

平成21年 5月11日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19570005
 研究課題名（和文） サルモネラ特異的アディクションモジュールの発現制御と生理機能
 研究課題名（英文） Expression and function of a *Salmonella*-specific addiction module
 研究代表者
 沓掛 和弘（KUTSUKAKE KAZUHIRO）
 岡山大学・大学院自然科学研究科・教授
 研究者番号：90143362

研究成果の概要：サルモネラはストレス特異的シグマ因子 RpoS に依存した増殖阻害を示す。この増殖阻害の原因因子の解析から、サルモネラに特異的に存在するトキシン遺伝子 *rsaB* とそれに対するアンチトキシン遺伝子 *rsaA* とからなる新しいアディクションモジュールを発見した。*rsaB* 遺伝子は RpoS 依存的に高発現するが、*rsaA* 遺伝子は RpoS 非依存的に低レベルで発現している。RsaB トキシンのターゲットの候補因子として、mRNA に結合して翻訳を制御する蛋白質 CsrA が同定されたことから、このモジュールの生理機能を解明する道がひらかれた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学，遺伝・ゲノム動態

キーワード：分子遺伝，ゲノム機能・発現

1. 研究開始当初の背景

細菌のゲノム中には、自身の増殖に対して阻害的に働く因子（トキシン）の遺伝子が多数存在することが明らかになってきた。トキシン遺伝子は、それに対して解毒作用を有するアンチトキシンの遺伝子とペアで存在していることが一般的で、このトキシン-アンチトキシン遺伝子ペアをアディクションモジュールまたは TA システム（トキシン-アンチトキシン・システム）と呼ぶ。

アディクションモジュールは、初めプラスミドの安定保持に関わる因子として発見さ

れた。プラスミドのアディクションモジュールにおいては、トキシンは安定な蛋白質で、アンチトキシンは不安定な蛋白質（あるいはトキシン mRNA に対するアンチセンス RNA）である。プラスミドが脱落するとアンチトキシンがすばやく消失するので、トキシンが宿主細胞を殺す。

その後、細菌染色体上にも同様なトキシン-アンチトキシン遺伝子ペアが多数見つかリ、それらは真核生物のプログラム細胞死（アポトーシス）と類似の機能をもつものであると考えられるようになった。しかし最近になっ

て、染色体上のアディクションモジュール様遺伝子ペアのなかには、細胞死を誘導するのではなく、ある条件下で細胞増殖停止を誘導する（すなわち、その条件が除去されれば細胞増殖を再開する）ものもあることが明らかになってきた。このことから、アディクションモジュール様遺伝子ペアの少なくとも一部はストレス応答因子であり、生育環境の悪化に応答して細胞増殖を停止させる役割を担っていると考えられるようになってきた。しかし、これはまだ証明されておらず、仮説の域を出ていない。

2. 研究の目的

研究代表者は長年サルモネラの鞭毛遺伝子の発現制御機構の研究を行ってきた。その過程で定常期ないしストレス特異的なシグマ因子 σ^S (RpoS) による鞭毛遺伝子発現の抑制機構を解析していたが、そのとき偶然に、 σ^S によって誘導される増殖阻害現象を発見した。この現象に関わる因子を分子遺伝学的手法により解析し、サルモネラに特異的な新しいトキシン遺伝子を同定した。このトキシン遺伝子は、 σ^S によって発現が誘導されて細胞増殖を停止させるが、細胞死は誘導しない。一方、このトキシン遺伝子のすぐ上流にはこれに対するアンチトキシン活性を有する遺伝子が存在していることも明らかになった。以上のことを総合して、これらが新規のアディクションモジュール (RsaABモジュールと命名：*rsaA*がアンチトキシン遺伝子、*rsaB*がトキシン遺伝子) を形成しているものと結論した。

