

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19093

研究課題名(和文) ビブリオが保有する3つの調節RNA分子の非冗長な発現メカニズムとその役割

研究課題名(英文) Expression mechanism of three CsrB family regulatory RNA in *Vibrio alginolyticus*

研究代表者

後藤 和義 (Gotoh, Kazuyoshi)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20626593

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)： *V. alginolyticus*の3つのCsrBのそれぞれ異なる転写のメカニズムを検討するため、プロモーターの構造の差異、転写の途中停止について仮説を立て検討した。さらに、転写後調節の可能性について3つのCsrBのRNA安定性の差異を検討した結果、転写メカニズムおよび安定性において差異を認めなかった。本研究で得られた結果に基づき、*V. alginolyticus*の調節RNA、3つのCsrBを介したコラゲナーゼ発現メカニズムの全容を明らかにすることで、最終的にビブリオ属細菌の病原性抑制の鍵となる標的遺伝子が同定できると期待される。

研究成果の概要(英文)： *Vibrio alginolyticus* possesses three CsrB family regulatory RNA. In this study, we investigated the mechanism of these RNAs expression system in transcriptional and post-transcriptional level. First, we checked stability among these RNAs using rifampicin RNA-chase assay. As a result, no any difference of RNA stability in three RNAs was shown. Next, we analyzed the possibility that ORF regions affect transcriptional activity. However, reporter assay indicated that the no difference of the activity was shown in ORF containing promoter. These resultu indicated that unknown mechanism produce the non-redundancy among three CsrB family regulatory RNAs.

研究分野：細菌学

キーワード：Vibrio 調節RNA

1. 研究開始当初の背景

調節 RNA 分子である CsrB ファミリーは、グラム陰性菌に広く保存されている非翻訳 RNA であり、2 次代謝産物合成、莢膜多糖類合成、運動性、バイオフィーム合成など、細菌の多くの生理機能を制御することが知られている。プロテイン・スポンジとも呼ばれる CsrB の制御メカニズムは、mRNA の 5'-UTR 上のシャイン・ダルガノ配列に結合する翻訳阻害タンパク CsrA を、CsrB-RNA 分子が 10~20 分子結合・吸着することで 5'-UTR 領域を解放し、CsrA による mRNA へのリボソーム結合阻害が解除されるというものである (図 1)。CsrB の発現は二成分制御系 VarS/VarA により転写調節されている。サルモネラ属や緑膿菌といった病原細菌において、CsrB は病原性の発現に関与していることから、申請者は平成 26 年度より *Vibrio alginolyticus* の「人喰いバクテリア」様組織破壊の原因と考えられているコラゲナーゼ毒素発現への CsrB の関与を解析してきた結果以下のことが明らかとなっていた。

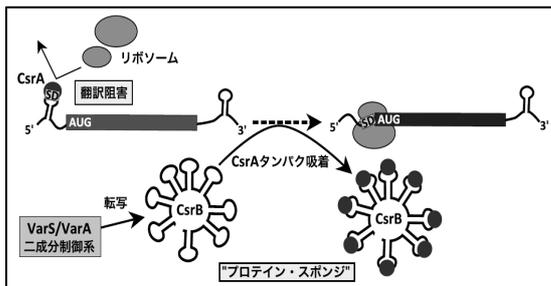


図 1. CsrB 調節 RNA による翻訳制御

(1) *V. alginolyticus* のゲノム配列上に、同じビブリオ属であるコレラ菌 CsrB のホモログを 3 種類 (CsrB/C/D) をそれぞれ独立した領域に見出し、いずれも転写されることをノザンプロット法と RT-PCR により確認した。転写開始点とプロモーター配列を RACE 法により決定した。

(2) 過剰発現系を用いたコラゲナーゼ発現アッセイ実験により、CsrB/C/D がコラゲナーゼ毒素の発現に関与していることを明らかにした。

(3) 二成分制御系 VarS/VarA の遺伝子破壊株を用いたノザンプロット法とリアルタイム

PCR により、CsrB/C/D のうち CsrC の発現は VarS/VarA により正に制御され、CsrB/D の発現は負に制御されていることを確認した。コレラ菌においては、これら 3 つの調節 RNA 分子はいずれも VarS/VarA により正に制御されており、機能も相同と考えられているため、単に「冗長な 3 種の調節 RNA」であると考えられてきた。*V. alginolyticus* の CsrB/C/D で発現態度が 3 種の間で互いに異なるという知見は、これまでに報告のあるどのバクテリアの冗長的な CsrB/C/D と異なるものであり、新規メカニズムが期待される。

