

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K16248

研究課題名（和文）腸管出血性大腸菌の宿主感染ステージに応じた小分子RNAによる病原性発現制御の解明

研究課題名（英文）Regulation of virulence expression by small RNA in enterohemorrhagic E. coli in response to host infection stages.

研究代表者

須藤 直樹（Sudo, Naoki）

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：50736105

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は腸管出血性大腸菌の病原性に重要な三型分泌装置の転写後制御を担う小分子RNA(sRNA)を同定し、宿主細胞感染時の同定したsRNAの役割を明らかにするものである。三型分泌装置の転写制御因子をコードするlerのmRNAに結合するsRNAの同定を試みた結果、3つのsRNAを見出し、これらがlerの発現抑制を介して三型分泌装置の発現を抑制することを示した。さらに、これらsRNAの宿主細胞感染・非感染時の発現変動を解析した結果、接着の初期または後期に発現が上昇するもの、非感染時に発現が上昇するものと様々であった。これらの結果から宿主細胞感染時における複雑な転写後制御ネットワークの存在が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の推進により腸管出血性大腸菌の病原性発現制御機構の一端を解明することができた。三型分泌装置は腸管出血性大腸菌のヒトへの感染に重要な因子であり、この制御機構の理解は、腸管出血性大腸菌感染症の制御に対する基盤的知見となる。

また、本研究では宿主細胞感染時における複数のsRNA発現を解析した結果、感染ステージによって各々のsRNA発現の変動が異なることを見出した。これは腸管出血性大腸菌における宿主細胞感染時のsRNAの挙動を網羅的に捉えた初めての例である。

研究成果の概要（英文）：This study identified small regulatory RNAs (sRNAs) that play a role in the post-transcriptional regulation of the type 3 secretion system, which is important for the pathogenicity of enterohemorrhagic Escherichia coli, and clarified the role of these sRNAs during host cell adhesion.

I attempted to identify sRNAs that interact with mRNA of ler, which encodes a central transcriptional regulator of the type 3 secretion system, and found three sRNAs that repress the expression of the type 3 secretion system through down-regulation of ler expression. Furthermore, we analyzed the expression of these sRNAs during host cell adhesion and non-adhesion, and found that some sRNAs were upregulated in the early or late stages of the adhesion, while others were upregulated during non-adhesion. These results indicate the existence of a complex post-transcriptional regulatory network during host cell adhesion.

研究分野：細菌学、分子生物学

キーワード：腸管出血性大腸菌 小分子RNA 転写後制御 ler LEE

1. 研究開始当初の背景

腸管出血性大腸菌 (enterohemorrhagic *E. coli*: EHEC) は少ない菌体数でも宿主への感染が成立する特徴を有することから、効率的な感染戦略とそれを実現する発現制御機構を備えていると考えられる。EHEC は病原性因子として 3 型分泌装置 (Type 3 secretion system: T3SS) を持ち、これを介して大腸上皮細胞に種々のエフェクターを注入することで、attaching and effacing 傷害と呼ばれる EHEC 感染に特徴的な病変を惹起し、上皮細胞に強固に接着する(1,2)。T3SS の構成因子とエフェクターは LEE (locus of enterocyte effacement) と呼ばれる病原性遺伝子群にコードされており、その発現は同じく LEE にコードされる *ler* によって転写段階で一括的に制御される。*ler* の発現は多くの転写因子によって調節されており、それらの因子の外環境や感染過程に応じた *ler* とそれに続く LEE の発現制御を実現している。しかし EHEC の複雑な感染現象の成立には *ler* や LEE の転写制御だけでなく、転写後制御も重要だと考えられる。

