀₀ = 0.8まで培養し、培養液の β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。

(4) *in vitro* において、Esr41 と *ler* RNA は Hfq 存在下でのみ結合する。

これまでの解析から、Esr41 は *ler* mRNA と塩基対形成を介して翻訳を抑制することが想定された。そこで、Esr41 と *ler* mRNA の間で塩基対形成可能な配列を探索した結果、*ler* mRNA の 148 - 172 塩基と、Esr41 の 11 - 35 塩基に塩基対形成可能な領域が存在した(図 9A)。次に、Esr41 と *ler* mRNA の結合を *in vitro* において確かめる目的で、ゲルシフト法による解析を行った。このとき、*ler* mRNA と確実に結合するコントロールとして、Esr41 の 1 - 26 塩基を、*ler* mRNA の 136 - 158 塩基と相補的な塩基を含む配列に置換した Esr41 変異体を用いた(図 9A)。野生型 Esr41 (Esr41-WT : 約 74 nt)、変異型 Esr41 (Esr41-c.ler : 約 74 nt)、及び予想塩基対形成領域を含む 136 - 271 塩基から成る *ler*136 RNA (136 nt) を *in vitro* 転写により合成し、*ler*136 RNA を ^{32}P で 5'末端標識した。Esr41-WT (または Esr41-c.ler) と標識した ^{32}P -*ler*136 RNA を混合後、加熱処理し、ゆっくり 37°C まで冷却するアニーリング処理をすることで Esr41 と ^{32}P -*ler*136 RNA の結合を促した。その後、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により複合体の形成を解析した。その結果、Esr41-WT と ^{32}P -*ler*136 を反応させた場合、Esr41-WT/ ^{32}P -*ler*136 複合体は観察されなかった(図 9B レーン 2-4)のに対して、Esr41-c.ler と ^{32}P -*ler*136 を反応させた場合、Esr41-c.ler/ ^{32}P -*ler*136 の二者複合体が検出された(図 9B レーン 5-7)。また、この複合体形成はアニーリング処理に依存していた(図 9B レーン 5-10)。

in vivo における Esr41 の *ler* 抑制効果は Hfq に依存していたこと(図 8B) から、*in vitro* における Hfq 存在下での Esr41 と *ler* mRNA の結合を解析した。精製した Hfq-His₆ を ^{32}P -*ler*136 と、Esr41-WT (または Esr41-c.ler) の混合液に添加

し反応させた後、非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動により複合体の形成を解析した。 ^{32}P -ler136 と Hfq-His₆ を反応させた場合、 ^{32}P -ler136 のみの場合には見られない複合体が検出された (図 10A レーン 1,2)。この複合体形成が Hfq 依存的であることは、 ^{32}P -ler136 が Hfq-His₆ と結合することを示す。Esr41-c.ler と ^{32}P -ler136、Hfq-His₆ を反応させた場合、 ^{32}P -ler136 と Hfq-His₆、及び ^{32}P -ler136 と Esr41-c.ler を反応させた場合には検出されない複合体が 2 種、検出された (図 10A レーン 2,6,7,8)。下のバンドは図 9 の結果を考慮すると ^{32}P -ler136/Esr41-c.ler の二者複合体であり、上のバンドは ^{32}P -ler136/Esr41-c.ler/Hfq-His₆ の三者複合体であると考えられる。また、Esr41-WT と ^{32}P -ler136、Hfq-His₆ を反応させた場合、 ^{32}P -ler136、Hfq-His₆、及び ^{32}P -ler136 と Esr41 を反応させた場合には検出されない複合体が少量であるが、1 種、検出された (図 10A レーン 2-5)。Esr41-c.ler と ^{32}P -ler136、Hfq-His₆ を反応させた場合の結果 (図 10A レーン 7,8) を考慮すると、この複合体は ^{32}P -ler136/Esr41-WT/Hfq-His₆ の三者複合体だと考えられる。これを確かめる目的で、 ^{32}P -ler136 に加え、5'末端標識した ^{32}P -Esr41-WT を用いて同様のゲルシフト実験を行った。その結果、図 10A レーン 4,5 で見られた ^{32}P -ler136/Esr41-WT/Hfq-His₆ を再度、検出することができた (図 10B レーン 4,5)。また ^{32}P -Esr41-WT と ler136、Hfq-His₆ を反応させた場合、 ^{32}P -ler136/Esr41-WT/Hfq-His₆ と同じサイズの複合体が観察された (図 10B レーン 9,10)。以上の結果は、検出された複合体が ler136/Esr41-WT/Hfq-His₆ からなる三者複合体であることを示す。

以上の結果は、*in vitro* において、Esr41 と *ler* mRNA は Hfq 存在下で結合することを示す。

A

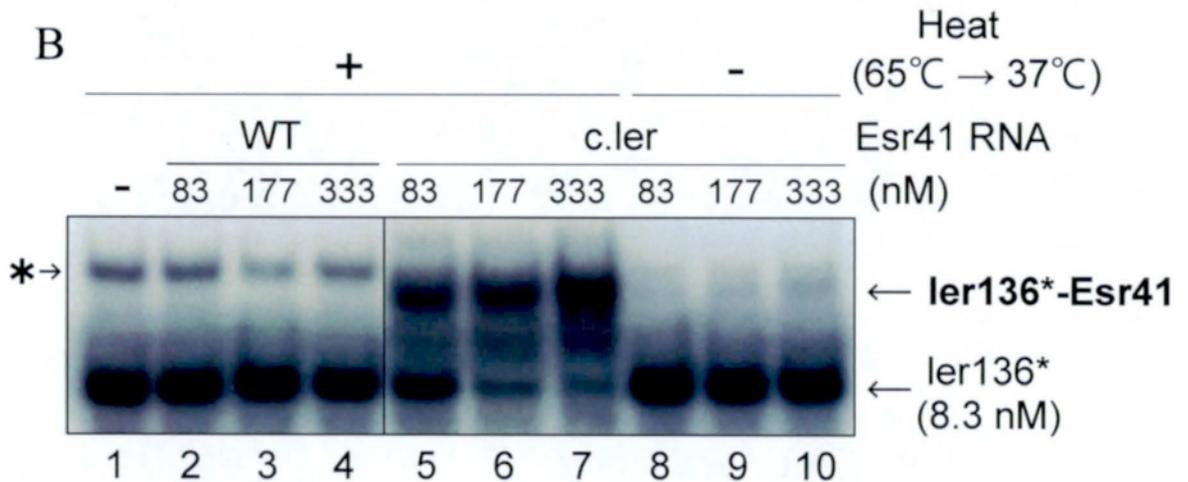
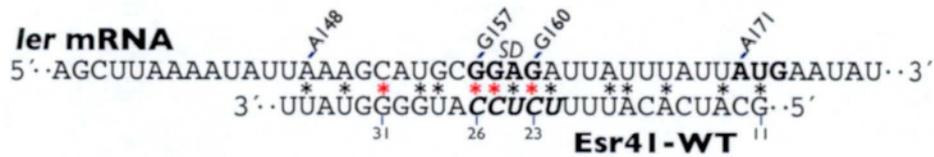


図9 Esr41-c.ler はアニーリング処理により *ler* RNA と結合するが、
Esr41-WT は *ler* RNA と結合しない。

- A. Esr41-*ler* mRNA間の塩基対形成モデルと、Esr41 (c.ler)と*ler* mRNA間の塩基対形成モデル。赤のアスタリスクはG-C間の水素結合を示す。黒のアスタリスクはA-U間、及びG-U間の水素結合を示す。*ler* mRNA側の数字は、開始コドンから遠い方のプロモーターの転写開始点を1としたときの(参考図1)、Esr41側の数字は5'末端を1としたときの塩基数。
- B. アニーリング処理によるEsr41と*ler* RNA結合解析。*ler* mRNAの136 - 271の範囲から成るler136、及びEsr41-WTとEsr41-c.lerを*in vitro*転写により合成した。³²P標識したler136 (8.3 nM)と図に示す量のEsr41-WT、またはEsr41-c.lerをreaction buffer中で混合した。混合溶液を65°Cで3分間加熱処理後、30分間かけて37°Cまで徐冷した。その後、混合液を4%非変性ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により分離した。黒のアスタリスクはler136同士の対合により生じた複合体だと考えられる。

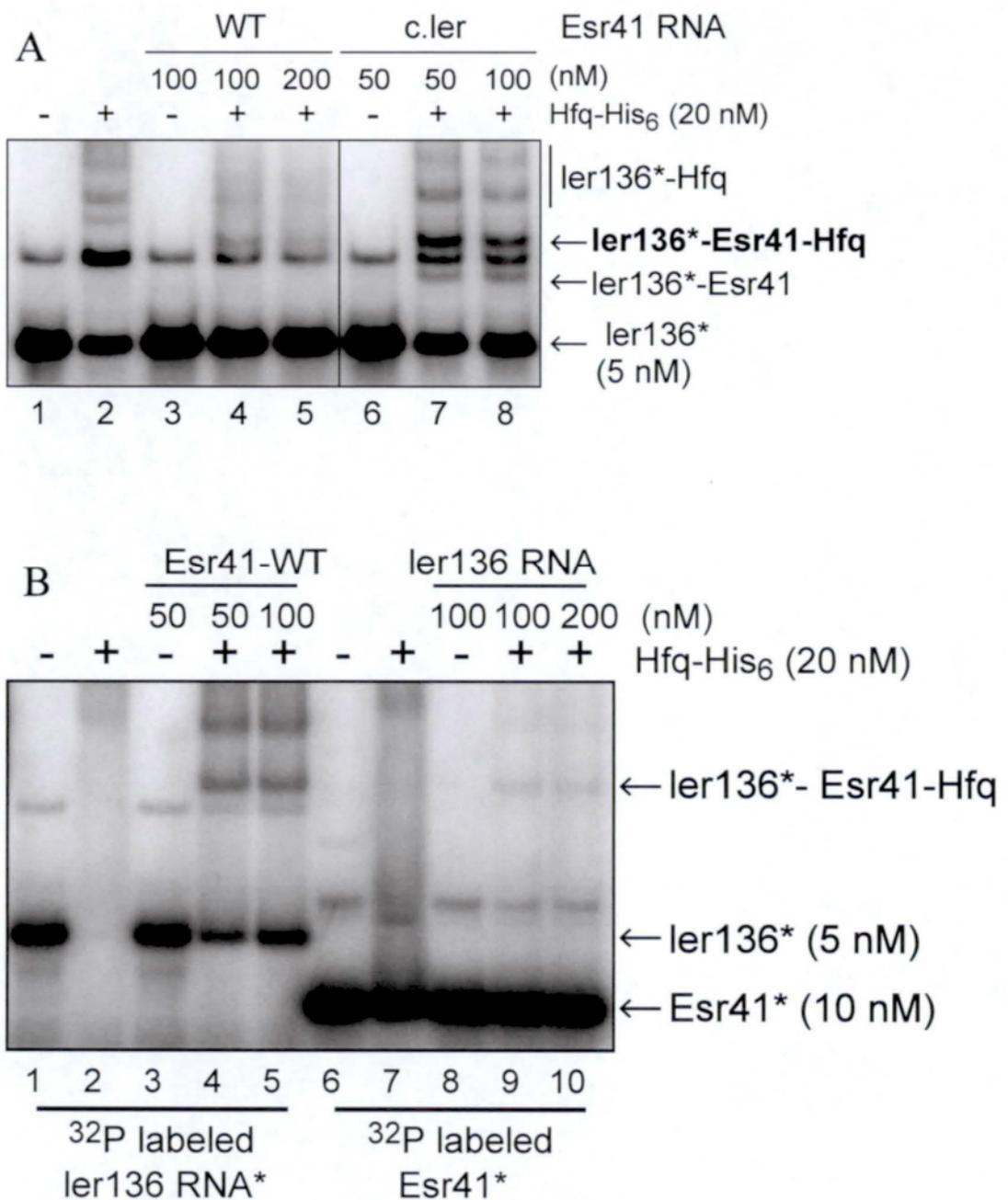


図10 ESR41はHfq存在下でler RNAと結合する。

A. Hfq存在下におけるEsr41とler RNA結合解析①。

B. Hfq存在下におけるEsr41とler RNA結合解析②。

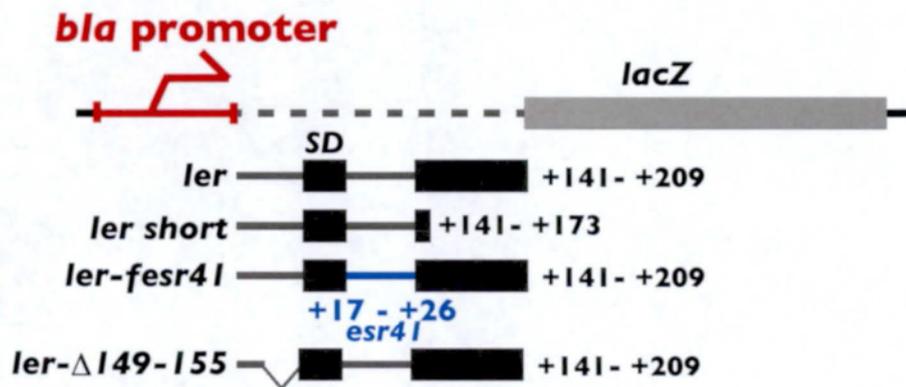
ler mRNAのの範囲を含むler136、及びEsr41-WTとEsr41-c.lerを*in vitro*転写により合成した。図に示す量の³²P標識したler136 (A、B)、または³²P標識したEsr41-WT (B)と、図に示す量のEsr41-WT (A、B)、Esr41-c.ler (B)、またはler136 (B) と図に示す量のHfqをreaction buffer中で混合した。37°Cで10分間反応後、混合液を4%非変性ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により分離した。

(5) Esr41 による *ler* 抑制効果において、*ler* mRNA の SD 配列以外は重要ではない。

in vitro において Esr41 と *ler* mRNA の結合が確認されたので、次に Esr41 と *ler* mRNA の塩基対形成領域の同定を目指した。そのためにまず、Esr41 による *ler* 抑制に必要な *ler* mRNA 側の最小領域の決定を目指した。これまでの解析から、図 7 で用いた $P_{bla-ler'-lacZ}$ (*ler*) に含まれている *ler* mRNA の 141 - 209 塩基の領域 (*ler* の P1 プロモーターの転写開始点を 1 とする: 参考図 1) が Esr41 による *ler* 抑制に必要な範囲であったので (図 11A,B)、このコンストラクトを基準に 3 つの変異体を構築した (図 11A)。1 つ目が、 $P_{bla-ler'-lacZ}$ に含まれていた *ler* の 13 アミノ酸のコード領域を開始コドンのコード領域のみにしたコンストラクト (*ler short*)、2 つ目が $P_{bla-ler'-lacZ}$ の SD 配列と開始コドンの間の 10 塩基を、二次構造を組まないと予想される *esr41* の 17 - 26 塩基に置換したコンストラクト (*ler-fesr41*)、3 つ目が $P_{bla-ler'-lacZ}$ の SD 配列の上流の 7 塩基を欠失させたコンストラクト (*ler Δ 149-155*) である。各コンストラクトを運ぶプラスミドで、pRS-Esr41 (または pRS414) を保持する K-12 株を形質転換した。その形質転換体を培養し、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定した。解析の結果、*ler short*、*ler-fesr41*、*ler Δ 149-155* のどのコンストラクトにおいても、141 - 209 塩基の領域を持つ *ler* のコンストラクトと同程度の *ler* 抑制効果が見られた (図 11B)。これらの結果から、SD 配列上流の 149 - 155 塩基、SD 配列と開始コドンの間の 161 - 170 塩基、開始コドン下流の 174 塩基以降の配列は Esr41 による *ler* 抑制効果において重要ではないことが示された。これは、Esr41 による *ler* 抑制効果において、*ler* mRNA の SD 配列が特に重要であることを示唆する。

また、*ler short*、及び *ler-fesr41* の両コンストラクトの β -ガラクトシダーゼ活性は、*ler*、及び *ler Δ 149-155* と比べて顕著に低下した。この結果は、SD 配列から開始コドンの間の領域と開始コドン直下のコード領域が、*ler* の翻訳効率に影響を与えるシス配列であることを示す。これらのシス配列が開始コドン付近に存在することから、おそらくこれらのシス配列は、*ler* mRNA とリボソームの結合の安定化による効率的な翻訳開始に貢献していると考えられる。

A



B

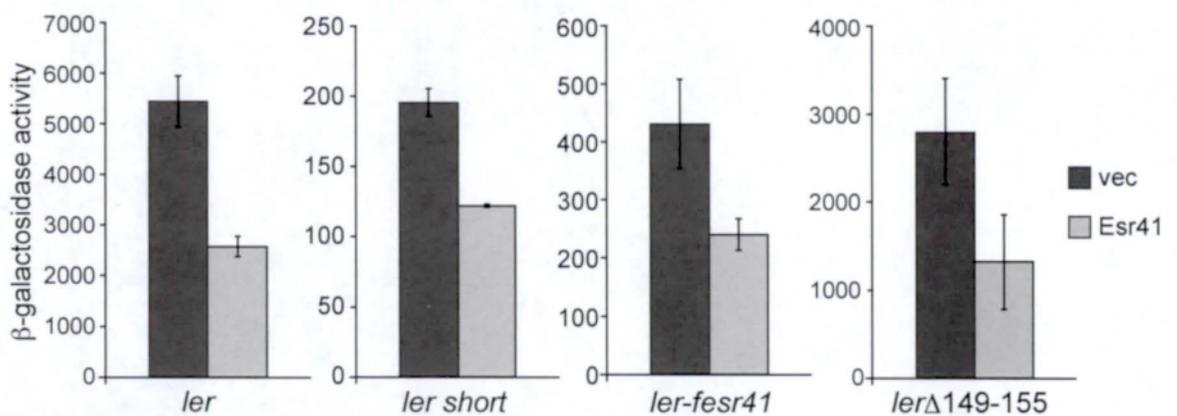


図11 Esr41による*ler*抑制効果において *ler* mRNAのSD配列以外は重要ではない。

A. 解析に用いたコンストラクトの略図。

B. Esr41の*ler*抑制効果における *ler* mRNAの翻訳領域、SD配列と開始コドン間、SD配列前の配列の重要性の解析。Aに示すコンストラクト (P_{bla} -*ler*、 P_{bla} -*ler short*、 P_{bla} -*ler-fesr41*、 P_{bla} -*lerΔ149-155*)を運ぶプラスミド(それぞれpMWbla-*ler*d1、pMWbla-*ler short*、pMWbla-*ler-fesr41*、pMWbla-*lerΔ149-155*)で、pRS414 (vec)、またはpRS-Esr41 (Esr41)を保持するMG1655Δ*lacZ*株を形質転換した。各形質転換体をLBでOD₆₀₀ = 0.8まで培養し、培養液のβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した。

(6) Esr41 による *ler* 抑制効果における Esr41 の stem1 と stem2 の変異の影響

Esr41 と *ler* mRNA の塩基対形成領域の同定を目的に、Esr41 による *ler* 抑制に必要な Esr41 の領域の同定を目指した。Esr41 の二次構造を、RNA 二次構造予測ソフト mfold (Zuker, 2003) を用いて解析した結果、Esr41 の 1 - 15 塩基領域と 29 - 39 塩基領域にステムループが存在し、42 - 74 塩基領域は Rho 非依存性ターミネーターであることが予測された (図 12A)。5'側のステムループを stem-1、Rho 非依存性ターミネーターの直上流のステムループを stem-2 とした。Esr41 による *ler* 抑制における stem-1 と stem-2 の重要性を解析する目的で、stem-1 に置換変異を導入した Esr41-stmu1、及び stem-2 に置換変異を導入した Esr41-stmu2 を発現するプラスミドを構築した (図 12A)。変異を導入する際、RNA の二次構造はその RNA の安定性に密接に関わることを勘案し、二次構造を壊さないような変異を導入した。pRS414、pRS-Esr41、もしくは Esr41-stmu1 または Esr41-stmu2 を発現するプラスミドで $P_{bla-ler'-lacZ}$ を運ぶプラスミドを保持する K-12 株を形質転換した。この形質転換体を培養し、 β -ガラクトシダーゼ活性を測定、及び Esr41 とその変異体の RNA 量をノーザンブロットィングにより解析した。解析の結果、Esr41-stmu1 は、Esr41-WT と同程度の *ler* 抑制効果が得られた (図 12B)。この結果は、Esr41 の stem-1 は *ler* 抑制において重要ではないことを示す。一方、Esr41-stmu2 は、Esr41-WT より *ler* 抑制効果が低下した (図 12B)。しかしながら、Esr41-stmu2 の RNA 量は Esr41-WT と比べて減少していることから (図 12B)、Esr41 の stem-2 が *ler* 抑制に重要であるかどうかは議論できない。