2. 研究の目的

グラム陰性菌に広く存在する Csr 調節システムは調節 RNA 分子を介した翻訳制御システムであり、多様な生理機能を制御している。ビブリオ属細菌には 3 種類の Csr ファミリー調節 RNA が存在し、その発現は 3 分子ともレギュレーター VarA により正に制御されることが知られていた。発現の冗長な 3 つの RNA 分子、というこれまでの知見に反して、申請者は *V. alginolyticus* の 3 つの調節 RNA のうち 1 つが VarA によって正に、うち 2 つが負に制御されることを見出した。本研究は「非冗長な」3 つの RNA 分子が正・負真逆の転写調節を受けるメカニズムを解明するとともに、転写後の翻訳制御メカニズムにおける 3 分子間の機能差まで解析することで、これまで知られていなかった Csr ファミリー調節システムの新たなメカニズムを明らかにするものである。

本研究の目的は、発現態度の異なる非冗長な 3 つの調節 RNA の新規発現メカニズムの解明とその機能解析である。研究期間内に以下のことを明らかにしたい。

(1) CsrB/C/D の発現機構の解明

CsrB/C/D のうち、CsrC はこれまでに知られた二成分制御系 VarS/VarA により正の発現調節を受けることを明らかにしたので、実際に CsrC のプロモーター領域をレスポンスレギュレーターである VarA が直接制御している

かどうか明らかにする。CsrB/D はこれまでに知られた発現機構とは異なる新規の発現メカニズムを持っていることが示唆されたため、既知制御因子である VarS/VarA 以外のレギュレーターの可能性も含め、CsrB/C/D 全体の発現機構の解明を目指す。

(2) CsrB/C/D による翻訳制御メカニズムの解明

これまでの報告を基に考えると、CsrB/C/D は転写後、CsrA タンパクを吸着することで翻訳制御すると予想される。しかしながら、CsrB/C/D の中に、同一の環境シグナルに対し正の制御と負の制御を受けている分子が混在することから、3つの RNA 分子の間の環境に応じた使い分けが示唆される。このことから申請者は、CsrB/C/D が3分子とも同じ親和性で単に CsrA だけを結合するという冗長な機構ではなく、CsrB/C/D の3分子間で翻訳制御機構にも「個性」があるのではないかと予想している。そこで CsrB/C/D のによる翻訳制御メカニズムの差異を明らかにしたい。

(3) CsrB/C/D の病原因子発現調節メカニズムの解明

CsrB/C/D はコラゲナーゼ毒素の発現調節因子の一つとして見出した経緯がある。そこで CsrB/C/D による *V. alginolyticus* の病原性発現メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) CsrB/C/D-RNA 分子と既知翻訳調節タンパク CsrA の相互作用の解析

CsrB/C/D が実際に CsrA と結合するか調べるために、*in vitro* 転写により合成した CsrB/C/D の各 RNA 分子と CsrA タンパクの間の結合を RNA ゲルシフトアッセイにより解析する。CsrB/C/D の3分子間で CsrA に対する結合親和性に差がないか、結合の詳細な物理化学的プロフィールを3分子間で比較解析する。具体的には等温熱滴定 (ITC) を用いて、結合の自由エネルギーと結合サイト数を算出し、3種の RNA の間で比較する。

