

平成 22 年 6 月 14 日現在

研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2008～2009  
課題番号：20790348  
研究課題名(和文) 核様体蛋白質 Hha を介した病原性遺伝子発現と遺伝子再編成の制御機構  
研究課題名(英文) Regulation of virulence gene expression and genomic rearrangement by a nucleoid-associated protein Hha  
研究代表者  
山本 章治 (YAMAMOTO SHOUJI)  
国立感染症研究所・細菌第一部・研究員  
研究者番号：80469957

研究成果の概要(和文)：本研究は、腸管出血性大腸菌(EHEC)の病原性遺伝子発現制御において、核様体蛋白質 Hha の制御に関与すると考えられる蛋白質 Gr1A の作用機構を明らかにする目的で行われた。本研究によって、1) Hha 欠損株では Gr1A による病原性遺伝子の活性化能が抑圧されること、2) Gr1A は Hha の発現に影響を与えないこと、3) Hha と Gr1A の間で相互作用が検出されないこと、が明らかになった。この結果は Hha に対する Gr1A の作用が間接的であり、両者をリンクさせる因子が存在することを示唆している。

研究成果の概要(英文)：This study was done to understand the regulatory mechanism of virulence gene expression by the Hha and Gr1A proteins in enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC). This study showed that: 1) the loss of Hha suppressed the ability of Gr1A to activate virulence gene expression, 2) Gr1A had no effect on the expression of Hha, and 3) Gr1A did not interact with Hha. These results suggested that Gr1A might regulate Hha activity through unidentified factor(s).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	0	1,600,000
2009年度	1,600,000	0	1,600,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	0	3,200,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：病原因子, 遺伝子発現, 遺伝子再編成, 核様体蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

Hha は大腸菌やサルモネラ等の腸内細菌に保存される核様体蛋白質の一種であり、多くの病原性遺伝子の発現に抑制的にはたらく。これらの遺伝子が活性化するためには、Hha による抑制が解除されなければならないが、その分子機構については理解されていない。現在までの申請者らの解析によって、Hha の発現・機能調節に関連する蛋白質のひとつとして Gr1A が候補に挙がっている。Gr1A は腸管出血性大腸菌 (EHEC) のゲノムに特異的にコードされており、III 型蛋白質分泌装置など複数の病原性遺伝子の発現を活性化する。Hha 欠損下ではその活性化能が失われることから、Gr1A に依存した発現制御は Hha を介しているものと考えられる。

Hha は遺伝子の発現制御だけでなく、遺伝子の再編成にも関与しており、大腸菌ゲノムに散在した IS の転移を 10 倍から 100 倍促進する。EHEC ゲノムには 98 個の IS が存在しているが、その転移機構と生理的意義は不明である。上述した Gr1A と Hha の相互関係が正しければ、Gr1A は Hha を介してゲノムの安定性にも寄与している可能性も考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究ではまず Gr1A の Hha に対する作用機構およびそれに依存した病原性遺伝子の制御機構を分子レベルで明らかにする。第二の目標としては、Gr1A/Hha の制御下にある遺伝子を新規に同定し、その制御系の全体像を明らかにする。以上の目標が達成された場合には、Gr1A/Hha 制御と IS 転移の関連性について解析し、EHEC における遺伝子再編成の制御機構を解明することを最終目標とする。

## 3. 研究の方法

### 1) Gr1A 制御における Hha 欠損の影響

Gr1A/Hha の制御下にある 3 つの遺伝子 (*ler*: III 型蛋白質分泌系の正の制御遺伝子, *ehxC*: エンテロヘモリシンの構造遺伝子, *flhD*: 鞭毛レギュロンの正の制御遺伝子) と *lacZ* の転写融合株を染色体上で構築し、Gr1A/Hha がそれらの融合遺伝子の発現に及ぼす影響を詳細に解析した。

### 2) Gr1A の Hha 発現におよぼす影響

Gr1A 欠損下における Hha の発現量をウエスタンブロットイングによって解析した。

### 3) Hha の Gr1A 発現におよぼす影響

Hha の Gr1A 発現におよぼす影響を調べるために、Gr1A の発現 Gr1A 欠損下における Hha の発現量をウエスタンブロットイングによって解析した。

### 4) Gr1A および Hha の精製

*in vitro* での発現解析に用いるため、タグ付き蛋白質 (His タグもしくは FLAG タグ) を大腸菌細胞内で大量発現させた後、各タグに対するアフィニティー精製を行った。Hha はうまく精製できたが、Gr1A は実験に使用できるほどの純度で精製することができなかった。

