

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590531

研究課題名(和文) 桿菌の形態形成に関わる細胞骨格蛋白 RodZ と赤痢菌病原遺伝子発現の解析

研究課題名(英文) Analysis for role of bacterial cytoskeleton RodZ on virulence gene expression of Shigella type III secretion system

研究代表者

三戸部 治郎 (Mitobe, Jiro)

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官

研究者番号：40333364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：桿菌の桿状構造を形成するバクテリア細胞骨格の RodZ 蛋白が、赤痢菌の病原性に作用することを発見した。rodZ 遺伝子を破壊した赤痢菌では病原遺伝子の mRNA の安定性が増加することから、RodZ 蛋白が mRNA に結合することが分かった。結合には塩基性アミノ酸群が必要であることを示すことで、RodZ の形態形成以外の機能として RNA 結合能を持つことを初めて報告した。さらに RodZ は膜蛋白にも関わらず、他の RNA 結合蛋白 Hfq のように 6 量体を形成していることを見出した。

研究成果の概要(英文)：Bacterial cytoskeleton RodZ was isolated as a factor affecting virulence gene expression of Shigella sonnei. Messenger RNA of the virulence gene was highly stabilized in the deletion mutant of rodZ gene and consistently purified RodZ protein bound to the RNA probe. Finding of amino-acids cluster essential for RNA binding indicated that RodZ has two distinct functions for RNA binding and cell-shape formation. We also found the membrane protein RodZ existed as homohexamer similar to another RNA binding protein Hfq.

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：病原性 バクテリア細胞骨格 転写後制御 RNA 結合蛋白 III 型分泌装置 赤痢菌

1. 研究開始当初の背景

(1) 赤痢菌は大腸菌に近縁のグラム陰性桿菌で、その病原因子であるIII型分泌装置によって、ヒトの腸管上皮に侵入・増殖し血性下痢を起こす。

我々は国立感染症研究所・細菌第一部の研究業務として赤痢菌のIII型分泌装置を調べ、そのレギュレーター *invE* (*virB*) の発現が、宿主の体温より低い 30 °C で転写後制御によって抑制されること、細菌の主要なRNA結合蛋白 *hfq* の欠損変異株では *invE* の mRNA が安定化することで、この抑制が失われることを報告してきた。

(2) この転写後制御は、平成 17-18 年度に文部科研究費 (若手B) の援助を受けた研究でも見いだされ、二成分制御系のセンサー *cpxA* の欠損株では *invE* の mRNA は転写されるが、未知の原因で転写後レベルの蛋白発現が阻害されていた。

(3) そこで *cpxA* 欠損株では未知の因子が増加しているという作業仮説を立て、*invE* の発現を回復させる変異をスクリーニングしたところ、機能未知の *yfgA* 遺伝子のトランスポゾン変異が得られた。*yfgA* の単独欠損株の表現型を調べたところ、通常 30 °C で抑制されるIII型分泌装置が発現することが分かった。

驚いたことに、この株は形態が球形に変化しており、偶然同時期に内外の形態を専門とするグループが、YfgA蛋白は内膜に局在し、桿状の形態を形成するバクテリア細胞骨格として機能することを報告し、RodZと命名した。

(4) 一方、我々の赤痢菌の表現型からは転写後制御に関わるHfq様のRNA結合能を持つことが予想され、実験的にも精製したRodZはRNA及び、ランダムラベルした染色体DNAに結合することが分かり、RodZの機能を包括的に調べる必要が生じた。

2. 研究の目的

赤痢菌の病原性に必須なIII型分泌装置の発現にRodZが関与することから、RodZには形態形成以外の作用があることが示唆された。赤痢菌の病原性遺伝子の解析を通じて、これまで報告されていないRodZの役割を明らかにすることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

赤痢菌の病原性の解析から発展し、蛋白のマクロ構造、病原遺伝子以外に対する機能を調べた。

(1) 赤痢菌 *rodZ* 欠損株のIII型分泌装置の発現解析 表現型の解析には以下のプロトコールを用いた。: D群赤痢菌 *Shigella sonnei* MS390 株より常法で、*rodZ* 遺伝子の欠損変異株MS5201 株を作製した。