このトキシン遺伝子がストレス特異的なシグマ因子によって誘導されることから、このアディクションモジュールを研究すればストレスに応答した細胞増殖制御におけるアディクションモジュールの役割が証明できるのではないかと考えるに至った。さらには、RsaABモジュールはサルモネラのマクロファージ内での生存率を制御している遺伝子領域のなかに含まれていること、 σ^S は酸ストレスによって誘導され、酸耐性や病原性制御に関与していること、 σ^S が高発現していると推定される条件では病原性や持続感染能に影響があること、サルモネラは宿主内での増殖速度を低く抑えることで持続感染を確立するらしいこと、などの知見を考え合わせると、RsaABモジュールがサルモネラの感染宿主細胞内での増殖を制御することにより病原性発現の制御に関与しているという可能性も示唆される。

そこで本研究課題は、サルモネラの RsaAB

モジュールに注目し、その発現制御を解析してトキシン機能発現のストレス応答と増殖阻害効果の関係を明らかにするとともに、トキシン機能の作用機構を明らかにすることを目的として計画された。これにより、アディクションモジュールの細胞増殖制御因子としての生理機能が解明されるものと期待した。さらには、病原性制御因子としてのアディクションモジュールにも注目して解析を行う計画で開始された。

以上をまとめると、本研究の当初の目的は以下のように整理される。

- (1) トキシン遺伝子とアンチトキシン遺伝子それぞれの発現制御における環境要因やグローバルレギュレーターの役割を解析し、トキシン機能の活性化条件を解明する。
- (2) その結果に基づいて増殖阻害がおこる生理条件を解析し、増殖制御因子としてのアディクションモジュールの機能を解明する。
- (3) トキシンとアンチトキシンの蛋白質間相互作用を解析し、この相互作用に関わる両蛋白質の機能領域を同定する。
- (4) トキシンのターゲットとなる蛋白質を同定し、増殖阻害の原因となる生理過程を明らかにする。また、それに関わるトキシンの機能領域を解明する。
- (5) トキシンとアンチトキシンそれぞれの遺伝子の欠失のサルモネラの病原性への影響を解析し、病原性制御因子としてのアディクションモジュールの機能を検証する。

3. 研究の方法

(1) RsaAB モジュールの発現制御の解析

RNA ligation-RT PCR 法により、トキシン遺伝子とアンチトキシン遺伝子の転写開始点を決定し、その位置から各遺伝子のプロモーターを推定した。

また、ノーザンブロッティング法および *IacZ* 遺伝子との転写融合を用いて、様々な培養条件でのトキシン遺伝子とアンチトキシン遺伝子の発現量を解析した。特に、 σ^S の細胞内濃度に大きな影響を与える温度、pH、塩濃度、 Mg^{2+} 濃度、酸素分圧などの環境要因を単独または複合で変動させたときの発現への影響を解析した。一方、環境要因のシグナル伝達系に関わる各種のグローバルレギュレーター(特に σ^S の細胞内濃度調節因子として知られる因子群) について、その欠損や過剰発現の RsaAB モジュール発現への影響を解析した。様々な培養条件でのトキシン遺伝子とアンチトキシン遺伝子の転写量をさらに詳細に解析し、トキシン活性が優位になり、増殖阻害が起こる条件を解析した。

以上の研究の過程で、アンチトキシン遺伝

子は転写されているにも関わらず mRNA の存在が確認されないことが明らかになったことから、*lacZ* 遺伝子との翻訳融合を用いてその転写後調節についても解析した。

(2) トキシン遺伝子とアンチトキシン遺伝子の欠失株の増殖の解析

これまでの研究により、サルモネラ実験室株から RsaAB モジュールのそれぞれの遺伝子の欠失体が得られている。これらの株の増殖に対する生育環境要因の影響とグローバルレギュレーター欠損や過剰発現の影響を解析し、上の結果と比較した。

上記のサルモネラ実験室株で構築されたトキシンとアンチトキシンのそれぞれの欠損遺伝子をマウス毒性株に導入によって移入し、毒性試験の準備を進めた。

(3) トキシンとアンチトキシンの相互作用と機能構造

トキシン遺伝子とアンチトキシン遺伝子について、それぞれを His-tag 付加および非付加発現ベクターにクローン化した。前者を用いて His-tag 付加トキシンとアンチトキシンを高発現させ、Ni²⁺ resin によりアフィニティー精製した。