(7) Esr41 の *ler* 抑制効果における Esr41 の stem2 と Rho 非依存性ターミネーターの置換による影響

図 12 の結果からは stem-2 の Esr41 の *ler* 抑制効果における重要性を判断するに至らなかった。また、可能性は低いながらも Rho 非依存性ターミネーターが *ler* mRNA との塩基対形成領域であることも考えられた。そこで、既知の sRNA の Hfq 結合モジュールを利用することで、Esr41 による *ler* 抑制における stem-2 と Rho 非依存性ターミネーターの重要性を解析した。Hfq 結合モジュールとは、大腸菌 sRNA である SgrS の解析から見出された配列であり、sRNA の塩基対形成領域以外の機能領域を指し、その領域は Hfq との機能的相互作用をすることが報告されている (Ishikawa et al., 2012)。また、その報告では、図 13A の N の領域に標的 mRNA のアンチセンス配列を導入することで標的 mRNA の翻訳を抑制することが可能であった (Ishikawa et al., 2012)。そこで、Esr41 の一部と Hfq 結合モジュールを結合させたキメラ sRNA を構築することで、Esr41 の塩基対形成領域を決めることができると考え、stem-2 を含まない Esr41 の 1 - 28 塩基と Hfq 結合モジュールを結合させた Esr41-28-Hbm、stem-2 を含む Esr41 の 1 - 41 塩基と Hfq 結合モジュールを結合させた Esr41-41-Hbm を構築した (図 13B)。pRS414、pRS-Esr41、Esr41-28-Hbm、または Esr41-41-Hbm を発現するプラスミドで、*P_{bla}-ler'-lacZ* を運ぶプラスミドを保持する K-12 株を形質転換した。この形質転換体を培養し、 β -ガラクトシダーゼ活性の測定、及び Esr41 とその変異体の RNA 量をノーザンブロットィングにより解析した。解析の結果、Esr41-28-Hbm と Esr41-41-Hbm の両方とも Esr41-WT と同程度の量が存在し、Esr41-WT と同程度の *ler* 抑制効果が観察された (図 13C)。この結果は、Esr41

の stem-2、及び Rho 非依存性ターミネーターが *ler* mRNA との塩基対形成に関与しないことを示す。

ここまでの解析で、Esr41 の stem-1 と stem-2、及び Rho 非依存性ターミネーターは *ler* 抑制に重要でないことが示された。つまり、Esr41 の残りの領域である 16 - 28 塩基が塩基対形成に重要な可能性が高い。

3. 考察

esr41 の過剰発現は、III 型分泌装置、及び分泌タンパク質の発現抑制と、それに起因する宿主細胞への接着性の低下を引き起こす。本章では、その要因を解明するため、*esr41* 過剰発現時における LEE 遺伝子群、及びその発現制御因子の発現を解析した。その結果、*esr41* の過剰発現により LEE 遺伝子群、その発現制御因子である *ler*、*pchA*, *B*, *C*、及び *lrhA* の mRNA 量が減少することを示した (図 6)。O157 Sakai 株染色体上には *pch* 遺伝子が 5 コピー存在するが、そのうち *pchA*, *B*, *C* は相同性が特に高く、定量的 PCR でこれらを区別することができない。そのため、Esr41 により *pchA*, *B*, *C* のどの発現が抑制されるのかはわからない。しかし、*pchA*, *B*, *C* の単独欠損株のうち *pch* mRNA 量が最も減少するのは *pchA* 単独欠損株であることが報告されていることから (Honda et al., 2009)、Esr41 による *pch* 発現抑制も *pchA* の発現抑制が主因だと考えられる。図 7 の結果から、Esr41 は *pchA* の転写を抑制することが示された。*pchA* の転写を正に制御する因子として LrhA が報告されており (Honda et al., 2009)、*esr41* の過剰発現によって *lrhA* の mRNA 量が減少すること (図 6) から、Esr41 は、*lrhA* の発現抑制を介して *pchA* の転写を抑制している可能性が高い (図 6)。また、*lrhA* は *pchA* と共に、*pchB* の転写も正に制御することから (Honda et al., 2009)、Esr41 により *pchB* の発現も抑制されることが示唆される。Esr41 による *lrhA* の発現抑制が、Esr41 の直接的作用か、もしくは間接的作用かどうかは今後の課題である。後者の作用の場合、*lrhA* の転写を制御する因子として二成分制御系のレスポンスレギュレーター RcsB が報告されていることから (Peterson et al., 2006)、*rscB* が Esr41 の標的となる可能性がある。しかしながら、*lrhA* の転写制御は未解明の

部分が多く、Esr41 の標的を同定するには、まず *lrhA* の転写制御機構の解明が必要であろう。

Esr41 が *ler* を標的とし、その翻訳を抑制することを示した (図 7)。図 7 の解析では、*ler* のプロモーターとして 2 つある *ler* のプロモーターのうち、開始コドンから近い方の P2 プロモーターを用いて *ler'-lacZ* を転写させた。*ler* のプロモーターのうち、より転写活性が高いのは P1 プロモーターであり、様々な転写因子に制御されている (Islam et al., 2011; Sharp and Sperandio, 2007)。一方、P2 プロモーターに作用する転写因子はあまり知られていない。そのため、P2 プロモーターを用いて *ler'-lacZ* を転写させた場合の Esr41 による *ler* 抑制効果は、Esr41 の P2 プロモーターの転写への作用ではなく、*ler'-lacZ* の翻訳への作用に起因すると考えられる。これは、Esr41 が作用しない *bla* 遺伝子のプロモーターにより *ler'-lacZ* を転写させた場合にも Esr41 が *ler* の発現を抑制することとも一致する。また Esr41 の *ler* 抑制が塩基対形成を介した機構であるならば、P2 プロモーターより上流の P1 プロモーターから転写された *ler* mRNA にも Esr41 は塩基対を形成し、その翻訳を抑制すると考えられる。また *ler* は LEE1 オペロンの先頭にコードされており、*ler* の下流には 8 種の遺伝子が存在する (Elliott et al., 2000)。翻訳抑制を引き起こす sRNA の多くは、翻訳を抑制すると同時に mRNA の分解も引き起こすため、Esr41 により LEE1 mRNA の分解が促進される可能性があり、また Esr41 により *ler* の翻訳が抑制されることで、下流の遺伝子の翻訳に影響がある可能性がある。これらの可能性と P1 プロモーターからの転写産物への Esr41 の効果を検証するため、Esr41 による、O157 Sakai 株染色体上の LEE1 オペロンの発現への影響を解析する必要がある。

Esr41 は *ler* を標的とし、Hfq 依存的に翻訳を抑制することを示した (図 7,8)。このことから、Esr41 は *ler* mRNA との塩基対形成を介して、翻訳を抑制することが示唆される。また *in vitro* において Esr41/*ler* RNA/Hfq の三者複合体が形成されること (図 10)、Hfq 非存在下では Esr41/*ler* mRNA の二者複合体は形成されないこと (図 9) を示した。この結果は、Esr41 が *ler* mRNA と Hfq 依存的に結合することを示しているが、Esr41 と *ler* mRNA が Hfq をハブとして三者複合体を形成している可能性を排除できないため、Esr41 と *ler* mRNA が塩基対を形成することは示せていない。これを示すためには、Esr41、または *ler* mRNA に変異を導入し、それが三者複合体形成に与える影響を解析する必要がある。

翻訳抑制効果を持つ多くの sRNA は、標的 mRNA の SD 配列や開始コドン周辺で塩基対を形成することで、その翻訳を抑制する (Aiba, 2007)。この知見は、Esr41 による *ler* 抑制効果において *ler* mRNA の SD 配列が塩基対形成に重要であるという可能性を支持する (図 11)。実際に図 9A に示すように、*ler* mRNA の 148 - 172 塩基領域と Esr41 の 11 - 35 塩基領域で塩基対を形成すると予想された。このうち *ler* mRNA の 157 - 160 塩基の SD 配列と Esr41 の 23 - 26 塩基が塩基対形成の核となることが予想される。Esr41 の 23 - 26 塩基が二次構造をとらない 16 - 28 塩基に含まれる (図 12A) ことは、Esr41 と *ler* mRNA の効率的な塩基対形成に寄与することを示唆する。また Esr41 の stem-2 と Rho 非依存性ターミネーターの領域 (29 - 74 塩基) を SgrS の Hfq-binding module と置換しても、Esr41 の安定性、及び *ler* 抑制効果維持されたことから、Esr41 の stem-2 以下の 29 - 74 塩基が Hfq-binding module として機能する可能性が高い。実際、Esr41 の 29 - 74 塩基と SgrS の Hfq-binding module は、配列は異なるものの、そ

の二次構造は類似していることも上述の可能性を支持する。この可能性の検証のため、Esr41 の 1 - 28 塩基を *ler* 以外の何らかの mRNA の SD 配列付近のアンチセンス配列に置換した RNA による抑制を調べることにより、Esr41 の 29 - 74 塩基領域が Hfq-binding module として機能することを示したい。SgrS の Hfq-binding module における重要な配列的特徴は、Rho 非依存性ターミネーターのポリ U 配列と 5'末端の 5'-UAUU-3'にあり (図 13A)、前者の短鎖化、後者の欠失は Hfq との結合能が顕著に低下することが報告されている (Ishikawa et al., 2012; Otaka et al., 2011; Sauer and Weichenrieder, 2011)。その一方、Esr41 の 3'末端にはポリ U 配列は存在するものの、stem-2 の 5'側に 5'-UAUU-3'は存在しない。しかし、stem-2 のループ領域は 5'-UAUU-3'となっていることから、この領域が Hfq との結合に重要であることが示唆される。実際、stem-2 のループ領域を 5'-AUAG-3'に変異させた Esr41-stmu2 では、RNA の安定性が低下した (図 12)。この結果から、stem-2 のループ領域の 5'-UAUU-3'が Hfq との結合に重要である可能性が高いと考えられるため、ゲルシフト法を用いた Esr41 変異体の Hfq との結合解析を行うことで検証したい。

第3章 Hfq による Esr41 安定化機構の解析

1. 要旨

Hfq 依存性の sRNA は、標的 mRNA との塩基対形成領域、Hfq 結合領域、Rho 非依存性ターミネーター領域の少なくとも 3 つの機能領域を有している。このうち塩基対形成領域や Rho 非依存性ターミネーター領域の役割は明確であり、その領域の同定も多くの sRNA で行われている。しかしながら、Hfq との結合領域は、sRNA の安定化、及び sRNA と標的 mRNA の間の塩基対形成の促進という Hfq の機能のために必須の領域でもあるが、Hfq との機能的結合に必要な RNA 配列や構造的特徴は部分的にしか明らかになっていない。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し、また第2章の図8で示した Esr41 による *ler* 抑制効果が Hfq に依存していることと一致する。次に Esr41 に部分的な欠失変異を導入し、それらの Esr41 部分欠失体の RNA 量の解析、及びゲルシフト法による Hfq との結合能解析を行った。その結果、Esr41 の 11 - 15 塩基領域欠失体、及び 31 - 35 塩基領域欠失体では RNA 量の減少と Hfq との結合能の低下が見られた。このことから、11 - 15 塩基、及び 31 - 35 塩基領域欠失体の 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。Esr41 部分欠失体の二次構造解析を行

った結果、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。また、Hfq との結合において sRNA の Rho 非依存性ターミネーター末端のポリ U 配列が重要であることが報告されていることから、Hfq と Esr41 の結合における Esr41 のポリ U 配列の重要性をゲルシフト法で解析した結果、Esr41 においてもポリ U 配列が Hfq との結合に重要であることが示された。

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、及び Rho 非依存性ターミネーター末端のポリ U 配列が重要であることが示唆された。

2. 結果

(1) Esr41 は Hfq と結合することで安定化する。

Hfq は、第 2 章 結果 (3) で述べた通り sRNA による翻訳制御系において重要な働きをする。実際、既知の sRNA による標的 mRNA の翻訳抑制と同様、Esr41 による *ler* 抑制も Hfq に依存している (図 8)。また Hfq は sRNA と結合することで、sRNA を安定化することが知られている。Esr41 の安定性における Hfq の寄与を、O157 Sakai の *hfq* 欠損株を用いたノーザンブロットィングにより解析した。解析の結果、pRS-Esr41 により *esr41* を過剰発現させた場合も、過剰発現させなかった場合も、野生株と比べて *hfq* 欠損株では著しく Esr41 RNA 量が減少することわかった (図 14A)。

次に、*in vitro* における Esr41 と Hfq-His₆ の結合をゲルシフト法により解析した。RI でラベルした ³²P-Esr41 と Hfq-His₆ を反応させた場合、³²P-Esr41 のみの場合と比べて、シフトアップしたバンドが観察された (図 14B)。これは ³²P-Esr41/Hfq-His₆ の複合体だと考えられる。加えて、Hfq 濃度の上昇に伴い、泳動距離の短いバンドが観察された (図 14B)。これは、多量体化した ³²P-Esr41/Hfq-His₆ だと考えられる。また ³²P-Esr41 と Hfq-His₆ に加え、非標識の Esr41 を加えた場合、加えなかった場合に観察された ³²P-Esr41/Hfq-His₆ 複合体の形成量が減少した (図 14B)。このことは、Hfq が、³²P-Esr41、及び非標識 Esr41 と競合的に結合している事を示し、したがって Hfq が Esr41 にある程度、特異的に結合することを示す。

次に Hfq が Esr41 の安定性に与える影響を解析した。pRS-Esr41 を保持する K-12 株の野生株と *hfq* 欠損株を OD₆₀₀=0.4 まで培養し、RNA ポリメラーゼ

の活性を阻害するリファンピシンを添加した。添加後、0分、6分、12分、20分培養した培養液から RNA 試料を調製し、ノーザンブロットィングにより解析した。解析の結果、*hfq* 欠損株の *Esr41* RNA 量は、リファンピシンの添加後、著しく減少した。一方、野生株の *Esr41* RNA 量はリファンピシンの添加後、ほとんど減少しなかった (図 14C,D)。この結果は、*Hfq* 存在下では、*Esr41* は比較的安定に存在できるが、*Hfq* 非存在下では速やかに分解されることを示す。以上の結果から、*Esr41* は *Hfq* と結合し、細胞内で安定化することが示された。

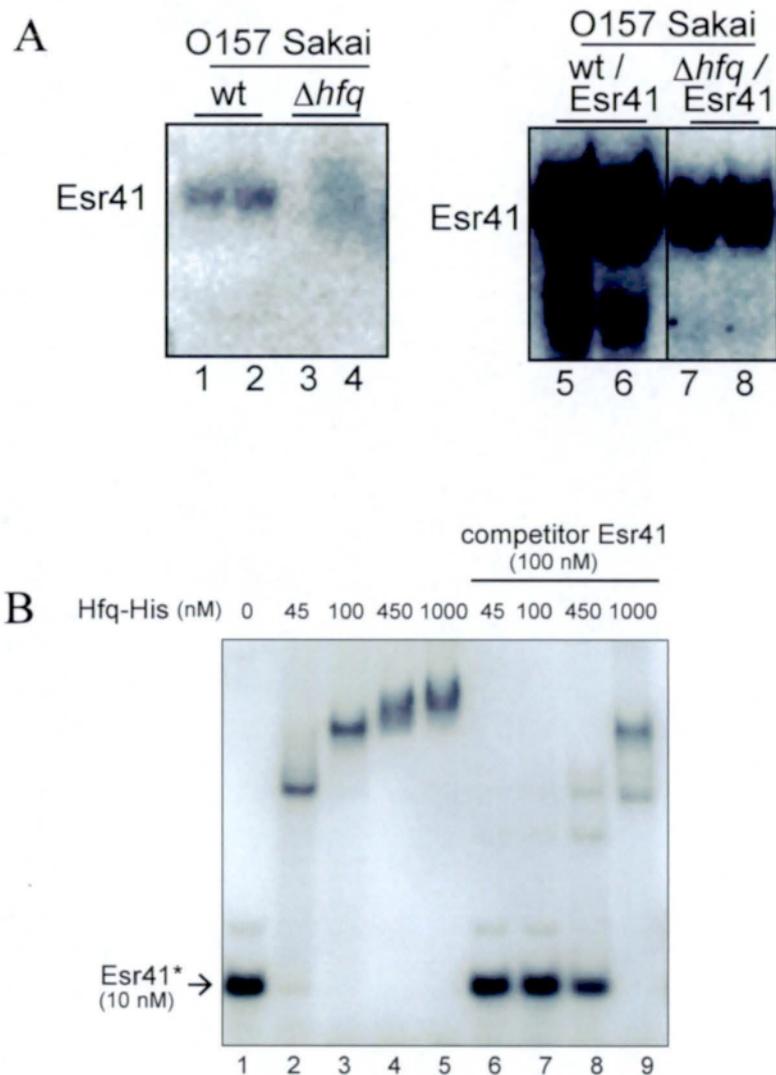


図14 Esr41はHfqと結合することで安定化する。

- A. O157 Sakai株の hfq 欠損株におけるEsr41のノーザンブロットニング。SKI-5142株(O157 Sakai WT; レーン1,2)、SKI-5142 Δhfq 株(O157 Sakai Δhfq ; レーン3,4)、及びpRS-Esr41を保持するSKI-5142(WT/Esr41; レーン5,6)、pRS-Esr41を保持するSKI-5142 Δhfq (Δhfq Esr41; レーン7,8)をLBで $OD_{600} = 0.6$ まで培養し、培養液からRNA試料を調製した。RNA試料をOigo-41を用いたノーザンブロットニングにより解析した。解析には1.5 μ gのRNAを用いた。各株について、独立に2本の培養を行い、各々からRNA試料を調製し、隣り合わせのレーンで電気泳動を行った。
- B. Esr41とHfqの結合解析。Esr41を*in vitro*転写により合成した。10 nMの 32 P標識したEsr41、図に示す量のHfq-His₆、及び100 nMの非標識のEsr41をreaction buffer中で混合し、37°Cで10分間反応させた。その後、4%非変性ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により分離した。

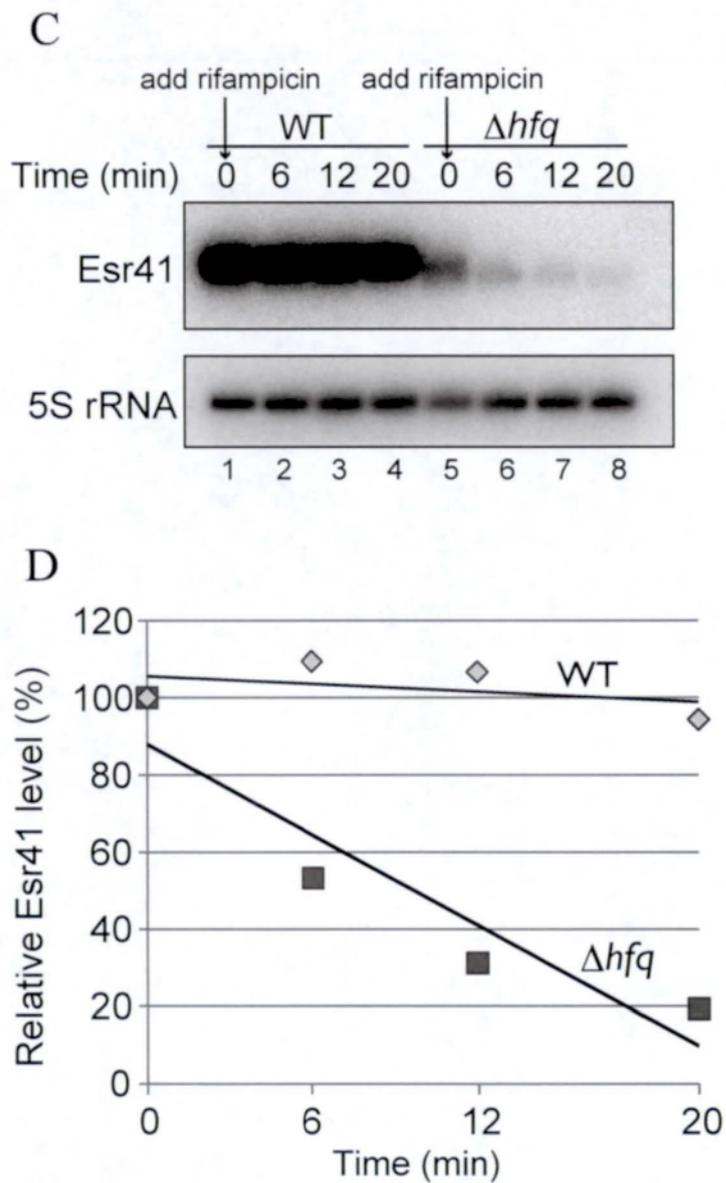


図14 Esr41はHfqと結合することで安定化する。

- C. 野生株、*hfq*欠損株におけるEsr41の安定性解析。pRS-Esr41を保持するMG1655Δ*lacZ*株(WT)、及びNS1203株(Δ*hfq*)をLBでOD₆₀₀ = 0.4付近まで培養した培養液に終濃度0.25 mg/mlとなるようにリファンピシンを添加し培養を継続した。添加後、0分間、6分間、12分間、20分間培養した培養液からRNA試料を調製した。RNA試料を#41-stem1 probeを用いたノーザンブロットングにより解析した。解析には1.4 ugのRNAを用いた。
- D. 野生株、*hfq*欠損株におけるEsr41の安定性解析。Cの結果を、0分の時のRNA量を100として定量化し、グラフに示した。ひし形が野生株(WT)、四角形が*hfq*欠損株(Δ*hfq*)を示し、最小二乗法により線形近似を求めた。

(2) Esr41 の 11 - 15 塩基領域、または 31 - 35 塩基領域の欠失は Hfq への結合能を低下させる。

Hfq による Esr41 の安定化において重要な Esr41 の領域を同定するため、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 41 塩基の領域を 5、または 6 塩基欠失させた一連の Esr41 部分欠失体を産生するプラスミドを構築し、これを保持する K-12 株の野生株と *hfq* 欠損株における各 Esr41 部分欠失体の RNA 量をノーザンブロットィングにより解析した。解析の結果、野生株、*hfq* 欠損株、いずれの株においても、11 - 15 塩基領域欠失体の RNA 量が野生型 Esr41 と比べて顕著に減少しており、両株における RNA 量は同程度であった (図 15A)。野生株と *hfq* 欠損株間で RNA 量に差がないことは、11 - 15 塩基領域欠失体が、Hfq が持つ sRNA 安定化作用を享受できないことを示し、少なくとも Hfq と機能的に結合できないことを示唆する。また、11 - 15 塩基領域欠失体と比べて RNA 量の減少は顕著ではないものの、26 - 30 塩基領域、31 - 35 塩基領域欠失体においても野生株において RNA 量の減少が見られた (図 15A)。野生株において RNA 量が減少した欠失体は Hfq との結合能が低下していることを示唆する。