細菌における転写後制御因子として小分子 RNA (small RNA: sRNA) が挙げられる。これらは外環境ストレスにより発現が誘導され、RNA 結合タンパク質 Hfq と協調して標的 mRNA の 5' 末端非翻訳領域 (5' UTR) に塩基対形成を介して結合し、その発現を調節する。これまでに研究代表者らは *ler* の転写制御因子として自身が同定した Esr41 sRNA が *ler* の発現を抑制すること、また sRNA に依存しない制御として Hfq が単独で *ler* の発現を抑制することを明らかにした(3,4)。また近年、LEE にコードされる遺伝子の転写後制御が数例、報告された(5)。このように *ler*、及び LEE の転写後制御の一端が明らかになりつつあるが、これらは純培養系での知見であり EHEC の感染現象における、それらの転写後制御の役割は未解明である。解糖系、TCA 回路を担う代謝酵素の発現では sRNA はファインチューニングと呼ばれる微細な発現量の調製を行うことで、効率的に代謝カスケードを亢進することから(6,7)、EHEC の複雑な感染現象においても sRNA によるファインチューニングが存在する可能性は高いと考えられた。

- 1 Frankel, G., et. al. (1998) Mol. Microbiol., 30, 911-921.
- 2 Nataro, J.P. and Kaper J.B. (1998) Clin. Microbiol. Rev., 11, 142-201.
- 3 Sudo, N., et. al. (2018) Microbiol., 164, 821-834.
- 4 Sudo, N., et. al. (2022) Mol. Microbiol., 117, 86-101.
- 5 Sauder, A.B. and Kendall, M.M. (2018) J. Bacteriol., 200, e00228-18.
- 6 Bobrovskyy, M. and Vanderpool, C. K. (2014) Front. Cell Infect. Microbiol., 4, 61.
- 7 Mets, F.De., et. al. (2018) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 116, 1043-1052.

2. 研究の目的

本研究では、EHEC の宿主細胞接着の各段階における全 sRNA 発現プロファイルと、LEE の発現制御の核となるレギュレーターをコードする *ler* mRNA に結合する全 sRNA 発現プロファイルを取得し、その結果から *ler* の転写後制御を担う sRNA の同定、及びその役割の解明をすることである。これまで EHEC における sRNA 研究の多くが純培養系の解析であり、実際の感染現象における sRNA の重要性は未解明であったが、本研究で行う宿主細胞接着の各段階における sRNA の解析から EHEC 感染症における sRNA 機能の重要性を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 菌株及び培地

EHEC O157:H7 Sakai 株の *lac* 遺伝子欠失株を野生株として用い、種々の遺伝子欠失株はラムダ Red 法で構築した。sRNA 遺伝子のマルチコピー株では sRNA 遺伝子をクローニングしたプラスミドを用いた。培地は LB、もしくは LEE の発現が上昇する DMEM を用い、必要に応じて抗生剤を添加した。

(2) MAPS (MS2-affinity purification and RNA sequencing) (8)

IPTG 誘導系プロモーターの下流に MS2 タグ配列を付加した *MS2-ler-sfGFP* (以下、*MS2-ler*)、及び *MS2-lacZ-sfGFP* (以下、*MS2-lacZ*) のコンストラクトを構築した。このコンストラクトを保持する EHEC を IPTG 添加培地で培養し、細胞粗抽出液を調製し、MS2 タグ精製法により *MS2-ler* mRNA、または *MS2-lacZ* mRNA を精製した。精製画分から低分子 RNA を分画し、次世代シーケンス用サンプルを調製し、次世代シーケンスを行なった。

(3) HeLa 細胞への接着性解析

細胞の培養には 10% fetal bovine serum (FBS) を添加した DMEM を用いて 37℃、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。EHEC は事前に DMEM で培養し、MOI=50 になるように菌液を調整し、HeLa 細胞に接種した。接種後、250 g、5 分間遠心分離した後、37℃、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。1 時間後、培地を除去し、滅菌 PBS で 3 回洗浄後、10% FBS を加えた DMEM を加え、37℃、5% CO₂ インキュベーター内で培養した。培養後、培地を除去し、滅菌 PBS で 6 回洗浄した後、0.05% SDS を添加した滅菌 PBS で HeLa 細胞を溶解した。HeLa 細胞に結合した EHEC の