(2) RNA 安定性の解析

CsrB/C/D それぞれの RNA 安定性を検討するために、リファンピシン・チェイスアッセイを行う。RNA の検出にはノザンプロットと qPCR を用いる。

4. 研究成果

(1) 転写因子 VarA による3つの CsrB 遺伝子の異なる発現態度

ビブリオ属において CsrB 遺伝子の発現は、二成分制御系転写因子 VarS/VarA により正に制御されることが知られる。そこで VarS と VarA の遺伝子破壊における3つの CsrB (CsrB1, CsrB2, CsrB3) の発現量を比較した。その結果、野生株で見られた CsrB の発現は、VarS/VarA の遺伝子破壊により CsrB1 と CsrB3 では増加、一方 CsrB2 では減少した。このことから、CsrB2 はこれまでに知られるように VarS/VarA により正に制御されていると考えられたが、CsrB1 と CsrB3 はこれまでの知見に反して負に制御されていると考えられた。

(2) CsrB のプロモーター活性

結果 1 から CsrB1, 2, 3 はそれぞれ異なる転写活性を持つ可能性が示唆された。そこで CsrB1, 2, 3 のそれぞれのプロモーター領域の転写活性を LacZ レポーターアッセイにより測定した。その結果、野生株で認められた CsrB1, 2, 3 のプロモーター由来の転写活性は、いずれも二成分制御系 VarS/VarA の遺伝子破壊により低下した。このことから、CsrB1, 2, 3 では3つの CsrB 同士のレポーター活性に差はなく、いずれのプロモーター活性も VarS/VarA により正に制御されることが考えられた。

(3) CsrB1 と CsrB3 の転写制御

少なくともプロモーター領域の転写活性については、CsrB1とCsrB3は予想に反して、VarS/VarAにより正に制御されることが明らかとなった。このことから、3つのCsrB遺伝子発現の差は単にプロモーターの活性によらず、転写後調節が関与することが推測された。そこで、1つの可能性として、プロモーターというよりむしろ被転写領域中に存在する配列の影響で転写調節される可能性を検討した。遺伝子のプロモーター領域と遺伝子領域の全長をLacZ遺伝子と結合させた場合のレポーター活性を測定したところ、野生株、VarS/VarA遺伝子破壊株ともにプロモーター領域のみのときと同様の結果が得られた。このことから被転写領域に転写調節配列が含まれる可能性は低いと考えられた。

(4) CsrBの安定性

他の転写後調節の可能性としてRNA分解が考えられたため、CsrBのRNA安定性を測定した。その結果、CsrB1, 2, 3のいずれにおいても野生株とVarS/VarA遺伝子破壊株の間で安定性の差は認められなかった。

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 1 件)

Mima T, Gotoh K, Yamamoto Y, Maeda K, Shirakawa T, Matsui S, Murata Y, Koide T, Tokumitsu H, Matsushita O. Expression of Collagenase is Regulated by the VarS/VarA Two-Component Regulatory System in *Vibrio alginolyticus*. *J Membr Biol*. 251(1):51-63, 2017. 査読有り

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 後藤和義, Agus Eka Darwinata, 美間健彦, 松下治. *Vibrio alginolyticus* が保有する CsrB ファミリー調節 RNA の遺伝子発現メカニズムの研究. 第 10 回細菌学若手

コロッセウム. 2016 年 07 月 31 日 ~ 2016 年 08 月 02 日. (群馬)

2. 美間健彦, 師岡和輝, 白川拓, 後藤和義, 山本由弥子, 横田健治, 松下治. *Vibrio alginolyticus* のコラゲナーゼ産生調節にかかわる新規転写調節因子の解析. 第 69 回日本細菌学会中国・四国支部総会. 2016 年 10 月 15 日 ~ 2016 年 10 月 16 日. (徳島)
3. 西川裕太郎, 美間健彦, 中田悠介, 波多野直哉, 後藤和義, 山本由弥子, 横田健治, 松下治. *Vibrio alginolyticus* I.029 のコラゲナーゼの発現は HapR により調節される. 第 69 回日本細菌学会中国・四国支部総会. 2016 年 10 月 15 日 ~ 2016 年 10 月 16 日. (徳島)
4. 美間健彦, 西川裕太郎, 中田悠介, 波多野直哉, 後藤和義, 山本由弥子, 横田健治, 松下治. *Vibrio alginolyticus* のコラゲナーゼ発現は HapR により調節される. 第 90 回日本細菌学会総会. 2017 年 03 月 19 日 ~ 2017 年 03 月 21 日. (仙台)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 和義 (GOTOH, Kazuyoshi)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20626593

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()