菌はLB培地で 30 °C で一晩振盪培養し、新鮮な培地で 100 倍希釈し、30 ないし 37 °C で OD₆₀₀ が 1.0 まで培養した。β-ガラクトシダーゼ活性の測定には 50 μl の培養液を用い、ウエスタンブロットには 10 μl の培養液を 10%

SDS-PAGEで泳動し、III型分泌装置のレギュレーター *InvE* およびエフェクター *IpaB*、もしくは *RodZ* に対する抗体で検出した。

RNAは 2 ml の培養液から集菌し、フェノール法で精製した。mRNAの半減期の測定はリファンピシンを終濃度で 50 μg/ml となるように加え、2分おきに集菌し、それぞれRNAを精製した。DNase処理後、*invE* に対するプライマーおよび、内部標準として 6S RNA に対するプライマーを用いてRT-PCRを行なった。また、*invE* と 6S RNA に対するTaqManプローブを用いた、リアルタイムPCRでもmRNA量を測定した。

rodZ 遺伝子の変異体群ΔKRRKKR, R3G, RevI は pBAD18Kanベクターに組み込んだ野生型 *rodZ* 遺伝子をSite directed mutagenesisで改変して作成した。これらのプラスミドで *S. sonnei* の *rodZ* 欠損変異株MS5201 株を形質転換し、表現型として 30 °C で発現する *InvE* と細胞形態を観察した。

生化学的解析: RodZ蛋白の精製は *rodZ* 遺伝子をpET22bベクターにクローニングし、大腸菌BL21 株で大量発現し、0.1% Triton X-100 で可溶化し硫酸沈殿後、イオン交換体のHi-prep SP、Whatman P-11 phosphocellulose カラム及びC末端に付加したHis-tagで精製した。RNAプローブは、T7 プロモータ配列を付加したプライマーで、*invE* 遺伝子の転写開始点から 142 スクレオチドの部位を増幅したものを鋳型に、T7RNAポリメラーゼで転写し、その 5' 末端に ³²P をラベルした。

(2) RodZ蛋白のマクロ構造解析: RodZ複合体のゲル濾過解析: 精製したRodZ蛋白を 10mM Tris HCl (pH7.5), 100mM塩化アンモニウム, 5mM酢酸マグネシウムに溶解し、ゲル濾過カラムSuperdex200 PC3.2 で分画した。

実験に応じて 0.1% Tween20 もしくは 0.1% Tween20 + 5mM DTTを加え、同バッファで平衡化したカラムで分画した。

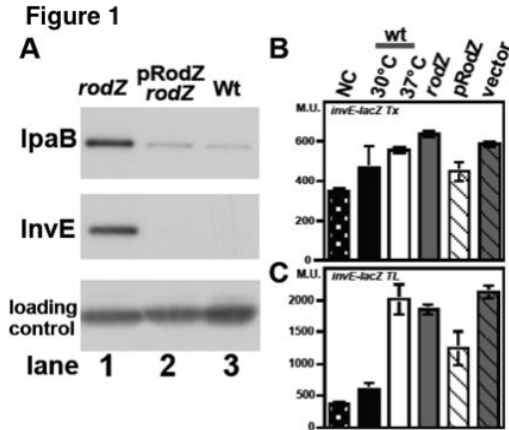
質量分析によるストイキオメトリーの解析: RodZ蛋白を 1mg/ml まで濃縮しスイス・CovallX社の質量分析装置High-Mass MALDI MS (http://www.covallx.com/files/CovallX_MALDI_kits.pdf) で測定した。

(3) 病原遺伝子以外の核酸に対する作用の解析。RNA: 野生型赤痢菌と *rodZ* 欠損株の培養液 200ml にリファンピシンを加え、転写を止めてから 4 分後にRNAを採取した。リファンピシンを加えないサンプルを 0 分として全遺伝子のmRNAの減少量 (傾き) をマイクロアレイで比較した。