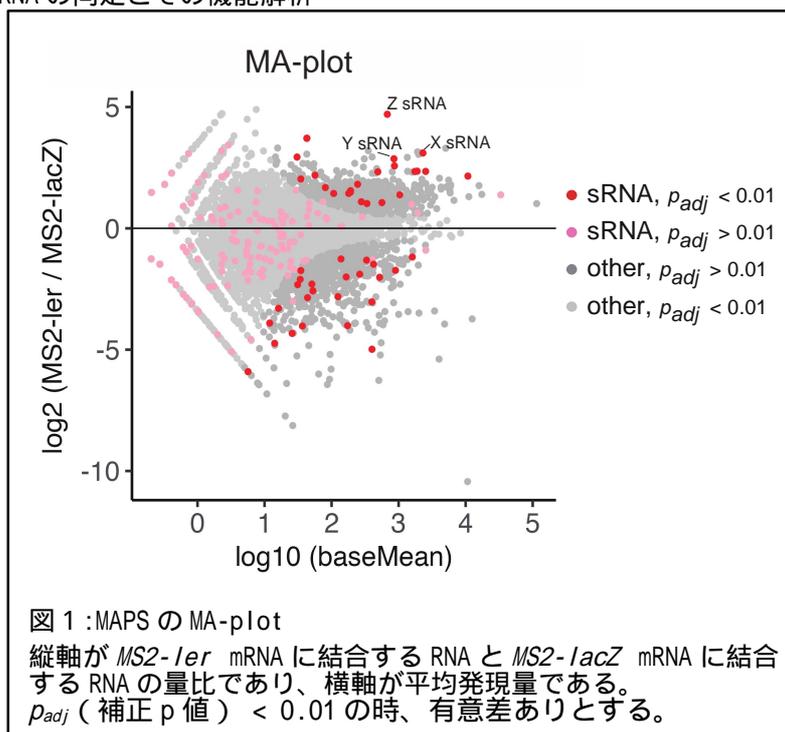
細菌数は溶解溶液の寒天培地へのプレーティングにより解析し、sRNA プロファイルは溶解溶液を遠心分離により集菌した検体を用いて解析した。

8 Carrier, M.C., et. al. (2016) RNA Biol., 13, 473-476.

4. 研究成果

(1) *ler* mRNA に結合する sRNA の同定とその機能解析

ler mRNA に結合する sRNA を同定するため、MAPS による解析を行なった。その結果、*MS2-lacZ* mRNA と比較して *MS2-ler* mRNA の精製画分にはいくつかの機能未知 sRNA が多く存在していた (図 1)。この結果の検証のため、精製画分の RNA をノーザンプロットングにより解析した結果、少なくとも 3 つの sRNA (それぞれ X、Y、Z sRNA とする) は MAPS と同様の結果となった。次に 3 つの機能未知 sRNA 遺伝子のマルチコピー株を構築し、LEE、及び *ler* の発現変動を解析したところ、3 つの sRNA は LEE、及び *ler* の発現を抑制することを見出した。さらにこれらマルチコピー株の HeLa 細胞への接着性を解析した結果、3 つの sRNA と



も接着性の低下が見られた。これらの結果は、3 つの sRNA がともに *ler* の発現抑制を介して LEE の発現を抑制し、その結果、宿主細胞への接着性を低下させることを示す。これより本研究の目的の一部は達成された。次に 3 つの sRNA の *ler* 抑制機構を解析するため、*ler* の 5' UTR、及び sRNA への変異解析を行った。その結果、Y sRNA は *ler* mRNA の SD 配列直上流で塩基対を形成することを、X、Z sRNA は *ler* mRNA の SD 配列より約 50 ヌクレオチド上流の領域が発現抑制に重要であることがわかった。

