

立教大学学術推進特別重点資金（立教 S F R）
 大学院生研究
 2012年度研究成果報告書

研究科名	立教大学大学院	理学研究科	生命理学専攻
研究代表者	在籍研究科・専攻・学年	氏名	
	理学研究科・生命理学専攻・ 博士後期課程3年	須藤 直樹 印	
指導教員	所属・職名	氏名	
	理学部・教授	関根 靖彦 印	
自然・人文・ 社会の別	自然	個人・共同の別	個人
研究課題名	腸管出血性大腸菌 O157 株に存在する新規 non-coding RNA の機能解析		
研究組織	在籍研究科・専攻・学年	氏名	
研究期間	2012年度		
研究経費	426,784	千円（実績額又は執行額）	

研究の概要 (200~300字で記入、図・グラフ等は使用しないこと。)

腸管出血性大腸菌 O157:H7 Sakai 株（以下、O157 株と記す）はヒトに感染し、重症例を伴った感染症を引き起こすことが知られているが、その病原性発現制御機構の詳細は未解明である。そこで O157 株の包括的な病原性発現制御機構の解明を目的として、non-coding RNA（以下、ncRNA と記す）の作用に着目した以下の3つの解析を行った。

- (1) #41 のより詳細な作用機構の解明、#41 遺伝子の発現制御に関与する因子の同定
- (2) #29 の標的遺伝子の同定、及び作用機構の解明
- (3) 志賀毒素保持ファージの溶原化維持、溶菌における#29 の役割

キーワード（研究内容をよく表しているものを3項目以内で記入。）

[腸管出血性大腸菌]

[non-coding RNA]

[志賀毒素保持ファージ]

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

これまで申請者が所属する研究室では、O157 株に存在し、病原性に関与する可能性がある ncRNA の同定を行った結果、2 種の新規 ncRNA、#41 ncRNA (以下、#41 と記す) と #29 ncRNA (以下、#29 と記す) を見出した。#41、及び #29 の機能解析の結果、この 2 つの ncRNA は病原性関連遺伝子の発現制御に関与することが示唆されたため、申請者は #41、及び #29 が直接制御する標的遺伝子の同定と、その制御機構の解明に取り組んだ。その結果、#41 の標的は、病原性発現を制御する転写因子 *ler*、及びべん毛形成を制御する転写因子 *flhDC* であること、その制御機構が RNA 結合タンパク質 Hfq に依存した翻訳制御であることが示唆された。同様に #29 についても解析した結果、#29 の標的は *flhDC* であることが示唆された。#29 は溶原化した志賀毒素保持ファージ上にコードされている。興味深いことに、#29 が、その上流に位置する *cI* 遺伝子と共転写されることを示した。*cI* はバクテリア染色体上に溶原化している λ プロファージの溶菌を抑制する λ リプレッサーをコードするため、#29 は志賀毒素保持ファージの溶原化の維持や誘発、及び溶菌に関与する可能性がある。

(1) #41 のより詳細な作用機構の解明、#41 遺伝子の発現制御に関与する因子の同定

1) #41 と *ler* mRNA 間の塩基対形成領域の同定

これまでの解析から、#41 は *ler* mRNA を標的とし、その翻訳を抑制すること、その作用機構は標的 mRNA との塩基対形成を介した翻訳制御であることが示唆された。そこで、#41 と *ler* mRNA 間の塩基対形成領域の同定を目的として、*ler* mRNA の 5' 非翻訳領域に欠失変異を導入した欠失変異型 *ler-lacZ* の発現に対する #41 の効果を解析した。欠失変異型 *ler-lacZ* として、2 つある *ler* の転写開始点のうち上流側の転写開始点を +1 としたとき (*ler* mRNA の開始コドン は +171)、*ler* mRNA の +149 から +155 を欠失させた *ler*(Δ +149-155)-*lacZ* では、#41 による *ler* 抑制効果は失われた。このことから、*ler* mRNA の +149 から +155 の領域が、#41 による *ler* 抑制効果に必要な領域であることが示唆された。次に、#41 (推定長 74 nt) の転写開始点を +1 としたとき、+6 から +41 までの連続する 5~6 塩基を欠損させた欠失変異型 #41 シリーズを構築し、*ler-lacZ* の発現における欠失変異型 #41 の効果を解析した。その結果、#41(Δ +6-10)、#41(Δ +16-20)、#41(Δ +21-25)、#41(Δ +36-41) では、野生型 #41 と同程度の *ler* 抑制効果が見られた。このことは、欠失を導入したこれら 4 つの領域が *ler* 抑制効果に必要なことを示す。一方、#41(Δ +11-15)、#41(Δ +26-30)、#41(Δ +31-35) では、*ler* 抑制効果が失われた。また、欠失変異型 #41 の RNA 量を解析した結果、*ler* 抑制効果が失われた 3 つの欠失変異型 #41 では、RNA が著しく減少した。この結果は、#41 の +11 から +15、+26 から +35 領域が #41 の安定性に重要であることを示し、これらの欠失変異型 #41 の存在量が少ないために *ler* 抑制効果が失われたことが示唆される。ただし、#41 の +11 から +15、+26 から +35 領域に、*ler* mRNA と塩基対形成する領域が含まれる可能性は排除されない。