DNA: 法政大学の石浜明と嶋田友裕 (現東京工業大学) の協力でプラスミドにクローニングした大腸菌ゲノムDNA配列をRodZ蛋白を用いて濃縮し、PCRで増幅を行うSELEX法を利用してゲノム上の結合配列を同定した。また *in vivo* での結合を観察するため、ホルマリン固定した大腸菌から、RodZに結合しているDNA配列をクロマチン免疫沈降法で回収し、ChIP on chip法でゲノム上の結合部位を同定した。

4. 研究成果

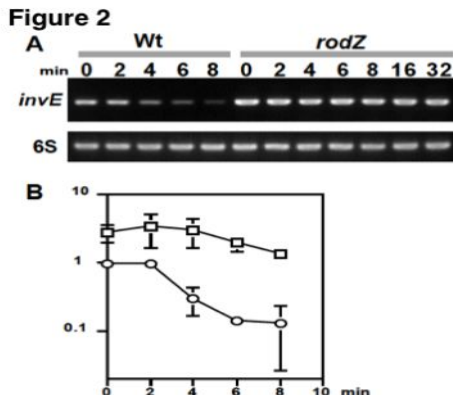
(1) 赤痢菌 *rodZ* 欠損株のIII型分泌装置の発現解析: 上述のように *rodZ* の欠損株は、通常野生株では 30 で抑制されるはずのIII型分泌装置のレギュレーター InvE 及びエフェクター蛋白 IpaB が発現していた (Figure 1A)。



また、30 で転写融合 (Fig. 1B) と翻訳融合 (Fig. 1C) の *invE-lacZ* レポーターの発現を比較したところ、*rodZ* 変異体 (灰色) では、野生型 (黒) では抑制される翻訳が増加していた。

なお RodZ 発見のきっかけとなった *cpxA* 欠損株では、RodZ の発現量が予想通り、軽度増加していたが、Cpx 二成分制御系のレギュレーター *cpXR* の欠損株では RodZ は増加しないため、Cpx 系による直接的な制御はないと考えられ、それ以上の解析は行わなかった。

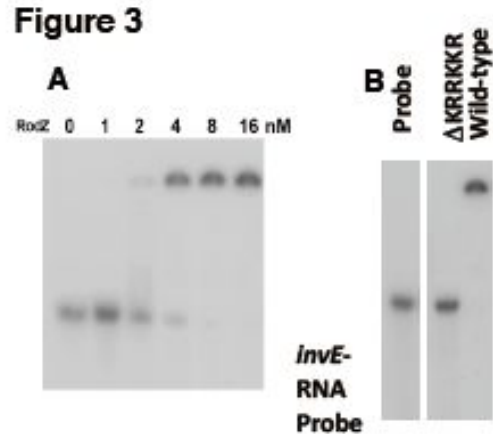
多くの転写後調節では翻訳活性が低下した結果、mRNA の安定性が変化することが知られているため、野生株と *rodZ* 欠損株で *invE* の mRNA の安定度を比較した。対数増殖期に培地にリファンピシンを加えて転写を停止し、2 分おきに採取した菌から RNA を精製し、*invE*-mRNA に対する RT-PCR (Fig. 2A) と real-time PCR (Fig. 2B) を行った。



野生型では mRNA の安定性が低く、半減期は 2 分 20 秒であった。*rodZ* 欠損株では mRNA の安定性が増加し半減期は 20 分であり RT-PCR では 30 分以上経過後もシグナルが認められた。

以上の表現型は RNA 結合蛋白 *hfq* の欠損株と大変良く似ており、RodZ と *invE* の mRNA が相互作用することが予想された。

in vitro で *invE*-mRNA と RodZ 蛋白の相互作用を証明するために、精製した RodZ 蛋白と合成した *invE*-RNA でゲルシフトを行った。RodZ は膜蛋白であるため、0.1% Triton X-100 で可溶化できたが、単純な His-tag 精製では活性のある蛋白は精製できず、最終的に SP-sephadex と P11 phosphocellulose カラムで分離し、His-tag で精製した。



放射能ラベルした *invE*-RNA プロブと RodZ 蛋白は強く結合し、ゲル上のシグナルのシフトから推定した解離定数 (Kd) は約 3.5 nM であった (Fig. 3A)。