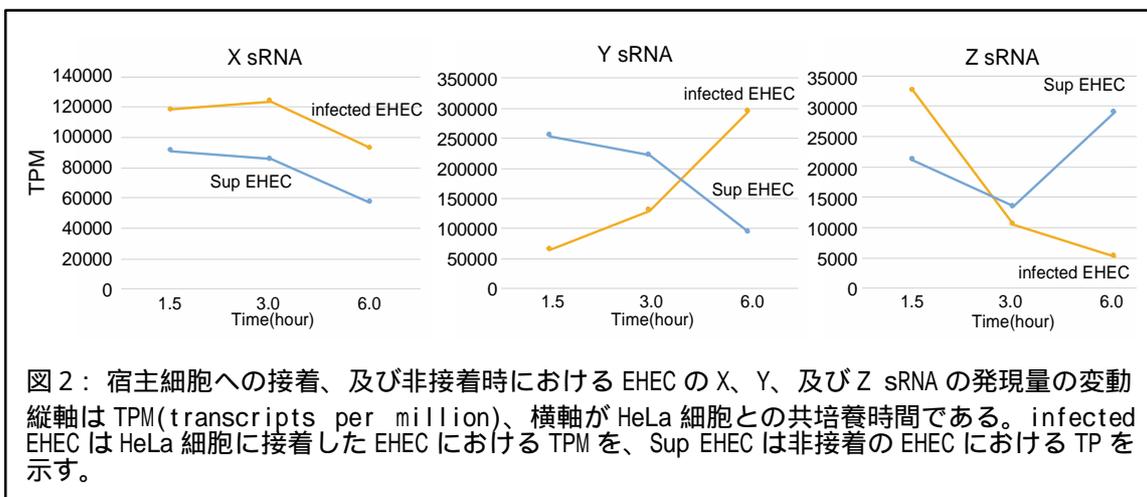
一方で、本研究では RNA 架橋剤を用いた MAPS の新規手法の開発に取り組んだが、同定した 3 つの sRNA の解析を優先したため、現時点では新規手法の確立には至っていない。また当初は HeLa 細胞に接着した EHEC を用いて MAPS を行う計画であったが、HeLa 細胞に接着する EHEC の菌量では精度の高い MAPS の結果を得ることが困難であったため、断念した。

(2) 3 つの sRNA の発現制御解析

3 つの sRNA (X, Y, Z) の培養条件による発現量の変動を解析した。まず LB と DMEM を用いた純培養系における発現量を、ノーザンプロットングを用いて解析した結果、Z は DMEM と比べ LB で発現量が増加したが、X、及び Y は DMEM で発現量が著著に増加した。DMEM では LEE の発現が上昇することから、LEE と X、及び Y sRNA 発現の関係を解析するため、LEE 欠失株を用いて解析したところ、X、及び Y の DMEM における発現の増加が見られなくなった。この結果は LEE に X、及び Y の発現を制御する因子がコードされていること示唆するため、LEE にコードされる転写因子 *Ler* と *GrIA* を発現誘導した際の X、及び Y の発現量を解析した。その結果、*GrIA* 発現時に X、及び Y の発現量の増加が見られた。このことは、X、及び Y sRNA が *GrIA* により制御されることを示す。

次に宿主細胞との共培養時の全 sRNA 発現プロファイルの取得と、3 つの sRNA の発現について解析した。sRNA に結合する RNA 結合タンパク質 Hfq に FLAG タグを付加した Hfq-FLAG を発現する EHEC を HeLa 細胞と共培養し、HeLa 細胞に接着した EHEC と非接着の EHEC を回収し、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降を行い Hfq-FLAG を精製した。精製した Hfq-FLAG に結合する sRNA を、次世代シーケンスを用いて解析し、全 sRNA 発現プロファイルを取得した。このプロファイルから 3 つの sRNA の発現変動を解析した結果、X は接着・非接着に関わらず培養時間の増加に伴い発現量が低下したが、Y は培養時間の増加に伴い、非接着の EHEC では発現量が低下し、接着した EHEC では発現量が上昇した。Z は、Y とは逆に非接着で発現量が上昇するのに対して接着で発現量が低下した (図 2)。これらの結果は、3 つの sRNA が宿主細胞感染の各段階で発現パターンを変化させながら *ler* の発現を調節すること示し、EHEC の宿主細胞への接着において複数の sRNA が関