この可能性を検証する目的で、Esr41 の各欠失体の *in vitro* における Hfq 結合能をゲルシフト法で解析した。³²P-Esr41 と Hfq-His₆ を反応させた場合、³²P-Esr41/Hfq-His₆ 複合体のバンドが 2 本、検出された (図 15B)。移動度の大きいバンドは、Esr41 と Hfq-His₆ が 1 対 1 で結合した複合体であり、移動度の小さいバンドは、Esr41 と Hfq-His₆ が 1 対 2、もしくは 2 対 1 で結合した複合体だと考えられる。同条件で非標識の野生型、もしくは欠失型 Esr41 を同時に加え、

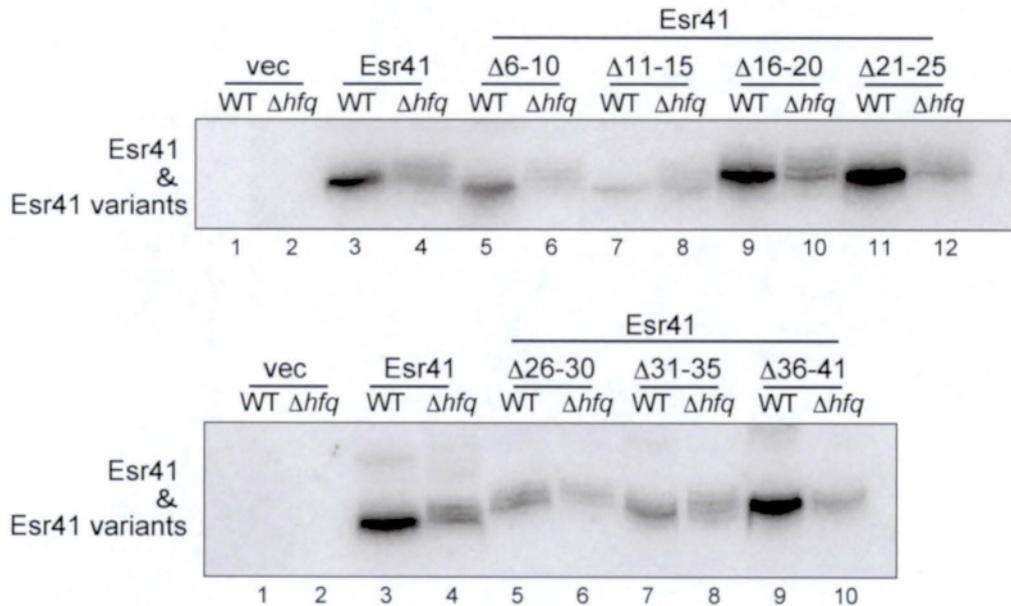
³²P-Esr41/Hfq-His₆ 複合体の形成阻害を観察した (図 15B)。非標識の野生型 Esr41 を反応液に添加した場合、³²P-Esr41/Hfq-His₆ 複合体の形成阻害が観察された (図 15B)。これは、³²P-Esr41 と非標識 Esr41 が競合的に Hfq と結合していることを示す。同様に、非標識の Esr41 の 26 - 30 塩基領域欠失体を添加した場合、³²P-Esr41/Hfq-His₆ 複合体の形成阻害が観察された (図 15B)。一方で、非標識の 11 - 15 塩基領域欠失体を添加した時、³²P-Esr41/Hfq-His₆ 複合体の形成に影響がなかった (図 15B)。同様に非標識の 31 - 35 塩基領域欠失体を添加した場合、³²P-Esr41/Hfq-His₆ 複合体の形成のうち移動度が小さい方の形成が阻害されたが、移動度の大きい方はあまり影響を受けなかった (図 15B)。これらの結果は、11 - 15 塩基領域欠失体の Hfq 結合能が大きく低下していること、31 - 35 塩基領域欠失体の Hfq 結合能が野生型 Esr41 と比べて、低下していることを示す。このことから、11 - 15 塩基、及び 31 - 35 塩基領域欠失体の RNA 量の低下は、Hfq との結合能の低下に起因すると思われる。

31 - 35 塩基領域欠失体は、移動度の小さい複合体の形成を阻害する一方、移動度の大きい複合体の形成を阻害しなかった。この結果は、2つの移動度の異なる複合体に構造的な違いがあり、31 - 35 塩基領域欠失体は Hfq と移動度の小さい複合体しか形成できない可能性がある。

(3) Esr41 の Rho 非依存性ターミネーター末端のポリ U 配列は Hfq との結合に重要である。

sRNA の 3'末端に位置する Rho 非依存性ターミネーターのポリ U 配列が Hfq との機能的結合に必須であり、また構造学的にもポリ U 配列が Hfq と結合することが報告されている (Otaka et al., 2011; Sauer and Weichenrieder, 2011)。そこで、Hfq との結合における Esr41 のポリ U 配列の重要性を、第 3 章 結果(2)と同様のゲルシフト法を用いて解析した。解析には Esr41 の 3'末端にある 7 塩基の U と、それに続く AU の配列を、4 塩基の U に短鎖化した Esr41-4U を用いた。解析の結果、 ^{32}P -Esr41 と Hfq-His₆ を反応させた場合に見られる ^{32}P -Esr41/Hfq-His₆ 複合体形成が、 ^{32}P -Esr41 と Hfq-His₆ に非標識の Esr41-4U を加え反応させた場合においても阻害されなかった (図 15B)。この結果は、Esr41-4U の Hfq 結合能が、野生型 Esr41 と比べて、大きく低下していることを示す。このことから、Esr41 の Rho 非依存性ターミネーターのポリ U 配列が Hfq との結合に重要であることが示された。

A



B

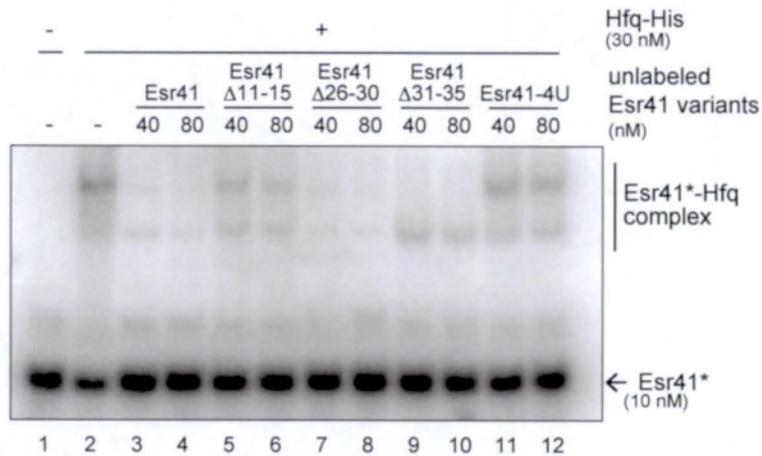


図15 Esr41の11 - 15、または31 - 35塩基領域の欠失はHfqへの結合性を低下させる。

- A. 野生株、及び*hfq*欠失株におけるEsr41部分欠失変異体のノーザンプロット。図に示すEsr41部分欠失変異体を発現するプラスミドを保持するMG1655 Δ *lacZ*株(WT)、及びNS1203株(Δ *hfq*)をLBでOD₆₀₀ = 0.6付近まで培養し、RNA試料を調製した。RNA試料を#41ter probeを用いたノーザンプロットにより解析した。解析には1.5 ugのRNAを用いた。
- B. Esr41部分欠失変異体とHfqの結合解析。Esr41、及びEsr41部分欠失変異体を*in vitro*転写により合成した。10 nMの³²P標識したEsr41、図に示す量のHfq-His₆、及び図に示す量の非標識Esr41、もしくはEsr41部分欠失変異体をreaction buffer中で混合し、37°Cで10分間反応させた。その後、4%非変性ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動により分離した。

(4) Hfq による sRNA の安定化に必要な Esr41 の構造的特徴

Esr41 部分欠失体には、Hfq との結合能が低下するものがあった。一般的に、RNA とタンパク質の相互作用や RNA の安定性において、その RNA の二次構造、三次構造が重要であることが知られている。そのため、Esr41 部分欠失体の Hfq 結合能の低下の原因として、欠失変異による Esr41 の二次構造の変化の可能性を考え、RNA 二次構造解析ソフトウェア mfold (Zuker, 2003) を用いて Esr41 部分欠失体の二次構造を予測した(図 16)。先に述べたように、野生型 Esr41 には stem-1 と stem-2 の 2 つのステムループと Rho 非依存性ターミネーターという二次構造が予測されている。各部分欠失体の予想二次構造を比較したとき、Hfq 結合能が低下する 11 - 15 塩基領域欠失体と 31 - 35 塩基領域欠失体のみ、stem-2 にあたる Rho 非依存性ターミネーターの直上流のステムループが失われていた(図 16)。この結果から、Hfq との結合において Esr41 の stem-2 が重要であることが示唆された。

本章の結果、及び第 2 章の Esr41 の塩基対形成領域の同定の結果を考慮すると、Esr41 の 16 - 28 塩基領域は塩基対形成領域、29 - 39 塩基領域、及び Rho 非依存性ターミネーター末端のポリ U 配列は Hfq 結合領域だと考えられる(図 17)。

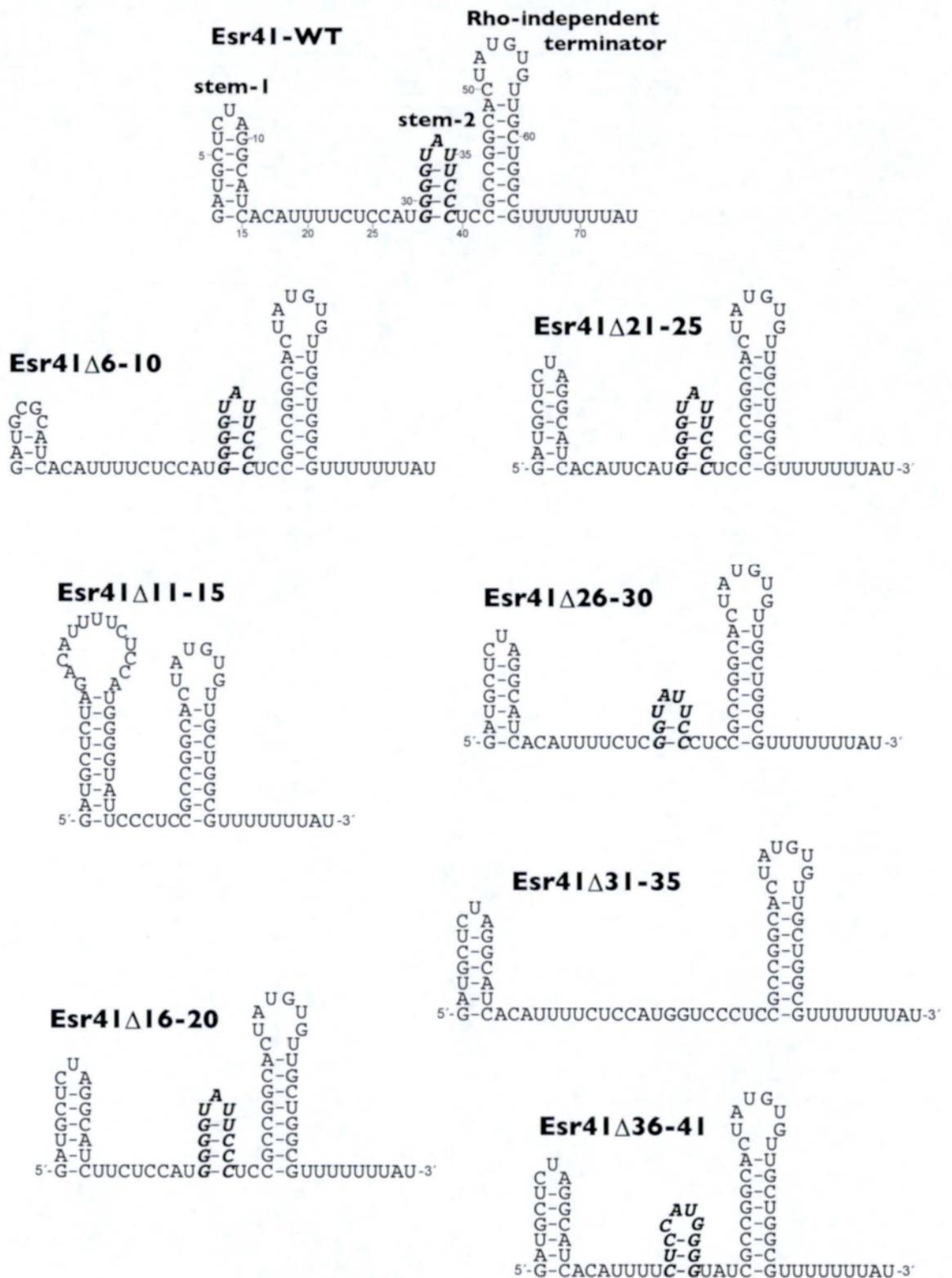


図16 Esr41部分欠失変異体の予想二次構造

各Esr41部分欠失変異体の二次構造をmfold (Zuker, 2003)を用いて解析した。斜体太字はRho非依存性ターミネーターの5'側直上流のステムループ構造(stem-2)を示す。

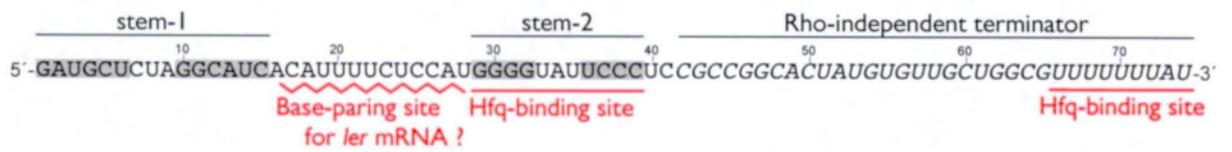


図17 Esr41の予想される各機能領域

3. 考察

Hfq 依存性の sRNA は、標的 mRNA との塩基対形成領域、Hfq 結合領域、Rho 非依存性ターミネーター領域の少なくとも 3 つの機能的な要素を有している。標的 mRNA と部分的な相補性を持つ塩基対形成領域は、多くの sRNA で明確にされており、この領域で形成される塩基対形成を介して標的 mRNA の翻訳や安定性を制御する。また、GC-rich な回文配列の直後にポリ U 配列が続く Rho 非依存性ターミネーターの役割も明確にされている。sRNA に限らず、多くの RNA の 3' 末端に位置する Rho 非依存性ターミネーターの第一義的な役割は、転写を終結させることである。また、ターミネーターの一部であるステム構造は、転写後の RNA を 3' エキソリボヌクレアーゼによる分解から保護するという一般的な役割を持つ (Abe and Aiba, 1996; Aiba et al., 1991)。一方で、sRNA の Hfq 結合領域は不明な点が多い。これまでにフットプリント法などの *in vitro* の解析から OxyS (Zhang et al., 2002) や、Spot42 (Møller et al., 2002b)、DsrA (Brescia et al., 2003)、RyhB (Geissmann and Touati, 2004)、RybB (Balbontín et al., 2010) などのいくつかの sRNA において Hfq 結合領域が同定された。これらの Hfq 結合領域は sRNA の内部のステムループ構造の近傍に存在する一本鎖 AU リッチ配列である。しかしながら、RyhB において、フットプリント法から同定された Hfq 結合領域を変異させても、*in vivo* での RNA 量と標的 mRNA 抑制機能に影響がなかった (Geissmann and Touati, 2004; Hao et al., 2011)。このことは、*in vitro* で同定された Hfq 結合領域の中に、*in vivo* での sRNA 機能とは関連しない領域が含まれる可能性を示唆する。これは、これまでの sRNA の Hfq 結合領域に関する複数の報告に共通する課題である。これらのことを踏まえ本研究では、*in*

vivo と、*in vitro* の実験を組み合わせることで、Hfq による Esr41 の安定化に重要な領域や配列、構造的な特徴の解明を目指した。

野生株と *hfq* 欠損株における Esr41 部分欠失体の RNA 量を解析した結果、11 - 15 塩基領域欠失体では、野生型 Esr41 と比べ RNA 量の減少が見られるとともに、野生株と *hfq* 欠損株での RNA 量が同程度であった (図 15A)。また 11 - 15 塩基領域欠失体は Hfq との結合能が低下していた (図 15B)。これらの結果は、野生株と *hfq* 欠損株での RNA 量を解析することで、その RNA の Hfq 結合能を解析可能であることを示唆する。一方で、31 - 35 塩基領域欠失体では、野生株と *hfq* 欠損株間で RNA 量に差が見られたにも関わらず、Hfq 結合能の低下が見られた。このことは、野生株と *hfq* 欠損株での RNA 量の解析による、その RNA の Hfq 結合能解析は、定性的な評価しかできないことを示す。また 11 - 15 塩基領域欠失体よりも 31 - 35 塩基領域欠失体の方が、野生株における RNA 量が増加しており、*in vitro* における Hfq との結合能も高かった (図 15B)。この結果は、Hfq 結合能の高さと RNA の安定性に相関があることを示唆する。

本研究の結果、Esr41 の stem-2 構造が Hfq との結合に重要であることが示唆された。しかし、stem-2 の構造を維持するように変異を導入した Esr41-stmu2 も RNA の安定性が低下した (図 12) ことから、stem-2 の構造だけが Hfq による Esr41 の安定化に重要なのではなく、他に必要な要素が存在する可能性が高い。その必要な要素の一つとして挙げられるのが、第 2 章の考察で述べた stem-2 のループ領域の 5'-UAUU-3'配列である。この予想と、先に述べた「sRNA の内部のステムループ構造の近傍に存在する一本鎖 AU リッチ配列が Hfq 結合領域になる」という報告は合致する。これを検証するため、ゲルシフト法を用いた

Esr41-stmu2 や、ループ領域の 5'-UAUU-3'配列に変異を導入した変異体の Hfq 結合能の *in vitro* 解析、また Esr41 変異体と Hfq の *in vivo* における結合能を解析するため、Hfq の免疫沈降法を用いて解析したい。

ここまでの解析の結果、Esr41 の各機能領域を部分的に明らかにできた (図 17)。stem-1 の構造の重要性はまだ明確には見出せていないが、5'末端に位置すること、stem-1 が短くなることが予想される 6-10 塩基領域の Esr41 部分欠失体 (図 16) は、野生型 Esr41 と比べて RNA 量の減少が見られること (図 16) から、5'エキソリボヌクラーゼからの分解を防いでいる可能性がある。この点について理解をより深めることで、Esr41 全体の機能領域を解明したい。

第4章 Esr41 によるべん毛遺伝子群発現の促進機構の解析

1. 要旨

O157 Sakai 株において、病原性発現時に LEE 遺伝子群の発現が促進し、べん毛遺伝子群の発現が抑制されるという協調的発現制御機構が報告されている (Iyoda et al., 2006)。そのため、LEE 遺伝子群の発現が抑制される *esr41* 過剰発現株では、べん毛遺伝子群の発現促進と、それによる遊走性の上昇が予想された。これを検証した結果、予想通り *esr41* 過剰発現株では遊走性の上昇、及びべん毛の主要構成タンパク質 FliC (フラジエリン) の量、及びべん毛遺伝子群の発現促進が観察された。前述のように O157 Sakai 株には協調的発現制御機構が存在するため、べん毛遺伝子群の発現上昇は、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 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 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 による FlhD タンパク質量の増加が見られた。この結果から、Esr41 が *flhD* の翻訳を促進することが示唆された。次に、Esr41 による *flhD* 発現促進において、*flhDC* mRNA の 5' 非翻訳領域に存在する、Esr41 との予想塩基対形成領域が重要である可能性を検討するために、この領域を欠失させた *flhDCA1* を構築し、解析した。その結果、野生型 *flhDC* と同様に *flhDCA1*

でも Esr41 による発現促進が観察された。この結果から、Esr41 は、*flhDC* mRNA 上の予想した領域とは別の領域と塩基対を形成することで *flhD* の発現を促進していると考えられる。

2. 結果

(1) *esr41* の過剰発現により、べん毛遺伝子群の発現が上昇することで遊走性が上昇する。

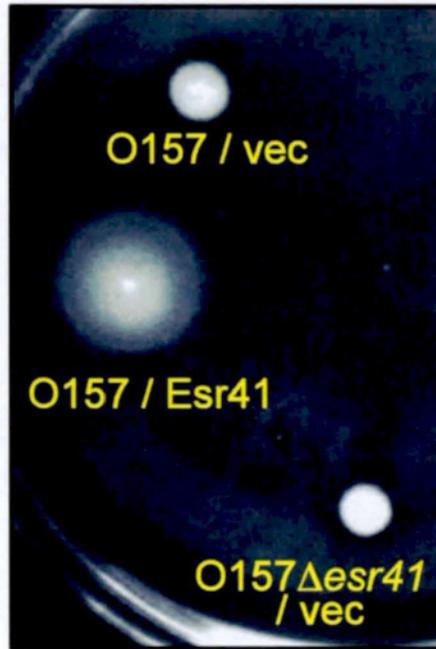
多くの病原性細菌において病原性関連遺伝子とべん毛関連遺伝子の協調的発現制御が知られている (Akerley et al., 1995; Bleves et al., 2002; Eichelberg and Galan, 2000; Horne and Prüss, 2006; Iyoda et al., 2001; Lucas et al., 2000)。O157 Sakai 株についても、LEE 遺伝群の発現が上昇するとき、*grlRA* 系の働きによりべん毛遺伝子群の発現が抑制されるという協調的発現制御が報告されている (Iyoda and Watanabe, 2005; Iyoda et al., 2006)。この報告を考慮すると、LEE 遺伝子群の発現を抑制する *esr41* の過剰発現が、同時にべん毛遺伝子群の発現を上昇させる可能性が考えられた。そこで、*esr41* を過剰発現させた O157 Sakai 株の遊走性を解析した。*esr41* を過剰に発現する pRS-Esr41 (またはコントロールベクター pRS414) を保持する SKI-5142 株を DMEM 軟寒天培地で培養した。DMEM は LEE 遺伝子群の発現を誘導する培地であり、べん毛遺伝子群の発現を抑制する (Abe et al., 2002; Girón et al., 2002; Zhou et al., 2003)。解析の結果、pRS-Esr41 を保持する *esr41* 過剰発現株では、保持しない株と比べ、遊走円が大きく、高い遊走能を持つことがわかった (図 18A)。また、DMEM で培養した *esr41* 過剰発現株におけるべん毛を構成するタンパク質の一つ、FliC (フラジェリン) の量をウェスタンブロッティングにより解析したところ、*esr41* 過剰発現株において、過剰発現しない株と比べて FliC タンパク質量の増加が見られた (図 18B)。