RodZ は細胞質領域に塩基性アミノ酸のクラスター KRRKKR を持つ (Fig. 4A)。塩基性アミノ酸は核酸結合部位を形成する可能性があるため、RNA 結合部位を同定する目的で KRRKKR ドメインの分子内欠損蛋白を精製した。予想されたように KRRKKR 欠損蛋白は *in vitro* での RNA 結合活性を失っていた (Fig. 3B)。

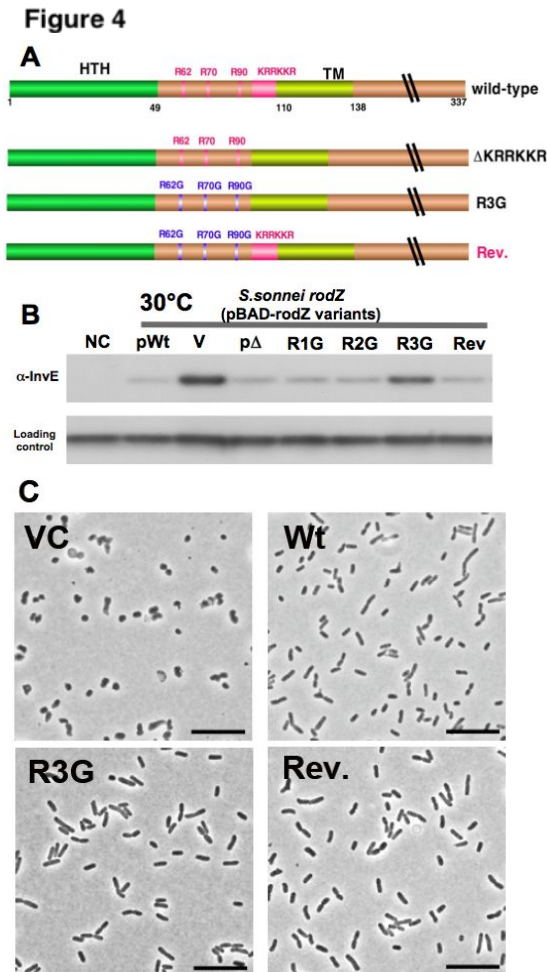
次にこの RNA 結合能を失った KRRKKR 欠損 RodZ 蛋白が *in vivo* でも機能を失っていることを示すため、KRRKKR 欠損 *rodZ* 遺伝子をプラスミドで *rodZ* 欠損株に導入し、30 で InvE 蛋白の発現を確認した。もしも KRRKKR 欠損が RodZ の機能を損なうとすると、空ベクター (Fig. 4B V) のように InvE 蛋白が発現するはずである。

予想に反して KRRKKR 欠損 *rodZ* 遺伝子を入れた株 (Fig. 4B pΔ) の InvE の発現は、野生型 *rodZ* 遺伝子 (Fig. 4B pWt) と同様に抑制された。これは、*in vivo* においては KRRKKR 以外の部位も mRNA と相互作用している可能性を示しており、RodZ 蛋白のアミノ酸配列を調べると、N 末端側の HTH モチーフから塩基性アミノ酸のクラスター KRRKKR までの間に 3 カ所アルギニンが存在した (Fig. 4A)。

これらのアルギニンを順次グリシンに置換したところ、KRRKKR 欠損に加えて 3 カ所全

てを置換したプラスミド、R3Gを導入した *rodZ*欠損株ではInvEの発現が起こり、*rodZ*欠損変異を相補する能力が失われる事が分かった (Fig. 4B R3G)。

また、R3Gの欠損しているKRRKKR部位だけを野生型に戻したプラスミド (Fig. 4B Rev) では、再びInvE発現が抑制されたことから、KRRKKR部位も *in vivo*でのRNA結合に関与していることが示された。



このR3G, Rev (Fig. 4C) 変異をもつ *rodZ*遺伝子をコードするプラスミドは全て *rodZ*欠損株の形態 (Fig. 4C VC) を野生型 (Fig. 4C Wt) と同じ桿状に戻した。以上の結果は、*rodZ*のRNA結合部位と形態形成に関わる部位は異なるドメインであることを明確に示した。

