

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（要約）

新潟大学大学院自然科学研究科 生命・食料科学専攻

氏名 伊藤 学

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 RNA 結合タンパク質 CsrA は mRNA に結合して翻訳を制御する。2 つの sRNA、CsrB 及び CsrC 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。CsrB/C RNA の半減期が長くなった場合は CsrA 活性が抑制され、半減期が短くなった場合はより高い CsrA 活性が発揮される。つまり、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。*Serratia sp.* においては CsrD のホモログである PigX が c-di-GMP 分解活性を示す可能性が報告されているが、Csr sRNA 分解への関与は示されていない。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、大腸菌において相当する *csr* 遺伝子欠損を補い、*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 の安定性に関与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

【別紙2】

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 *pnpΔ683* において複数の CsrB 分解中間産物の蓄積が確認され、プライマーエクステンション法と 3'-RACE 法による解析により、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' 末端は異なり 9 つの領域に分類されることがわかった。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* 遺伝子を導入したプラスミドを作製し、*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。