

黄色ブドウ球菌における RNA 3'-末端構造変換を介した遺伝子発現制御に関する研究

沼田 俊介

【序】

黄色ブドウ球菌はヒトにおいて様々な疾病を引き起こす日和見感染菌である。健康なヒト宿主体内において、黄色ブドウ球菌は様々な因子の発現調節を介してその体内環境に適応し、宿主との共生関係を築いているが、この関係が破綻した際には様々な疾病を引き起こす。黄色ブドウ球菌の病原性関連遺伝子の発現制御機構を理解することは、本菌による感染症を理解する上で重要である。転写された RNA の安定性制御による遺伝子発現制御は環境変化に対する迅速な応答を可能にし、細菌が宿主体内という環境に適応する上で重要であると考えられる。しかしながら、病原性細菌における RNA 代謝調節機構の全体像の理解は未だ不完全である。

当教室においてカイコ感染モデルを用いた黄色ブドウ球菌の新規病原性因子の探索研究が行われ、溶血毒素産生に必要な新規病原性因子をコードする *cvfA* 遺伝子が同定されている (図 2)。*cvfA* 遺伝子は RNA 3'-末端ヌクレオチド中の 2',3'-環状ホスホジエステルの結合を開裂させて 3'-位がリン酸化された RNA を生成する環状ホスホジエステラーゼをコードすることが明らかになっており (図 1)、この活性は溶血毒素産生に必要である。しかし、CvfA による RNA の末端修飾がどのような機構で溶血毒素産生を制御しているのかは不明であった。私は、CvfA の機能解析を通して新規の溶血毒素産生制御機構を明らかにできると考え、本研究に着手した。本研究において私は、*cvfA* の抑圧因子としてエキソヌクレアーゼをコードする *pnpA* 遺伝子を同定し、さらに、CvfA と PnpA が拮抗して病原性遺伝子の発現を制御することを明らかにした。

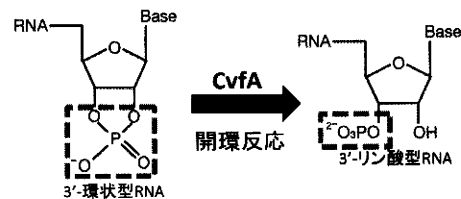


図1 CvfAによるRNA末端修飾

【結果】

(1) *cvfA* 遺伝子欠損株における溶血毒素産生低下は *pnpA* 遺伝子の欠損によって抑圧される

私は、CvfA 依存的溶血毒素産生制御の分子機構を知るために、*cvfA* 遺伝子破壊株における溶血毒素産生低下を抑圧する因子の探索を行った。CvfA が RNA 代謝酵素であることから、私は他の RNA 代謝酵素が CvfA と相互作用していると考えた。これを検証するために私は、黄色ブドウ球菌の RNA 分解酵素をコードする遺

伝子8個と *cvfA* 遺伝子の二重遺伝子欠損株を作出し、それぞれの溶血毒素産生能を検討した。その結果、3'→5'エキソヌクレアーゼをコードする *pnpA* 遺伝子の欠損が *cvfA* 欠損株における溶血毒素産生低下を抑圧することを見出した (図2)。この *pnpA* 遺伝子欠損による抑圧効果は、野生型 *pnpA* 遺伝子の導入によって相補された (図2)。以上の結果から、*cvfA* 遺伝子と *pnpA* 遺伝子が遺伝学的相互作用をすること、並びに、CvfA と PnpA が拮抗的に溶血毒素の産生を制御することが示唆された。

