

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870115

研究課題名(和文)細菌の情報伝達とアンチセンスリボ核酸の機能解明

研究課題名(英文)Functional analysis of anti-sense RNA and signal transduction in bacteria

研究代表者

平川 秀忠(Hirakawa, Hidetada)

群馬大学・先端科学研究指導者育成ユニット・助教

研究者番号：80431758

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、様々な細菌の情報伝達を抑制する分子を発見した。これらは、アンチセンスリボ核酸と呼ばれるものである。我々は、光合成細菌や病原性細菌である腸管出血性大腸菌や緑膿菌を対象として、アンチセンスリボ核酸による情報伝達抑制のメカニズムを解明した。これらの成果により、細菌の情報伝達を標的とした新しいコンセプトを持つ感染症治療薬創出の分子基盤を作製することが可能になった。

研究成果の概要(英文)： We found molecules that represses signal transduction in bacteria. These are termed anti-sense RNA. We have the molecular mechanism of antisense RNA in photosynthetic bacterium and pathogens such as Escherichia coli and Pseudomonas aeruginosa. This studies aid us to create a new idea for anti-bacterial reagent that targets to signal transduction.

研究分野：細菌学

キーワード：クオラムセンシング 病原性 アンチセンスRNA オートインデューサー

1. 研究開始当初の背景

細菌は単細胞生物であるが、ある種の化学物質を介して細菌同士コミュニケーションを行っている。この情報伝達は、クオラムセンシングと呼ばれており、種々の細菌の多様な生理機能を制御することが近年、知られるようになった。とりわけ、病原細菌のクオラムセンシングにおいては、バイオフィルム形成や病原性、薬剤耐性などとも密接に関係していることから、医歯薬学分野で注目を浴びている。

一方で、細菌のアンチセンス RNA 研究は、未知の部分が多く、その役割や標的遺伝子の制御機構などほとんど理解されていない。しかしながら近年、次世代型シーケンサー等の RNA 検出ツールが飛躍的に発展し、当該研究分野は注目を浴びている。

2. 研究の目的

我々は、光合成細菌 *Rhodospseudomonas palustris* の *p*-Coumaroyl-homoserine lactone (*p*C-HSL)クオラムセンシング機構の解析を行ってきた過程で、レセプター遺伝子 *rpaR* に対するアンチセンス RNA を発見した。本研究では、クオラムセンシングとアンチセンス RNA の生理的意義や両者の関係、制御メカニズムについて理解を深めることを目指した。我々は、光合成土壌細菌に加えて、ヒト病原細菌である腸管出血性大腸菌 O157 と緑膿菌からアンチセンス RNA を発見し、クオラムセンシングとの関係について解析を行った。

3. 研究の方法

ノーザンブロッティングにより RNA の検出および、サイズの確認を行った。アンチセンス RNA の 5' と 3' 末端の決定は、プライマー伸長反応と 3'RACE 解析により行った。標的蛋白の検出と定量は、特異的抗体を用いたウエスタンブロッティングにより行った。クオラムセンシングの活性評価は、標的遺伝子の発現定量、表現型であるバイオフィルム形成能および、オートインデュースーシグナル産生量の定量測定により行った。

4. 研究成果

はじめに、我々は光合成細菌から発見したアンチセンス RNA (*asrpaR*) の発現とその機能解析を行った。*asrpaR* は、約 400 塩基からなり、*rpaR* 転写物の 3' 領域において塩基対を形成し、*rpaR* の翻訳を抑制した。しかしながら、*rpaR* 転写物の安定性には影響を与えなかった。これまで報告されてきたアンチセンス RNA は標的転写物のリボソーム結合部位を含む 5' 領域において塩基対を形成することで、リボソームや RNA 分解酵素の結合に影響を与える。本 RNA は、これまで提唱されていたモデルでは説明できない、全く異なる機構で標的転写物の翻訳を抑制していると考えられた。

O157 は、インドールという化合物を介してクオラムセンシングを行う。我々は、以前にインドールによって制御される遺伝子の 1 つとして *GadE* を発見した。今回、新たに我々は、*gadE* 遺伝子に対するアンチセンス RNA (*asgadE* と命名) を発見した。*asgadE* は、*gadE* mRNA の 3' 領域側と塩基対を形成し、*gadE* の翻訳を抑制することが分かった。*gadE* 同様、*asgadE* の発現もインドールによって誘導された。これらの結果から、インドールによって、*gadE* の発現誘導を介して、酸耐性や薬剤排出関連の蛋白質の発現が誘導される一方で、*asgadE* を介した負のフィードバック制御も受けていることが示唆された。さらに、我々は上記のプロジェクを行った過程で、インドール型クオラムセンシングが O157 のホスホマイシンに対する自然抵抗性を増強することも発見した。我々は、インドールがホスホマイシン輸送体 *GlpT* と *UhpT* トランスポーターの発現を低下させ、ホスホマイシンの菌体内蓄積量を低下させることで、O157 に本抗菌剤に対する抵抗性を与えることを証明した。