次に、DMEM で培養した *esr41* 過剰発現株におけるべん毛遺伝子群の発現を、定量的 PCR を用いて解析した。べん毛遺伝子群は 3 つの階層に分かれて

おり、べん毛遺伝群の発現を制御するマスターレギュレーターFlhDC をコードするクラス 1、FlhDC による正の転写制御を受けるクラス 2、クラス 2 にコードされるシグマ 28 による正の転写制御を受けクラス 3 にわかれる (図 20C)。解析の結果、*esr41* 過剰発現株では、過剰発現しない株と比べて、クラス 1 の *flhD*、クラス 2 のシグマ 28 をコードする *fliA*、クラス 3 の *fliC*、*motA* の mRNA 量が顕著に増加した (図 19)。一方、クラス 2 の *fliA* 以外の遺伝子は mRNA の変動が見られなかった (図 19)。クラス 2 の *fliA* 以外の遺伝子の mRNA 量が変動しない理由は定かではないが、Esr41 によりべん毛遺伝子群の発現が全体的に上昇することがわかった。

esr41 過剰発現株の遊走性の上昇、及びべん毛遺伝子群の発現上昇は、DMEM で培養した際に観察されたことから、Esr41 による *ler* の発現抑制を介して、べん毛遺伝子群の発現が上昇したと予想した。しかしながら、LB で *esr41* 過剰発現株を培養した場合においても、Esr41 による FliC タンパク質量の上昇が観察された (図 18B)。LB で培養した O157 Sakai 株は、DMEM で培養した場合と比べて、*flhDC* の発現を負に制御する *ler* や *grlRA* の発現が抑制される (Abe et al., 2002)。したがって、LB で培養した場合でも Esr41 による FliC タンパク質量の上昇が見られたことは、Esr41 によるべん毛遺伝子群の発現促進は *ler* を介した制御だけではなく、Esr41 が *ler* 以外のべん毛遺伝子群の発現に関与する遺伝子を標的とし、その発現を制御することで、べん毛遺伝子群の発現を促進していることを示唆する。

A



B

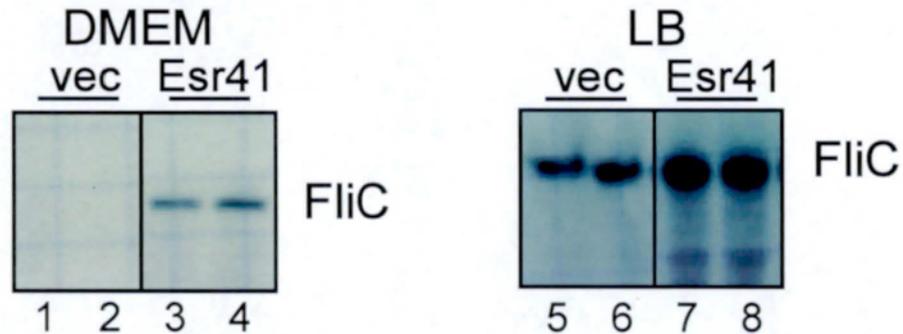


図18 *esr41*の過剰発現により、O157 Sakai株の遊走能が上昇する。

- A. *esr41*過剰発現株、*esr41*欠損株の遊走性解析。pRS414 (vec)、またはpRS-Esr41 (Esr41)を保持するSKI-5142株(O157)、またはSKI-5142 Δ *esr41*株(O157 Δ *esr41*)をDMEM軟寒天培地で培養した。
- B. *esr41*過剰発現株の菌体中に含まれるフラジエリン(FliC)の解析。pRS414 (vec)、またはpRS-Esr41 (Esr41)を保持するSKI-5142株をDMEM、及びLBで培養した。培養液を遠心分離し、菌体沈殿からタンパク質試料を調製し、anti-FliC (anti-H7)抗体を用いたウェスタンブロットングにより解析した。各株について、独立に2本の培養を行い、各々からタンパク質試料を調製し、隣り合わせのレーンで電気泳動を行った。

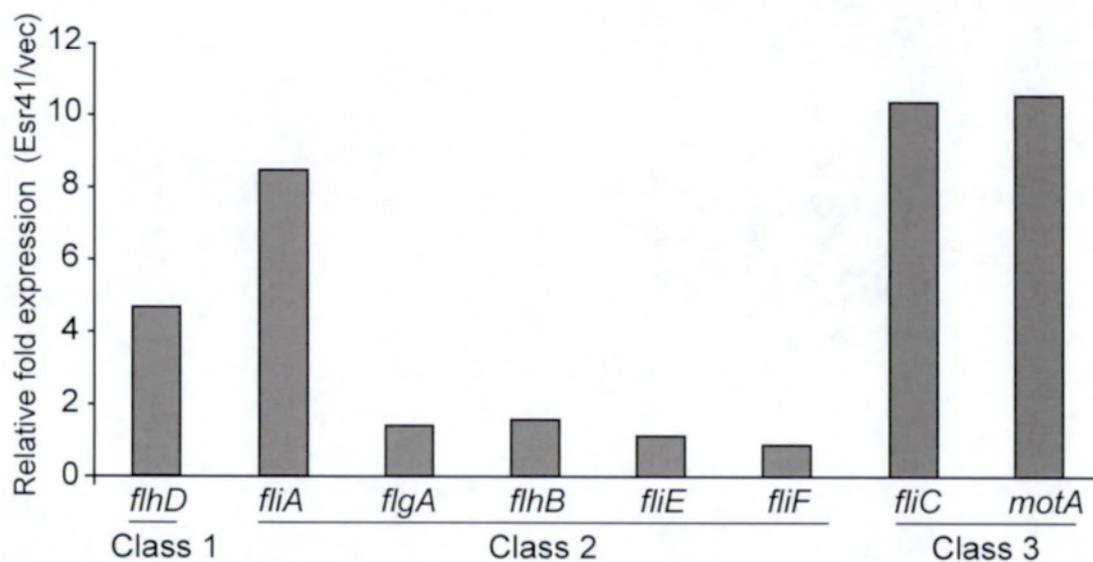


図19 *esr41*の過剰発現により、*pchA*、及びLEE遺伝子群のmRNA量が減少する。一方、べん毛遺伝子群のmRNA量が増加する。

*esr41*過剰発現株におけるべん毛遺伝子群の遺伝子発現解析。pRS414 (vec)、または pRS-Esr41 (Esr41) を保持するSKI-5142株をDMEMで培養した、RNA試料を調製した。RNA試料からcDNA試料を調製し、図に示す遺伝子のmRNA量を定量的PCRにより解析した。

(2) Esr41 は K-12 株の遊走性も上昇させる。

Esr41 は O157 Sakai 株のべん毛遺伝子群の発現を促進することで遊走性を上昇させる。これまでの解析から Esr41 によるべん毛遺伝子群の発現促進機構として2つの可能性を予想した。一つが、Esr41 による *ler* 抑制を介したべん毛遺伝子群の発現促進、もう一つが、Esr41 による、*ler* 以外の標的遺伝子の発現制御を介したべん毛遺伝子群の発現促進である。後者の可能性を検証するため、*ler* を含む LEE 遺伝子群を持たない K-12 株において *esr41* を発現させた時の遊走性を解析した。pRS-Esr41 (または pRS414) を保持する K-12 株を DMEM 軟寒天培地で培養した。その結果、pRS-Esr41 を保持する株のみ、遊走性の上昇がみられた (図 20A)。このことは、Esr41 が *ler* 以外の標的遺伝子を持つことを示す。また、O157 Sakai 株由来の *flhDC* の転写制御領域と *flhDC* のコード領域 (参考図 2) を運ぶプラスミドで、pRS-Esr41 (または pRS414) を保持する *flhD* 欠損 K-12 株を形質転換した。この形質転換体を DMEM で培養したときの FlhD タンパク質量をウェスタンブロッティングにより解析した。その結果、*esr41* を発現する株は、発現しない株と比べて、FlhD タンパク質量が増加していた (図 20B)。*flhD* は *flhC* とオペロンを組むことが知られており、また *flhC* の翻訳は *flhD* と共役している可能性がある。そのため、FlhD タンパク質量の増加は FlhC のタンパク質量の増加を伴う可能性が高い。これらのことから、Esr41 は、*flhDC* の発現を上昇させることで、べん毛遺伝子群の発現を促進していることが示唆され、加えて、Esr41 は *flhDC* を直接の標的とするか、もしくは *flhDC* の転写を制御する遺伝子を標的とすることが示唆された (図 20C)。

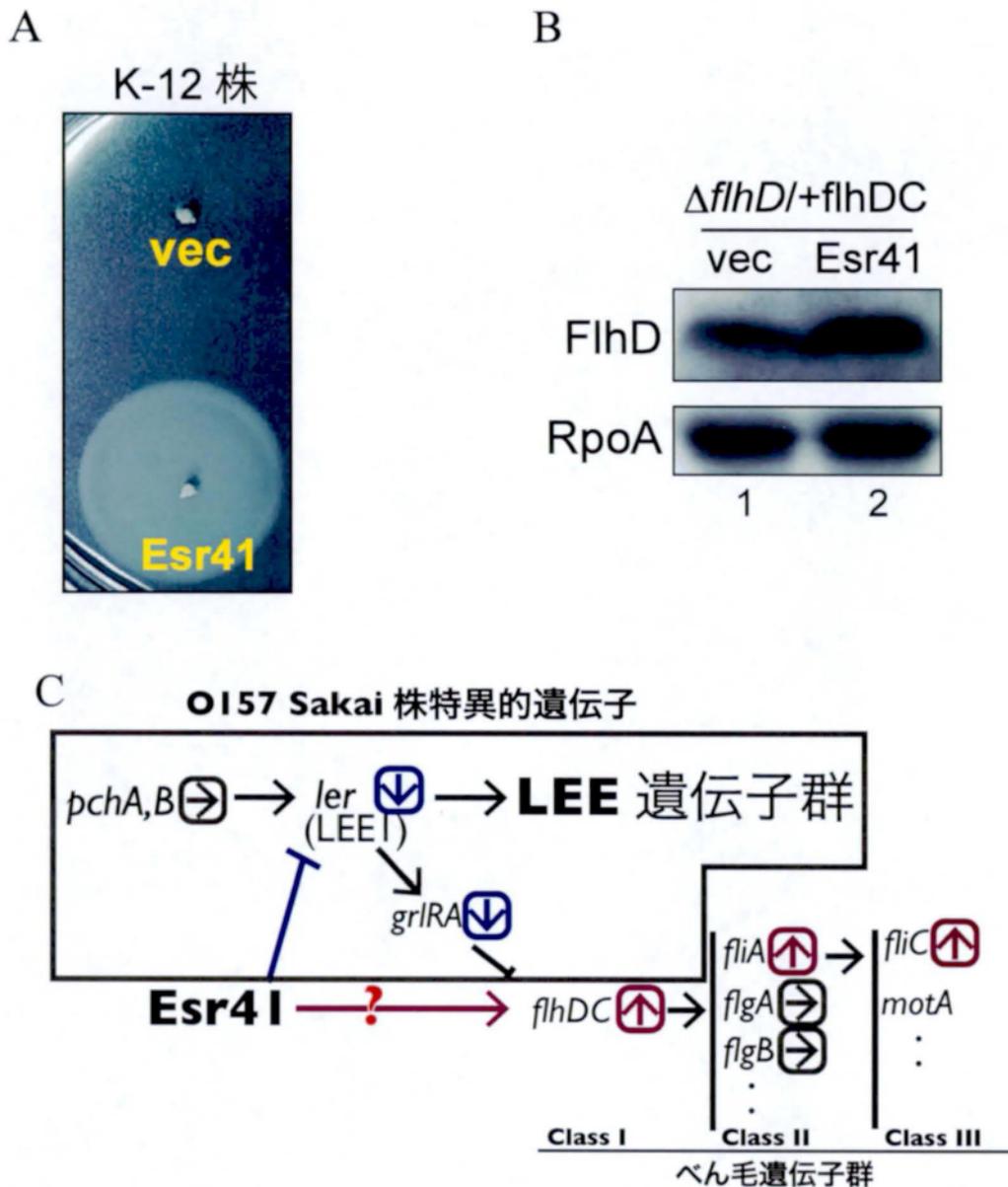


図20 Esr41はK-12株の遊走性も上昇させる。

- A. *esr41* 発現K-12株の遊走性解析。pRS414 (vec)、またはpRS-Esr41 (Esr41) を保持する MG1655 $\Delta lacZ$ をDMEM軟寒天培地で培養した。
- B. *esr41* 発現K-12株の菌体中に含まれるFlhDタンパク質の解析。pRS414 (vec)、または pRS-Esr41 (Esr41) で、pMW-*flhDC* fullを保持するNS1212 ($\Delta flhD/+flhDC$)を形質転換した。DMEMでOD₆₀₀=0.6まで培養し、培養液を遠心分離した。菌体沈殿からタンパク質試料を調製し、anti-FlhD抗体、もしくはanti-RpoA (ローディング・コントロール)を用いたウェスタンブロットングにより解析した。
- C. LEE遺伝子群、べん毛遺伝子群とEsr41の標的遺伝子の予想。

(3) Esr41 は、*flhD* を標的とし、その翻訳を上昇させる。

Esr41 によるべん毛遺伝子群の発現促進における、Esr41 の標的として、*flhDC* の可能性と *flhDC* の転写制御因子の可能性が考えられた。まず后者の可能性を検証するため、*flhDC* の転写制御領域 (参考図 2) の下流に SD 配列を含む *lacZ* 遺伝子を結合させたコンストラクト (*P_{flhDC}-lacZ*) を構築し、Esr41 による *flhDC* プロモーター活性の変動を解析した (図 21A)。*P_{flhDC}-lacZ* を運ぶプラスミドで、pRS-Esr41 (または pRS414) を保持する *flhD* 欠損 K-12 株を形質転換した。各形質転換体を DMEM で培養し、その培養液の β-ガラクトシダーゼ活性を測定した。その結果、*esr41* の発現による β-ガラクトシダーゼ活性の上昇の程度は小さかった (図 21B)。この結果は、Esr41 が *flhDC* のプロモーター活性に影響を与えないことを示し、これは Esr41 の標的が、*flhDC* の転写を制御する因子ではなく、*flhDC* であることを強く示唆する。

この可能性の検証のため、*flhDC* のプロモーターを外来のプロモーターであるアラビノース濃度依存的に転写活性を制御可能な *araBAD* プロモーターに置換したコンストラクト (*Para-flhDC*) を構築した (図 21C ; 参考図 2)。*Para-flhDC* を運ぶプラスミドで、pRS-Esr41 (または pRS414) を保持する *flhD* 欠損 K-12 株を形質転換した。その形質転換体を DMEM で培養し、OD600=0.4 付近でアラビノースを添加し、*flhDC* mRNA を転写誘導した。誘導後、0 分、及び 15 分で培養をとめ、ウェスタンブロッティングにより FlhD タンパク質量を解析した。解析の結果、誘導後 15 分で FlhD タンパク質が検出された (図 21D)。また *esr41* を発現させた株の FlhD タンパク質量は、発現しない株と比べて、顕著に増加していた (図 21D)。この結果は、Esr41 は *flhDC* を標的とし、その翻

訳を促進することを示唆する。

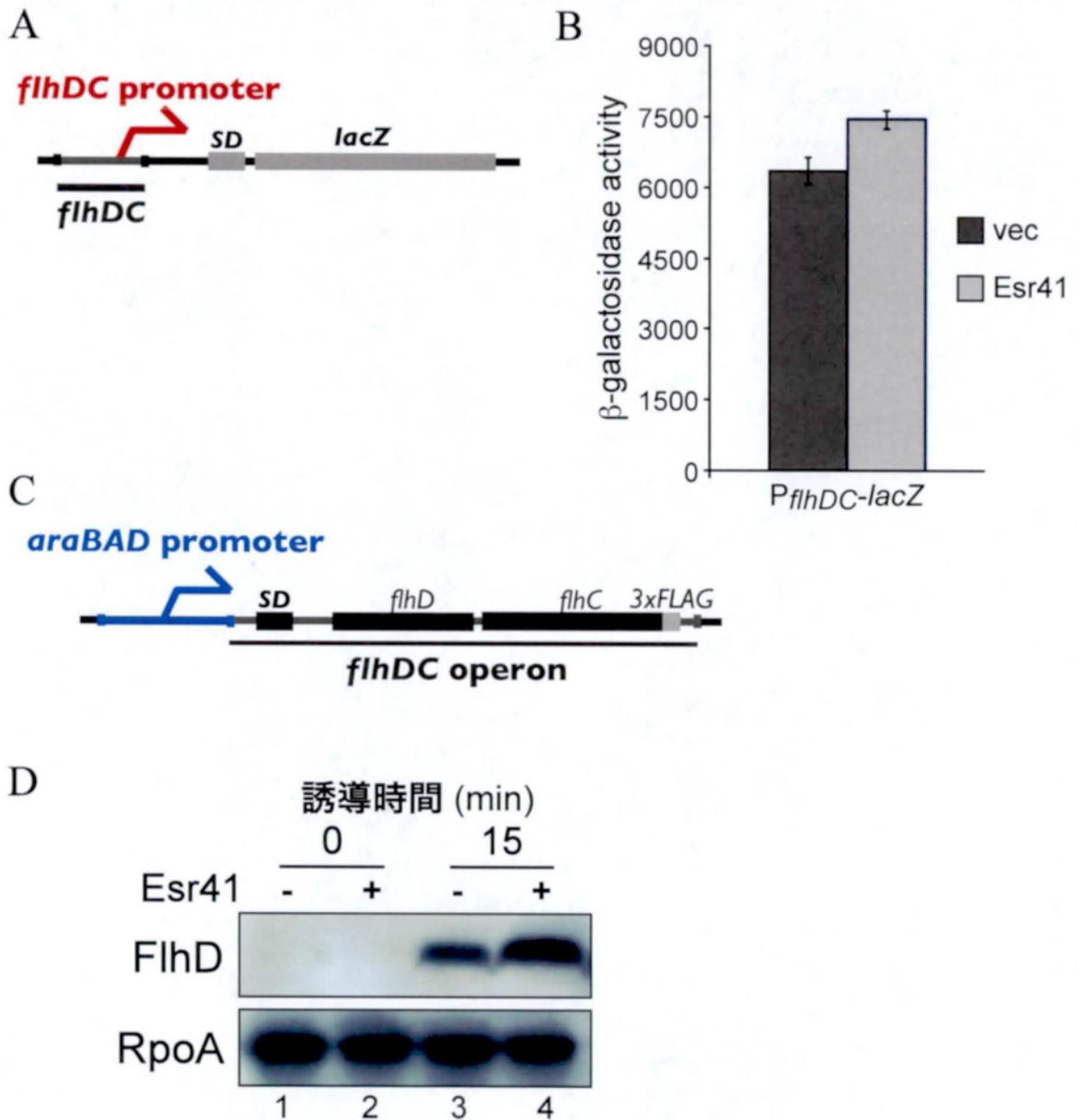


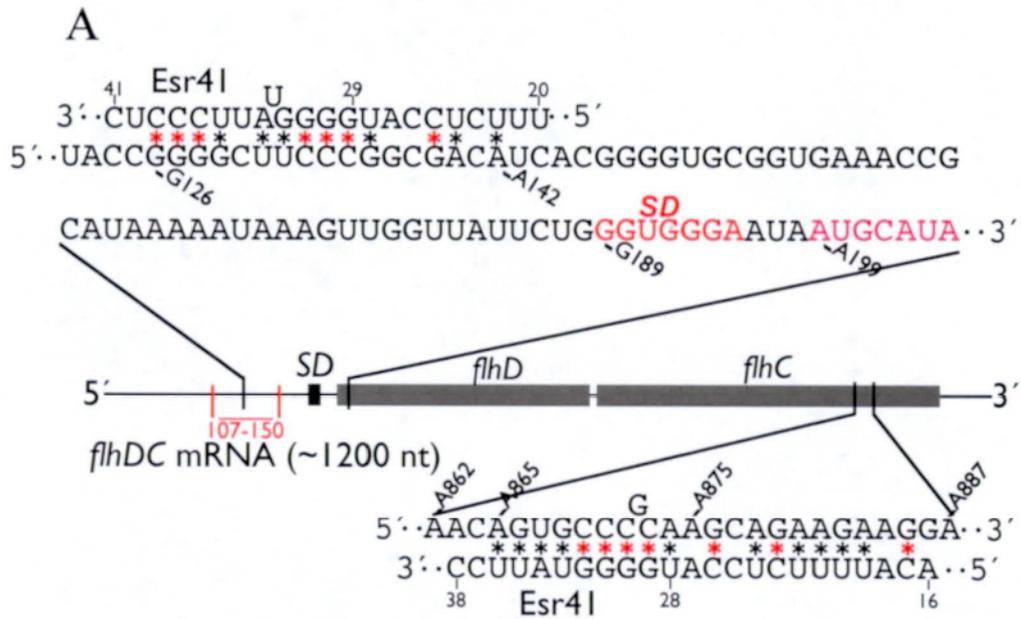
図21 Esr41は*flhD*を標的とし、翻訳を上昇させる。

- A. 図21Bの解析に用いたコンストラクト*P_{flhDC}-lacZ*(参考図2)の略図。
- B. Esr41が*flhDC*の転写に与える影響。pRS414 (vec)、またはpRS-Esr41 (Esr41) で、Aのコンストラクトを運ぶpMW-p*flhDC*-lacZを保持するNS1212 (Δ *flhD*)を形質転換した。各形質転換体をDMEMでOD₆₀₀ = 0.6まで培養し、培養液のβ-ガラクトシダーゼ活性を測定した。
- C. 図21Dの解析に用いたコンストラクト*Para-flhDC*(参考図2)の略図。
- D. Esr41の標的遺伝子の同定。pRS414 (vec)、またはpRS-Esr41 (Esr41) で、Cのコンストラクトを運ぶpAraDC3Fを保持するNS1212株 (Δ *flhD*)を形質転換した。形質転換体をOD₆₀₀ = 0.4付近まで培養した培養液に終濃度2%となるようにアラビノースを添加し培養を継続した。アラビノース添加後、0分間、15分間培養した培養液からタンパク質試料を調製した。タンパク質試料をanti-FlhD抗体、もしくはanti-RpoA (ローディング・コントロール)を用いたウェスタンブロットティングにより解析した。