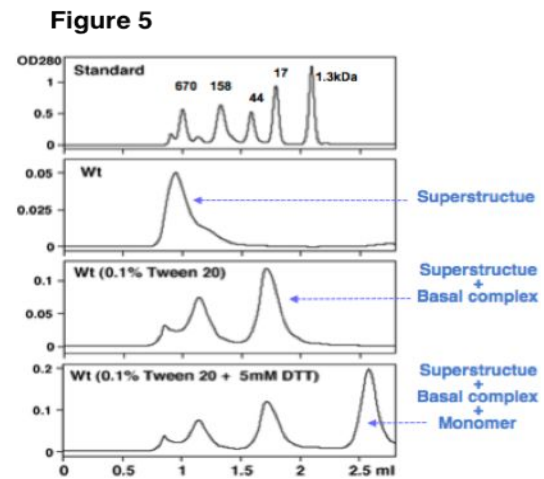
(2) RodZ蛋白のマクロ構造解析: RodZ蛋白の計算上の分子量は37kDaであるが、RNA結合の観察に用いた非変性ゲルでは泳動が遅く、ウエル部分にシグナルが現れた (Fig. 3 A)。

また、界面活性剤を含まないバッファーでゲル濾過クロマトグラフィーを行ったところ、数百kDaの高分子量側に蛋白のピークが現れた (Fig. 5 Superstructure)。

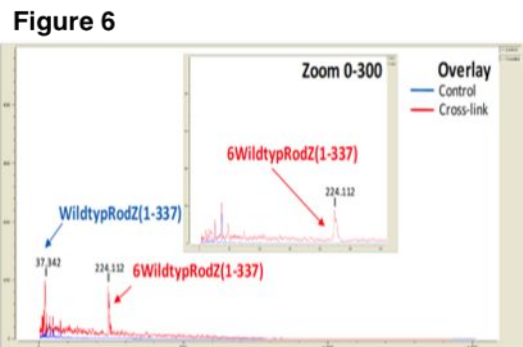
これらのことから、RodZは複雑な多量体を

形成していることが予想されたため、精製したRodZをそれぞれ 0.1% Tween20 と、0.1% Tween20 + 5 mM DTT存在下でゲル濾過分画した。その結果、高分子量、中分子量、低分子量と3つのピークが現れた。(Fig. 5)。

RodZは細胞質領域とペリプラズム領域に各1つシステイン残基を持ち、DTTの存在下で単量体が分離するため、単量体がS-S結合で中程度の分子量の“basal complex”を形成し、このbasal complex同士が、Tween20で解離する疎水結合で“superstructure”を形成していることが予想された。



このbasal complexのストイキオメトリーを求めるため、超遠心分析を行なった。200kDa付近に最大ピークが得られたものの、原理的にsuperstructureが混入するため、正確な分子量の決定は困難であった。そのため高分子量蛋白が測れる新型の質量分析装置を持つ、スイス・CovallX社でジスルフィド結合に特異的なクロスリンクをかけて、巨大分子のままMALDI-TOF解析をおこなった。



クロスリンクをかけないコントロールでは、野生型RodZ分子は37.3kDaの単量体分子として検出され (Fig. 6 青グラフ)、クロスリンクをかけたサンプルは単量体の6倍の224kDaにピークが現れた (Fig. 6 赤グラフ)。

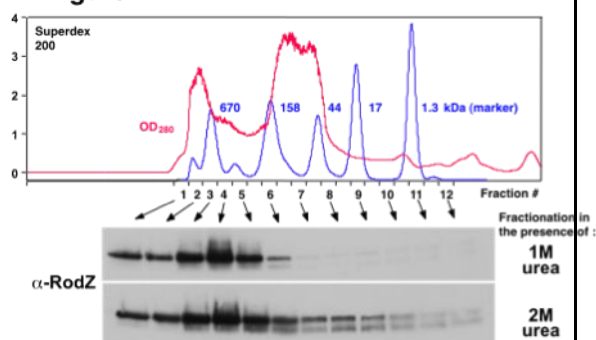
質量分析ではイオン化時に共有結合より弱い結合は外れるため、basal complex が会合したsuperstructureは検出されない。以上