His-tag 付加と非付加の蛋白質を組み合わせて用いることにより両蛋白質間の相互作用を Far-Western 法や Pull-down 法などで解析し、トキシンとアンチトキシンの結合を *in vitro* で証明することを試みた。また、それぞれの遺伝子の一部を発現ベクターにクローン化し、それぞれの蛋白質について部分欠失体シリーズを作成した。トキシンについてはこれを発現誘導したときの増殖阻害活性を、アンチトキシンについてはトキシンの増殖阻害効果の抑圧活性を指標にしてそれぞれの機能部位を特定することを試みた。

(4) RsaB トキシンのターゲット蛋白質の同定と解析

His および GST-tag を付加した RsaB 蛋白質をアフィニティー精製し、これによるプルダウン解析により、RsaB トキシンのターゲット蛋白質の候補を精製した。その蛋白質について N 末のアミノ酸配列を決定することにより、蛋白質分子種を同定した。

後述するように、これにより RsaB トキシンのターゲット蛋白質の候補として CsrA が同定されたことから、CsrA の高発現系を構築してその精製を行い、RsaB との相互作用を詳細に解析した。また、CsrA によって発現が制御される遺伝子の中から、RsaB トキシンによる増殖阻害に直接関係するものを検索し、RsaB トキシンによる増殖阻害のメカニズムを解明することを試みた。

4. 研究成果

(1) サルモネラ実験室株の増殖能の詳細な解析を行った結果、RpoS 高発現時の RsaB による増殖阻害効果は高温時に特異的に見られることが明らかになった。しかし、RsaB 自身を高発現した場合には、低温でも増殖阻害効果が見られた。したがって、増殖阻害効果の温度依存性は RsaB の発現または機能発現が温度依存性であることに起因しているものと考えられる。

(2) ノーザンブロッティングによる転写解析の結果、予想通り *rsaB* 遺伝子は RpoS 依存的に転写されていることが示されたが、これに対して、*rsaA* 遺伝子の転写は本実験条件の範囲内では検出されないことが明らかになった。

(3) RsaA および RsaB 蛋白質の欠失解析の結果、RsaA のアンチトキシン活性と RsaB のトキシン活性はともに、それぞれの蛋白質の C 末側領域に局在することが明らかになった。

(4) RsaB トキシンの標的分子の同定を目指して、精製 RsaB 蛋白質を用いたプルダウン解析を行ったところ、翻訳制御蛋白質である CsrA が共精製されてくることが明らかになった。サルモネラでは *csrA* が必須遺伝子であることと合わせて考えると、RsaB は CsrA に結合してその機能を阻害することによりトキシン活性を発揮するものと推定される。

そこで次に、実際に生体内において、RsaB が CsrA の機能を阻害しているか否かを解析した。CsrA はグリコーゲン合成系遺伝子群 *glgCAP* の mRNA に結合してその翻訳活性を阻害することが知られている。そこで、RsaB を高発現させたときのグリコーゲン合成能への影響を解析したところ、RsaB の高発現により活性化されることが判明した。また、*glgCAP* mRNA への CsrA の結合が RsaB の添加によって阻害されることが示された。以上のことから、生体内において、RsaB が CsrA の機能を阻害しているものと考えられる。

(5) RsaB 高発現による増殖阻害の原因をさぐる目的で、この増殖阻害効果を抑圧するマルチコピーサプレッサー遺伝子を検索した。その結果、*torS* と *ytfP* の 2 つの遺伝子が同定された。前者は嫌気的な条件で作用するリン酸化活性のある蛋白質をコードしているが、後者の機能は未解明である。RsaB 高発現下でのグリコーゲン合成能の上昇は TorS の高発現によって抑制されるが、YtfP の高発現によって抑制されなかった。このことから、TorS は RsaB に作用してその機能を阻害している可能性が高く、一方、YtfP は CsrA の機