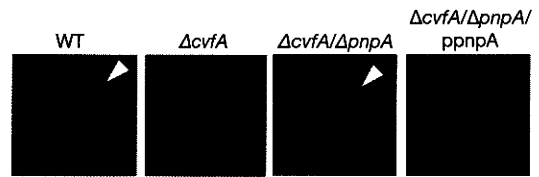


図2 CvfAとPnpAによる溶血毒素産生制御
野生株 (WT)、*cvfA*欠損株 ($\Delta cvfA$)、*cvfA/pnpA*二重破壊株 ($\Delta cvfA/\Delta pnpA$) 及び *cvfA/pnpA*二重破壊株に *pnpA* 発現プラスミド (*ppnpA*) を導入した株の一晩培養液を5%羊血プレートにスポットし、さらに37°Cで一晩培養した後にコロニー周辺に形成される溶血環 (白矢印) を観察した。

(2) CvfA 依存的溶血毒素産生制御には PnpA の RNA 分解活性が必要である

私は、黄色ブドウ球菌の CvfA と PnpA による拮抗的な溶血毒素産生制御に PnpA の RNA 分解活性が必要であるか否かを検討した。PnpA は N 末端側から順に PH-1、PH-2 と呼ばれる二つの触媒ドメインを有する。先ず私は、PH-1、PH-2 において細菌間で保存されたアミノ酸残基を置換した点変異型 PnpA タンパク質

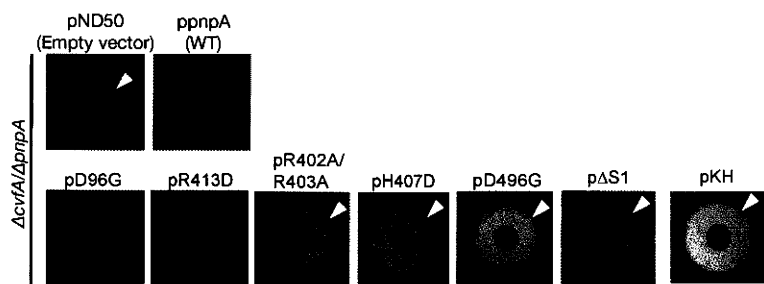


図3 *cvfA/pnpA*二重欠損株の溶血毒素産生に対する変異型PnpAの相補活性
野生株(NCTC8325-4)、*cvfA*欠損株(CKP1129)、*cvfA/pnpA*二重破壊株(DM1NC)に、pND50ベクター、野生型*pnpA*(*ppnpA*)、変異型*pnpA*(*pD96G*, *pR402A/R403A*, *pH407D*, *pR413D*, *pD496G*, *pΔKH*, *pΔS1*)を持つプラスミドを導入した株の一晩培養液を5%羊血液寒天プレートにスポットし、37°Cで一晩培養した。各コロニーの周縁部に見られる透明帯は溶血毒素の活性を反映する。

(R402A/pR403A、H407D、D496G、D96G、R413D) が RNA 分解活性を有するか否かを検討した。N-末端に 6x ヒスチジンタグを融合した野生型 PnpA タンパク質の大量発現大腸菌を作出し、細胞破碎液から、硫酸沈殿及びニッケルレジンアフィニティクロマトグラフィによる精製を行った。ニッケルレジン吸着画分の比活性は $3.1 \mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であり、硫酸沈殿画分での値の 10 倍であった。最終画分への活性の回収率は 33% であった。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により検定した PnpA タンパク質の純度は 90% 以上であった。各点変異型 PnpA を野生型 PnpA と同様の方法で調製したところ、R402A/R403D、H407D 及び D496G においては RNA 分解活性が検出されなかった。一方、D96G、R413D については野生型 PnpA の約 10% の RNA 分解活性が検出された。次に私は、上記の点変異型 PnpA タンパク質の発現プラスミド (*pR402A/pR403A*、*pH407D*、*pD496G*、*pD96G*、*pR413D*) を *cvfA/pnpA* 二重遺伝子破壊株に導入した。*pR402A/pR403A*、*pH407D*、*pD496G* 導入株の溶血毒素産生は空ベクター (*pND50*) 導入株と同程度であった (図3)。一方、*pD96G*、*pR413D* 導入株の溶血毒素産生は野生型 *pnpA* 導入株と同程度であった (図3)。以上の結果、即ち RNA 分解活性を有さない点変異型 *pnpA* は *cvfA/pnpA* 二重遺伝子破壊株における溶血毒素産生上昇を相補しないことから、PnpA の RNA 分解活性が CvfA と PnpA に依存の溶血毒素産生制御に必要であることが示唆された。