(4) Esr41 による *flhD* 発現促進に *flhDC* mRNA の 107 - 150 塩基領域は不必要である。

sRNA による翻訳促進の例は少ない (Storz et al., 2004)。その中で、最も詳細に解析されているのは DsrA による *rpoS* mRNA の翻訳促進である (Soper and Woodson, 2008)。*rpoS* mRNA が持つ約 350 nt の長い 5' 非翻訳領域は、SD 配列や開始コドンを含むような二次構造を形成することで翻訳効率が低い状態に保たれている。この 5' 非翻訳領域に、低温ストレスなどで転写誘導される DsrA が結合することで、二次構造が変化し、翻訳効率が上昇する (Soper and Woodson, 2008; Soper et al., 2011)。一方、*flhDC* mRNA も約 200 nt もの長い 5' 非翻訳領域を持ち、SD 配列や開始コドンを含むように二次構造を形成する (Yakhnin et al., 2013)。そして、その二次構造を変化させ得る領域で、Esr41 が塩基対形成でき得る配列が *flhDC* mRNA の 126 - 142 塩基領域 (*flhDC* の転写開始点を 1 とする; 参考図 2) に存在する (図 22A)。そのため、*flhDC* mRNA の 107 - 150 塩基領域を欠失させることで、SD 配列や開始コドンを含むような二次構造ができず、かつ Esr41 との予想塩基対形成領域 (図 22A) もないコンストラクト (*flhDCA1*; 図 22A、参考図 2) を構築した。このコンストラクトを運ぶプラスミドで、pRS-Esr41 (または pRS414) を保持する *flhD* 欠損 K-12 株を形質転換した。この形質転換体を DMEM で培養したときの FlhD タンパク質量をウェスタンブロッティングにより解析した。その結果、107 - 150 塩基領域を保持している場合 (図 20B) と同じように、Esr41 を発現する株は、発現しない株と比べて、FlhD タンパク質量が増加していた (図 22B)。この結果は、Esr41 による *flhD* 発現促進に *flhDC* mRNA の 107 - 150 塩基領域は必要ないことを示し、図 22A で示した Esr41

と *flhDC* mRNA の 5'非翻訳領域間での塩基対形成の可能性は否定された。このことから、Esr41 は *DsrA-rpoS* mRNA 型翻訳促進機構ではない別の機構で、*flhDC* の発現を促進している可能性が高い。そこで、Esr41 と塩基対形成可能な領域を *flhDC* mRNA の翻訳領域を中心に探索した結果、*flhC* 翻訳領域に Esr41 と塩基対形成可能な領域が存在した (図 22A)。この塩基対形成を介して、Esr41 は、*flhDC* mRNA の安定性の上昇や、二次構造変化に伴う翻訳促進を促している可能性がある。



B



図22 Esr41による*flhD*発現促進に*flhDC* mRNAの107-150塩基領域は不必要である。

- A. *flhDC* mRNAの略図と、予想されるEsr41塩基対形成領域。*flhDC*の転写開始点を1とする。赤で示す107-150塩基領域はpMW-*flhDC* $\Delta 1$ で欠損させた領域(参考図2)を示す。黒のアスタリスクはA-U、またはG-Uペアを、赤のアスタリスクはG-Cペアを示す。
- B. Esr41による*flhD*発現促進における*flhDC* mRNAの5'非翻訳領域の重要性。pRS414 (vec)、またはpRS-Esr41 (Esr41) で、pMW-*flhDC* $\Delta 1$ を保持するNS1212株($\Delta flhD/+flhDC\Delta 1$)を形質転換した。形質転換体をDMEMでOD₆₀₀=0.6まで培養し、培養液を遠心分離した。菌体沈殿からタンパク質試料を調製し、anti-FlhD抗体を用いたウェスタンブロッティングにより解析した。

3. 考察

多くの病原性細菌において病原性関連遺伝子とべん毛関連遺伝子の協調的発現制御が知られている (Akerley et al., 1995; Bleves et al., 2002; Eichelberg and Galan, 2000; Horne and Prüss, 2006; Iyoda et al., 2001; Lucas et al., 2000)。O157 Sakai 株にも、病原性関連遺伝子をコードする LEE 遺伝子群とべん毛遺伝子群の協調的発現制御が知られており、その制御には GrlRA が重要な働きをする。*grlRA* の発現は Ler によって正に制御されており、GrlA は、*ler* の発現を正に、*flhDC* の発現を負に制御する。GrlR は GrlA の転写制御活性を抑制するが、何らかの条件下でプロテアーゼ ClpXP により分解されるため、GrlA による *ler* の発現促進、及び *flhDC* の発現抑制が誘起される (Iyoda and Watanabe, 2005; Iyoda et al., 2006)。これが、O157 Sakai 株で見られる LEE 遺伝子群とべん毛遺伝子群が協調的に制御される機構の 1 つである。

上述のような機構が知られているため、Esr41 によるべん毛遺伝子群の発現促進も、Esr41 による *ler* 抑制を介した制御であると考えた。しかしながら、*ler* を含む LEE 遺伝子群や *grlRA* を持たない K-12 株においてもべん毛遺伝子群の発現促進が見られたことからさらに解析を進めた結果、Esr41 が *flhDC* の発現を促進することを見出した。このことから、*esr41* 過剰発現時の O157 Sakai 株においては、Esr41 による *flhDC* 発現促進の直接的な効果に加え、Esr41 による *ler* 抑制を介した間接的な効果でべん毛遺伝子群の発現が上昇することが示唆される。

flhDC 遺伝子はオペロンを形成しており、また *flhD* の翻訳と *flhC* の翻訳は共役することが示唆されている。*esr41* の発現により FlhD 量が増加する (図

20B) ことから、同時に FlhC 量も増加することが示唆される。この点を確認するために、今後、ウェスタンブロットティングにより FlhC 量を解析する必要がある。

O157 Sakai 株において、*esr41* の発現が *lrhA* の発現を抑制することを示した (図 6)。LrhA は *flhDC* の発現を負に制御することが知られおり (Lehnen et al., 2002 ; 図 23)、これを考慮すると Esr41 によるべん毛遺伝子群の発現促進は LrhA を介した機構でも説明できるが、図 21 で示したように Esr41 による *flhDC* の転写活性の上昇はあまりみられなかった。この結果は、Esr41 による *flhDC* の発現促進において LrhA を介した機構はあまり重要ではないことを示唆するが、図 21 の解析は K-12 株を用いた解析であるため、O157 Sakai 株でも LrhA 非依存的に Esr41 による *flhDC* の発現促進が見られるかどうかを解析する必要がある。

図 21B の結果は、Esr41 による *flhD* 発現促進が転写後制御であることを示す。*flhDC* mRNA は比較的長い 5'非翻訳領域を持ち、フットプリント法から 5つのステムループを形成することが報告されている (Yakhnin et al., 2013)。このステムループの機能は部分的にしか明らかになっていないが、おそらく *flhDC* mRNA の翻訳活性に影響を与えている可能性が高い。また、5種類の sRNA が *flhDC* mRNA の 5'非翻訳領域に結合し、翻訳を制御することも報告されていることから (De Lay and Gottesman, 2012; Thomason et al., 2012)、Esr41 も同様に 5'非翻訳領域に結合する可能性を考え、Esr41 と塩基対形成可能な領域を、5'非翻訳領域を中心に探索をした結果、*flhDC* mRNA の 126 - 142 塩基領域を同定した (図 22A) が、解析の結果、その領域は Esr41 の *flhD* 発現促進に関与しないことがわかった。次に、Esr41 と塩基対形成可能な領域を *flhDC* mRNA の翻訳領

域を中心に探索した結果、*flhDC* mRNA の 865 - 885 塩基領域を同定した (図 22A)。Esr41 がこの領域で実際に塩基対形成を形成しているかどうかは、今後、解析する必要がある。標的 mRNA の翻訳領域に結合し、その発現を促進するような sRNA は知られておらず、Esr41 がもし予想した領域で塩基対を形成するのであれば、その発現促進機構は新規である。多くの既知 sRNA の作用機構を勘案すると、翻訳領域に結合することによる mRNA の安定性の上昇、もしくは二次構造変化に伴う翻訳効率の上昇は十分に予想することができる。一方で、先に述べたように *flhDC* mRNA に作用する sRNA や翻訳因子が既に知られているため、Esr41 がそれらの因子のいずれかに作用することにより *flhDC* の発現を制御している可能性もある。

第5章 総合考察

本研究は、O157 Sakai 株が有する small regulatory RNA Esr41 の機能を、過剰発現株における遺伝子発現変動に着目し、それが引き起こされる分子機構の解明を目指した。Esr41 のような O157 Sakai 株に存在し、K-12 株には存在しない sRNA の解析は初めての試みであり、O157 Sakai 株を用いた解析により Esr41 の機能を解析するとともに、細菌が生育するために必要な基本システムを O157 Sakai 株と共有する K-12 株を用いることで、より詳細な Esr41 の作用機構を解析した。O157 Sakai 株はその染色体内に多くのプロファージを保持するため (Asadulghani et al., 2009; Hayashi et al., 2001b)、解析の内容によっては安定した結果を得ることが難しい一方、K-12 株ではそのような問題がなく、Esr41 の詳細な作用機構を解析するには適している。

Esr41 は LEE 遺伝子群の発現抑制、べん毛遺伝子群の発現促進を、それぞれ独立した標的遺伝子を持つことで果たしており、また別の標的遺伝子が存在することも本研究により示唆された (図 6,7)。複数の標的遺伝子を持つ sRNA は多数報告されており、sRNA の一般的特徴と言ってもよい。例えばカタボライト抑制に関与する Spot42 sRNA は糖代謝に関与する約 16 種の標的遺伝子を持ち (Papenfert and Vogel, 2011; Beisel and Storz, 2011)、また鉄イオン代謝に関与する RyhB sRNA は 10 種の膜タンパク質遺伝子を標的とする (Vogel, 2009)。これらの例のように sRNA が複数の標的遺伝子を持つことは、細胞内の遺伝子発現パターンを生育環境の変化に合わせて迅速に変化させることに寄与していると考えられる。LEE 遺伝子群は約 40 個、べん毛遺伝子群は約 60 個の遺伝子

を含んでおり、Esr41 がこれらの遺伝子群のマスターレギュレーターの発現を制御することは、多くの遺伝子の発現を一斉に制御する方法として合理的である。加えて、Esr41 の *ler* 抑制効果は、翻訳融合した *lacZ* 遺伝子由来の酵素活性で測定した場合、過剰発現させない場合と比べて 0.5 倍程度であり (図 7)、それほど強い翻訳抑制ではないが、*ler* の発現を制御する上流因子にも Esr41 の標的遺伝子があることを考えると、LEE 遺伝子群の発現抑制は、Esr41 が *ler* だけでなく、その上流因子の発現制御も含めた二重の効果によってもたらされている可能性が高い (図 6,7)。

先述したように O157 Sakai 株において LEE 遺伝子群の発現が上昇する時、べん毛遺伝子群の発現は抑制される (Iyoda et al., 2006)。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に運動性を司るべん毛は不必要であることと、べん毛は宿主側の免疫の対象となるため、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 (Hayashi et al., 2001a)。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規のレギュレーターであることから、O157 株の病原性発現制御機構の一端を担うことが予想される。*esr41* 自身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。したがって、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。

Esr41 作用機構の解析から、Esr41 は *ler*、及び *flhDC* を標的とすることが示されたが、塩基対形成領域の同定には至っていない (第 2 章、第 4 章)。こ

れまでに標的が同定されている sRNA では、核となる塩基対形成領域の一塩基の置換だけでも sRNA の作用が失われるものもある (De Lay and Gottesman, 2012; Kawamoto et al., 2006)。その一方で、sRNA の作用の阻害のためには、複数の塩基置換をしなければならない sRNA もある (De Lay and Gottesman, 2012)。*ler* mRNA の SD 配列を含む領域に 1 塩基の置換変異を導入しても Esr41 による *ler* 抑制効果は失われなかったこと (結果未記載) から、Esr41 は後者のタイプの sRNA であることが示唆される。今後は、複数の変異を Esr41 に導入することで、塩基対形成領域を同定したい。しかし、その一方で、*ler* や *flhDC* の発現を翻訳段階で制御する因子に Esr41 が作用している可能性がある。その翻訳制御因子として、sRNA、及び RNA に特異的に結合するタンパク質が挙げられる。前者に関して、*ler* を標的とする sRNA は報告がないが、*flhDC* を標的とする sRNA は K-12 株で 5 種同定されている (De Lay and Gottesman, 2012)。sRNA 自身の発現制御に別の sRNA が関与することはあまり知られていないが、今後はその可能性も考える必要がある。また後者に関して、翻訳制御に関わる RNA 結合タンパク質として CsrA が知られている (Wei et al., 2001)。CsrA は糖代謝制御を行う因子として同定されたが、その後、多くの標的 mRNA の翻訳を負、または正に制御することが報告されている (Baker et al., 2007; Bhatt et al., 2009; Lucchetti-Miganeh et al., 2008)。CsrA の標的となる RNA は特徴的な結合モチーフを持ち、それは短いステムループのループ上の GGA 配列である。この CsrA 結合モチーフを複数持つ CsrB RNA、CsrC RNA によって CsrA の翻訳制御活性は調節されている (Timmermans and Van Melderen, 2010)。興味深いことに、CsrA は *flhDC* mRNA に結合し、その RNA の安定性を向上させることで *flhDC* の発現

を促進している (Wei et al., 2001; Yakhnin et al., 2013)。Esr41 は、CsrA や他の翻訳制御因子の活性や発現を調節することで、*ler* や *flhDC* の発現を促進している可能性も考えられる。また近年、Hfq 依存的な塩基対形成を介した翻訳制御と、CsrB や CsrC のように CsrA に結合することによる翻訳制御活性の調節という両方の機能を持った McaS sRNA が報告された (Jorgensen et al., 2013; Thomason et al., 2012)。McaS も、Esr41 と同様に 100 nt 以下の小さい RNA であるが、Hfq に依存した塩基対形成を介して標的 mRNA の翻訳を制御する機能と、CsrA に結合することで、CsrA を介した翻訳制御のパターンを変化させる機能を持つ。Esr41 には CsrA との結合に重要な GGA モチーフが存在しないため、CsrA と結合する可能性は低いですが、Esr41 にも McaS のように、Hfq に依存した翻訳の制御機能以外の機能を有していることは考えられるため、その可能性を考慮して解析を進める必要がある。

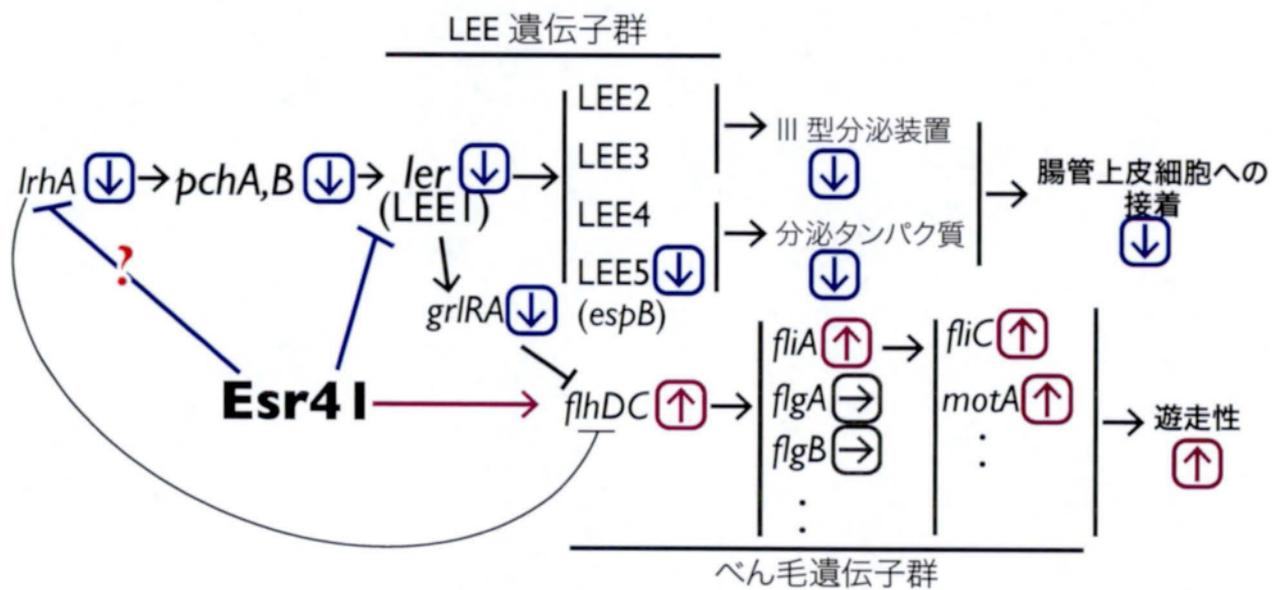


図23 Esr41の作用モデル

定量的PCR、及びマイクロアレイの結果のまとめと、Esr41の標的遺伝子。pRS414を保持するSKI-5142株と比べ、pRS-Esr41を保持するSKI-5142株の方が、mRNA量またはタンパク質が減少している遺伝子、及び減少している細胞接着性を下矢印(青)で、変動のない遺伝子を右矢印(黒)で、mRNA量またはタンパク質が増加している遺伝子、及び上昇している遊走性を上矢印(赤)で示す。

材料と方法

○菌株

本研究で用いた大腸菌株を表 1 に示す。

本研究では、腸管出血性大腸菌 O157:H7 Sakai 株の野生株として SKI-5142 (Iyoda and Watamabe, 2005) を、非病原性大腸菌 K-12 株の野生株として MG1655 Δ lacZ 株 (Sudo et al., 2014) を用いた。本研究で用いた MG1655 Δ lacZ 株の親株である MG1655 (CGSC#6300) 株は、*flhDC* の転写制御領域にトランスポゾンの挿入がない株である (Barker et al., 2004)。

K-12 株の *hfq* 欠損株である NS1201 株は以下のように構築した。TM587 株の染色体上の、*hfq* 遺伝子を FRT-*cat* 遺伝子-FRT カセットで置換した領域を、P1 トランスダクションにより MG1655 株染色体に移すことで、NS1201 株を得た。*hfq* 遺伝子の欠失の確認は、*hfq* 欠損株の表現型である生育遅延を確認することで行った。NS1202 株は、pCP20 を用いた FRT の部位特異的組換えにより NS1201 株から *cat* 遺伝子を除去することで得た。*cat* 遺伝子除去の確認は、株のクロラムフェニコールへの感受性観察により行った。

hfq 遺伝子と *lacZ* 遺伝子の二重欠損株である NS1203 株は以下のように構築した。MG1655 Δ lacZ 株の染色体上の、*lacZ* 遺伝子を *cat* 遺伝子で置換した領域を、P1 トランスダクションにより NS1202 株染色体に移すことで、NS1203 株を得た。*lacZ* 遺伝子の欠失の確認は、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド (X-gal) を含む LB 寒天培地を用いた呈色反応の有無の観察により行った。

flhD 遺伝子と *lacZ* 遺伝子の二重欠損株である NS1211 株は以下のように構築した。JW1881 株の染色体上の、*flhD* 遺伝子を FRT-*kan* 遺伝子-FRT カセットで置換した領域を、P1 トランスダクションにより MG1655 Δ *lacZ* 株染色体に移すことで、NS1211 株を得た。*flhD* 遺伝子の欠失の確認は、*flhD* 欠損株の表現型である遊走性の低下を確認することで行った。NS1212 株は、pCP20 を用いた FRT の部位特異的組換えにより NS1211 株から *kan* 遺伝子を除去することで得た。*kan* 遺伝子除去の確認は、株のカナマイシンへの感受性観察により行った。