能阻害による増殖阻害効果を抑制している可能性が高い。

(6) その他の展開

本研究はサルモネラを主たる生物材料として用いることで計画されたものであるが、本研究の途上で、RsaB トキシンの大腸菌への増殖阻害効果も確認された。したがって、大腸菌にも RsaB トキシンに感受性の増殖制御系が存在することになる。

ところで、従来から大腸菌は *csrA* 遺伝子を欠損可能であるとされていたが、最近になって大腸菌でも *csrA* 遺伝子の欠損は致死であり、その致死効果はグリコーゲン生産系遺伝子の高発現によるグリコーゲンの過剰生産が原因であるとする報告がなされた。そこで我々は、「RsaB トキシンの高発現による増殖阻害は RsaB による CsrA の機能阻害によりグリコーゲンの過剰生産が引き起こされるためである」とする仮説を立てた。これを確かめるため、大腸菌とサルモネラの両方を用いてグリコーゲン生産系遺伝子の欠失体を作成し、RsaB の高発現による増殖阻害効果が抑圧されるか否かを解析した。その結果、大腸菌とサルモネラの両方において抑圧されないことが判明した。

また、大腸菌において様々な遺伝的背景下での致死効果をあわせて解析した。その結果、trans-translation に関わる *ssrA* 遺伝子とペリプラズムのシャペロン/プロテアーゼをコードする *degP* 遺伝子の二重欠損が高温で高い増殖阻害効果を示すことが判明した。この増殖阻害は細胞外ストレス応答性シグマ因子 σ^E の高発現によって抑圧されることが示された。

(7) 今後の展望

本研究では、RsaB トキシンによる増殖阻害効果の直接的な原因の解明には至っていない。今後は CsrA 下流の必須因子あるいはトキシン遺伝子の同定を目指す予定である。

また、本研究課題の当初の計画の1つである RsaAB モジュールの病原性制御への関与については、解析の準備はほぼ整ったものの、未解明である。今後は、本研究で構築された突然変異体を用いて、病原性解析を進めていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

①Ono K, Kutsukake K, Abo T. Suppression by enhanced RpoE activity of the temperature-sensitive phenotype of a *degP*

ssrA double mutant in *Escherichia coli*. Genes & Genetic Systems 84(1): 15-24 (2009). 査読有.

②Kobayashi H, Kanazaki M, Ogawa T, Iyoda S, Hara-Kudo Y. Changing prevalence of O-serogroups and antimicrobial susceptibility among STEC strains isolated from healthy dairy cows over a decade in Japan between 1998 and 2007. Journal of Veterinary Medical Science 71(3): 363-366 (2009). 査読有.

③Yanagihara S, Kori Y, Ishikawa R, Kutsukake K. Production of novel anti-recombinant human erythropoietin monoclonal antibodies and development of a sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of bioreactive human erythropoietin. Journal of Immunoassay & Immunochemistry 29: 181-196 (2008). 査読有.

④Oshima K, Toh H, Ogura Y, Sasamoto H, Morita H, Park SH, Ooka T, Iyoda S, Taylor TD, Hayashi T, Itoh K, Hattori M. Complete genome sequence and comparative analysis of the wild-type commensal *Escherichia coli* strain SE11 isolated from a healthy adult. DNA Research 15(6): 375-386 (2008). 査読有.

⑤Saitoh T, Iyoda S, Yamamoto S, Lu Y, Shimuta K, Ohnishi M, Terajima J, Watanabe H. Transcription of the *ehx* enterohemolysin gene is positively regulated by GrlA, a global regulator encoded within the locus of enterocyte effacement in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology 190(14): 4822-4830 (2008). 査読有.