(3) CvfA による RNA 3'末端ヌクレオチドの構造変換は PnpA による RNA を抑制する

CvfA が 3'末端ヌクレオチドの構造変換活性を持つこと及び PnpA が 3'→5'エキソヌクレアーゼ活性を持つことから私は、CvfA による 3'末端ヌクレオチドの構造変換が PnpA による RNA 分解に影響を及ぼすと考えた。これを検証するために私は、3'-OH 型 RNA、3'末端ヌクレオチド中に 2', 3'-環状ホスホジエステル構造

を持つ RNA (3'-環状型 RNA) 及び 3'-末端ヌクレオチドの 3'-位がモノリン酸化された RNA (3'-リン酸型 RNA) を合成し、PnpA による分解反応を検討した。その結果、3'-OH 型 RNA と 3'-リン酸型 RNA を基質とした場合には、PnpA の添加量の増加に伴って、これらの RNA が分解されるのに対し (図 4)、3'-リン酸型 RNA を基質とした場合には、RNA の分解が著しく抑制されることがわかった (図 4)。PnpA による 3'-OH 型 RNA、3'-環状型 RNA 及び 3'-リン酸型 RNA の PnpA による分解の Vmax はそれぞれ、35、6、1 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ であった。また、PnpA による各 RNA の分解の Km は、それぞれ 22、42、156 μM であった (表 1)。以上の結果は、3'-リン酸型 RNA が PnpA による分解に対して耐性であることを示唆する。

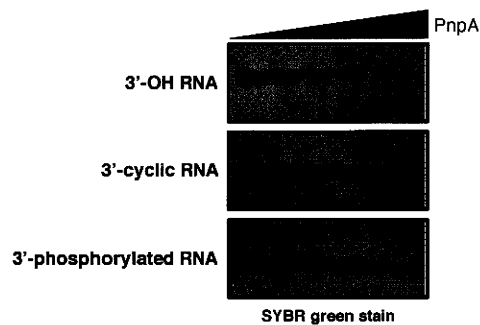


図4 RNA 3'-末端ヌクレオチドがPnpAによる分解に対する影響

Substrate RNA	Vmax $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	Km μM
3'-OH	35	22
3'-Cyclic	6	42
3'-Phosphorylated	1	156

表1 3'-末端構造のRNA分解に対する影響

(4) CvfA と PnpA は *agr* 遺伝子座及び *sae* 遺伝子座の発現を制御する

当教室におけるこれまでの解析によって、*cvfA* 欠損株において *agr* 遺伝子座の発現が低下することが明らかになっている。*agr* 遺伝子座は黄色ブドウ球菌の溶血毒素産生促進因子の一つである。*agr* 遺伝子座には P2 と P3 と呼ばれる二つのプロモーター領域が存在し、それぞれが RNAII、RNAIII と呼ばれる RNA の転写を制御する。RNAII にコードされる転写因子 AgrA は、RNAII と RNAIII の転写を促進し、RNAIII は機能性 RNA として溶血毒素の発現を促進する。私は、CvfA と PnpA が *agr* 遺伝子座の発現を拮抗的に制御するかを検討した。その結果、*cvfA* 遺伝子破壊株における RNAII 及び RNAIII 量の低下が *cvfA/pnpA* 二重遺伝子破壊株において回復することがわかった。さらに、*cvfA* 遺伝子破壊株において P2 及び P3 プロモーター活性が低下し、この低下が *cvfA/pnpA* 二重遺伝子破壊株において回復することがわかった (図 5AB)。以上の結果は、CvfA と PnpA が拮抗的に *agr* 遺伝子座の発現を制御することを示唆する。

