

氏名(本籍)	お ばな のぞむ 尾 花 望 (栃木県)
学位の種類	博 士 (理 学)
学位記番号	博 甲 第 5710 号
学位授与年月日	平成 23 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	生命環境科学研究科
学位論文題目	Functional Analysis of a Small RNA and Novel Regulatory Proteins on Toxin Gene Expression in <i>Clostridium perfringens</i> (ウェルシュ菌における低分子 RNA 及び新規制御タンパク質による毒素遺伝子発現制御機構の解析)
主 査	筑波大学准教授 理学博士 中 村 幸 治
副 査	筑波大学教授 理学博士 漆 原 秀 子
副 査	筑波大学准教授 博士(農学) 鈴 木 石 根
副 査	筑波大学准教授 博士(工学) 野 村 暢 彦

論 文 の 内 容 の 要 旨

病原細菌の感染成立及び生存において、宿主細胞の免疫機構や環境に適応するために、外界のシグナルに応答した素早い遺伝子発現制御が必須である。このような生体内の遺伝子発現制御においては、これまで知られていた DNA 結合タンパク質等の転写制御因子だけでなく、低分子 RNA が重要な役割を持つことが明らかとなってきた。特に、低分子 RNA は翻訳を必要とせずその機能を発現することができ、また、その化学的性質上、容易に分解されうるという点からも、迅速な環境応答に有利であると考えられる。このように、毒素遺伝子の発現制御には数多くの因子が関与し、複雑な遺伝子発現制御ネットワークを形成していると考えられ、病原細菌の感染の予防や病原性の発現機構の理解という観点から、病原細菌における遺伝子発現制御ネットワークの解明は、非常に重要な課題である。

ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は、土壤中及び動物の腸管内に常在する病原細菌であり、対数増殖期中期に一過的に毒素を産生することが明らかとなっている。ウェルシュ菌における遺伝子発現制御には、VirR/VirS 二成分制御系のエフェクター分子である VR-RNA が重要な役割をもっている。本研究では、ウェルシュ菌低分子 RNA、VR-RNA 及び、クロストリジウム属で高く保存されており、DNA 結合モチーフを有する CPE1447 及び CPE1446 タンパク質による毒素遺伝子発現制御機構の解析を行った。

VR-RNA はコラゲナーゼ遺伝子 (*colA*) の発現を正に制御しており、ノザン及びプライマー伸長解析の結果より、VR-RNA は *colA* mRNA 5'UTR 内におけるプロセッシングを促進することによって、その安定性を上昇させていることがわかった。*colA* mRNA 5'UTR の二次構造を予測したところ、RBS (ribosome binding site) を含む安定なステムループ構造を形成することから、完全長の *colA* mRNA ではリボソームの進入が阻害されていると考えられた。一方、プロセッシングを受けた *colA* mRNA の二次構造では、RBS 周辺の塩基は一本鎖領域であると予測された。レポーター遺伝子を用いた解析より、VR-RNA 依存的プロセッシングは ColA タンパク質の翻訳を促進しており、*colA* mRNA はプロセッシングを受けることによって RBS が解放され、リボソームの結合及び翻訳伸長が促進されると考えられた。さらに、VR-RNA の 3' 領域と *colA* 5'UTR の配列間には

高い相補性が見出され、VR-RNA 及び *colA* mRNA の点変異解析の結果より、この塩基相補性は VR-RNA による *colA* 遺伝子発現制御に必須であることが明らかとなった。

次に、CPE1447 及び CPE1446 タンパク質がウェルシュ菌における毒素産生に関与するかどうかを調べるために、CPE1447-CPE1446 オペロン欠失株を作成し、毒素遺伝子の発現を解析した。その結果、変異株において、4 種類のヒアルロニダーゼ遺伝子 (*nagH/I/J/K*) の発現が減少し、シアリダーゼ遺伝子 (*nanI*)、パーフリンゴリジン遺伝子 (*pfoA*) 及びフォスフォリパーゼ C 遺伝子 (*plc*) の発現が上昇した。プラスミドによる CPE1447、または、CPE1446 の相補解析の結果、これらの遺伝子群の発現制御には CPE1447 及び CPE1446 両タンパク質が必要であり、両タンパク質は協調して毒素遺伝子群を制御していることが示された。また、ウェルシュ菌体内において、His タグを付加した CPE1446 を発現させ、共沈するタンパク質を解析したところ、CPE1446 は CPE1447 タンパク質と相互作用しうることが明らかとなった。

一方、VR-RNA 欠損株及び CPE1447-CPE1446 欠損株を用いた毒素遺伝子群のノザン解析の結果、VR-RNA 及び CPE1447-CPE1446 はそれぞれ独立して毒素遺伝子発現を制御していることが明らかとなった。ウェルシュ菌は対数増殖期中期において、様々な外界のシグナルに応答するため、複数の遺伝子発現制御ネットワークを有していると考えられた。

本研究の結果より、ウェルシュ菌 VR-RNA による *colA* 遺伝子発現制御機構及び、CPE1447-CPE1446 複合体による毒素遺伝子調節が明らかとなった。特に、これまでに、sRNA がプロセッシングを誘導し、標的遺伝子の mRNA の安定性を増加させる例は報告されておらず、VR-RNA による *colA* 発現制御は、新規の sRNA による遺伝子発現制御機構であると考えられ、この分野における非常に意義深い発見であるといえる。本研究によって、sRNA による遺伝子発現制御機構及び病原細菌における病原因子の調節に関する新たな知見が得られたと考えられる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

病原細菌の感染及び生存において、環境に応答した素早い遺伝子発現制御は必須であり、病原性の理解という観点から、そのような機構の解析は重要な課題である。生体内における遺伝子発現制御では、従来の DNA 結合性タンパク質因子のみならず、低分子 RNA も重要な役割を果たしており、これらの個別の因子の機能解析が病原性制御ネットワークの理解に必須である。本論文によって、病原細菌であるウェルシュ菌における低分子 RNA、VR-RNA による、新規の毒素遺伝子発現制御メカニズムが明らかとなり、また、新規毒素制御タンパク質複合体が同定された。これらの発見は、RNA による遺伝子発現制御機構の解明及び病原細菌における遺伝子発現制御ネットワークの解明に多大に寄与することが期待される。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。