O157 に加えて、我々は緑膿菌からも新規アンチセンス RNA を発見した。これは、クオラムセンシングシグナル

(N-butanoyl-homoserine lactone) のレセプター遺伝子 *rhlR* に対する相補鎖転写物であるため、*asrhlR* と命名した。*asrhlR* も上記のアンチセンス RNA 同様、標的はセンス RNA である *rhlR* mRNA と塩基対を形成し、翻訳を抑制した。しかしながら、*asrhlR* の発現は、クオラムセンシング非依存的であった。恐らく、*asrhlR* は非クオラムセンシング状態において *RhlR* の発現を抑制することで、より厳密にクオラムセンシング活性をシャットダウンすることに寄与していると推測された。

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 5 件)

1. Kurabayashi K, Hirakawa Y, Tanimoto K, Tomita H, Hirakawa H: Identification of a second two-component signal transduction system that controls fosfomycin tolerance and glycerol-3-phosphate uptake. 査読有 **Journal of Bacteriology**. **197**: 861-871, **2015** doi:10.1128/JB.02491-14
2. Kurabayashi K, Hirakawa Y, Tanimoto K, Tomita H, Hirakawa H: The role of the CpxAR two-component signal transduction system in control of fosfomycin resistance and carbon substrate uptake. 査読有 **Journal of Bacteriology**. **196**: 248-256, **2014** doi:10.1128/JB.01151-13
3. Hirakawa H, and Tomita H.: Interference of bacterial cell-to-cell communication: a new concept of antimicrobial chemotherapy breaks antibiotic resistance. 査読有 **Frontiers in Microbiology**. **4**: 114, **2013**
4. 平川秀忠, 富田治芳: 「新しい細菌オートインデューサーによるクオラムセンシ

ング機構」査読無 **感染・免疫・炎症** **44**: 269-272, **2014**

5. 平川秀忠, 富田治芳: 「新規ホモセリンラクトンクオラムセンシングシグナル」査読有 **日本細菌学会誌** **68**:325-335, **2013**

[学会発表](計 14 件)(代表的なもののみ記載)

1. 平川秀忠; 社会形成による大腸菌群の薬剤耐性と病原性制御; 第 66 回日本生物工学会大会; 依頼講演; 札幌コンベンションセンター; 2014 年 9 月(招待講演)
2. 倉林久美子、平川裕子、谷本弘一、富田治芳、平川秀忠; Trimethylamine-N-oxide 感知応答 Tor システムによる腸管出血性大腸菌 O157 のホスホマイシン耐性誘導; 第 61 回日本化学療法学会東日本支部総会; 口頭発表; 東京ドームホテル; 2014 年 10 月 (**日本化学療法学会東日本支部奨励賞受賞**)
3. 平川秀忠; アシルホモセリンラクトン新規サブタイプと細菌間コミュニケーション; 日本細菌学会 第 7 回若手研究者育成のためのワークショップ「若手研究者によるバイオフィルム研究ワークショップ」; 依頼講演; 国立感染症研究所戸山庁舎; 2013 年 6 月
4. Kumiko Kurabayashi, Yuko Hirakawa, Koichi Tanimoto, Haruyoshi Tomita, Hidetada Hirakawa; Reversible Control of Fosfomycin Resistance and Carbon Substrate Uptake by Two-component Signal Transduction System; American Society for Microbiology 114th General Meeting; ポスター発表; 米国(マサチューセッツ州ボストン); 2014 年 5 月
5. Kumiko Kurabayashi, Shohei Nishioka, Takuya Matsuzawa, Naohiro Matsumoto, Shinobu Fueki, Hidetada Hirakawa; Indole Signal Induces Multidrug Tolerance in Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC); 5th

ASM Conference on Cell-Cell
Communication in Bacteria ; ポスター発表
; サンアントニオ (米国・テキサス); 20
14年10月

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0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 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
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

平川 秀忠 (HIRAKAWA, Hidetada)
群馬大学・先端科学研究指導者育成ユニッ
ト・助教
研究者番号：80431758

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：