○プラスミド

本研究で用いたプラスミド、及びオリゴヌクレオチドをそれぞれ表 2、表 3 に示す。

Esr41、及び Esr41 変異体発現プラスミドの構築

pRS-Esr41 は *esr41* の予想される転写制御領域、及び *esr41* のコード領域 (Esr41 の 5'末端を+1 とした場合の-483 から+114) を含む DNA が pRS414 にクローニングされた pBR タイプのプラスミドである (Sudo et al., 2014)。

pRS-Esr41stmu1、及び pRS-Esr41stmu2 は以下のように構築した。
#41-Rev-stem-mu1、#41-Fwd-16nt の 5'末端リン酸化プライマーセット、及び #41-Rev-stem-mu2、#41-Fwd-42nt の 5'末端リン酸化プライマーセットを用いて、pRS-Esr41 プラスミド DNA を鋳型にした PCR により RS-Esr41stmu1 断片、及び RS-Esr41stmu2 断片を増幅させた。各 DNA 断片を分子内ライゲーション反応により連結させ、この構築プラスミドを *EcoRI* で処理、精製することで、Esr41stmu1 断片、及び Esr41stmu2 断片を得た。この DNA 断片と *EcoRI* で処理した pRS414

をライゲーション反応により連結させることで pRS-Esr41stmu1、及び pRS-Esr41stmu2 を得た。

pRS-Esr41-28Hbm、及び pRS-Esr41-41Hbm は以下のように構築した。互いの 3'末端が対合する 5-SgrSmodule、BamHI-3-SgrSmodule のプライマーセットを用いた PCR により Hfq-binding module 断片を得た。次に、EcoRI-5-#41、3-SgrSmodule-#41-28bp のプライマーセット、または EcoRI-5-#41、3-SgrSmodule-#41-41bp のプライマーセットを用いて、pRS-Esr41 を鋳型にした PCR により Esr41-28bp 断片、及び Esr41-41bp 断片を得た。EcoRI-5-#41、BamHI-3-SgrSmodule のプライマーセットを用いて、Hfq-binding module 断片、及び Esr41-28bp 断片を鋳型にした PCR により、これら 2 つの断片を連結させ Esr41-28Hbm 断片を得た。同様の PCR により、Hfq-binding module 断片、及び Esr41-41bp 断片を連結させ Esr41-41Hbm 断片を得た。EcoRI、及び BamHI で処理した Esr41-28Hbm 断片、または Esr41-41Hbm 断片と EcoRI、及び BamHI で処理した pRS414 をライゲーション反応により連結させることで pRS-Esr41-28Hbm、及び pRS-Esr41-41Hbm を得た。

各 Esr41 部分欠失体発現プラスミド (pRS-Esr41 Δ 6-10、pRS-Esr41 Δ 11-15、pRS-Esr41 Δ 16-20、pRS-Esr41 Δ 21-25、pRS-Esr41 Δ 26-30、pRS-Esr41 Δ 31-35、pRS-Esr41 Δ 36-41) は以下のように構築した。各 5'末端リン酸化プライマーセット (pRS-Esr41 Δ 6-10: #41-Rev-5nt, #41-Fwd-11nt; pRS-Esr41 Δ 11-15: #41-Rev-10nt, #41-Fwd-16nt; pRS-Esr41 Δ 16-20: #41-Rev-15nt, #41-Fwd-21nt; pRS-Esr41 Δ 21-25: #41-Rev-20nt, #41-5p-25; pRS-Esr41 Δ 26-30: #41-Rev-25nt, #41-Fwd-31nt; pRS-Esr41 Δ 31-35: #41-Rev-30nt, #41-Fwd-36nt; pRS-Esr41 Δ 36-41: #41-Rev-35nt,

#41-Fwd-42nt) を用いて、pRS-Esr41 プラスミド DNA を鋳型にした PCR により各 DNA 断片を増幅させ、その DNA 断片を分子内ライゲーション反応により連結させ、この構築プラスミドを *EcoRI* で処理、精製することで、各 Esr41 部分欠失体 DNA 断片を得た。この DNA 断片と *EcoRI* で処理した pRS414 をライゲーション反応により連結させることで各 Esr41 部分欠失体発現プラスミド (pRS-Esr41 Δ 6-10、pRS-Esr41 Δ 11-15、pRS-Esr41 Δ 16-20、pRS-Esr41 Δ 21-25、pRS-Esr41 Δ 26-30、pRS-Esr41 Δ 31-35、pRS-Esr41 Δ 36-41) を得た。

***lacZ* 融合遺伝子発現プラスミドの構築**

pMW-*lacZ*ter、及び pMWbla-*lacZ*ter は以下のように構築した。MfeI-pR_{ster}4-5p、*lacZ* seq のプライマーセット、及び SphI-5'-pRS、HindIII-ter-3'-pRS のプライマーセットを用いて、pRS414 プラスミド DNA を鋳型にした PCR により、大腸菌 *rrnB* オペロンの転写ターミネーター配列が 4 コピータンデムに連結した *ter*4 断片、及び SD 配列と開始コドンを持たない *lacZ* と、その 3' 端に *crp* の転写ターミネーター配列を持つ *lacZ*ter 断片を増幅させた。MfeI、及び *EcoRI* で処理した *ter*4 断片と *EcoRI* で処理した pMW218 をライゲーション反応により連結させて、構築されたプラスミドを *SphI* と *HindIII* で処理した。この DNA 断片と *SphI* と *HindIII* で処理した *lacZ*ter 断片をライゲーション反応により連結させることで pMW-*lacZ*ter を得た。MfeI-5-bla、及び *EcoRI*-3-bla のプライマーセットを用いて、pBR322 プラスミド DNA を鋳型にした PCR により *bla* プロモーター断片を増幅した。*EcoRI* で処理した pMW-*lacZ*ter と MfeI、及び *EcoRI* で処理した *bla* プロモーター断片をライゲーション反応により連結させる

ことで pMWbla-*lacZ*ter を得た。

pMW-*lacZ*ter は以下のように構築した。MfeI-pRSter4-5p、HindIII-ter-3'-pRS のプライマーセットを用いて、pRS415 プラスミド DNA を鋳型にした PCR により SD 配列と開始コドンを含む *lacZ* と、その 3' 端に *crp* の転写ターミネーター配列を持つ *lacZ*ter 断片を増幅させた。MfeI、及び HindIII で処理した *lacZ*ter 断片と EcoRI、及び HindIII で処理した pMW218 をライゲーション反応により連結させることで、pMW-*lacZ*ter を得た。

pMW-*pchA*19aa、及び pMW-*ler* は以下のように構築した。*pchA* 5' EcoRI、SphI-3-*pchA*19aa のプライマーセットを用いて、SKI-5142 から抽出したゲノム DNA を鋳型にした PCR により *pchA* の転写制御領域と *pchA* の N 末端 19 アミノ酸のコード領域を含む *pchA*19aa 断片を増幅した。EcoRI、及び SphI で処理した *pchA*19aa 断片、及び pMW-*lacZ*ter をライゲーション反応により連結させることで pMW-*pchA*19aa を得た。EcoRI-5-*ler*-p4、SalI-3'-*ler* のプライマーセットを用いて、SKI-5142 から抽出したゲノム DNA を鋳型にした PCR により *ler* の開始コドンに近い方のプロモーターと *ler* の N 末端 13 アミノ酸のコード領域を含む *ler* 断片を増幅した。EcoRI、及び SalI で処理した *ler* 断片、及び pMW-*lacZ*ter をライゲーション反応により連結させることで pMW-*ler* を得た。

pMWbla-*pchA*19aa、及び pMWbla-*ler*d1 は以下のように構築した。EcoRI-5-*pchA*-p2、SphI-3-*pchA*19aa のプライマーセットを用いて、SKI-5142 から抽出したゲノム DNA を鋳型にした PCR により *pchA* のプロモーターを含まず、*pchA* の N 末端 19 アミノ酸のコード領域を含む *pchA*Δp 断片を増幅した。EcoRI、及び SphI で処理した *pchA*Δp 断片、及び pMWbla-*lacZ*ter をライゲーション反応

により連結させることで pMWbla-pchA19aa を得た。EcoRI-5-ler-p4、SallI-3'-ler のプライマーセットを用いて、SKI-5142 から抽出したゲノム DNA を鋳型にした PCR により *ler* のプロモーターを含まず、*ler* の N 末端 13 アミノ酸のコード領域を含む *ler* Δ p 断片を増幅した。EcoRI、及び *Sa*II で処理した *ler* Δ p 断片と EcoRI、及び *Sa*II で処理した pMWbla-lacZter をライゲーション反応により連結させることで pMWbla-lerd1 を得た。

pMWbla-ler short、及び pMWbla-ler Δ 149-155 は以下のように構築した。EcoRI-5-ler-p4、*ler*-SallI-174-3p のプライマーセット、及び EcoRI-5-ler-d149-155、SallI-3'-*ler* のプライマーセットを用いて、SKI-5142 から抽出したゲノム DNA を鋳型にした PCR により *ler* のプロモーターを含まず、*ler* の開始コドンまでを含む *ler* short 断片、及び *ler* のプロモーターを含まず、*ler* の 149-155 領域を欠失した *ler* Δ 149-155 断片を増幅した。EcoRI、及び *Sa*II で処理した *ler* short 断片、または *ler* Δ 149-155 断片と EcoRI、及び *Sa*II で処理した pMWbla-lacZter をライゲーション反応により連結させることで pMWbla-ler short、及び pMWbla-ler Δ 149-155 を得た。

pMWbla-ler-fesr41 は以下のように構築した。bla-*ler* 160-Rev、#41-17-26 fusion *ler* 171-Fwd の 5'末端リン酸化プライマーセットを用いて、pMWbla-lerd1 プラスミド DNA を鋳型にした PCR により MW-*ler*-fesr41 断片を増幅させた。MW-*ler*-fesr41 断片を分子内ライゲーション反応により連結させ、この構築プラスミドを EcoRI、及び *Sa*II で処理、精製することで、*ler*-fesr41 断片を得た。この DNA 断片と EcoRI、及び *Sa*II で処理した pMWbla-lacZter をライゲーション反応により連結させることで pMWbla-ler-fesr41 を得た。

pMW-pflhDC-lacZ は以下のように構築した。EcoRI-FlhDC-Fwd、BamHI-5-flhDC-pro のプライマーセットを用いて、SKI-5142 から抽出したゲノム DNA を鋳型にした PCR により *flhDC* の転写制御領域のみを含む PflhDC 断片を増幅した。EcoRI、及び *Bam*HI で処理した PflhDC と pMW-lacZter をライゲーション反応により連結させることで pMW-pflhDC-lacZ を得た。

FlhDC 発現プラスミド

pTWV-flhDC は以下のように構築した。EcoRI-FlhDC-Fwd、BamHI-FlhDC-Rev のプライマーセットを用いて、SKI-5142 から抽出したゲノム DNA を鋳型にした PCR により *flhDC* の転写制御領域、及びコード領域を含む flhDC 断片を増幅した。EcoRI、及び *Bam*HI で処理した flhDC 断片と pTWV228 をライゲーション反応により連結させることで pTWV-flhDC を得た。

pMW-flhDC full は以下のように構築した。pTWV-flhDC を *Eco*RI、及び *Sal*I で処理、精製することで、EcoRI-flhDC-*Sal*I 断片を得た。EcoRI-flhDC-*Sal*I 断片と *Eco*RI、及び *Sal*I で処理した pMW219 をライゲーション反応により連結させることで pMW-flhDC full を得た。

pMW-flhDC Δ 1 は以下のように構築した。EcoRI-FlhDC-Fwd、flhD-107rev-add150 のプライマーセット、及び BamHI-FlhDC-Rev、flhD-150Fwd のプライマーセットを用いて、SKI-5142 から抽出したゲノム DNA を鋳型にした PCR により flhD-5UTR 断片、及び flhDC ORF 断片を得た。次に、EcoRI-FlhDC-Fwd、BamHI-FlhDC-Rev のプライマーセットを用いて、flhD-5UTR 断片、及び flhDC ORF 断片を鋳型にした PCR により、これら 2 つの断片を連結させ flhDC Δ 1 断片

を得た。*EcoRI*、及び *BamHI* で処理した *flhDC*Δ1 断片と pMW219 をライゲーション反応により連結させることで pMW-*flhDC*Δ1 を得た。

pAraDC3F は以下のように構築した。FlhC-FLAG sen、FlhC-FLAG anti の 5'末端リン酸化プライマーセットを用いて、pTWV-*flhDC* プラスミド DNA を鋳型にした PCR により *flhC* コード領域の 3'末端に 3xFLAG コード配列が付加された TWV-*flhDC*3F 断片を増幅させた。TWV-*flhDC*3F 断片を分子内ライゲーション反応により連結させ、この構築プラスミドを *EcoRI*、及び *BamHI* で処理、精製することで、*flhDC*3F 断片を得た。この DNA 断片と *EcoRI*、及び *BamHI* で処理した pTWV228 をライゲーション反応により連結させることで pTWV-*flhDC*3F を得た。次に *XbaI*-Fwd-tsFlhDC、*SalI*-Rev-FlhDC のプライマーセットを用いて、pTWV-*flhDC*3F プラスミド DNA を鋳型にした PCR により *flhDC* の転写制御領域を含まない *flhDC*3F short 断片を得た。*XbaI*、及び *SalI* で処理した *flhDC*3F short 断片と pAraX をライゲーションにより連結させることで pAraDC3F を得た。

○培地、および培養条件

本研究では培地として LB または DMEM を用いた。菌は好氣的条件下において、37 °C で振とう培養した。波長 600 nm で培養液の濁度を計測し、菌体の増殖を測定した。また必要に応じて、培地にアンピシリン（最終濃度 100 μg/ml）、カナマイシン（最終濃度 30 μg/ml）、クロラムフェニコール（最終濃度 30 μg/ml）を加えた。

○ウェスタンブロッティング

タンパク質試料は以下の方法で調製した。各菌株を $OD_{600} = 0.6 \sim 1.0$ まで培養した培養液を 1.0 ml 分取し、遠心分離 (12,000 rpm、 4°C 、3 分) により集菌した。沈殿を OD_{600}/ml になるように、 H_2O と 2xSDS バッファー (120 mM Tris-HCl pH6.8、3.8% SDS、19% グリセロール、9.6% β -メルカプトエタノール、0.02% BPB) で懸濁し、 97°C で 5 分間加熱処理を行いタンパク質試料とした。

タンパク質試料を SDS-PAGE (濃縮ゲル: 5% アクリルアミド、125 mM Tris-HCl pH6.8、0.1% SDS、0.033% APS、0.05% TEMED; 分離ゲル: 15% アクリルアミド、375 mM Tris-HCl pH8.8、0.1% SDS、0.033% APS、0.05% TEMED) により分離し、セミドライトランスファー装置 (BIO CRAFT) を用いてメンブレン (Immobilion-P; Millipore) へ転写した。転写後、メンブレンを 5% スキムミルク-0.1% Tween-PBS (0.1% Tween20、0.15 M NaCl、10 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ [pH 7.5]) によって 1 時間ブロッキングした。5% スキムミルク-0.1% Tween-PBS で 1/5000 に希釈した一次抗体 (抗 FlhD 抗体 (ウサギ宿主抗体)、及び抗 RpoA 抗体 (マウス宿主抗体; SANTA CRUZ) とメンブレンを 1 時間反応させ、その後 0.1% Tween-PBS で 15 分洗浄を 2 回行った。5% スキムミルク-0.1% Tween-PBS で 1/5000 に希釈したアルカリフォスファターゼ標識二次抗体 (Sigma-Aldrich) とメンブレンを 1 時間反応させ、その後 0.1% Tween-PBS で 15 分洗浄を 2 回行った。メンブレンを Attophos Fluorescent AP Substrate System (Promega) により検出した。

○ノーザンブロットイング

RNA 試料は以下の方法で調製した。各菌株を $OD_{600} = 0.6 \sim 1.0$ まで培養した培養液を 2.0 ml 分取し、遠心分離 (12,000 rpm、 4°C 、3 分) により集菌した。沈殿を 1.2 ml の ISOGEN (ニッポンジーン) で懸濁し、3 分間室温で静置し、240 μl のクロロホルムを加え、激しく攪拌した。攪拌後、3 分間室温で静置し、遠心分離 (12,000 x g、 4°C 、15 分) し、水溶性画分を新しいエッペンドルフチューブに移し、600 μl のイソプロパノールを加え、10 分間、氷上で静置後、遠心分離 (14,000 rpm、 4°C 、15 分) した。上清を取り除き、1 mL の 75% エタノールで洗浄し、得られた沈殿を 400 μl の RNA バッファー (0.5% SDS、10 mM EDTA[pH 8.0]、20 mM CH_3COONa [pH 5.2]) で再懸濁し、1 mL の 100% エタノールを加え、10 分間、氷上で静置後、遠心分離 (14,000 rpm、 4°C 、15 分) した。上清を取り除き、1 mL の 75% エタノールで洗浄し、得られた沈殿を 20 μl の RNA バッファーで懸濁した。最後に RNA 試料の OD_{260} を測定することで、RNA 濃度を計測した。

RNA 試料を等量の Urea dye (7M 尿素、10 mM EDTA[pH 8.0]、36% グリセロール、0.02% BPB、0.02% XC) に溶解し、7M 尿素ポリアクリルアミドゲルを用いて分離した。分離後、ゲルを 1 x TBE で 15 分間洗浄し、洗浄後、ゲル中の RNA を、セミドライトランスファー装置を用いてメンブレン (Immobilion NY+ ; Millipore) に転写した。転写後、UV クロスリンカーを用いてメンブレンを 1200 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ で 2 回照射処理し、ハイブリバックにメンブレンを移し、pre-Hybridization バッファー (5 x SSC、1% SDS、1 x Denhardts solution) で 42°C 1 時間震盪した。震盪後、pre-Hybridization バッファーを除き、Hybridization バ

ッファー (900 mM NaCl, 90 mM Tris-HCl [pH 8.0], 6 mM EDTA [pH 8.0], 0.3% SDS)、及び 95°C、3 分間加熱処理した後氷上で静置した γ -[³²P]-ATP で標識したオリゴヌクレオチドを加え、50°C で 16 時間反応させた。その後、メンブレンを 1 x SSC で 10 分間洗浄を 3 回行い、オートラジオグラフィーで検出した。

○ β -ガラクトシダーゼ (LacZ) ・レポーターアッセイ

各菌株を OD₆₀₀ = 0.6 ~ 1.0 まで培養した培養液を氷上で 10 分間静置後、OD₆₀₀ を測定した。培養液、及び Z バッファー (60 mM Na₂HPO₄, 40mM NaH₂PO₄, 10mM KCl, MgSO₄, 50mM β -メルカプトエタノール) の合計が 800 μ l となるように混合し、0.1% SDS をピペットマンの P200 チップで 1 滴、クロロホルムを 2 滴加えたアッセイ試料を調製した。アッセイ試料を 10 秒間 vortex し、28 °C で 10 分間静置した。静置後、160 μ l の 4 mg/ml ONPG の添加により反応させ、400 μ l の 1M Na₂CO₃ の添加により反応を停止させた。アッセイ試料を遠心分離 (14,000 rpm、4°C、5 分) し、上清の OD₄₂₀ を測定した。また、ONPG 添加時点から、Na₂CO₃ の添加時点までの時間 (反応時間) を測定した。 β -ガラクトシダーゼ活性 (Miller units) を以下の式から計測した。

$$\text{Miller units} = 1000 \times \text{OD}_{420} / \text{反応時間(分)} \times \text{培養液の体積(ml)} \times (1.7 / 1.36) \times \text{OD}_{600}$$

各株に対し、3 回以上、独立に培養し、活性測定を行った。

○Hfq-His₆ 精製

イソプロピル- β -チオガラクトピラノシド (IPTG) の添加により *hfq* の発現誘導が可能な pQE80L-Hfq-His (Morita et al., 2005) を保持する TM589 (Morita

et al., 2005) を 200 mL の LB 培地で $OD_{600}=0.2$ 付近まで震盪培養した。その後、培養液に終濃度が 2 mM となるように IPTG を添加し、80 分間震盪培養を継続し、遠心分離 (6,000 rpm、 4°C 、10 分) により集菌した。沈殿を 12.5 mL の STE バッファー (100mM NaCl、10mM Tris-HCl [pH 8.0]、1mM EDTA) で洗浄した。洗浄後、10 mL の NA バッファー (50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ [pH 8.0]、300mM NaCl、10 mM イミダゾール) で懸濁し、超音波破碎後、遠心分離 (12,000 rpm、 4°C 、20 分) し、上清を新しいチューブに移した。この細胞抽出液に 10 μg の RNase A を添加し、氷上で 10 分間静置した後、 75°C で 10 分間加熱することにより Hfq-His₆ を含む熱耐性を持つタンパク質以外のタンパク質を変性させた。これを遠心分離 (12,000 rpm、 4°C 、20 分) し、上清を新しいチューブに移した。この細胞抽出液に 500 μl の Ni^+ -NTA Agarose (Qiagen) を加え、 4°C で 20 分間遠心撹拌した。遠心撹拌後、Poly-Prep Chromatography Column (Bio Rad) を用いて Ni^+ -NTA アガロースを分離し、5 mL の NB バッファー (50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ [pH 8.0]、300mM NaCl、20 mM イミダゾール) で 2 回洗浄した。洗浄後、 Ni^+ -NTA アガロースに結合したタンパク質を 500 μl NC バッファー (50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ [pH 8.0]、300mM NaCl、250 mM イミダゾール) で溶出し、microcon Ultracel YM-3 (Millipore) を用いて溶出液を濃縮した。濃縮後、溶出液に溶出液と等量の 2 \times Hfq strage バッファー (30 mM Tris-HCl [pH 8.0]、150 mM KCl、7.5 mM MgCl_2 、60% グリセロール、0.15% Tween20、1.5 mM DTT) を加え、 4°C で保存した。タンパク質濃度は SDS-PAGE 後の CBB 染色により計測した。図に示す Hfq-His₆ のモル量は 6 量体として算出した。

