

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	大腸菌の酸耐性発現制御機構の解明
Title(English)	Regulatory mechanism of acid resistance in Escherichia coli.
著者(和文)	神田健
Author(English)	Takeshi Kanda
出典(和文)	学位:博士(工学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11965号, 授与年月日:2021年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:和地 正明,福居 俊昭,田中 寛,平沢 敬,八波 利恵
Citation(English)	Degree:Doctor (Engineering), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11965号, Conferred date:2021/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

論文題目：大腸菌の酸耐性発現制御機構の解明

神田 健 指導教員 和地 正明

【緒言】

病原性大腸菌は主要な食中毒原因菌の一つであり、主に経口感染によりヒトに感染する。したがって感染過程では、強力な酸である胃酸（ $\text{pH} < 2.5$ ）に曝されることになる。その際、大腸菌は強力な酸耐性機構を発現することで生残り、腸に到達して病原性を発現する。これまでに GAD（Glutamic acid decarboxylase）システムと呼ばれる酸耐性機構が胃酸中での生残に必須であることが見出されているものの、その発現制御機構の全容は解明されていない。そこで本研究は、病原性大腸菌の感染防除の観点に立ち、GAD システム発現制御機構の解明を目指した。

【結果と考察】

1. GAD システムの発現を抑制するシグナル分子の発見

先行研究において、薬剤や細胞内代謝物の排出に寄与する外膜チャネルタンパク質 TolC を欠損した大腸菌株では GAD システムの発現が抑制されることが見出されていた。そこで、TolC チャネルの欠損により細胞内に蓄積した代謝物の中に GAD システムの発現を抑制するシグナル分子があると予想し、大腸菌が酸性条件に曝された際に発現が大きく変動する代謝関連遺伝子を RNA-seq 解析により探索した。その結果、培養 pH を弱酸性（ $\text{pH} 5.5$ ）にシフトしたとき、わずか 30 分で mRNA 量が 1/100 以下にまで減少する遺伝子として *tnaA* を見出した (Fig. 1)。*tnaA* 遺伝子はトリプトファンを分解してインドールを生産する唯一の酵素、トリプトファナーゼをコードしている。一方、インドールは TolC チャネル依存的排出ポンプにより細胞外に排出されることが報告されていた。これらのことから、*tolC* 欠損株ではインドールが排出されず細胞内に蓄積することで GAD システムの発現が抑制されていることが示唆された。*tolC* 欠損株に *tnaA* 欠損を導入しインドールを生産できないようにしたところ、予想通り GAD システムの発現が回復し、逆に培養液中にインドールを添加すると GAD システムの発現が抑制された。以上より、インドールが GAD システムの発現を抑制するシグナル分子であることを特定した。

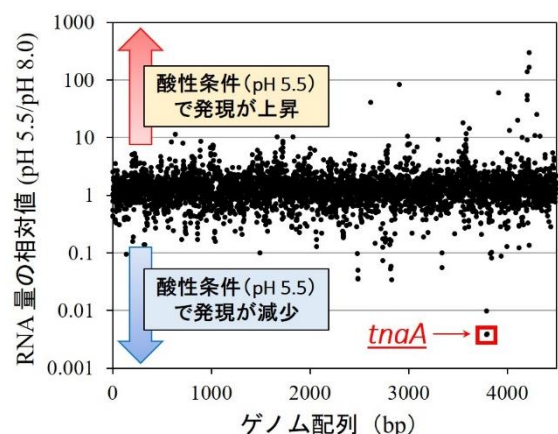


Fig. 1 酸応答遺伝子プロファイル

2. 酸性条件における *tnaA* mRNA の特異的な分解

次に、酸性環境下で *tnaA* mRNA 量が急減する機構の解明を目指した。*tnaA* mRNA の減少は細胞の倍化時間にあたる 30 分以内に起きており、転写レベルの抑制ではこれほど急激な mRNA の減少が説明できないため、RNA 分解酵素 (RNase) の関与について検証を行った。

