

令和 6 年 6 月 22 日現在

機関番号：26301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07004

研究課題名(和文) 機能性sRNAとmRNA結合タンパク質CsrAによる統合型発現制御システムの解明

研究課題名(英文) Integrated regulatory system by functional sRNA and mRNA-binding protein CsrA

研究代表者

美間 健彦 (Mima, Takehiko)

愛媛県立医療技術大学・保健科学部・教授

研究者番号：80596437

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：VarS/VarA二成分制御系によって調節される複数のsmall RNA (sRNA) は、単純なコピーであり冗長と考えられてきた。本研究により、*Vibrio alginolyticus*が保有する4つのsRNAのうちの一つ(sRNA1)の発現が、ArcB/ArcA二成分制御系を介した嫌気状態のシグナルおよびLrpを介したロイシンのシグナルによって調節されることが明らかとなった。この結果から、細菌が保有する複数コピーのsRNAとRNA結合タンパク質CsrAからなる調節系は、複数の環境シグナルを統合して演算し、多数の標的遺伝子の発現を最適化する統合制御システムであるというモデルを提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、これまでVarS/VarA二成分制御系の構成因子とされていた複数コピーのsRNAが、他の複数の環境シグナルによっても別々に制御されることを初めて示した。その結果から、それら複数コピーのsRNAとRNA結合タンパク質CsrAからなる制御系が、複数の環境シグナルを統合して演算し、環境の変化に適応するための複数の標的遺伝子の発現を統合的に調節する(multiple-input and multiple-output)という全く新しい発現調節機構(sRNAs-CsrA統合制御システム)であると考えられることを示した学術的意義の大変高いものである。

研究成果の概要(英文)：VarS/VarA two-component regulatory system controls the expression of target genes through regulating the transcription of small RNAs (sRNAs). Bacteria possesses several copies of sRNA genes which were thought to be redundant. *Vibrio alginolyticus* possesses four copies of sRNAs. We have found the possibility that different proteins regulate the expression of their respective sRNAs. This study revealed that the expression of one of the four sRNAs, sRNA1, is regulated by the anaerobic state signal via ArcB/ArcA two-component regulatory system and leucine signals via Lrp. Based on these results, we proposed a model in which the regulatory system consisting of the multiple copies of sRNAs and an mRNA-binding protein CsrA is an integrated regulatory system that integrates multiple environmental signals to optimize the expression of target genes.

研究分野：細菌学

キーワード：発現調節 sRNA RNA binding protein *Vibrio*

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌は、個々の細胞が環境に直接曝されているため、環境の変化に応じて遺伝子発現を調節し新たな環境に適応する必要がある。そのための分子機構の一つとして、二成分制御系が知られている。二成分制御系は、細胞質膜に存在するセンサー・キナーゼによって環境を感知し、そのシグナルを細胞内の転写因子であるレスポンス・レギュレーターに伝達して標的遺伝子の発現を調節する。細菌は、様々な環境変化に適応するため多数の二成分制御系を有している。

一般的な二成分制御系では、レスポンス・レギュレーターが、標的遺伝子のプロモーター領域に結合して直接に転写を調節する。他方、二成分制御系には、より複雑な機構を介して間接的に標的遺伝子の発現を調節するものがある。多様な環境に適応したグラム陰性細菌(大腸菌、*Vibrio* 属菌や *Pseudomonas* 属菌等)で広く保存されている VarS/VarA 二成分制御系は、まず機能性 small RNA (sRNA) の転写を調節する。次に、sRNA は、標的遺伝子の mRNA の Shine-Dalgarno (SD) 配列に結合してリボソームの結合を阻害することで翻訳を OFF にする RNA 結合タンパク質 CsrA を吸着する(プロテイン・スポンジ)。その結果、CsrA が標的遺伝子の mRNA から遊離して、翻訳が ON になる。上記菌種は複数の sRNA を有するが、それらは冗長なコピー(redundant)で機能は同じと考えられてきた。

V. alginolyticus は、海水中に free-living に存在する状態と、宿主に感染した状態で遺伝子発現パターンを大きく変える必要がある。我々は、本菌が 4 つの sRNA (sRNA1、sRNA2、sRNA3、sRNA4) を有することを明らかにした。さらに、これら 4 つの sRNA の転写が、VarS/VarA 系以外の調節を受けることを示唆する結果を得た。それぞれの sRNA の転写調節に関わるタンパク質をプルダウン法により探索したところ、各 sRNA プロモーターに特異的に結合するバンドを見出した。この結果は、各 sRNA の転写がそれぞれ異なるタンパク質によって調節されることを示唆している。それらのうちの一つを解析した結果、嫌気呼吸に関わる遺伝子の発現をグローバルに調節する二成分制御系 ArcB/ArcA のレスポンス・レギュレーター ArcA と推定された。精製 ArcA の各 sRNA プロモーター領域への結合を調べたところ、ArcA は sRNA1 のプロモーター領域にのみ特異的に結合した。さらに、ArcA が嫌気条件下でのみ sRNA1 の発現を調節する可能性を示す結果も得られた。これらより、ArcA は嫌気シグナルによって sRNA1 の転写を特異的に調節すると考えられる。これらの結果は、これまで単一のシグナルにより同等に調節されると考えられてきた sRNA の転写が、多数の環境シグナル伝達系によって調節されることを示している。さらに、これまで冗長なコピーと考えられてきた複数の sRNA が、それぞれ異なる環境シグナルによって調節されている可能性が示された。

2. 研究の目的

本研究の目的は、これまで冗長であると考えられてきた VarS/VarA 二成分制御系によって制御される複数コピーの sRNA が、複数の環境シグナルを統合して複数の遺伝子の発現パターンをグローバルに調節する分子機構の全容を明らかにすることである。これまでに sRNA1 のプロモーター領域に特異的に結合することが明らかとなった ArcA について、ArcB/ArcA 二成分制御系による sRNA1 の調節機構を明らかにする。さらに、sRNA1 のプロモーター領域に特異的に結合するとして同定された Lrp について、sRNA1 の調節機構を解明する。

3. 研究の方法

(1) ArcB/ArcA 二成分制御系による sRNA1 の発現調節

arcB 欠失株は、相同組換えにより作製した。PCR により *arcB* を欠失させた DNA 断片を構築し、遺伝子破壊用ベクター pOU531 に挿入した (pOU634)。野生株 I.029 株に pOU634 を接合伝達により導入し、相同組換えを 2 回おこなった後、*arcB* を欠失した株を PCR により選択した。sRNA の発現量は、定量 RT-PCR により測定した。sRNA の転写活性は、 β -galactosidase レポーターアッセイにより測定した。sRNA のプロモーター領域を PCR により増幅し、得られた DNA 断片を β -galactosidase レポーターベクター pHRP309 に挿入した (pOU444)。pOU444 を接合伝達してレポーター株を作製し、 β -galactosidase アッセイを行った。

(2) Lrp による sRNA1 の発現調節

lrp 欠失株は、相同組換えにより作製した。PCR により *lrp* を欠失させた DNA 断片を構築し、遺伝子破壊用ベクター pXAC623 に挿入した (pOU150)。野生株 I.029 株に pOU150 を接合伝達により導入し、相同組換えを 2 回おこなった後、*lrp* を欠失した株を PCR により選択した。Lrp の生産と精製は、Cold Shock Expression システムを用いて行った。*lrp* 遺伝子を PCR により増幅し、pCold II ベクターに挿入した (pOU667)。大腸菌 BL21 株を pOU667 で形質転換した。得られた形質転換株を LB 培地で濁度 (OD₆₀₀) が 0.4~0.5 になるまで 37℃ で振盪培養した後、終濃度が 1 mM となるように IPTG を添加し、15℃ で 24 時間振盪してタンパク質の発現を誘導した。培養液

より菌体を回収し、French press (10,000 psi) により菌体を破碎した。Ni-NTA アガロースを用いたアフィニティークロマトグラフィーにより、His-tag 融合 Lrp を精製した。Lrp の sRNA1 上流領域の DNA 断片への結合は、ゲルシフト法により調べた。

4. 研究成果

(1) ArcB/ArcA 二成分制御系による sRNA1 の発現調節

Vibrio alginolyticus の 4 つ sRNA の発現を調節するタンパク質を探索した結果、sRNA1 のプロモーター領域に結合するタンパク質として、ArcB/ArcA 二成分制御系のレスポンス・レギュレーターである ArcA が見出された。これまでに、sRNA1 の発現が ArcA によって調節されることを示した。ArcB/ArcA 二成分制御系は、大腸菌などの他の細菌において、嫌気条件に適応するための遺伝子の発現を調節することが知られている。そこで、好気条件および嫌気条件での、ArcA による sRNA1 の発現調節を調べた結果、ArcA は嫌気条件下で sRNA1 の発現を調節することが明らかになった。ArcA が sRNA1 の発現を制御したことから、センサー・キナーゼである ArcB も sRNA1 の発現調節に関わると予想された。そこで、*arcB* 遺伝子欠失株を作製して、*arcB* が sRNA1 の発現調節に関わるか調べた。その結果、*arcB* 欠失株では、*arcA* 欠失株と同様に、親株株と比較して、嫌気条件での sRNA1 の転写活性が低下し、発現量が減少した (図 1)。この結果から、ArcB/ArcA 二成分制御系は、嫌気状態を感知し、sRNA1 の発現を制御することが明らかとなった。本結果は、VarS/VarA-sRNAs-CsrA 制御系の構成因子である sRNA の発現が、他の制御系によっても制御されることを示した初めての結果である。

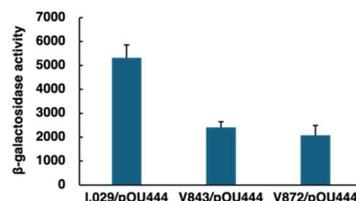


図 1. 野生株 I.029、*arcA* 欠失株 V843 および *arcB* 欠失株 V872 中の sRNA1 の転写活性

(2) Lrp による sRNA1 の発現調節

Vibrio alginolyticus の 4 つ sRNA の発現を調節するタンパク質を探索した結果、sRNA1 のプロモーター領域に結合するタンパク質として、Leucine-responsive regulator (Lrp) が見出された。そこで、*lrp* 欠失株を作製して sRNA1 の発現量を親株と比較した結果、2.3 倍に増加した (図 2)。*lrp* 欠失株に *lrp* 発現プラスミドを導入したところ、sRNA1 の発現量が約 1/3 に減少した。以上より、Lrp が sRNA1 の発現を調節することが明らかとなった。次に Lrp を His-tag 融合タンパク質として精製して、ゲルシフト法により sRNA1 のプロモーター領域の結合を調べた。その結果、反応液に添加した精製 Lrp の量に依存して sRNA1 プロモーター領域の DNA 断片のシフトが観察された。この結果から、Lrp が sRNA1 のプロモーター領域に結合することが明らかとなった。*lrp* の上流領域の塩基配列を解析した結果、大腸菌の Lrp 結合部位のコンセンサス配列に高い類似性を示す領域が 1 ヶ所同定された。以上より、Lrp は sRNA1 のプロモーター領域に存在する Lrp 結合配列に結合して、その発現を調節すると考えられた。Lrp はその名が示す通り、ロイシンの存在を感知して遺伝子発現を調節する転写因子である。sRNA1 の発現が Lrp によって調節されたことから、sRNA1 の発現量がロイシンによって調節される可能性が考えられた。そこで、ロイシンを添加した培地で野生株を培養したところ、sRNA1 の発現量が 2 倍に増加した。一方、*lrp* 欠失株では培地へのロイシン添加による sRNA1 の発現量に変化は見られなかった。さらに、Lrp の sRNA1 プロモーター領域への結合に対するロイシンの影響をゲルシフト法により調べた。その結果、反応液中に添加したロイシンの濃度に依存して、シフトしたバンドの量が減少した。一方、反応液中へのイソロイシンの添加ではシフトしたバンドの量に変化は見られなかった (図 3)。これより、Lrp の sRNA1 プロモーター領域への結合がロイシンによって阻害されることが明らかとなった。以上より、Lrp は、ロイシン非存在下ではプロモーター領域に結合して sRNA1 の発現を抑制しており、ロイシンが結合すると sRNA1 のプロモーターから外れ sRNA1 の発現が脱抑制されると考えられる。

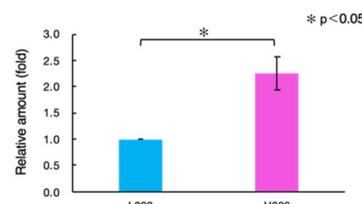


図 2. 野生株 I.029 および *lrp* 欠失株 V386 中の sRNA1 発現量

細菌が保有する VarS/VarA 二成分制御系が調節する複数コピーの sRNA は、冗長なコピー (redundant) であり、機能に差は無いと考えられてきた。(1)と(2)の結果から、*V. alginolyticus* が保有する 4 つの sRNA のうち一つ (sRNA1) の発現が、ArcB/ArcA 二成分制御系を介した嫌気シグナルおよび Lrp を介したロイシン・シグナルによって調節されることが明らかとなった。これらの結果から、我々は、複数の sRNA と CsrA よりなる調節系は、複数の環境シグナル (入力) を統合して演算し、多数の標的遺伝子の発現 (出力) を最適化する制御システム (sRNAs-CsrA 統

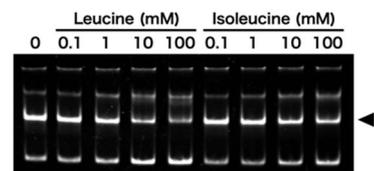


図 3. Lrp の sRNA1 上流領域 DNA 断片への結合に対するロイシンおよびイソロイシンの影響

(3) sRNAs-CsrA 統合制御システム

細菌が保有する VarS/VarA 二成分制御系が調節する複数コピーの sRNA は、冗長なコピー (redundant) であり、機能に差は無いと考えられてきた。(1)と(2)の結果から、*V. alginolyticus* が保有する 4 つの sRNA のうち一つ (sRNA1) の発現が、ArcB/ArcA 二成分制御系を介した嫌気シグナルおよび Lrp を介したロイシン・シグナルによって調節されることが明らかとなった。これらの結果から、我々は、複数の sRNA と CsrA よりなる調節系は、複数の環境シグナル (入力) を統合して演算し、多数の標的遺伝子の発現 (出力) を最適化する制御システム (sRNAs-CsrA 統

合制御システム)であるというモデルを提唱している(図4)。従来、遺伝子発現調節は、ラクトースオペロンに代表されるように、一つのシグナル(ラクトース)による一つのオペロン(-ガラクトシダーゼ等)の転写レベルの調節(single-input and single-output)の積み重ねとして理解されてきた。sRNAs-CsrA 統合制御システムは、複数の環境シグナルを統合し、複数の遺伝子の発現を翻訳レベルで統合的に調節する(multiple-input and multiple-output)という全く新しい発現調節機構であると考えられる。

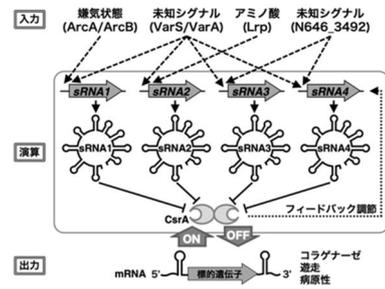


図4. sRNAs-CsrA統合制御システムのモデル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mayura I. Putu Bayu, Gotoh Kazuyoshi, Nishimura Hayato, Nakai Erina, Mima Takehiko, Yamamoto Yumiko, Yokota Kenji, Matsushita Osamu	4. 巻 65
2. 論文標題 Elizabethkingia anophelis, an emerging pathogen, inhibits RAW 264.7 macrophage function	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Microbiology and Immunology	6. 最初と最後の頁 317 ~ 324
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1348-0421.12888	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松下 治、美間健彦、後藤和義、山本由弥子、横田憲治
2. 発表標題 Vibrio alginolyticusのsmall RNAの発現調節機構の解明
3. 学会等名 2021年度中四国乳酸菌研究会・研究発表会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 美間健彦、Agus Eka Darwinata、後藤和義、山本由弥子、松下 治
2. 発表標題 Regulation of expression of the VarS/VarA-controlled sRNA by ArcA in Vibrio alginolyticus.
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 美間健彦、後藤和義、山本由弥子、横田憲治、松下 治
2. 発表標題 Vibrio alginolyticusのArcB/ArcA二成分制御系による sRNA1の発現調節機構の解析
3. 学会等名 第75回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 美間健彦、藤井 萌、後藤和義、山本由弥子、横田憲治、松下 治
2. 発表標題 Regulation of sRNA1 expression by ArcB/ArcA two-component regulatory system in <i>Vibrio alginolyticus</i> .
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 細菌性コラゲナーゼの構造活性相関の解析
2. 発表標題 Md Asaduzzaman、美間健彦、後藤和義、山本由弥子、内山淳平、Joshua Sakon、松下 治
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 猪飼まりえ、熊懷香葉、平田 直、藤井 萌、坂入孔明、美間健彦、森田雄二、佐藤綾人、港 雄介
2. 発表標題 細菌代謝機構を標的とした抗菌化合物のスクリーニング
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 藤井 萌、横田憲治、美間健彦
2. 発表標題 <i>Vibrio alginolyticus</i> のArcB/ArcA二成分制御系による遊走制御機構の解析
3. 学会等名 第76回日本細菌学会中国・四国支部総会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

愛媛県立医療技術大学ウェブサイト
https://www.epu.ac.jp/graduate/health_sciences/in-mima.html

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
研究分担者	港 雄介 (Minato Yusuke) (10836620)	藤田医科大学・医学部・講師 (33916)	

	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
研究協力者	松下 治 (Matsushita Osamu) (00209537)	岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授 (15301)	
研究協力者	ジョシュア サコン (Joshua Sakon)	アーカンソー大学・教授	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------