

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 伊藤 学
 学位 博士 (農学)
 学位記番号 新大院博 (農) 第 137 号
 学位授与の日付 平成 26 年 3 月 24 日
 学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当
 博士論文名 細菌の small RNA が関与する遺伝子発現制御システムと GGDEF/EAL タンパク質に関する研究

論文審査委員 主査 教授・渡邊 剛志
 副査 教授・星野 力
 副査 教授・末吉 邦
 副査 准教授・鈴木 一史
 副査 准教授・佐藤 努

博士論文の要旨

Csr (carbon storage regulator) システムは多くの真正細菌に存在し、バイオフィーム形成、病原性、運動性、解糖系、糖新生などをはじめ、幅広く遺伝子発現を調節しているグローバル制御システムである。Csr システムは RNA 結合タンパク質 CsrA、CsrA に結合してその活性を抑制する 2 つの small RNA (sRNA) CsrB/C、sRNA の安定性を制御するタンパク質 CsrD から構成されている。Csr システムの活性本体である CsrA は mRNA に結合して翻訳を制御する。CsrB/C RNA は複数の CsrA 結合部位を含むステムループ構造からなり、CsrA を捕捉することで細胞内での CsrA の働きを阻害する。GGDEF-EAL ドメインタンパク質である CsrD は、これら CsrB/C RNA の RNase E 依存的な分解を調節することで CsrA の細胞内での働きを制御している。Csr システムは CsrB/C RNA の半減期を変えることによって、*csrA* 遺伝子の新たな発現を待たずに細胞内 CsrA 量を調節してターゲット遺伝子の発現を制御し、環境変化に素早く対応する全く新しいシステムだと考えられる。

CsrD は c-di-GMP 非代謝型の GGDEF/EAL タンパク質として初めて報告されたタンパク質であるが、sRNA 安定性制御メカニズムは明らかになっていない。CsrD のホモログは多数の細菌に存在するが、大腸菌以外で sRNA 安定性制御の報告はない。そこで、本研究では *Serratia marcescens* の Csr システムに着目し、その構成因子を明らかにするとともに、CsrD ホモログの sRNA 安定性への関与を明らかにすることとした。ゲノム情報から *S. marcescens* の Csr システムは大腸菌と同様に RNA 結合タンパク質 (CsrA)、2 つの Csr sRNA (CsrB 及び CsrC)、Csr sRNA の安定性制御因子 (CsrD) から構成されていることが明らかとなった。これら遺伝子をクローン化し、大腸菌の各 *csr* 遺伝子欠損株に導入し、Csr システムが影響を与える、グリコーゲン生合成、バイオフィーム形成、*csrB* 発現について調べた。その結果、大腸菌において *S. marcescens* の各 *csr* 遺伝子が機能することが明らかとなった。さらに、*S. marcescens* の CsrD は大腸菌の *csrD* 欠損を補い、大腸菌 CsrB/C RNA の安定性を制御することがわかった。また、ゲノム情報が明らかとなっ

ている *Serratia* 属においても Csr システムと共に CsrD のホモログが存在することがわかった。これらの結果から、*Serratia* 属の細菌は RNase E と CsrD 依存の CsrB/C RNA 安定性制御によって調節される Csr システムを持っていることが示唆された。

CsrD による CsrB/C RNA 安定性制御メカニズムの解明を目的として、大腸菌における CsrB RNA の分解過程を解析した。CsrB RNA の分解には CsrD とエンドリボヌクレアーゼである RNase E が必須であり、エキソリボヌクレアーゼ PNPase に依存している。PNPase 欠損株において複数の CsrB 分解中間産物の蓄積が確認され、これらの CsrB 分解中間産物の 5'末端は野生型 CsrB RNA と一致するが、3'末端は異なることがわかった。これらは主に 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分解中間産物であると考えられた。5'末端のステムループ構造への変異や、CsrB 分解中間産物の 3'末端領域の欠損を導入した変異 *csrB* 遺伝子を *csrB* 変異株に導入してバイオフィーム形成及び *csrB* 発現に与える影響を調べた。その結果、ターミネーター直前の一本鎖領域を欠失した変異型 CsrB がバイオフィーム形成量を大幅に増加させ、*csrB* 発現を抑制した。さらに、ノーザンブロット解析によりこの変異型 CsrB RNA の半減期を測定したところ、半減期が 30 分以上となり極端に安定化したことがわかった。これらの結果から、CsrB のターミネーター直前の一本鎖領域が CsrB RNA の分解に最も重要であり、その分解に CsrD が関与していると考えられた。

審査結果の要旨

細菌バイオフィーム形成を制御する Csr システムは、RNA 結合タンパク質とそれに結合して活性を阻害する small RNA (sRNA) が基本構成となっている。大腸菌においては Csr システムの新たな因子 CsrD が Csr sRNA の安定性制御に関わっていることが明らかになっている。CsrD のホモログが他の細菌にも存在しているが、大腸菌以外では機能の報告がなく、また、そのメカニズムも明らかになっていない。本論文では、*Serratia marcescens* の Csr システムの構成因子を明らかにし、大腸菌以外で初めて CsrD が Csr sRNA の安定性制御因子であることを証明した。また、Csr システムを有する多くの細菌に CsrD が存在することを示した。さらに、RNase E 依存の Csr sRNA 分解に必要な領域を大腸菌 CsrB RNA を用いた実験で特定し、CsrD がその領域の分解に関与することを示唆した。これは、膜結合型の c-di-GMP 非代謝型 GGDEF/EAL タンパク質である CsrD による Csr sRNA の安定性制御メカニズム解明に繋がる重要な発見であった。

以上の結果は、細菌における sRNA 安定性制御の重要性とその制御機構に関して新たな知見を提供するものであり、細菌バイオフィーム制御の研究に貢献できると評価される。本論文の主な内容は、申請者を筆頭著者として Identification of a Csr system in *Serratia marcescens* 2170 のタイトルで The Journal of General and Applied Microbiology に掲載が決定している。よって、本論文は博士（農学）の博士論文として十分であると認定した。