○*in vitro* 転写系を用いた RNA の調製

本研究で用いた *in vitro* 合成 RNA は、T7 プロモーターを含む DNA 断片を鋳型に CUGA 7 *in vitro* 転写キット (ニッポンジーン) を用いて合成した。合成後、得られた合成 RNA は非変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、波長 254 nm で検出したバンドを切り出し、1 ml TE で溶出した。溶出液をエタノール沈殿により精製し、OD₂₆₀ を測定することで、RNA 濃度を計測した。以下に鋳型 DNA の調製について記す。

Esr41、Esr41 Δ 26-30、Esr41 Δ 31-35、及び Esr41 Δ 36-41 の *in vitro* 転写反応鋳型 DNA は、それぞれ pRS-Esr41、pRS-Esr41 Δ 26-30、pRS-Esr41 Δ 31-35、pRS-Esr41 Δ 36-41 プラスミド DNA を鋳型にし、T7 プロモーター配列を持つ #41 T7-5'p-2、#41 polyU-r のプライマーセットを用いた PCR により増幅した。Esr41 Δ 6-10、Esr41 Δ 11-15、Esr41 Δ 16-20、及び Esr41 Δ 21-25 の *in vitro* 転写反応鋳型 DNA は、それぞれ pRS-Esr41 Δ 6-10、pRS-Esr41 Δ 11-15、pRS-Esr41 Δ 16-20、pRS-Esr41 Δ 21-25 プラスミド DNA を鋳型にし、T7 プロモーター配列を持つプライマー (それぞれ #41 del6-10 T7-5'p、#41 del11-15 T7-5'p、#41 del16-20 T7-5'p、#41 del21-25 T7-5'p)、#41 polyU-r のプライマーセットを用いた PCR により増幅した。Esr41-4U の *in vitro* 転写反応鋳型 DNA は、pRS-Esr41 プラスミド DNA を鋳型にし、T7 プロモーター配列を持つ #41 T7-5'p-2、#41 T7-3'p のプライマーセットを用いた PCR により増幅した。Esr41-c.ler の *in vitro* 転写反応鋳型 DNA は、ler annealing T7f、ler annealing r のプライマーセットを用いた PCR により増幅し、得られた PCR 産物を鋳型 DNA にし、ler annealing T7f、#41 polyU-r のプライマーセットを用いた PCR により増幅した。ler136 の *in vitro* 転写反応鋳型 DNA は、

SKI-5142 から抽出したゲノム DNA を鋳型にし、T7 プロモーター配列を持つ ler-T7f-2、ler extension-p1 のプライマーセットを用いた PCR により増幅した。各 PCR 産物を非変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動後、波長 254 nm で検出したバンドを切り出し、400 μ l TE で溶出した。溶出液をエタノール沈殿により精製し、*in vitro* 転写反応鋳型 DNA とした。

○ゲルシフトアッセイ

reaction buffer (20 mM Tris-HCl [pH 8.0]、20 mM KCl、1 mM MgCl₂、10 mM NaH₂PO₄/Na₂HPO₄ [pH 8.0]、1 mM DTT) 内で、各図に示す ³²P 標識 RNA、非標識 RNA、Hfq-His₆ を混合した。混合液を図に示すように反応させた後、loading dye (25% グリセロール、0.05% BPB) を加え、4%非変性ポリアクリルアミドゲル (0.5 x TBE、5% グリセロール) で分離した。分離後、ゲルを減圧乾燥して、オートラジオグラフィーで検出した。

○定量的 PCR

RNA 試料は以下の方法で調製した。各菌株を OD₆₀₀ = 0.6 ~ 1.0 まで培養した培養液を 1.0 mL ずつ 2 本の 2.0 mL チューブに分注し、1.0 mL の RNAprotect Bacterial Reagent (Qiagen) と混合し、すばやく vortex し室温で 5 分間静置した。静置後、遠心分離 (5,000 x g、室温、10 分) し、上清を取り除いた。この操作により細胞中の RNA が安定化する。この後の操作は RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて、製品添付のプロトコールに従った。

抽出した RNA 試料を TURBO DNase (Life Technologies) を用いた DNA

の分解処理をした。その後、水飽和フェノール処理、クロロホルム処理、エタノール沈殿を行い RNase free water で懸濁した。最後に RNA 試料の OD₂₆₀ を測定することで、RNA 濃度を計測した。

2.5 µg の RNA 試料を用いて逆転写反応を行った。逆転写酵素 ReverTraAce (TOYOBO)、及びプライマーとして Random hexamers (Life Technologies) を用いた。RNA 試料、Random hexamers、dNTPs、及び ReverTraAce 用バッファーを製品添付のプロトコールに従い混合し、95 °C で 5 分間加熱処理し、処理後すばやく氷上で 3 分間静置した。静置後、ReverTraAce を添加し、30 °C で 10 分間、55 °C で 60 分間、95 °C で 5 分間加熱処理した。その後、RNaseA 処理をし、TE 飽和フェノール/クロロホルム/イソアミルアルコール(各 25:24:1)、エタノール沈殿し、50 µl の TE で懸濁し cDNA 試料とした。同時に、逆転写酵素を加えずに上述の逆転写反応を行った cDNA (RT-) 試料を調製した。

2 µl の cDNA 試料を用いて定量的 PCR を行った。定量的 PCR には SYBR Green master Mix (Life Technologies)、及び以下に示すプライマーセットを用いて製品添付のプロトコールに従った。また、各遺伝子の検量線計測用鋳型 DNA は、以下に示すプライマーセットを用いて O157 Sakai 株ゲノム DNA を鋳型にした PCR により増幅、精製することで調製した。定量的 PCR 後、各遺伝子の mRNA 量の値は以下の式より算出した。各遺伝子の mRNA 量 = (各遺伝子の定量値 [cDNA 試料]) - (各遺伝子の定量値 [cDNA (RT-)試料]) / (16S rRNA の定量値 [cDNA 試料]) - (16S rRNA の定量値 [cDNA (RT-)試料])。各 cDNA 試料に対し、3 回以上、定量的 PCR を行い、各遺伝子の mRNA 量の絶対値の平均値を算出した。

プライマーセット: 16S rRNA (16SrRNA Realtime Fwd、16SrRNA Realtime Rev) ; *PchA* (PchA Realtime Fwd、PchA Realtime Rev) ; *ler* (Ler RealTime Fwd、Ler RealTime Rev) ; *espB* (EspB Realtime Fwd、EspB Realtime Rev) ; *lrhA* (lrhA O157 Realtime Fwd、lrhA O157 Realtime Rev) ; *flhD* (FlhD Realtime Fwd、FlhD Realtime Rev) ; *fliA* (fliA O157 Realtime Fwd、fliA O157 Realtime Rev) ; *flgA* (flgA O157 Realtime Fwd、flgA O157 Realtime Rev) ; *flgB* (FlgB O157 Realtime Fwd、FlgB O157 Realtime Rev) ; *flhB* (flhB O157 Realtime Fwd、flhB O157 Realtime Rev) ; *fliE* (FliE O157 Realtime Fwd、FliE O157 Realtime Rev) ; *fliF* (FliF O157 Realtime Fwd、FliF O157 Realtime Rev) ; *fliC* (FliC Realtime Fwd、FliC Realtime Rev) ; *motA* (motA O157 Realtime Fwd、motA O157 Realtime Rev)

表 1 本研究で使用した菌株

Strain	Relevant genotype and property	Source
O157 株		
SKI-5142	腸管出血性大腸菌 O157:H7 Sakai Δ (<i>lacIZYA</i>)	Iyoda and Watanabe, 2005
SKI-5142 Δ <i>esr41</i>	SKI-5142 Δ <i>esr41</i>	Sudo et al., 2014
SKI-5142 Δ <i>hfq</i>	SKI-5142 Δ <i>hfq</i>	国立感染症研究所 伊豫田博士より
K-12 株		
MG1655	CGSC#6300	CGSC
MG1655 Δ <i>lacZ</i>	MG1655 Δ <i>lacZ::cat</i>	Sudo et al., 2014
TM587	W3110 <i>mlc</i> Δ <i>hfq::cat</i>	Morita et al., 2005
TM589	W3110 <i>mlc</i> Δ <i>hfq</i>	Morita et al., 2005
NS1201	MG1655 Δ <i>hfq::cat</i>	本研究
NS1202	MG1655 Δ <i>hfq</i>	本研究
NS1203	MG1655 Δ <i>hfq</i> Δ <i>lacZ::cat</i>	本研究
JW1881	BW25113 Δ <i>flhD::kan</i>	国立遺伝学研究所より分与
NS1211	MG1655 Δ <i>lacZ::cat</i> Δ <i>flhD::kan</i>	本研究
NS1212	MG1655 Δ <i>lacZ::cat</i> Δ <i>flhD</i>	本研究

表 2 本研究で使用したプラスミド

plasmid	Relevant genotype and property	Source	主な掲載図
pRS414	Amp ^r , pBR ori, <i>lacZ</i> 遺伝子を運ぶベクタープラスミド	Simons et al., 1987	
pRS415	Amp ^r , pBR ori, <i>lacZ</i> 遺伝子を運ぶベクタープラスミド	Simons et al., 1987	
pRS-Esr41	<i>esr41</i> 遺伝子を運ぶ pRS414	Sudo et al., 2014	
pRS-Esr41stmu1	<i>esr41-stmu1</i> 遺伝子を運ぶ pRS414	本研究	図 12
pRS-Esr41stmu2	<i>esr41-stmu2</i> 遺伝子を運ぶ pRS414	本研究	図 12
pRS-Esr41-28Hbm	<i>esr41-28Hbm</i> 遺伝子を運ぶ pRS414	本研究	図 13
pRS-Esr41-41Hbm	<i>esr41-41Hbm</i> 遺伝子を運ぶ pRS414	本研究	図 13
pRS-Esr41Δ6-10	<i>esr41Δ6-10</i> 遺伝子を運ぶ pRS414	本研究	図 15
pRS-Esr41Δ11-15	<i>esr41Δ11-15</i> 遺伝子を運ぶ pRS414	本研究	図 15
pRS-Esr41Δ16-20	<i>esr41Δ16-20</i> 遺伝子を運ぶ pRS414	本研究	図 15
pRS-Esr41Δ21-25	<i>esr41Δ21-25</i> 遺伝子を運ぶ pRS414	本研究	図 15
pRS-Esr41Δ26-30	<i>esr41Δ26-30</i> 遺伝子を運ぶ pRS414	本研究	図 15
pRS-Esr41Δ31-35	<i>esr41Δ31-35</i> 遺伝子を運ぶ pRS414	本研究	図 15
pRS-Esr41Δ36-41	<i>esr41Δ36-41</i> 遺伝子を運ぶ pRS414	本研究	図 15
pMW218	Km ^r , pSC101 ori ベクタープラスミド	ニッポンジーン	
pMW- <i>lacZ</i> ter	開始コドン欠く <i>lacZ</i> 断片遺伝子を運ぶ pMW218	本研究	
pMWbla- <i>lacZ</i> ter	<i>bla</i> 遺伝子のプロモーターを運ぶ pMW- <i>lacZ</i> ter	本研究	
pMW- <i>lacZ</i> ter	<i>lacZ</i> 遺伝子を運ぶ pMW218	本研究	
pMW-pchA19aa	<i>pchA'</i> - <i>lacZ</i> 遺伝子を運ぶ pMW218	本研究	図 7
pMWbla-pchA19aa	<i>P_{bla}</i> - <i>pchA'</i> - <i>lacZ</i> 遺伝子を運ぶ pMW218	本研究	図 7
pMW-ler	<i>ler'</i> - <i>lacZ</i> 遺伝子を運ぶ pMW218	本研究	図 7
pMWbla-lerd1	<i>P_{bla}</i> - <i>ler'</i> - <i>lacZ</i> 遺伝子を運ぶ pMW218	本研究	図 7
pQE80L-Hfq-His	<i>hfq-his₆</i> 遺伝子を運ぶ pQE80L	Morita et al., 2005	
pMWbla-ler short	<i>P_{bla}</i> - <i>lershort'</i> - <i>lacZ</i> 遺伝子を運ぶ pMW218	本研究	図 11

pMWbla-ler-fesr41	<i>P_{bla-ler-fesr41-lacZ}</i> 遺伝子を運ぶ pMW218	本研究	図 11
pMWbla-lerΔ149-155	<i>P_{bla-lerΔ149-155-lacZ}</i> 遺伝子を運ぶ pMW218	本研究	図 11
pTWV228	Amp ^r , pBR ori, ベクタープラスミド	タカラバイオ	
pMW219	Km ^r , pSC101 ori ベクタープラスミド	ニッポンジーン	
pTWV-flhDC	<i>flhDC</i> を運ぶ pTWV228	本研究	
pMW-flhDC full	<i>flhDC</i> を運ぶ pMW219	本研究	図 20
pMW-pflhDC-lacZ	<i>P_{flhDC-lacZ}</i> 遺伝子を運ぶ pMW218	本研究	図 21
pMW-flhDC Δ1	<i>flhDCΔ1</i> を運ぶ pMW219	本研究	図 22
pAraX	<i>araC-P_{ara}</i> を運ぶ pMW218	Otaka et al., 2011	
pTWV-flhDC3F	<i>flhDC-3×FLAG</i> (<i>flhC</i> の C 末端に 3× FLAG 配列が付加) を運ぶ pTWV228	本研究	
pAraDC3F	<i>araC</i> 遺伝子、 <i>Para-flhDC-3×FLAG</i> を 運ぶ pMW218	本研究	図 21
pBR322	Amp ^r , Tet ^r , pBR ori, を運ぶ ベクター プラスミド	Bolivar et al., 1977	
pCP20	<i>flp</i> 遺伝子(リコンビナーゼ)の発現プラ スミド	Cherepanov and Wackernagel., 1995	

表3 本研究で使用したオリゴヌクレオチド

DNA オリゴ	配列 (5'→3')
クローニング	
MfeI-pRSter4-5p	AAACAATTGAGGCGTATCACGAGGCCCTT
lacZ seq	TGCGCAACTGTTGGGAAGGG
SphI-5'-pRS	ACATGCATGCGTCGTTTTACAACGTCGTGA
HindIII-ter-3'-pRS	CCCAAGCTTGAAACAAAATGGCGCGCTACCAG GTAACGCGCCACTGATATGGTTGATGTCATGT AGCC
MfeI-5-bla	AAACAATTGTCCACAGGACGGGTGTGGTC
EcoRI-3-bla	CGGAATTCCTTTAATGCGGTAGTTTATC
pchA 5' EcoRI	CCGGAATTCCAACTGGAAGGAGCACAGGA
SphI-3-pchA19aa	ACATGCATGCTGCTCTCCGGTACAGTCCT
EcoRI-5-pchA-p2	CCCGGAATTCATTCATTAAGGGAAGGTA
EcoRI-5-ler-p4	CCGGAATTCATTTGATTAATTGTTGGTCCTTC
SallI-3'-ler	GGGGGGTTCGACGTATGGACTTGTTGTATGTG A
EcoRI-5'-ler-d1	CCCGGAATTCAAATATTAAGCATGCGGAGA
#41-Rev-stem-mu1	ATACGCTAGACGTACATGAATATATAATTA AATAGTTAG
#41-Rev-stem-mu2	GTCCCTTATGGGGATGGAGAAAATGTGATGCC TAGAG
#41-Rev-5nt	GCATCATGAATATATAATTA AAAATAG
#41-Fwd-11nt	GCATCACATTTTCTCCATGG
#41-Rev-10nt	CTAGAGCATCATGAATATATAATTA AAAATAG
#41-Fwd-16nt	ACATTTTCTCCATGGGGTATTC
#41-Rev-15nt	GATGCCTAGAGCATCATGAATA
#41-Fwd-21nt	TTCTCCATGGGGTATTCCCTC
#41-Rev-20nt	AATGTGATGCCTAGAGCATC
#41-5p-25	CATGGGGTATTCCCTCCGCC
#41-Rev-25nt	GAGAAAATGTGATGCCTAGAG
#41-Fwd-31nt	GGTATTCCCTCCGCCGGCACTA

#41-Rev-30nt	CCATGGAGAAAATGTGATGC
#41-Fwd-36nt	TCCCTCCGCCGGCACTATGTG
#41-Rev-35nt	ATACCCCATGGAGAAAATGTG
#41-Fwd-42nt	CGCCGGCACTATGTGTTGCTG
BamHI-3-SgrSmodule	CCCGCGGATCCATAAAAAAAAAACCAGCAGGTAT AATCTGCTGGCGGG
5-SgrSmodule	TATTGGTGTAATAATCACCCGCCAGCAGATTAT ACC
EcoRI-5-#41	CCCGGAATTCGCAGAGATGTTGATGGCGGAAG
3-SgrSmodule-#41-41bp	CTGGCGGGTGATTTTACACCAATAGAGGGAAT ACCCCATGGAGAAAATG
3-SgrSmodule-#41-28bp	CTGGCGGGTGATTTTACACCAATAATGGAGAA AATGTGATGCCTAGAG
ler-sall-174-3p	GGGGTCGACCATAATAAATAATCTCCGC
bla-ler 160-Rev	CTCCGCATGCTTTAATATTTGAATTC
#41-17-26 fusion ler	CATTTTCTCCATGAATATGGAAAATAATTCAC
171-Fwd	
EcoRI-5-ler-d149-155	CCCGGAATTCAAATATTACGGAGATTATTTATT ATG
EcoRI-FlhDC-Fwd	CCCGGAATTCTTCTGTGAACTTCAGGTGAC
BamHI-FlhDC-Rev	CCCGCGGATCCTCCTTCCACTGTTGACCATG
flhD-107rev-add150	TTTATGCGGTTTCACCGCATAGAATAGTTGCG ATAAGCT
flhD-150Fwd	TGCGGTGAAACCGCATAAAA
BamHI-5-flhDC-pro	CCCGCGGATCCAAGCAGAGCCACCTTTTTG
FlhC-FLAG sen	CATGATATCGACTACAAAGATGACGACGATAA ATAACTGATACGGTGTGGCGCAACATTC
FlhC-FLAG anti	ATCTTTATAATCACCGTCATGGTCTTTGTAGTC AACAGCCTGTACTCTCTGTTCATCCAGC
XbaI-Fwd-tsFlhDC	GCGCTCTAGATAGATTTAGGAAAAATCTTAGA TAAGTG
SalI-Rev-FlhDC	GGGGGGGTCGACTCCTTCCACTGTTGACCATG

定量的 PCR

16SrRNA Realtime Fwd	CGTGTTGTGAAATGTTGGGTTAAG
16SrRNA Realtime Rev	CCGCTGGCAACAAAGGATA
PchA Realtime Fwd	TGGCGGCACAGAAACGA
PchA Realtime Rev	CTTGTTTTATTTTCGGTCAGGTTAC
Ler RealTime Fwd	GGGATATACTAATGTGCCTGATGATG
Ler RealTime Rev	ACCAGGTCTGCCCTTCTTCA
EspB Realtime Fwd	CAGAAAGCGATGGCCACAA
EspB Realtime Rev	CAGAGGCTTTCGCAACATCA
lrhA O157 Realtime Fwd	CCAGGAAGTGGATTTGATGGT
lrhA O157 Realtime Rev	ACCAGTGTGTTGGCGAGGT
FlhD Realtime Fwd	GCAAGATTCCCGCGTTGA
FlhD Realtime Rev	TCATTCAGCAAGCGTGTTGAG
fliA O157 Realtime Fwd	GGCGCTATGCTGGATGAA
fliA O157 Realtime Rev	TCAGTTTCCGTGGCGTTG
flgA O157 Realtime Fwd	AACTTGTTGATGCCGTTAGCC
flgA O157 Realtime Rev	CGTTGTCCCGCTTTTACCC
FlgB O157 Realtime Fwd	ACGCCGCCTTACGTTTTC
FlgB O157 Realtime Rev	AACCAGGGGTATCGGCATT
flhB O157 Realtime Fwd	TGCGATGGATTTGGTAGGG
flhB O157 Realtime Rev	CAGGTGGCTGAAGATTTGGA
FliE O157 Realtime Fwd	GCGATACAGGGGATTGAAGG
FliE O157 Realtime Rev	GGCAAACTAATGGTCGGTTG
FliF O157 Realtime Fwd	AATCCTGTCGCCTATTGTTGGTA
FliF O157 Realtime Rev	CGATACTGTTCTTCCGTTTGTCTT
FliC Realtime Fwd	CCGCGGGTAAAATCACTACTG
FliC Realtime Rev	TTGTGATGGAGCTGATTGC
motA O157 Realtime Fwd	GCCTATCGCCGTTGAGTTTG
motA O157 Realtime Rev	TCCTCGGTTGTCGTCTGTTG

in vitro 転写

ler extension-p1	TCCTGCTCTCGCAGTCGCTTTGC
------------------	-------------------------

ler-T7f-2	CGCTAATACGACTCACTATAGGGCTTAAAATA TTAAAGCATGCGG
#41 T7-5'p-2	GCTAATACGACTCACTATAGGATGCTCTAGGC ATCACATTTTC
#41 polyU-r	ATAAAAAACGCCAGCAACACATAG-
#41T7-3'p	AAAACGCCAGCAACACATAGTG
ler annealing T7f	CGCTAATACGACTCACTATAGGCCGCATGCTT TAATATTTTAAGCATGGGGTATTCCCTCC-3'
ler annealing r	AAAACGCCAGCAACACATAGTGCCGGCGGAG GGAATACCCCATGC'
#41 del6-10 T7-5'p	GCTAATACGACTCACTATAGGATGCGCATCAC ATTTTCTCCATGG
#41 del11-15 T7-5'p	GCTAATACGACTCACTATAGGATGCTCTAGAC ATTTTCTCCATGG
#41 del16-20 T7-5'p	GCTAATACGACTCACTATAGGATGCTCTAGGC ATCTTCTCCATGG
#41 del21-25 T7-5'p	GCTAATACGACTCACTATAGGATGCTCTAGGC ATCACATTCATGG
プローブ	
#41-stem1 probe1	ATGGAGAAAATGTGATGCCTAGAGCATC
Oligo-41	TAGTGCCGGCGGAGGGAATACCCCATGGAG
#41 ter probe1	AAAAAACGCCAGCAACACATAGTGCCGGCG
5S rRNA probe1	GCGCTACGGCGTTTCACTTCTGAGTTCGGCATG GGGTCAGGTGGG