sae 遺伝子座は二成分制御系をコードし、溶血毒素産生を正に制御することが知られている。当教室で行われたマイクロアレイ解析によって *cvfA* 欠損株において *sae* 遺伝子座の発現が低下することが明らかになっている。私は、CvfA と PnpA が、*sae* 遺伝子座の発現を拮抗的に制御するかを知るために、*cvfA* 遺伝子破壊株、*cvfA/pnpA* 二重遺伝子破壊株における *sae* 遺伝子座の発現量を調べた。その結果、*cvfA* 遺伝子破壊株における *sae* 遺伝子座の発現低下が *cvfA/pnpA* 二重遺伝子破壊株において回復することがわかった (図 5C)。以上の結果は CvfA と PnpA が拮抗的に *sae* 遺伝子座の発現を制御することを示唆する。

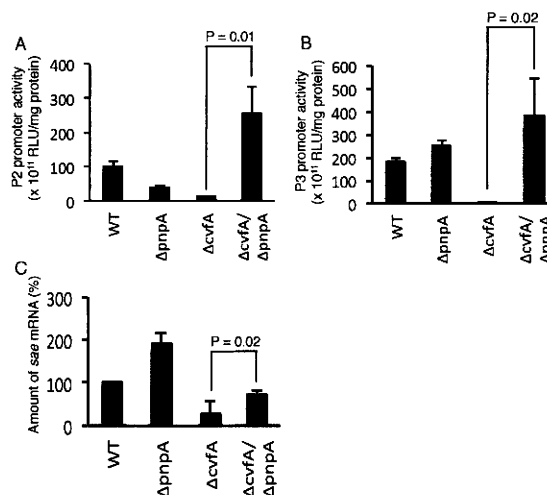


図5 CvfAとPnpAによる*agr*と*sae*の発現制御

(A) (B) *agr* 遺伝子座のプロモーター活性 (C) *sae* 遺伝子座の転写産物量

【考察】

本研究の結果は、CvfA と PnpA が *agr* 及び *sae* 遺伝子座の発現調節を介して黄色ブドウ球菌の溶血毒素産生を拮抗的に制御することを示唆する。また、CvfA による RNA 3'-末端ヌクレオチドの構造変換がその RNA

の PnpA による分解を抑制することを示唆する。これらのことから、CvfA が溶血毒素産生に必要な RNA を 3'-リン酸型 RNA へ変換することによって、これらの RNA の PnpA による分解を抑制し、溶血毒素産生を制御するという機構が考えられる(図 6)。RNA の 3'-末端ヌクレオチドの構造変換が RNA の安定性を変化させること、及びこの RNA 安定性制御系が細菌の病原性遺伝子の発現を制御することを示唆したのは本研究が初めてである。この成果は、RNA 代謝調節系の全体像の理解に寄与するものであり、また RNA 代謝系を標的とした新規創薬基盤の確立に貢献するものである。

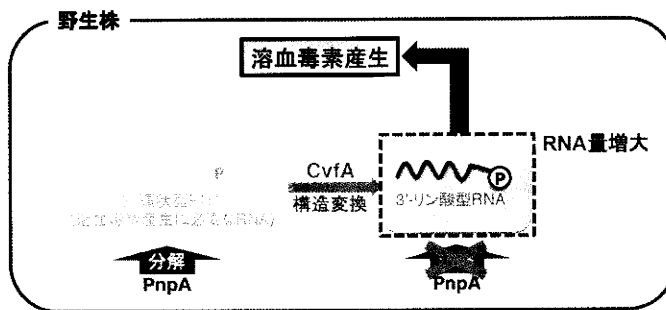


図6 CvfAとPnpAによるRNA分解制御を介した溶血毒素産生制御