大腸菌では、主に RNase E および RNase G のいずれかのエンド型リボヌクレアーゼによる切断が mRNA 分解の引き金となる。そこでこれらの RNase に変異を導入し *tnaA* mRNA 量を定量した。RNase G 変異株 (Δrng 欠失変異) では野生株と同様であったが、RNase E 変異株 (*rne-1* 温度感受性変異) では酸性条件における *tnaA* mRNA の減少が顕著に抑制された。続いて培養液ヘリファンピシンを添加して新規 RNA 合成を停止させ *tnaA* mRNA の分解を経時的に調べた。その結果、酸性条件に曝すと *tnaA* mRNA の分解速度が増大するとともに、この pH 依存性は RNase E 変異株では完全に消失した (Fig. 2)。以上より、酸性条件では RNase E による *tnaA* mRNA の分解活性が増大することで、その急激な減少がもたらされることを明らかにした。

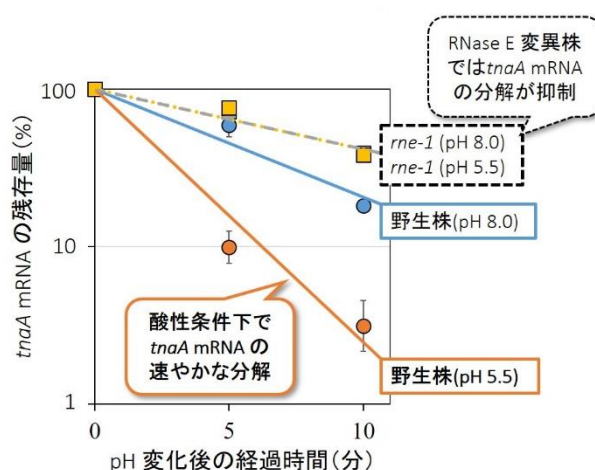


Fig. 2 pH に依存した RNase E による *tnaA* mRNA の分解

pH 依存性は RNase E 変異株では完全に消失した (Fig. 2)。以上より、酸性条件では RNase E による *tnaA* mRNA の分解活性が増大することで、その急激な減少がもたらされることを明らかにした。

【結言】

以上のことから、次のような GAD システム発現誘導メカニズムを提唱した (Fig. 3)。①中性・アルカリ性条件ではインドールにより GAD システムの発現は抑制されている。②酸性環境に曝されると RNase E により *tnaA* mRNA が急速に分解され、トリプトファンナーゼの合成が停止する。③細胞内に残留しているインドールは TolC チャンネルにより細胞外に排出される。④その結果、細胞内インドール濃度が低下し、GAD システムの発現が誘導される。

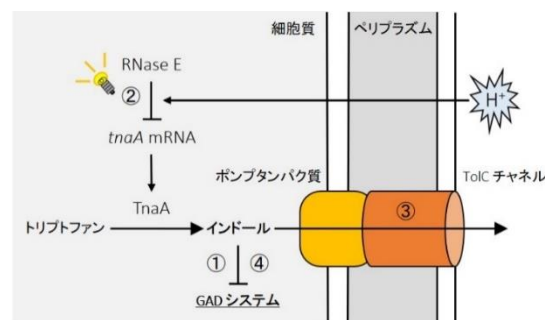


Fig. 3 GAD システムの発現誘導モデル

【研究発表】

- Kanda T, Abiko G, Kanesaki Y, Yoshikawa H, Iwai N, Wachi M. (2020) RNase E-dependent degradation of *tnaA* mRNA encoding tryptophanase is prerequisite for the induction of acid resistance in *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* **10**, 7128. doi: 10.1038/s41598-020-63981-x.
- 神田健、和地正明 (2020) 特異的 mRNA 分解を介した大腸菌の酸耐性発現機構. バイオサイエンスとインダストリー. **78**, 494-495.