### 5) Gr1A と Hha の相互作用

Gr1A と Hha の相互作用を、bacterial two-hybrid system (stratagene) もしくは pull-down 法を用いて解析した。なお、pull-down 法による相互作用の解析は、Gr1A を大量発現させた大腸菌抽出液と精製した His-Hha と混合した後、His-Hha と共精製される Gr1A を検出することによって行われた。

## 4. 研究の成果

まず、Gr1A の制御下にある 3 つの遺伝子

(*ler*, *ehxC*, *flhD*) と *lacZ* の融合遺伝子の発現解析を行った。Gr1A は *ler* と *ehxC* の転写を活性化するのに対して、*flhD* の転写を抑制する。Hha が欠損すると Gr1A による *ler::lacZ* の活性化が完全に抑圧された。一方、*ehxC::lacZ* と *flhD::lacZ* の発現に関しては、Hha 欠損下で Gr1A の効果が半分程度抑圧されるものの、完全には抑圧されなかった。以上の結果より、Gr1A は Hha を介して *ler*, *ehxC* および *flhD* の転写を制御するが、*ehxC* と *flhD* の転写制御には、Hha を介した機構に加えて、別の機構が関与することが示唆された。

次に、Gr1A と Hha の発現解析を行ったところ、両者は互いの発現に影響を与えなかった。このことから、Gr1A は Hha の発現ではなく、Hha の機能を調節しているものと推測された。

Gr1A と Hha の相互作用を bacterial two-hybrid system もしくは pull-down 法を用いて解析した。しかしながら、両者の結合を検出することができなかつたので、Gr1A の Hha に対する作用は間接的なものであると考えられた。

今後は Gr1A と Hha の間に介在する因子を同定することにより、Hha を介した病原性遺伝子の制御機構が明らかになるものと期待される。

本研究の当初の目標（1. Gr1A による Hha の作用機構の解明、2. Gr1A/Hha 制御系の全体像の解明、3. Gr1A/Hha 制御と IS 転移の関連性の把握）を達成することができなかつたものの、本研究で確立したレポーター遺伝子の染色体導入技術が、EHEC のみならず、他の細菌における遺伝子発現解析にも有用であることを示すことができた（発表論文 2, 3, 4 および 5）。

## 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. Motita M., Ohnishi M., Arakawa E., Yamamoto S., Matsushita S., Yokoyama K., Kai A., Seto K., Watanabe H., Izumiya H. Appearance and genetic diversity of El Tor *Vibrio cholerae* O1 that possess classical biotype *ctxB* among imported cases cholera in Japan. *J. Med. Microbiol.*, in press.

2. Yamamoto S., Morita M., Izumiya H., Watanabe H. Chitin disaccharide (GlcNAc)<sub>2</sub> induces natural competence in *Vibrio cholerae* through transcriptional and translational activation of a positive regulatory gene *tfoX<sup>VC</sup>*. *Gene*, in press.

3. Honda N., Iyoda S., Yamamoto S., Terajima J., Watanabe H., 2009. LrhA positively controls the expression of the locus of enterocyte effacement genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* by differential regulation of their master regulators PchA and PchB. *Mol. Microbiol.*, 74: 1393-1411.

4. Yamamoto S., Izumiya H., Morita M., Arakawa E., Watanabe H., 2009. Application of  $\lambda$  Red recombination system to *Vibrio cholerae* genetics: Simple methods for inactivation and modification of chromosomal genes. *Gene*, 438: 57-64.

5. Saitoh T., Iyoda S., **Yamamoto S.**, Lu Y., Shimuta K., Ohnishi M., Terajima J., Watanabe H., 2008. 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*. *J. Bacteriol.*, 190: 4822-4830.

[学会発表] (計 0 件)

[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 :

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

山本 章治 (YAMAMOTO SHOUJI)

国立感染症研究所・細菌第一部・研究員

研究者番号 : 80469957

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :