

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月18日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580088

研究課題名（和文） Small RNAの安定性を制御するGGDEF/EAL蛋白質の機能解析

研究課題名（英文） Functional analysis of GGDEF/EAL proteins that control the stability of small RNA

研究代表者

鈴木 一史（SUZUKI KAZUSHI）

新潟大学・自然科学系・准教授

研究者番号：00444183

研究成果の概要（和文）：細菌バイオフィルムの形成制御メカニズムを解明するため、細菌に複数存在する GGDEF/EAL 蛋白質の機能解析を行った。CsrD は c-di-GMP 非代謝型の GGDEF/EAL 蛋白質であり、増殖期によって活性を変化させて small RNA の安定性を調節することでバイオフィルム形成を制御していることが明らかとなった。一方、GGDEF 蛋白質 YliF 及び EAL 蛋白質 YliE は c-di-GMP の合成及び分解を調節することでバイオフィルム形成を制御していた。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism of bacterial biofilm formation control, we analyzed the function of the GGDEF/EAL proteins in bacteria. GGDEF/EAL protein CsrD was not involved in c-di-GMP metabolism and altered the activity in each growth phase and controlled biofilm formation by regulating the stability of small RNA. On the other hand, YliF (GGDEF protein) and YliE (EAL protein) controlled biofilm formation by regulating the synthesis and degradation of c-di-GMP.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,900,000	1,170,000	5,070,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学、応用微生物学

キーワード：大腸菌、バイオフィルム、GGDEF ドメイン、EAL ドメイン、c-di-GMP、Csr システム、small RNA

1. 研究開始当初の背景

細菌が形成するバイオフィルムが、医療や工業などの様々な分野で近年問題となっている。バイオフィルムによる医療器具の汚染や感染症、金属腐食やパイプの詰まり、食品加工時の汚染などが原因で生じる損失は、ア

メリカ合衆国において年間数十億ドルにのぼるとされる。従って、バイオフィルムのコントロールが重要な課題となってきている。バイオフィルム形成の制御については、クオラムセンシングなど様々な研究がなされているが、本研究では新しい情報伝達蛋白質

「GGDEF/EAL 蛋白質」に着目した。GGDEF/EAL 蛋白質はバイオフィーム形成を促進する新規セカンドメッセンジャー bis-(3'-5')-cyclic dimeric GMP (c-di-GMP) の代謝酵素であり、微生物学領域において近年最も注目されている研究の一つである。我々は、これとは異なり、バイオフィームを制御するが c-di-GMP 代謝活性のない GGDEF/EAL 蛋白質「CsrD」を初めて報告し、CsrD が small RNA の安定性を制御していることを明らかにした¹⁾。GGDEF/EAL 蛋白質は細菌に広く分布し、大腸菌やサルモネラなどには数十もの GGDEF/EAL 蛋白質が存在している²⁾。我々の研究によって GGDEF/EAL 蛋白質に分類される蛋白質は、単なる c-di-GMP 代謝酵素の一群ではないことが明らかとなった。

c-di-GMP と GGDEF/EAL 蛋白質の研究は欧米で大変注目され多くの研究成果が報告されているが、日本での研究報告は少ない。GGDEF/EAL 蛋白質は GGDEF ドメイン単独、EAL ドメイン単独、もしくは GGDEF と EAL の2つのドメインから構成されている。GGDEF ドメインが c-di-GMP 合成酵素であり、EAL ドメインが c-di-GMP 開環酵素であることが証明されたのは 2004 年以降である²⁾。2つの GMP がリン酸結合し環状化した c-di-GMP は、*Acetobacter* におけるセルロース合成活性化因子として 1987 年に初めて報告された³⁾。これまでの研究から c-di-GMP はバイオフィーム形成、細菌の運動性、病原性、菌体外多糖生成などを制御する新規セカンドメッセンジャーであることが分かってきた²⁾。ほとんどの GGDEF/EAL 蛋白質は二成分制御系・ヒスチジinkinナーゼに類似した膜貫通型の蛋白質であり、外界や細胞内からシグナルを受け取り c-di-GMP 代謝を調節していると考えられる²⁾。細菌のゲノム解析によって、GGDEF と EAL の2つのドメインは細菌に広く分布しており、最も大きな蛋白質ファミリーの一つであることが分かってきた。また、細菌は複数の GGDEF/EAL 蛋白質をもっており、大腸菌においては GGDEF ドメインを含む蛋白質が 19 種類、EAL ドメインを含む蛋白質が 17 種類存在している。これらのことから、複数存在する GGDEF/EAL 蛋白質によるシグナルの感知とセカンドメッセンジャー c-di-GMP の合成及び分解の制御、それに伴う c-di-GMP によるバイオフィームや病原性などの制御という、今まで知られていなかったが非常に重要な情報伝達機構が細菌に存在することが明らかとなってきた。

我々は、大腸菌の mRNA 結合蛋白質「CsrA」と2つの small RNA「CsrB 及び CsrC (CsrB/C)」からなる転写後の遺伝子発現調節システム「Csr システム」の研究を行ってきた⁴⁾。Csr システムはバイオフィーム生成、運動性、病原性、グリコーゲン合成、糖代謝

など、数多くの制御を行っている重要なシステムである^{5,6)}。CsrA はターゲットとなる mRNA に結合することにより mRNA の安定性を制御し、翻訳を調節する⁵⁾。CsrB/C RNA は近年注目されている非翻訳型 small RNA の一種であり、CsrA に結合し複合体を形成することで細胞内の CsrA 活性を抑制する。Csr システムを制御する遺伝子のスクリーニングの結果、CsrB/C RNA の安定性を制御する膜貫通型 GGDEF/EAL 蛋白質「CsrD」を発見した(図1、2)¹⁾。CsrD は特異的に CsrB/C RNA

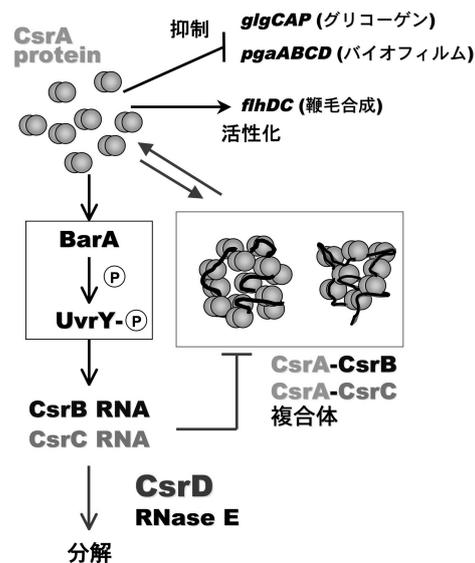


図1. Csr システムの制御回路

の安定性を変えることによって、細胞内での CsrA の活性を調節していることが分かった。しかし、CsrD は RNA 分解活性、c-di-GMP 代謝活性を示さず、さらに、非特異的に RNA に結合した¹⁾。CsrD は c-di-GMP 活性を持たない GGDEF/EAL 蛋白質として初めて報告された蛋白質であり、さらに、RNA の分解に関わるという今までの報告からは全く想像できなかった新たな機能を持っていた。

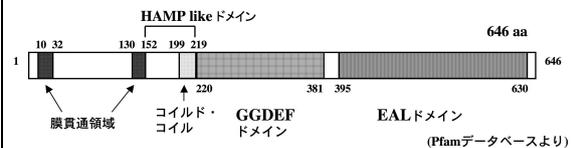


図2. CsrD のドメイン構造

GGDEF/EAL ドメインの立体構造の解析から、活性に必須なアミノ酸残基が特定され、それによって c-di-GMP 非代謝型 GGDEF/EAL 蛋白質の存在もより鮮明になってきた^{1,7)}。CsrD は何らかのシグナルを感知し、small RNA の安定性を制御するという全く新しい制御機構をもつと考えられる。この非常に興味深いメカニズムの解明に取り組むことが本研究の最大の特色である。

2. 研究の目的

“なぜ細菌は c-di-GMP 非代謝型と代謝型のしかも複数の GGDEF/EAL 蛋白質を持つ必要があるのか”という疑問に対し、c-di-GMP 非代謝型 GGDEF/EAL 蛋白質「CsrD」の機能と代謝型 GGDEF/EAL 蛋白質の相互作用と新たな機能を解明することを目的とした。c-di-GMP は細菌のセカンドメッセンジャーとして細胞内で働き、様々な細菌の生命現象に関わっていることが明らかとなっており、よって、GGDEF/EAL 蛋白質が重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。本研究によって、細菌における c-di-GMP 非代謝型と代謝型 GGDEF/EAL 蛋白質の機能が明らかとなり、細菌の生命現象の解明が進むことが期待される。

(1)大腸菌 CsrD の small RNA 安定性制御メカニズムを明らかにする。

一般的な c-di-GMP 代謝型 GGDEF/EAL 蛋白質とは異なり、CsrD が small RNA の安定性を制御するメカニズムは明らかにされていない。しかも、CsrD は情報伝達蛋白質であると考えられるため、何らかのシグナルによって small RNA の安定性が制御されていると考えられるが、このような RNA 安定性の制御機構は知られていない。よって、small RNA 安定性制御メカニズム解明に焦点を当て、以下のことを明らかにする。①CsrD ホモログ間に保存されているアミノ酸残基を部位特異的変異の手法で解析し、CsrD 活性に重要な領域・アミノ酸残基を特定する。また、c-di-GMP 代謝型 GGDEF/EAL 蛋白質との相違点を明らかにする。②CsrD 自身は RNA 分解活性を持たず、CsrB/C RNA は RNase E によって分解される¹⁾。そこで、CsrB/C RNA の RNase E による切断点の解析等、CsrB/C RNA の分解過程を明らかにする。また、CsrB/C RNA の 5'-末端や特徴的な二次構造が RNase E による分解に与える影響についても明らかにする。③CsrD は膜貫通型の情報伝達蛋白質であり、シグナルを感知して活性が変化すると考えられる。シグナル伝達に関与するペリプラズム領域や HAMP-like ドメインの解析を行い、シグナルによる small RNA 安定性制御を明らかにする。

(2)大腸菌 c-di-GMP 代謝型 GGDEF/EAL 蛋白質のバイオフィーム制御メカニズム及び新たな機能を明らかにする。

細菌には c-di-GMP 合成酵素と分解酵素がほぼ同数存在し、また、c-di-GMP の合成・分解が細胞内の局所で行われていると予測されていることから、我々は“c-di-GMP 合成酵素と分解酵素は局所で相互作用している”との仮説を立てている。そこで、c-di-GMP 合成酵素と分解酵素の最適な組み合わせについて調べ、これらの酵素間の相互作用について

明らかにする。

引用文献

- 1) Suzuki, K. et al. (2006) Genes & Dev. 20:2605-2617.
- 2) Römling, U. et al. (2005) Mol. Microbiol. 57:629-639.
- 3) Ross, P. et al. (1987) Nature. 325:279-281.
- 4) Suzuki, K. et al. (2002) J. Bacteriol. 184:5130-5140.
- 5) Romeo, T. (1998) Mol. Microbiol. 29:1321-1330.
- 6) Wang, X. et al. (2005) Mol. Microbiol. 56:1648-1663.
- 7) Rao, F. et al. (2008) J. Bacteriol. 190:3622-3631.

3. 研究の方法

(1)大腸菌 c-di-GMP 非代謝型 CsrD の small RNA 安定性制御メカニズムの解明

①CsrD の GGDEF/EAL 及び HAMP-like ドメインの解析：CsrD ホモログに保存されている複数のアミノ酸残基をアラニン残基に置換した結果、HAMP ドメイン類似の HAMP-like ドメイン及び GGDEF ドメインの N 末端側の領域が重要であることが明らかとなってきた。そこで、引き続き CsrD ホモログに保存されているアミノ酸残基を複数選択し、アラニン残基に置換した。野生型及び変異型 *csrD* 遺伝子がクローン化されたプラスミドを *csrD* 欠損株に導入し、バイオフィーム形成量、グリコーゲン生成量、*csrB* 発現量 (*csrB-lacZ*) を測定することで変異の影響を調べた。さらに、変異型 CsrD 発現株の培養液にリファンピシンを添加することで転写を阻害し、一定時間ごとのサンプリング及び RNA 調製後、ノーザンブロットにより CsrB RNA を検出することで CsrB RNA の半減期を測定した。これらの方法により CsrB RNA の安定性に対する CsrD への変異導入の影響をより詳細に解析した。

②CsrB/C RNA の分解過程の解析：エキソヌクレアーゼである PNPase の欠損株 *pnp Δ 683* において、CsrB RNA の分解中間産物が認められた。これらは RNase E によって切断された後、PNPase による分解を受けなかった RNA 断片であると考えられた。これらの RNA 断片（分解中間産物）が CsrB のどの領域に相当するかを明らかにするためノーザンブロット及びプライマーエクステンションによる解析を行った。さらに、これらの RNA 断片の 3'-末端を 3'-RACE 法によって決定した。これによって RNase E によると考えられる CsrB の切断部位を予測した。さらに、RNase E や PNPase 以外の各種リボヌクレアーゼ変異株における CsrB RNA の半減期を測

定し、これらリボヌクレアーゼの CsrB RNA 分解への関与を調べた。

③CsrB RNA の安定性に影響を与える配列・二次構造：RNase E による RNA 認識に影響を与える可能性のある 5'-末端の二本鎖部分及び CsrB RNA に特徴的な複数のステムループ構造に欠損や変異を導入し、種々の変異 CsrB RNA 発現プラスミドを構築した。それら変異 CsrB RNA を発現するプラスミドを *csrB* 欠損株に導入し、バイオフィーム形成量、グリコーゲン生成量、*csrB* 発現量 (*csrB-lacZ*) を測定し、変異 CsrB RNA による影響を調べた。さらに、これら変異 CsrB RNA の半減期をノーザンブロットにより測定し、安定性への影響を調べた。

④培養条件による CsrB/C RNA の半減期変化：既に予備実験で増殖期の違いによる CsrB/C RNA の半減期の変化が認められている。これは、培養条件によって CsrD の活性が変化し、その結果 CsrB/C RNA の半減期が変化したためと考えられた。そこで、対数増殖期、対数増殖期から定常期への移行期、定常期における CsrB RNA の半減期をノーザンブロットにより測定した。

(2)大腸菌 c-di-GMP 代謝型 GGDEF/EAL 蛋白質のバイオフィーム制御メカニズムの解明及び新機能の解析

①機能不明 c-di-GMP 代謝酵素の評価：大腸菌に存在する 29 の GGDEF/EAL 蛋白質のうち、機能不明でありしかもオペロンを形成しているなど GGDEF 蛋白質と EAL 蛋白質間の相互作用が予測される 10 遺伝子を選択し、クローン化した。これら大腸菌で発現させ、バイオフィーム形成、運動性など、c-di-GMP 代謝によると考えられる表現型を観察した。

②c-di-GMP 合成酵素と分解酵素の組み合わせ：10 遺伝子の評価の結果、GGDEF 蛋白質 YliF 及び EAL 蛋白質 YliE を選択した。YliE と YliF の相互作用の可能性を調べるため、大腸菌 Two-hybrid system によって解析した。YliE 及び YliF の c-di-GMP 代謝活性を確認するため、活性に必須なアミノ酸残基からなるモチーフを改変した変異 YliE 及び YliF を構築してプラスミド上で発現させ、変異 YliE 及び YliF 発現株のバイオフィーム形成や運動性を野生型と比較した。また、YliE 及び YliF が制御する因子を特定するため、細胞外多糖 poly-N-acetylglucosamine (PGA) の生産を行う *pgaABCD* 遺伝子への関与を調べるとともに、付着性因子生産への影響を確認するため CR binding assay を行った。

4. 研究成果

(1)大腸菌 c-di-GMP 非代謝型 CsrD の small RNA 安定性制御メカニズムの解明

c-di-GMP 非代謝型 GGDEF/EAL 蛋白質

「CsrD」の small RNA の安定性制御に重要なアミノ酸残基を見いだすため、部位特異的変異によってアミノ酸残基を置換した変異 CsrD を構築し解析を行った。CsrD ホモログには保存され、典型的な GGDEF/EAL タンパク質には保存されていないアミノ酸残基を中心に選択し、アラニン残基（一部ロイシン残基）に置換した。変異 CsrD の活性をバイオフィーム形成、*csrB-lacZ* 発現、グリコーゲン合成により測定し、野生型 CsrD と比較した。その結果、HAMP-like ドメインと GGDEF ドメインの N 末端領域に存在するアミノ酸残基の置換によって CsrD の活性が失われるかあるいは低下した。GGDEF または EAL ドメインの欠損によって CsrD の活性は失われるが、GGDEF/EAL ドメイン内のアミノ酸残基置換によって活性が低下する変異体はごくわずかであった。よって、HAMP-like ドメインとそれに続く GGDEF ドメインの N 末端領域が CsrD の活性に重要であることが明らかとなった。二次構造の予測からこの領域は長い α -ヘリックス構造になっていると考えられた。これら変異 CsrD のうち、CsrD の活性が顕著に低下した 15 の変異 CsrD を選択し、CsrB RNA の半減期を測定した。その結果、予測通り CsrB RNA の半減期は長くなったものの、変異体によって差がみられた。さらに、対数増殖期、移行期、定常期の各増殖段階における CsrB RNA の半減期を調べた結果、CsrB RNA の半減期のパターンが、変異体によって異なることが明らかとなった。このような増殖段階における半減期の違いを示した変異体は、CsrD の膜貫通領域と GGDEF ドメインの間に存在する HAMP-like ドメインのアミノ酸残基を置換したものであった。よって、この領域が CsrB RNA の分解調節に重要な役割を果たしていると考えられた。

各種 RNase 変異株における CsrB RNA の半減期をノーザンブロットによって調べた結果、CsrB RNA の分解にはエンドヌクレアーゼである RNase E が必須であり、完全分解にはエキソヌクレアーゼである PNPase が必要であることがわかった。PNPase 及びエキソヌクレアーゼ RNase II 遺伝子の二重変異株の解析から、RNase II は CsrB 分解に関与するが、必須ではないと考えられた。

PNPase 欠損株である *pnp* Δ 683 株において複数の CsrB RNA 分解中間産物が確認される。CsrB RNA の 5'及び 3'末端側のプローブによるノーザンブロットとプライマーエクステンションによる解析によって、これら分解中間産物の 5'末端は野生型 CsrB RNA と一致し、3'末端が異なっていることが明らかとなった。CsrB RNA 分解中間産物の 3'-末端を 3'-RACE 法によって決定した結果、3'末端は 9 つの領域（グループ A~I）に分類され、主要な分解中間産物は 5'-末端から 250 塩基付近までの

ものであった。*pnp* Δ 683 株で認められる分解中間産物は、最初に RNase E によって分解された後、PNPase による分解を受けずに蓄積したと考えられた。

3'-RACE 法による解析で得られた 3'-末端は、RNase E による切断で生じた末端であると予測された。その多くが CsrB RNA に特徴的なステムループの 3'末端側であった。これらステムループ構造のループ部分には CsrA 結合配列 CAGGA(U/A/C)G が存在する。そこで、CsrB RNA に複数存在するステムループ構造を削除した各種変異 *csrB* 遺伝子をプラスミドにクローン化して *csrB* 欠損株で発現させ、バイオフィーム形成量、グリコーゲン生成量、*csrB* 発現量 (*csrB-lacZ*) を測定することで変異の影響を調べた。さらに、ノーザンブロットにより半減期を測定した。CsrB 変異体の作製にあたっては変異 CsrB の二次構造を m-fold により予測し、既存のステムループ構造に変化が認められないことを確認した。これらの結果、ターミネーターのステムループ構造直前の一本鎖領域が存在しない場合、その変異 CsrB RNA の半減期が極端に長くなることが明らかとなった。よって、この領域が CsrB 分解に重要であり、RNase E による CsrB RNA の切断開始領域である可能性が示唆された。CsrD は RNase E による CsrB RNA の最初の切断に影響を及ぼすと考えられる。

(2)大腸菌 c-di-GMP 代謝型 GGDEF/EAL 蛋白質のバイオフィーム制御メカニズムの解明及び新機能の解析

大腸菌 MG1655 株において、機能未知の GGDEF/EAL 蛋白質をコードする 10 種の遺伝子をクローン化し、それらの過剰発現株でバイオフィーム形成量や運動性を調べた。その結果、GGDEF 蛋白質 YliF 及び EAL 蛋白質 YliE で顕著な差が表れ、以後は YliE 及び YliF について解析することとした。YliE はバイオフィーム形成量を減少させ、運動性を増加させた一方、YliF はバイオフィーム形成量を増加させ、運動性を減少させた。c-di-GMP はバイオフィーム形成量を増加させ、運動性を減少させることから、YliE と YliF はそれぞれ c-di-GMP の分解、合成活性を示すと考えられた。*yliE*, *yliF* は遺伝子の配置からオペロンを形成していることが示唆され、それぞれがバイオフィーム形成量と運動性において反対の表現型を示したことから、大腸菌に複数存在する GGDEF/EAL 蛋白質のうち、YliE と YliF が対となって機能している可能性が示唆された。大腸菌には 29 もの GGDEF/EAL 蛋白質が存在し、GGDEF 蛋白質と EAL 蛋白質がほぼ同数となっている。我々は、GGDEF 蛋白質と EAL 蛋白質の組み合わせが存在し、これらが相互作用をすることによって細胞局所で c-di-GMP の合成分解を行い、特異的

な作用を示しているとの仮説を立てている。そこで、YliE-YliF 間の相互作用を調べるため、Two-hybrid system による解析を進めている。

YliE、YliF がバイオフィーム形成に与える影響を調べた結果、CR binding assay により YliE の過剰発現株で付着性が減少した。よって、YliE は付着因子生産を抑制することによりバイオフィーム形成量を減少させる可能性が示唆された。また、バイオフィームの主成分である細胞外多糖、poly-N-acetylglucosamine (PGA) の生産に関与する遺伝子 *pgaABCD* オペロン依存的にバイオフィーム形成量を増加させた。

YliE 及び YliF による表現形が c-di-GMP の代謝活性によるものかを調べるため、部位特異的変異導入により YliE の EAL モチーフを AAL に、YliF の GGDEF モチーフを GGAAF に変化させ c-di-GMP 代謝活性を欠損させた変異体を作製した。それら変異体が導入された株は、バイオフィーム形成量、運動性、付着因子生産などの表現型が野生型の YliE 及び YliF とは異なる結果を示した。これらの結果から、YliE と YliF は c-di-GMP を分解・合成することで、バイオフィーム形成、運動性等に影響を与えていると考えられた。

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)

[学会発表] (計 6 件)

①高橋優介, 岡山明裕, 伊藤学, 杉本華幸, 渡邊剛志, 鈴木一史. 大腸菌における GGDEF-EAL ドメインタンパク質 CsrD による small RNA 半減期の調節. 日本農芸化学会 2012 年度大会. 2012 年 3 月 24 日. 京都女子大学 (京都市)

②塚田海斗, 渡部大樹, 杉本華幸, 渡邊剛志, 鈴木一史. 大腸菌における GGDEF/EAL ドメインタンパク質の機能解析. 日本農芸化学会 2012 年度大会. 2012 年 3 月 24 日. 京都女子大学 (京都市)

③鈴木一史, 岡山明裕, 伊藤学, 渡邊剛志, Tony Romeo. 大腸菌における CsrB RNA 分解中間産物の解析. 第 12 回日本 RNA 学会. 2010 年 7 月 28 日. 一橋記念講堂(東京都千代田区)

④鈴木一史, 岡山明裕, 伊藤学, 渡邊剛志, Tony Romeo. Analysis of turnover of the global regulatory RNA CsrB in *Escherichia coli*. American Society for Microbiology 110th General Meeting. 2010 年 5 月 26 日. San Diego Convebtion Center (San Diego, California, アメ

リカ合衆国)

⑤鈴木一史, 伊藤学, 岡山明裕, 水野孝彦, 渡邊剛志, Tony Romeo. 大腸菌 CsrB RNA の分解機構. 日本農芸化学会 2010 年度大会. 2010 年 3 月 28 日. 名城大学 (名古屋市)

⑥Kazushi Suzuki, Manabu Ito, Takeshi Watanabe, and Tony Romeo. Analysis of CsrB small RNA decay in *Escherichia coli*. 第 32 回日本分子生物学会年会. 2009 年 12 月 12 日. パシフィコ横浜 (横浜市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.agr.niigata-u.ac.jp/~ksuzuki/App1Micro/Welcome.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 一史 (SUZUKI KAZUSHI)
新潟大学・自然科学系・准教授
研究者番号: 00444183

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号:

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号:

(4) 研究協力者

Romeo, Tony
フロリダ大学・微生物・細胞科学・教授