より、RodZのbasal complexは6量体として存在することが示された。

次に *in vivo*でのRodZの集合状態を観察するために、大腸菌の菌体から可溶化したRodZを直接ゲル濾過で分画し、ウエスタンブロットで観察した (Fig. 7)。蛋白の再結合を防ぐため、変性剤である尿素 (1~2 M)の存在下で行ったゲル濾過では、RodZは200kDaより高い分子量側に分離された。

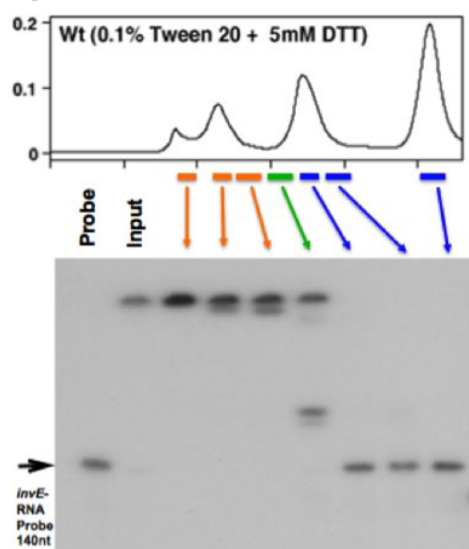
つまりRodZは基本構造としてS-S結合で6量体のbasal complexをとった上で、生体内ではそれが集合したsuperstructureを形成している可能性が高いと考えられた。また、670kDaのマーカー付近の濃度が高いことから、特定の個数に集合しているものが多いように思われた。

Figure 7



このRodZの集合体構造と機能の相関を求めるため、精製したRodZ蛋白を0.1% Tween20 + 5mM DTTを含むバッファーでゲル濾過することで分子量ごとに分画し、それをゲルシフト分析することで3種類の集合体のRNA結合能を調べた。

Figure 8



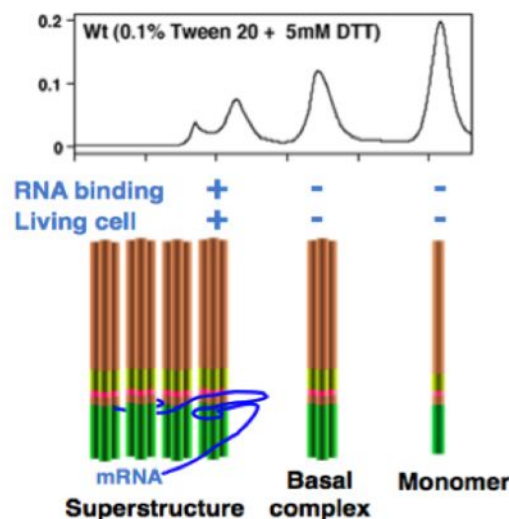
当初、他のRNA結合蛋白Hfqで見られるように、6量体の形成がRNAの結合に必須と考えていたが、驚いたことに、6量体に相当するbasal complexのピークでは結合は起こらず、

複数の6量体が集合した分画から (Fig.8 緑) 結合が始まり、高分子量のsuperstructureでより強く結合するという結果が得られた。

以上の結果をまとめると、RodZは生体では、RNA結合能を持たない単量体や6量体としては存在せず、少なくとも複数個の6量体が集合したsuperstructureとして存在し、RNA結合能を持つ可能性が示された (Fig.9)。

現時点では仮説の域を出ないが、RNA結合に必要な塩基性アミノ酸のドメイン (Fig.9 ピンク色) は膜貫通領域 (黄緑色) に近いペリプラズム側に存在し、疎水的に結合する膜貫通領域によって強く束ねられているため、複数のbasal complexがつくる間に、mRNAを収容している可能性が考えられた。

Figure 9



(3) 病原遺伝子以外のmRNAに対する作用の解析: 野生型赤痢菌とrodZ欠損株の培養にリファンピシンを加え、転写を止めてから4分後にRNAを採取した。リファンピシンを加えないサンプルを0分として、マイクロアレイで、mRNAの減少量 (傾き) を全遺伝子で比較した。約80種類の遺伝子で野生型と比較して有意にmRNAの分解が遅くなり、RodZとの相互作用が予想された。結果はNCBIのGene Expression Omnibusにアップロードした。
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE21051> accession No. GSE21051

