

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

2014 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 (2015年3月現在のものを記入)	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1年	満仲 翔一	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	腸管出血性大腸菌 O157 株に存在する non-coding RNA#29 の機能解析		
研究組織 (2015年3月現在のものを記入)	在籍研究科・専攻・学年	氏名	
研究期間	2014 年度		
研究経費	(支出金額)	327,545 円 / (採択金額)	500,000 円

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) のゲノム中に志賀毒素保持プロファージ、Sakai prophage 5 (以下、Sp5 と記す) が存在する。そのプロファージの溶原化を維持する cI 遺伝子の下流に位置し、共転写される non-coding RNA (ncRNA) #29 が当研究室により見いだされた。#29 は溶原化を維持する cI 遺伝子と共転写されることから、#29 も Sp5 の溶原化維持に寄与すると予想される。また、Sp5 の溶菌サイクルへの移行は志賀毒素の放出につながるため、#29 も病原性発揮に関与する可能性が考えられる。これらのことから、#29 の作用機構及び生理学的意義を知るために解析した研究を行った。

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。)

[non-coding RNA] [志賀毒素保持ファージ] [ベン毛遺伝子群]

研究成果の概要 (図・グラフ等は使用しないこと。)

成果の概要

(1) #29 の作用機構の解明

これまでの研究から、#29 は上流に ORF をつなげた形で過剰発現させると、べん毛遺伝子群のクラス 2 以降の遺伝子の mRNA 量が減少し、それに伴い遊走性も減少することが明らかになっている。このことから#29 の標的遺伝子は、べん毛遺伝子群のクラス 1 でありマスターレギュレーターをコードする *flhDC* またはクラス 2 に属する遺伝子であると予想し解析を行ったが、予想を支持する結果は得られなかった。多くの ncRNA は標的遺伝子の mRNA と塩基対形成し、翻訳を阻害することにより遺伝子発現を調節する。この機構において RNA シャペロンである Hfq が重要な役割を担っており、Hfq が欠失するとこの機構による遺伝子発現調節は起きなくなり、また Hfq 依存的に機能する ncRNA は安定性が低下する。#29 がこの機構によりべん毛遺伝子群の発現を抑制しているかを確かめるために、*hfq* 欠失株で#29 を発現させた。その結果、野生株と同様に遊走性が低下し、また#29 の安定性においても野生株と同程度だった。このことから、#29 は Hfq が関与しない作用機構によりべん毛遺伝子群を抑制していることが示された。

次に、#29 は転写因子である FlhD₄C₂ の転写促進活性を阻害することによりべん毛遺伝子群の発現を抑制していると予想し、#29 と FlhD₄C₂ が相互作用するかどうかを解析した。解析方法は FlhC の C 末端側に 3xFLAG 付加し、FLAG に特異的に結合する抗体を用いて免疫沈降を行い、#29 が FlhC-3xFLAG と共沈降するかどうかを解析した。その結果、#29 は FlhC と共沈降することが示された。これは#29 の標的が FlhD₄C₂ であることを示唆する。しかしながら、本来の *cI*-#29 の形での解析ではないため、本来の形で解析する必要がある。また、#29 は FlhD₄C₂ 以外と相互作用するかどうかを解析し、#29 は FlhD₄C₂ と特異的に作用するかを調べる必要がある。

(2) Sp5 の溶原化維持、溶菌における#29 の役割

Sp5 の溶原化維持や溶菌における#29 の役割を解析するにあたり、O157 株は多数のプロファージを保持しているために、他のプロファージの影響を排除できないことから解析に適していない。そこで、K-12 株に Sp5 を溶原化させることにより Sp5 溶原菌を作成した。次に、Sp5 溶原菌の#29 の領域を欠失させ、#29 欠失株を作成した。#29 は *cI* 遺伝子と共転写されることから溶原化維持に寄与すると予想し、プロファージ誘導条件における Sp5 溶原菌と#29 欠失株の溶菌速度を調べたが顕著な差は見られなかった。一方で、これまでの研究結果から#29 が発現すると、べん毛遺伝子群の発現が抑制されることが明らかになっている。そのため、非溶原菌、Sp5 溶原菌、#29 欠失株間でのべん関連毛遺伝子の発現の変化を知るために、べん毛関連遺伝子にレポーター遺伝子を翻訳融合させたコンストラクトをそれぞれに導入し、べん毛関連遺伝子の発現の変化を解析した。その結果、非溶原菌と比べて Sp5 溶原菌ではべん毛遺伝子群のクラス 3 に属する *fliC* の発現が低下していることが分かった。また一方で、クラス 1 である *flhDC* の発現は非溶原菌と Sp5 溶原菌の間で差は見られなかった。これらの結果は、#29 を過剰発現させた時のべん毛遺伝子群の発現の変化と一致する。しかしながら、Sp5 溶原菌と#29 欠失株との間では差は見られなかった。Sp5 溶原菌と#29 欠失株との間で差が見られなかったのは、おそらく欠失させた領域外に#29 の機能領域があった可能性が考えられる。現在、より広い範囲を欠失した#29 欠失株を作成中である。

研究成果の概要 つづき

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 8 回 日本ゲノム微生物学会 若手の会 (2014 年、9 月 28～29 日) ポスター発表

発表タイトル「腸管出血性大腸菌 0157:H7 Sakai 株に存在する non-coding RNA #29 の解析」

満仲翔一¹、須藤直樹¹、相馬亜希子²、伊豫田淳³、大島拓⁴、戸邊亨⁵、関根靖彦¹

(¹立教大・理・生命理学、²千葉大・園芸、³国立感染症研究所・細菌第一部、⁴奈良先端大・情報科学、⁵大阪大院・医)

第 37 回 日本分子生物学会年会 (2014 年、11 月 25～27 日) ポスター発表

発表タイトル「腸管出血性大腸菌 0157:H7 Sakai 株に存在する non-coding RNA #29 の解析」

満仲翔一¹、須藤直樹¹、相馬亜希子²、伊豫田淳³、大島拓⁴、戸邊亨⁵、関根靖彦¹

(¹立教大・理・生命理学、²千葉大・園芸、³国立感染症研究所・細菌第一部、⁴奈良先端大・情報科学、⁵大阪大院・医)