⑥Pei Y, Terajima J, Saito Y, Suzuki R, Takai N, Izumiya H, Morita-Ishihara T, Ohnishi M, Miura M, Iyoda S, Mitobe J, Wang B, Watanabe H. Molecular characterization of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates dispersed across Japan by pulse-field gel electrophoresis and multi-locus variable-number tandem repeat analysis. Japanese Journal of Infectious Disease 61(1): 58-64 (2008). 査読有.

⑦Tominaga A, Kutsukake K. Expressed and cryptic flagellin genes in the H44 and H55 type strains of *Escherichia coli*. Genes & Genetic Systems 82: 1-8 (2007). 査読有.

⑧Tokunaga A, Kawano M, Okura M, Iyoda S, Watanabe H, Osawa R. Identification of enterohemorrhagic *Escherichia coli*

0157-specific DNA sequence obtained from amplified fragment length polymorphism analysis. *Microbiology and Immunology* 51(9): 883-888 (2007). 査読有.

〔学会発表〕(計4件)

①南部隆之, 河原田実, 山内和仁, 杓掛和弘. サルモネラ鞭毛Pリング形成におけるFlgA蛋白質のβクリップドメインの役割. 日本遺伝学会第80回大会. 2008年9月4日. 名古屋.

②和田健男, 杓掛和弘. サルモネラ鞭毛レギュロンのマスターレギュレーターを制御する新規アンチアクティベーター蛋白質. 日本遺伝学会第80回大会. 2008年9月3日. 名古屋.

③和田健男, 森實友絵, 杓掛和弘. サルモネラ鞭毛レギュロンのマスターレギュレーターを制御する新規蛋白質. 日本遺伝学会第79回大会. 2007年9月21日. 岡山.

④杓掛和弘. ストレスシグマ因子 RpoS で誘導される2つのトキシソグエン遺伝子: サルモネラのTAシステムの発現制御と生理機能. 日本遺伝学会第79回大会. 2007年9月19日. 岡山.

〔図書〕(計2件)

①杓掛和弘(分担執筆). 現代生物学入門(高橋純夫監修, 岡山大学生物学教科書作成グループ編). 岡山大学出版会. 総頁数141頁. (2009). 分担部分 10-11頁, 59-81頁.

②杓掛和弘(分担執筆). 分子細胞生物学辞典 第2版(村松正實他編). 東京化学同人. 総頁数1184頁. (2009). 分担部分 530頁, 829頁.

〔その他〕

①シンポジウム開催

本研究課題に関連し, 日本遺伝学会第79回大会(2007)において, 下記のシンポジウムを企画・開催し, 世話人を務めるとともに, 話題を提供した.

日本遺伝学会第79回大会. 2007年9月21日. 岡山.

シンポジウム名: プログラム細胞死: 単細胞微生物での機構と意義

企画の意図: 「死」は, これまで「生」でない状態として消極的に扱われてきた. しかし, 多細胞生物では「プログラム細胞死」経路が分子レベルで解明され, その様々な生命活動での重要性が認識されている. 個体レベルでは, 「利他的な」死をプログラムする事によって存続する遺伝子という概念が提唱されたが, その実体は殆どの場合明らかになっていない. 「個体」=「細胞」の単細胞モデル

微生物では, 死のゲノム維持, ストレス応答, 感染防御, 分化等での役割, 遺伝機構と進化での積極的な意義と, 詳細な分子機構とを, 徹底的に解明・検証できる可能性がある. 最先端の研究を紹介したい.

世話人: 小林一三, 杓掛和弘

話題提供者: 小林一三, 鎌田勝彦, 山田守, 原弘志, 杓掛和弘.

②総説

伊豫田淳. 腸管出血性大腸菌における病原性遺伝子の協調的発現制御機構. *日本細菌学雑誌* 63:407-415 (2008).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杓掛 和弘 (KUTSUKAKE KAZUHIRO)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号: 90143362

(3) 連携研究者

伊豫田 淳 (IYODA SUNAO)

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究員

研究者番号: 70300928

(4) 研究協力者

江本 宗玄 (EMOTO KAZUNORI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・博士前期課程学生