2) #41 によるべん毛遺伝子群の発現促進における #41 の標的遺伝子の同定

これまでの解析から、#41 はべん毛遺伝子群の最上流転写因子 *flhDC* の翻訳を促進することを予想してきた。この予想は、① #41 を過剰発現させた株では、べん毛遺伝子群全体の発現量が上昇する、② #41 の過剰発現により *flhD-lacZ* の発現量が増加する、③ *flhDC* mRNA には自身の SD 配列をマスクするような二次構造を形成し得る塩基配列が存在し、その二次構造を崩す位置で #41 が結合し得る塩基配列が存在する、という結果に基づく。このうちの③を実験的に検証するため、*flhDC* mRNA の 5' 非翻訳領域に存在する予想二次構造形成領域、及び予想 #41 結合領域を欠失させた欠失変異型 *flhDC* を構築し、#41 の発現による FlhD タンパク質量の変動を解析した。その結果、予想に反して欠失変異型 *flhDC* においても、野生型 *flhDC* と同程度の #41 による FlhD タンパク質量の増加が見られた。このことは、#41 の直接の標的は *flhDC* ではなく、*flhDC* の発現を制御する何らかの因子であることを示唆する。

研究成果の概要 つづき

3)#41 遺伝子の発現制御に関与する因子の同定

#41 の発現制御機構を明らかにする目的で、#41 の発現を制御する因子の同定を試みた。具体的には、O157 ゲノムライブラリーをプラスミドに構築し、このプラスミドで、#41 のターミネーターを削りレポーターとして *lacZ* 遺伝子を結合させた #41-*lacZ* を染色体上に保持する K12 株を形質転換した。この形質転換体の LacZ 活性を指標に、#41 の発現を促進、もしくは抑制する因子をスクリーニングした。スクリーニングの結果、#41-*lacZ* の発現が変動する 144 個の遺伝子を同定した。この遺伝子の中に #41 の発現を制御する遺伝子が存在すると考えられる。

(2) #29 の標的遺伝子の同定、及び作用機構の解明

これまでの研究で、#29 はべん毛の形成を抑制することが示されている。#29 過剰発現時には、べん毛遺伝子群クラス II とその下流のクラス III の発現が抑制されることから、#29 の標的はべん毛遺伝子群クラス II の転写を制御する *flhDC* であることが示唆されている。しかし、その作用機構は #41 と異なる可能性があったため、#29 発現時における FlhD タンパク質量を解析した。その結果、#29 の発現による FlhD タンパク質量の変動は見られなかった。このことから、#29 は *flhDC* の発現制御には関与せず、FlhDC タンパク質の転写因子としての活性を阻害することが示唆された。

(3) 志賀毒素保持ファージの溶原化維持、溶菌における #29 の役割

#29 は溶原化した志賀毒素保持ファージ上にコードされている。興味深いことに、#29 が、その上流に位置する *cI* 遺伝子と共転写される。*cI* はバクテリア染色体上に溶原化している λ プロファージの溶菌を抑制する λ リプレッサーをコードするため、#29 は志賀毒素保持ファージの溶原化の維持や誘発、及び溶菌に関与する可能性を考えた。これらの可能性を検証するため、O157 株から志賀毒素保持ファージを単離し、K12 株に溶原化させた溶原菌を得た。この志賀毒素保持ファージ溶原菌は、DNA 損傷剤を添加することで溶菌を誘導することができた。このことから、志賀毒素保持ファージは、ファージとしての機能を保持することが示された。次に *cI*-#29 を発現するプラスミドを保持させた溶原菌を用いて、染色体上の *cI*-#29 の欠損を試みたが、*cI*-#29 欠損株を得ることができなかった。この結果は、欠損させようとした *cI*-#29 領域中に *cI* 以外の溶原化を維持する要因があることを示唆する。

※この(様式2)に記入の成果の公表を見合わせる必要がある場合は、その理由及び差し控え期間等を記入した調書(A4縦型横書き1枚・自由様式)を添付すること。

(様式3)

研究発表 (研究によって得られた研究経過・成果を発表した①～④について、該当するものを記入してください。該当するものが多い場合は主要なものを抜粋してください。)

- ①雑誌論文 (著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年、ページ)
- ②図書 (著者名、出版社、書名、発行年、総ページ数)
- ③シンポジウム・公開講演会等の開催 (会名、開催日、開催場所)
- ④その他 (学会発表、研究報告書の印刷等)

第9回21世紀大腸菌研究会 (2012年6月) 口頭発表

発表タイトル「病原性大腸菌 O157:H7 Sakai 株に存在する non-coding RNA #41 の機能解析」

○須藤直樹、相馬亜希子、伊豫田淳、齊藤泰一、大島拓、戸邊亨、関根靖彦。

第14回日本RNA学会 (2012年7月) ポスター発表

発表タイトル「病原性大腸菌 O157:H7 Sakai 株に存在する non-coding RNA #41 の機能解析」

○須藤直樹、相馬亜希子、伊豫田淳、齊藤泰一、大島拓、戸邊亨、関根靖彦。

第6回ゲノム微生物学会若手の会 (2012年9月) 口頭発表

発表タイトル「病原性大腸菌 O157:H7 Sakai 株に存在する non-coding RNA #41 の機能解析」

○須藤直樹、相馬亜希子、伊豫田淳、齊藤泰一、大島拓、武藤あきら、戸邊亨、小椋義俊、林哲也、関根靖彦。

第35回日本分子生物学会年会 (2012年12月) ポスター発表

発表タイトル「病原性大腸菌 O157:H7 Sakai 株に存在する non-coding RNA #41 の機能解析」

○須藤直樹、相馬亜希子、伊豫田淳、齊藤泰一、大島拓、武藤あきら、戸邊亨、小椋義俊、林哲也、関根靖彦。