

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15157

研究課題名(和文)腸管出血性大腸菌の病原性調節因子における転写後発現制御の網羅的解析

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of post-transcriptional control of the virulence regulators in enterohemorrhagic Escherichia coli

研究代表者

須藤 直樹 (Sudo, Naoki)

北里大学・薬学部・助教

研究者番号：50736105

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000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遺伝子群LEEの発現を制御する転写因子をコードするlerの転写後発現制御因子を、MS2タグを用いたRNA精製法を用いて同定することを目的として行った。解析の結果、ler mRNAと結合する因子としてRNA結合タンパク質Hfqを同定した。さらにHfqのdistal面のRNA結合活性がler mRNAとの結合に重要であり、その結合を介してler mRNAの翻訳が抑制されること、病原性非発現条件下、ler mRNAの翻訳抑制によりLEE全体が抑制されることを明らかにした。一方、ler mRNAと特異的に結合し、転写後制御に関与する小分子RNAは同定できなかった。

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が持つLEEの発現制御の一端を解明することができた。LEEは腸管出血性大腸菌のヒトへの感染に重要な遺伝子群であり、この制御機構を理解することは、腸管出血性大腸菌感染症を制御するための基盤的知見となる。

また、本研究ではler mRNAの精製のため、MS2タグを用いたRNA精製法を用いた。この手法によりler mRNAの制御因子としてHfqを同定し、その制御機構の解明に繋がった。このことは、MS2タグを用いたRNA精製法が被制御因子である標的mRNAから制御因子を同定するための一般的な手法になり得ることを示す。

研究成果の概要(英文)：In this study, I attempted to identify the post-transcriptional regulators of ler, which encodes the regulator of LEE essential for enterohemorrhagic Escherichia coli infection, using affinity purification of MS2-tagged RNA purification. I showed that RNA-binding protein, Hfq, binds to ler mRNA. Furthermore, Hfq inhibited translation of ler through binding of its mRNA to the distal face of Hfq. I also demonstrated that this Hfq-mediated ler repression leads to repression of all LEE-encoded genes expression under conditions where virulence genes are uninduced. On the other hand, I could not identify the small regulatory RNA, which specifically binds to and post-transcriptionally regulates ler mRNA.

研究分野：分子生物学、細菌学

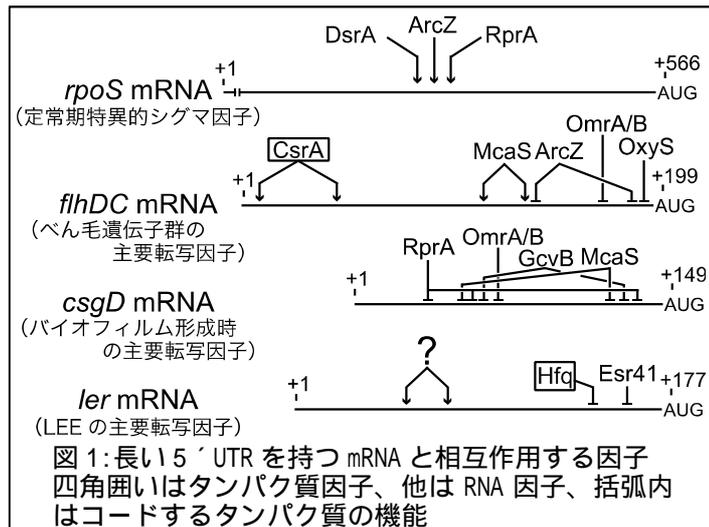
キーワード：腸管出血性大腸菌 転写後発現制御 Hfq LEE ler

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

EHECは溶血性尿毒症候群や脳症といった重症例を伴う感染症を引き起こす、临床上重要な病原性細菌である。EHECの多くは、病原性因子としてLEEと呼ばれる病原性遺伝子群を持つ。LEEには宿主細胞への接着に必要な3型分泌装置(Type 3 secretion system: T3SS)の構成因子遺伝子、及びT3SSを介して分泌され、宿主細胞に作用する分泌タンパク質の遺伝子がコードされている。LEEの発現はEHECの病原性発現に必須であり、主要転写因子Lerを介して厳密に制御されている。lerの発現は多くの転写因子によって調節されており、それらの因子によって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、これまでにlerの転写制御の研究は数多く行われてきたが、転写後制御に関してはほとんど行われていない。

細菌における転写後制御因子として、小分子RNA(small RNA: sRNA)やタンパク質性の翻訳制御因子などが知られている。これらはmRNAの5'末端非翻訳領域(5' UTR)に結合し、翻訳活性やmRNAの安定性を変化させることで、その遺伝子の発現を調節する。細菌における平均的な5' UTRの長さは、25-40ヌクレオチド(nt)であり、100 nt未満のものが約80%を占める()。一方で、転写後制御を受けるmRNAは、100 nt以上の5' UTRを持つことが多く、加えて転写因子などのレギュレーターをコードすることも多い(図1)。この2つの特徴をler mRNAは保持する(図1)。以上の背景から、ler発現にも転写後制御が関与する可能性は高い。



2. 研究の目的

本研究の目的は、ler mRNAに結合するタンパク質因子、RNA因子の網羅的な探索からlerの転写後制御因子を同定し、加えてEHECの病原性発現における同定した転写後制御因子の役割を解明することにある。さらに長期的にはler以外のLEEのレギュレーターの解析もすることで、包括的なLEE転写後制御ネットワークの解明を試みる。

3. 研究の方法

1) ler mRNAに結合する因子の精製と同定
細胞内におけるler mRNAと結合するタンパク質因子とRNA因子を同定するため、MS2タグによるRNA精製法を用いた。これはMS2ファージ由来のMS2コートタンパク質と、それと特異的に結合するRNA配列(MS2タグ)の相互作用を利用したRNA精製法である(図2)。mRNAに対してこの手法を適用した例がないため、まず条件検討を行った。次にMS2タグによるler mRNA精製を行い、ler mRNAに結合するRNA画分とタンパク質画分を取得した。

(a) RNA画分は次世代シーケンズ解析とノーザンブロットングで解析した。

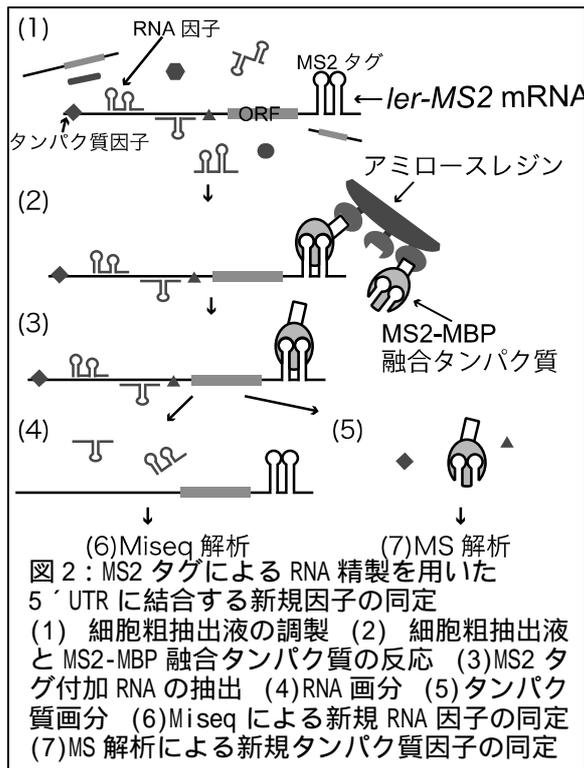
(b) タンパク質画分はSDS-PAGEによる展開とタンパク質染色による解析とウェスタンブロットングによる解析を行った。

2) 同定した因子の遺伝学的・生化学的解析とLEE以外の遺伝子への作用解析

1)で同定した因子についてlerの発現に与える影響を解析した。

(a) 同定したRNAをクローニングにより同定RNAの過剰発現プラスミドを構築し、これらの同定RNAがlerの発現に与える影響を解析した。

(b) 同定したタンパク質因子の遺伝子欠失株を構築し、タンパク質因子の欠失がlerの発現に与える影響を解析した。さらにler発現に影響が見られたタンパク質因子について、ler mRNAの結合領域、作用機構等を解析した。



4. 研究成果

1) *ler* mRNA に結合する因子の精製と同定

まずは MS2 タグによる RNA 精製法で *ler* mRNA を精製するため、条件検討を行った。MS2 タグの付加位置の検討をしたところ、*ler* mRNA の 5' 末端に MS2 タグを付加すること、MS2 タグの二次構造形成に干渉する配列を持たない位置への MS2 タグの配置が精製量の確保に重要であることがわかった。また *ler* mRNA を精製したとき、リボソームが共精製され、結合 RNA とタンパク質の解析に支障が生じた。リボソームの共精製量を減らすためリボソームの大サブユニット、小サブユニットの結合に必要なマグネシウムイオンを除去することを考え、レジンの洗浄バッファに EDTA を添加したところリボソームの共精製量を減少させることに成功した。