与する制御ネットワークが存在することを示唆する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hoshino Yusuke, Sakamoto Taro, Sudo Naoki, Ito Masahiro, Haneda Takeshi, Okada Nobuhiko, Miki Tsuyoshi	4. 巻 90
2. 論文標題 Fatty Acid Homeostasis Tunes Flagellar Motility by Activating Phase 2 Flagellin Expression, Contributing to Salmonella Gut Colonization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 e00184-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/iai.00184-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Miki Tsuyoshi, Hoshino Yusuke, Sudo Naoki, Ito Masahiro, Haneda Takeshi, Okada Nobuhiko	4. 巻 90
2. 論文標題 <i>uvrY</i> Deletion and Acetate Reduce Gut Colonization of Crohn's Disease-Associated Adherent-Invasive Escherichia coli by Decreasing Expression of Type 1 Fimbriae	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Infection and Immunity	6. 最初と最後の頁 e00662-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/iai.00662-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Sudo Naoki, Lee Kenichi, Sekine Yasuhiko, Ohnishi Makoto, Iyoda Sunao	4. 巻 117
2. 論文標題 RNA binding protein Hfq downregulates locus of enterocyte effacement encoded regulators independent of small regulatory RNA in enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Microbiology	6. 最初と最後の頁 86 ~ 101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/mmi.14799	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 須藤直樹、関根靖彦、岡田信彦
2. 発表標題 小分子 RNA MicA による外膜ポリン PhoE の発現抑制とその生物学的意義
3. 学会等名 第18回 21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 須藤直樹、佐々木万里香、今福拓也、岡田信彦
2. 発表標題 志賀毒素転換ファージが持つ低分子RNAの溶菌、及び志賀毒素産生への影響
3. 学会等名 第17回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺島栄、坂藤明音、須藤直樹、関根靖彦
2. 発表標題 合成致死スクリーニングから見出されたRNA結合タンパク質Hfq が関与する遺伝子発現制御機構の解析
3. 学会等名 第17回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 須藤直樹
2. 発表標題 腸管出血性大腸菌の病原性発現における転写後制御
3. 学会等名 第45回白金シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 須藤直樹 佐々木万里香 今福拓也 伊豫田淳 岡田信彦
2. 発表標題 志賀毒素転換ファージにコードされる低分子RNAの機能解析
3. 学会等名 第94回日本細菌学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三戸部治郎、須藤直樹、小泉信夫、志牟田健、Hemanta Koley
2. 発表標題 Hfq と赤痢ワクチンの話
3. 学会等名 第19回 21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 須藤直樹、栗田啓嗣、岡田信彦、三戸部治郎
2. 発表標題 腸管出血性大腸菌の病原性調節遺伝子 <i>ler</i> の発現制御に関与する小分子 RNA の探索
3. 学会等名 第19回 21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 須藤直樹、岡田信彦、三戸部 治郎
2. 発表標題 MAPSを用いた腸管出血性大腸菌の病原性発現制御に関する小分子RNAの網羅的解析
3. 学会等名 第18回日本ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

北里大学薬学部微生物学教室 http://www.pharm.kitasato-u.ac.jp/microbiology/ 杏林大学 大学院紹介 研究室・研究グループ紹介:感染症学教室 https://www.kyorin-u.ac.jp/univ/graduate/medicine/education/departments/infect-dis/ 杏林大学研究室・医学部・感染症学教室 https://www.kyorin-u.ac.jp/univ/faculty/medicine/education/labo/infection/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------