ler

1 TTTTTTTG^{-35 (P1)}TTGACA^{-10 (P1)}TTTAATGATAATGTATTTTACACA^{転写開始点 (P1)}TTAGAAAAAAGAGAATAATAACATTTTAAGGT

71 GGTGTTTATGATGAAATAGATGTGTCTAATTTGATAGATAAACGTTATCTCACATAATTTATATCA^{-35 (P2)}TTTGG

141 ^{-35 (P2)}ATTAATTGTTGGTCTTCTCTGAT^{-10 (P2)}TAAGGTCGCTAATAGCTTAAAAATATTAAGCATGCC^{SD}GGAGATTATTTAT

211 ^{開始コドン}TATGAATATGGAAAATAATTCACATACAACAAGTCCATACATTCAGCTTATAGAGCAAATTGCAGTCTCA

281 CAGCAGGAAGCAAAGCGACTGCGAGAGCAGGAAGTTCAAAGTGAATTGAGTCGATTCAGAAGCAGATTA

351 CTTATTACAATATAACCTTACAAGAGCTGGGATATACTAATGTGCCTGATGATGGACTCGCTCGCCGGAA

421 CTCATCGAAAGGTGTTTACTACCGCAATGAAGAAGGGCAGACCTGGTCGGGCGTAGGCCGACAGCCACGC

491 TGGCTTAAAGAAGCACTGTTGAATGGAATGAAGAAAGAAGATTTTCTTGTGAAGGACACTGAAGAAGAAA

561 TAATACCGCTGAAAAATATTTAA^{終止コドン} ler136 ——— *ler'-lacZ* *Pbla-ler'-lacZ*

pchA

1 ATGCAGAAGCAACTGGAAGGAGCACAGGAATATATCCGTACCCAGTGTATACCGTGATGTTTTGTTATGA

71 GGGTGTTACTGGTAACGTTAAGGTAATTTAACAAAGAGTCAGTTCCGGACTTTATAGTGTGCTCAGTTCA

141 TGGCCAAAACGATTTCTGTGATAAATATTTTGAATATTATTTACAGGTAAATGGAGTGGGGCACATGGA

211 TAGAAATATTACAATAGAGAATGAAGTATATGCCCGTATTGTATGGGCAGAGAAGGCAAAAACACGGTAA

281 TTCCGTGTGTTGCCATGATACCTGATTGGCAGAATAGTTGTTTGGTTTTGAGTATATAGTCAGCGTTTTT

351 TGTTCAGTAATTGCTCCCTCAAAAAATAATAAAATAAGGTGATTATTTTTGTTTTATTATTTAGTTTTTTTT

421 TGTGTGTTGTTTTAT⁻³⁵TGTTTT⁻¹⁰TGCGTGGTTTTGTTTTTTATTGTTATTTCA^{転写開始点}TAAAGGAAGGTAATTCAG

491 ^{SD}GATGGCAGTCTGTAGATAATCGGAGGTCACCTAT^{開始コドン}GTCTACATGATCACGTGGCAGAATGCTCTGGAGAAAAA

561 AGGACTGTACCGGAGAGCAGCTGAACGATGGGCAAAAGTGATGGTACAGCTAAGTGATGACCAGAAAAAGA

———— *pchA'-lacZ* *Pbla-pchA'-lacZ*

参考図1 *ler*、及び*pchA*の配列

ler、及び*pchA*の配列と各コンストラクトで用いた領域を示す。
 プロモーターと転写開始点、開始コドンは下記の論文を参考にした。SDは予想である。
ler (Sharp and Sperandio, 2007; Islam et al., 2011)
pchA (Honda et al., 2009)

flhDC



参考図2 *flhDC*の配列

*flhDC*の配列と各コンストラクトで用いた領域を示す。pMW-*flhDC* fullはここに示す全配列を運ぶ。またpMW-*flhDC*Δ1は、ここに示す全配列のうち網かけ文字以外の配列を運ぶ。プロモーターと転写開始点、開始コドンはBarker et al., 2004を参考にした。SDは予想である。

参考文献

- Abe H, Aiba H. 1996. Differential contributions of two elements of *rho*-independent terminator to transcription termination and mRNA stabilization. *Biochimie* **78**: 1035–1042.
- Abe H, Tatsuno I, Tobe T, Okutani A, Sasakawa C. 2002. Bicarbonate Ion Stimulates the Expression of Locus of Enterocyte Effacement-Encoded Genes in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **70**: 3500-3509.
- Aiba H. 2007. Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Curr Opin Microbiol* **10**: 134-139.
- Aiba H, Hanamura A, Yamano H. 1991. Transcriptional terminator is a positive regulatory element in the expression of the *Escherichia coli* *crp* gene. *J Biol Chem* **266**: 1721–1727.
- Akerley BJ, Cotter PA, Miller JF. 1995. Ectopic expression of the flagellar regulon alters development of the *Bordetella*-host interaction. *Cell* **80**:611–620.
- Asadulghani M, Ogura Y, Ooka T, Itoh T, Sawaguchi A, Iguchi A, Nakayama K, Hayashi T. 2009. The defective prophage pool of *Escherichia coli* O157: prophage-prophage interactions potentiate horizontal transfer of virulence determinants. *PLoS Pathog* **5**: e1000408.
- Baker CS, Eory LA, Yakhnin H, Mercante J, Romeo T, Babitzke P. 2007. CsrA inhibits translation initiation of *Escherichia coli* *hfq* by binding to a single site overlapping the Shine-Dalgarno sequence. *J Bacteriol* **189**: 5472-5481.
- Balbontín R, Fiorini F, Figueroa-Bossi N, Casadesús J, Bossi L. 2010. Recognition of heptameric seed sequence underlies multi-target regulation by RybB small RNA in *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol* **78**: 380-394.
- Barker CS, Pruss BM, Matsumura P. 2004. Increased motility of *Escherichia coli* by insertion sequence element integration into the regulatory region of the *flhD* operon. *J Bacteriol* **186**: 7529–7537.
- Beisel CL, Storz G. 2011. The Base-Pairing RNA Spot42 Participates in a Multioutput Feedforward Loop to Help Enact Catabolite Repression in *Escherichia coli*. *Mol Cell* **41**: 286-297.
- Bhatt S, Edwards AN, Nguyen HT, Merlin D, Romeo T, Kalman D. 2009. The RNA binding protein CsrA is a pleiotropic regulator of the locus of enterocyte

- effacement pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **77**: 3552-3568.
- Bleves S, Marenne MN, Detry G, Cornelis GR. 2002. Up-regulation of the *Yersinia enterocolitica* Yop regulon by deletion of the flagellum master operon *flhDC*. *J Bacteriol* **184**: 3214–3223.
- Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW, Crosa JH, Falkow S. 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**: 95-113.
- Brescia CC, Mikulecky PJ, Feig AL, Sledjeski DD. 2003. Identification of the Hfq-binding site on DsrA RNA: Hfq binds without altering DsrA secondary structure. *RNA* **9**: 33-43.
- Cherepanov PP, Wackernagel W. 1995. Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* **26**: 9-14.
- Datsenko KA, Wanner BL. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 6640-6645.
- De Lay N, Gottesman S. 2012. A complex network of small non-coding RNAs regulate motility in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **86**: 524-538.
- Eichelberg K, Galan JE. 2000. The flagellar sigma factor FliA (σ_{28}) regulates the expression of *Salmonella* genes associated with the centisome 63 type III secretion system. *Infect Immun* **68**: 2735–2743.
- Elliott SJ, Wainwright LA, McDaniel TK, Jarvis KG, Deng YK, Lai LS, McNamara BP, Sonnenberg MS, Kaper JB. 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* **28**: 1–4.
- Frankel G, Phillips AD, Rosenshine I, Dougan G, Kaper JB, Knutton S. 1998. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol* **30**: 911–921.
- Elliott SJ, Sperandio V, Girón JA, Shin S, Mellies JL, Wainwright LA, Hutcheson SW, McDaniel TK, Kaper JB. 2000. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler) controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic

- Escherichia coli*. *Infect Immun* **68**: 6115–6126.
- Geissmann TA, Touati D. 2004. Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. *EMBO J* **23**: 396-405
- Girón JA, Torres AG, Freer E, Kaper JB. 2002. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol Microbiol* **44**: 361–379.
- Gottesman S. 2004. The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms. *Annu Rev Microbiol* **58**: 303–328.
- Hao Y, Zhang ZJ, Erickson DW, Huang M, Huang Y, Li J, Hwa T, Shi H. 2011. Quantifying the sequence-function relation in gene silencing by bacterial small RNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 12473-12478.
- Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Eugene CY, Goodlett DR, Eng JK, Akira S, Underhill DM, Aderem A. 2001a. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* **410**: 1099–1103.
- Hayashi T, Makino K, Ohnishi M, Kurokawa K, Ishii K, Yokoyama K, Han CG, Ohtsubo E, Nakayama K, Murata T, Tanaka M, Tobe T, Iida T, Takami H, Honda T, Sasakawa C, Ogasawara N, Yasunaga T, Kuhara S, Shiba T, Hattori M, Shinagawa H. 2001b. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res* **8**: 11–22.
- Honda N, Iyoda S, Yamamoto S, Terajima J, Watanabe H. 2009. LrhA positively controls the expression of the locus of enterocyte effacement genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* by differential regulation of their master regulators PchA and PchB. *Mol Microbiol* **74**: 1393-1341.
- Horne SM, Prüss BM. 2006. Global gene regulation in *Yersinia enterocolitica*: effect of FliA on the expression levels of flagellar and plasmid- encoded virulence genes. *Arch Microbiol* **185**: 115–126.
- Huang HY, Chang HY, Chou CH, Tseng CP, Ho SY, Yang CD, Ju YW, Huang HD. 2009. sRNAMap: genomic maps for small non-coding RNAs, their regulators and their targets in microbial genomes. *Nucleic Acids Res* **37**: D150-154.
- Ishikawa H, Otaka H, Maki K, Morita T, Aiba H. 2012. The functional Hfq-binding module of bacterial sRNAs consists of a double or single hairpin preceded by a U-rich sequence and followed by a 3' poly(U) tail. *RNA* **18**: 1062-1074.

- Islam MS, Bingle LE, Pallen MJ, Busby SJ. 2011. Organization of the LEE1 operon regulatory region of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and activation by GrlA. *Mol Microbiol* **79**: 468-483.
- Iyoda S, Kamidoi T, Hirose K, Kutsukake K, Watanabe H. 2001. Aflagellar gene *fliZ* regulates the expression of invasion genes and virulence phenotype in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microb Pathog* **30**: 81-90.
- Iyoda S, Koizumi N, Satou H, Lu Y, Saitoh T, Ohnishi M, Watanabe H. 2006. The GrlR-GrlA regulatory system coordinately controls the expression of flagellar and LEE-encoded type III protein secretion systems in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**: 5682-5692.
- Iyoda S, Watanabe H. 2004. Positive effects of multiple *pch* genes on expression of the locus of enterocyte effacement genes and adherence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 to HEp-2 cells. *Microbiology* **150**: 2357-2571.
- . 2005. ClpXP protease controls expression of the type III protein secretion system through regulation of RpoS and GrlR levels in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**: 4086-4094.
- Jorgensen MG, Thomason MK, Havelund J, Valentin-Hansen P, Storz G. 2013. Dual function of the McaS small RNA in controlling biofilm formation. *Genes Dev* **27**: 1132-1145.
- Kawamoto H, Koide Y, Morita T, Aiba H. 2006. Base-pairing requirement for RNA silencing by a bacterial small RNA and acceleration of duplex formation by Hfq. *Mol Microbiol* **61**: 1013-1022.
- Kawano M, Reynolds AA, Miranda-Rios J, Storz G. 2005. Detection of 5'- and 3'-UTR-derived small RNAs and cis-encoded antisense RNAs in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **33**: 1040-1050.
- Kusumoto M, Ooka T, Nishiya Y, Ogura Y, Saito T, Sekine Y, Iwata T, Akiba M, Hayashi T. 2011. Insertion sequence-excision enhancer removes transposable elements from bacterial genomes and induces various genomic deletions. *Nat Commun* **2** :152-.
- Lease RA, Cusick ME, Belfort M. 1998. Riboregulation in *Escherichia coli*: DsrA RNA acts by RNA:RNA interactions at multiple loci. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12456-12461.
- Lehnen D, Blumer C, Polen T, Wackwitz B, Wendisch VF, Umden G. 2002. LrhA as a

- new transcriptional key regulator of flagella, motility and chemotaxis genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **45**: 521–532.
- Lucas RL, Lostroh CP, DiRusso CC, Spector MP, Wanner BL, Lee CA. 2000. Multiple factors independently regulate *hilA* and invasion gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **182**: 1872–1882.
- Lucchetti-Miganeh C, Burrowes E, Baysse C, Ermel G. 2008. The post-transcriptional regulator CsrA plays a central role in the adaptation of bacterial pathogens to different stages of infection in animal hosts. *Microbiology* **154**: 16-29.
- Majdalani N, Cuning C, Sledjeski D, Elliott T, Gottesman S. 1998. DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 12462-12467.
- Mellies JL, Elliott SJ, Sperandio V, Donnenberg MS, Kaper JB. 1999. The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli* : identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol Microbiol* **33**: 296-306.
- Møller T, Franch T, Højrup P, Keene DR, Bächinger HP, Brennan RG, Valentin-Hansen P. 2002a. Hfq: a bacterial Sm-like protein that mediates RNA-RNA interaction. *Mol cell* **9**: 23-30
- Møller T, Franch T, Udesen C, Gerdes K, Valentin-Hansen P. 2002b. Spot42 RNA mediates discoordinate expression of the *E.coli* galactose operon. *Genes Dev* **16**: 1696-1706.
- Morita T, Maki K, Aiba H. 2005. RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev* **19**: 2176-2186.
- Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**: 142–201.
- Otaka H, Ishikawa H, Morita T, Aiba H. 2011. PolyU tail of *rho*-independent terminator of bacterial small RNAs is essential for Hfq action. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 13059–13064.
- Papenfert K, Vogel J. 2010. Regulatory RNA in bacterial pathogens. *Cell Host Microbe* **8**: 116-127.
- . 2011. Sweet business: Spot42 RNA networks with CRP to modulate catabolite

- repression. *Mol Cell* **41**: 245-246.
- Peterson CN, Carabetta VJ, Chowdhury T, Silhavy TJ. 2006. LrhA regulates *rpoS* translation in response to the Rcs phosphorelay system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**: 3175-3181.
- Salgado H, Peralta-Gil M, Gama-Castro S, Santos-Zavaleta A, Muñiz-Rascado L, García-Sotelo JS, Weiss V, Solano-Lira H, Martínez-Flores I, Medina-Rivera A, Salgado-Osorio G, Alquicira-Hernández S, Alquicira-Hernández K, López-Fuentes A, Porrón-Sotelo L, Huerta AM, Bonavides-Martínez C, Balderas-Martínez YI, Pannier L, Olvera M, Labastida A, Jiménez-Jacinto V, Vega-Alvarado L, Del Moral-Chávez V, Hernández-Alvarez A, Morett E, Collado-Vides J. 2013. RegulonDB v8.0: omics data sets, evolutionary conservation, regulatory phrases, cross-validated gold standards and more. *Nucleic Acids Res* **41**: D203-213.
- Sauer E, Weichenrieder O. 2011. Structural basis for RNA 30-end recognition by Hfq. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 13065–13070.
- Schumacher MA, Pearson RF, Møller T, Valentin-Hansen P, Brennan RG. 2002. Structures of the pleiotropic translational regulator Hfq and an Hfq-RNA complex: a bacterial Sm-like protein. *EMBO J* **21**: 3546-3556
- Sharma CM, Vogel J. 2009. Experimental approaches for the discovery and characterization of regulatory small RNA. *Curr Opin Microbiol* **12**: 536-546.
- Sharp FC, Sperandio V. 2007. QseA directly activates transcription of LEE1 in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **75**: 2432-2440.
- Simons RW, Houman F, Kleckner N. 1987. Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**: 85–96
- Sittka A, Lucchini S, Papenfort K, Sharma CM, Rolle K, Binnewies TT, Hinton JC, Vogel J. 2008. Deep sequencing analysis of small noncoding RNA and mRNA targets of the global post-transcriptional regulator, Hfq. *PLoS Genet* **4**: e1000163.
- Soper TJ, Doxzen K, Woodson SA. 2011. Major role for mRNA binding and restructuring in sRNA recruitment by Hfq. *RNA* **17**: 1544-1550.
- Soper TJ, Woodson SA. 2008. The *rpoS* mRNA leader recruits Hfq to facilitate annealing with DsrA sRNA. *RNA* **14**: 1907-1917.
- Storz G, Opdyke JA, Zhang A. 2004. Controlling mRNA stability and translation with

- small, noncoding RNAs. *Curr Opin Microbiol* **7**: 140-144.
- Sudo N, Soma A, Muto A, Iyoda S, Suh M, Kurihara N, Abe H, Tobe T, Ogura Y, Hayashi T, Kurokawa K, Ohnishi M, Sekine Y. 2014. A novel small regulatory RNA enhances cell motility in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Gen Appl Microbiol* in press
- Thomason MK, Fontaine F, De Lay N, Storz G. 2012. A small RNA that regulates motility and biofilm formation in response to changes in nutrient availability in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **84**: 17-35.
- Timmermans J, Van Melderen L. 2010. Post-transcriptional global regulation by CsrA in bacteria. *Cell Mol Life Sci* **67**: 2897-2908.
- Tobe T, Beatson SA, Taniguchi H, Abe H, Bailey CM, Fivian A, Younis R, Matthews S, Marches O, Frankel G, Hayashi T, Pallen MJ. 2006. An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**: 14941-14946.
- Vecerek B, Beich-Frandsen M, Resch A, Blasi U. 2010. Translational activation of *rpoS* mRNA by the non-coding RNA DsrA and Hfq does not require ribosome binding. *Nucleic Acids Res* **38**: 1284-1293.
- Vogel J. 2009. A rough guide to the non-coding RNA world of *Salmonella*. *Mol Microbiol* **71**: 1-11.
- Vogel J, Luisi BF. 2011. Hfq and its constellation of RNA. *Nat Rev Microbiol* **9**: 578-589.
- Wassarman KM. 2002. Small RNAs in bacteria: diverse regulators of gene expression in response to environmental changes. *Cell* **109**: 141-144.
- Waters LS, Storz G. 2009. Regulatory RNAs in bacteria. *Cell* **136**: 615-628.
- Wei BL, Brun-Zinkernagel AM, Simecka JW, Prüß BM, Babitzke P, Romeo T. 2001. Positive regulation of motility and *flhDC* expression by the RNA-binding protein CsrA of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **40**: 245-256.
- Yakhnin AV, Baker CS, Vakulskas CA, Yakhnin H, Berezin I, Romeo T, Babitzke P. 2013. CsrA activates *flhDC* expression by protecting *flhDC* mRNA from RNase E-mediated cleavage. *Mol Microbiol* **87**: 851-866.
- Zhang A, Wassarman KM, Ortega J, Steven AC, Storz G. 2002. The Sm-like Hfq protein increases OxyS RNA interaction with target mRNAs. *Mol Cell* **9**: 11-22.
- Zhang A, Wassarman KM, Rosenow C, Tjaden BC, Storz G, Gottesman S. 2003.

- Global analysis of small RNA and mRNA targets of Hfq. *Mol Microbiol* **50**: 1111-1124.
- Zhou X, Girón JA, Torres AG, Crawford JA, Negrete E, Vogel SN, Kaper JB. 2003. Flagellin of enteropathogenic *Escherichia coli* stimulates interleukin-8 production in T84 cells. *Infect Immun* **71**: 2120–2129.
- Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* **31**: 3406-3415.

謝辞

本博士論文の提出に至るような能力を獲得できたのはひとえに関根靖彦 教授の科学に対して妥協のない熱心な指導のおかげであり、その姿勢を尊敬し、真に感謝致します。

本研究の基礎を築き、また指導者として、共同研究者として本研究の遂行を全面的に支援して頂いた千葉大学園芸学部 相馬亜希子 助教に心から感謝致します。

本研究における腸管出血性大腸菌を用いた実験の施設の提供、指導、及び解析をして頂き、また腸管出血性大腸菌研究の視点のもと本研究への多大な助言をして頂いた国立感染症研究所 伊豫田淳 主任研究官に深く感謝致します。

本研究に用いた菌株とプラスミドの提供、実験手法、及び small RNA 研究の基礎を指導して頂いた鈴鹿医療科学大学薬学部 饗場弘二 教授、森田 鉄兵 助手に感謝致します。

修士の1年半と本年度の1年、研究室で過ごし適切なアドバイスを頂いた小田原真樹 助教に感謝致します。O157 株の small RNA 研究を共に考え、議論しながら進めた関根研究室 齊藤泰一さん、新谷育子さん、満仲翔一さん、齋藤健太さん、小野田千鶴さんに感謝致します。1年間ではありますが、共に研究室で過ごし、研究、学位の取得に向け切磋琢磨した鈴木祥太さんに感謝致します。同時期に関根研究室に在籍し、研究をしてき先輩、同期、後輩の方々に感謝します。

最後に、私の生活を支え研究に専念させてくれた家族に感謝致します。