上記の検討を踏まえ、MS2 タグによる *ler* mRNA 精製を行い、共精製される RNA 画分とタンパク質画分を得てそれぞれ解析した。

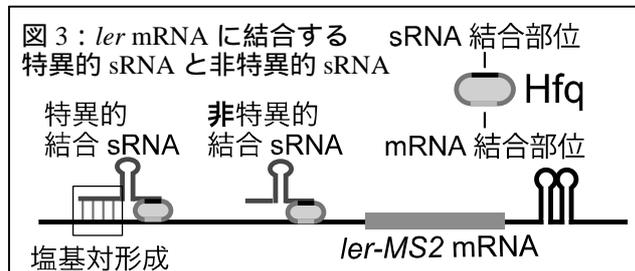
(a) RNA 画分を次世代シーケンズで解析したところ、多数の *ler* mRNA 結合 RNA を見出した。

(b) タンパク質画分を解析したところ、*ler* mRNA 結合タンパク質として RNA 結合タンパク質 Hfq を見出した。

2) 同定した因子の遺伝学的・生化学的解析と LEE 以外の遺伝子への作用解析

(a) *ler* mRNA と結合する RNA の過剰発現が *ler* の発現に与える影響を解析した結果、発現に影響を与える RNA は見出せなかった。この結果は、*ler* mRNA と非特異的に結合する RNA、もしくは *ler* mRNA に結合するタンパク質因子を介して *ler* mRNA と結合する RNA が多数存在することを示唆する。(b) に示す通り *ler* mRNA には RNA 結合活性がある Hfq が結合するため、Hfq と結合しているが *ler* mRNA とは結合していない RNA (非特異的結合 RNA) が共精製される可能性は高い (図 3)。今後は、RNA 間の架橋剤を用いることで、より特異性の高い *ler* mRNA 結合 RNA の同定を行う予定である。

(b) *hfq* 遺伝子の欠失が *ler* の発現に与える影響を解析したところ、*ler* 発現が上昇し、さらに *ler* が制御する LEE の発現も上昇した。この結果は Hfq が *ler* の発現抑制を介して LEE の発現を抑制して



いることを示し、Hfq が LEE の発現を転写後段階で抑制するという報告 () とも一致する。Hfq による *ler* 抑制の作用メカニズムを理解するため、Hfq に三ヶ所ある RNA 結合部位 (proximal 面、rim 面、distal 面) のそれぞれの変異体を構築し、各 *hfq* 変異株における *ler* 発現を解析した結果、distal 面の変異により *ler* の発現が上昇することを見出した。さらに、野生型 Hfq と distal 面の変異型 Hfq を精製し、生化学的解析を行った。In vitro 翻訳系を用いて *ler* の翻訳に与える影響を解析した結果、野生型 Hfq では *ler* の翻訳は抑制されるのに対して、distal 面の変異型 Hfq では抑制されなかった。またフットプリント法を用いて *ler* mRNA と Hfq の結合領域の同定を行ったところ、Hfq の distal 面は *ler* mRNA の翻訳開始領域周辺と結合することがわかった。これらの結果から、Hfq は、Hfq の distal 面で *ler* mRNA の翻訳開始領域に結合することで、その翻訳を抑制していることが明らかになった。さらに解析過程で、LEE のレギュレーターをコードする *grlA* も、*ler* と同様の機構で、Hfq による翻訳抑制を受けることを明らかにした。これらの結果は、学術雑誌 Molecular Microbiology に投稿中である。

<引用文献>

Kroger, C., et al. (2012) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, E1277-E1286

Hansen, A.M. and Kaper, J.B. (2009) *Molecular Microbiology*, **73**, 446-465

Shakhnovich, E.A., et al. (2009) *Molecular Microbiology*, **74**, 347-363

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 須藤直樹、伊豫田淳、関根靖彦、大西真
2. 発表標題 腸管出血性大腸菌における、RNA結合タンパク質Hfqによる病原性調節因子の発現抑制
3. 学会等名 第15回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須藤直樹、伊豫田淳、関根靖彦、大西真
2. 発表標題 RNA結合タンパク質HfqによるLEE遺伝子群発現抑制
3. 学会等名 第22回腸管出血性大腸菌感染症研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須藤直樹、小野田千鶴、齋藤大寛、竹本訓彦、秋山徹、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、大腸菌低分子RNAによる外膜ポリンの発現制御
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 須藤直樹、伊豫田淳、関根靖彦、大西真
2. 発表標題 RNA-binding protein Hfq represses the LEE expression in an sRNA-independent manner in enterohemorrhagic E. coli
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
--	---------------------------	-----------------------	----