DNAに関しては *in vitro*でのSELEX法で得られた結合部位と、*in vivo*でのChIP on chip法での結合部位が全く異なる結果が得られた。これはRodZが一般的なDNA結合蛋白のような配列特異性をもたず、例えばAT量で規定されるDNAの曲率などで結合が決まっている可能性があるものと考えられた。おそらくSELEX法で行った結合実験とChIP on chip法では多くの点で条件が異なり、違った結果となったものと思われる。未解決ではあるが、将来的には興味深いテーマを残すことになった。

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 2 件)

Mitobe J, Yanagihara I, Ohnishi K, Yamamoto S, Ohnishi M, Ishihama A and Watanabe H, RodZ regulates the post-transcriptional processing of the *Shigella sonnei* type III secretion system EMBO report 査読有 2011 vol.12(9) 911-916.

DOI:10.1038/embor.2011.132

大西真 三戸部治郎 病原大腸菌のゲノム進化と二成分制御系 化学療法の領域 査読無 29 巻 2013 53-61

https://www.iyaku-j.com/index.php?main_page=index&cPath=5_1_16_3893

[学会発表](計 7 件)

Mitobe J, Yanagihara I, Ohnishi K, Yamamoto S, Ohnishi M, Ishihama A and Watanabe H, RodZ regulates the post-transcriptional processing of the *Shigella sonnei* type III secretion system 2011, Sept. 6-10, XIII International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. Sapporo Convention Center. Sapporo, Japan.

Mitobe J, Koley H, Sinha R, Shimuta K, Koizumi N, Terajima J, Ohnishi M, Nail GB, Watanabe H. An attempt to develop experimental *Shigella* vaccine based on virulence gene expression. 2011, Dec. 13-15 US-Japan Cooperative Medical Science Program. 46th Annual Joint Panel Meeting for Cholera and Other Bacterial Enteric Infections. Kolkata. India

第 85 回日本細菌学会総会ワークショップ 細菌における遺伝子発現制御の普遍性と特異性 2012 年 3 月 27 日長崎ブリックホール: Bacterial cytoskeleton RodZ and virulence gene expression of *Shigella* type III secretion system

Mitobe J, Yamamoto S, Watanabe H, and Ohnishi M.

2012 Dec.12-14 US-Japan Cooperative Medical Science Program. 47 th Conference. Cholera and Other Bacterial Enteric Infections. Chiba Univ. Chiba Japan: Multimer formation of bacterial cytoskeletal protein RodZ.

Mitobe J, Yanagihara I, Ohnishi K, Yamamoto S, Watanabe H and Ohnishi M,

第 86 回日本細菌学会総会

2013 年 3 月 13-15 日幕張メッセ

三戸部治郎、山本章治、渡邊治雄、大西真 赤痢菌 Type III secretion system の発現に関わる細胞骨格蛋白 RodZ の RNA 結合活性と多量体形成機構の解析

Mitobe J, Yanagihara I, Yamamoto S Hexamer formation and RNA binding activity of bacterial cytoskeleton RodZ 3rd Conference on Regulating with RNA in Bacteria 2013 June4-8 Wurzburg Germany.

第 87 回日本細菌学会総会

三戸部治郎、山本章治、大西真 赤痢菌の病原性発現に関わるバクテリア細胞骨格蛋白 RodZ の多量体形成機構の解析 2014 年 3 月 26-28 日タワーホール船堀

[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]

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三戸部 治郎 (MITOBE, Jiro)
国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官
研究者番号: 4 0 3 3 3 3 6 4

(2) 研究分担者

柳原 格 (YANAGIHARA, Itaru)
地方独立行政法人 大阪府立病院機構
大阪府立母子保健総合医療センター(研究所)・免疫部門・部長
研究者番号: 6 0 3 1 4 4 1 5

(3) 連携研究者

()

研究者番号: