

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)	論文要旨
Type(English)	Summary

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	（工学）
学生氏名： Student's Name	神田 健		指導教員（主）： Academic Supervisor(main)	和地 正明	
			指導教員（副）： Academic Supervisor(sub)		

要旨（和文 2000 字程度）

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters)

本論文は「大腸菌の酸耐性発現制御機構の解明」と題し、大腸菌が経口感染した際に胃酸を通過して生残するために必要な機構である酸耐性機構に着目し、その発現制御機構の全容解明を目指したものである。本論文は、以下の6章より構成されている。

第1章「序論」では、まず食中毒被害を引き起こす主要な腸管内病原性大腸菌について、病理等を概説した。これまでに特定された様々な病原因子について紹介し、特に各菌株の主要感染経路が共通して経口感染である点に着目して述べた。病原性大腸菌の感染成立には、胃酸を通過するための酸耐性機構が必須な役割を担っているといえる。大腸菌の酸耐性機構の中で、最も強力なGAD (Glutamic acid decarboxylase) システムを中心に概説した。GAD システムは、哺乳動物の胃酸通過に必要な機構であることが長く知られていたが、その発現制御機構の全容は未だ解明されていなかった。そこで、GAD システムの発現制御因子について、これまでの報告例を紹介した。さらにそれに加え、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 が、GAD システムの発現制御に寄与していることを見出していたため、TolC 依存的な排出システムについて概説した。特に TolC により排出される細胞内代謝物の一例として、近年、シグナル伝達物質として注目されているインドールについて述べた。最後に、本研究により GAD システムの発現制御に重要な役割を果たしていることが明らかとなった RNase E について、一般的な役割を概説した。特に、大腸菌における mRNA 分解の起点となる RNase E を中心に述べた。

第2章「インドールによる GAD システムの発現抑制」では、*tolC* 変異株において生じる GAD システムの発現抑制が、細胞内に蓄積したインドールによりもたらされているかどうか検証した。まず細胞内インドール濃度を測定し、*tolC* 変異株では、野生株と比べて細胞内にインドールが蓄積していることを確かめた。次に、*tolC* 変異株にインドール合成酵素をコードする *maA* 遺伝子の欠損変異を導入し、GAD システムの発現レベルを解析した。*tolC* 変異株では GAD 活性の誘導および転写アクチベーターをコードする *gadA*, *gadE* mRNA の発現は抑制されていたが、*tolC maA* 二重変異株では、それらが野生株と同程度まで回復した。最後に、培養液にインドールおよびインドール前駆体であるトリプトファンを添加すると、野生株における GAD 活性の誘導が抑制されることを確認した。以上より、*tolC* 変異株ではインドールの蓄積により GAD システムの発現が抑制されていたと考えられた。したがってこれより、インドールは GAD システムの発現を抑制するシグナル分子であると結論付けた。

第3章「RNase E による *maA* mRNA の分解を介した GAD システムの発現誘導」では、まず RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析を行い、野生株と *tolC* 変異株の両株において、酸性条件下 (pH 5.5) では *maA* mRNA 量が顕著に減少することを発見した。この pH 5.5 における *maA* mRNA 量の減少は RNase E 変異の導入により抑制されたため、*maA* mRNA は RNase E による切断を引き金として分解されている可能性が示唆された。さらにリファンピシンチェイス実験により pH 8.0 と 5.5 における *maA* mRNA の半減期を測定したところ、*maA* mRNA の分解は pH 5.5 で促進されることが明らかとなった。一方、RNase E 変異の導入により *maA* mRNA の分解速度は顕著に遅くなり、また pH 5.5 における分解の促進も見られなくなった。したがって、酸性条件下では RNase E による *maA* mRNA の分解活性が増大することで、*maA* mRNA 量の急激な減少がもたらされていたと考えられた。RNase E による *maA* mRNA の急激な分解はトリプトファンへの発現を停止させることで、新規インドール合成の停止を引き起こすと推測された。酸性条件下における *maA* mRNA の分解活性の増大は、GAD システムの発現を誘導するトリガーとして機能する重要な現象であると考えられた。この発見をもとに、RNase E による *maA* mRNA の切断を介した GAD システムの発現誘導モデルを提唱した。

第4章「インドールが GAD システムの発現を抑制する機序の解析」では、GAD システムの発現制御因子の中から、インドールが作用する標的因子の特定を目指した。(詳細は公表不可)

第5章では、新規な酸耐性機構と考えられる酸応答現象を発見し、その詳細を解析した。(詳細は公表不可)

第6章「総括」では、本研究成果を総括するとともに、今後の展望について述べた。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(工学)
学生氏名： Student's Name	神田 健		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	和地 正明	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)		

要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Acid-resistance (AR) systems are essential for pathogenic *Escherichia coli* to survive in the strongly acidic environment of the human stomach (pH < 2.5). Although these systems have been revealed to be induced under moderately acidic conditions (pH 5.5), precise mechanisms of the induction are unclear. In this study, gene-expression profiles upon acid treatment were analyzed by RNA-sequencing. Upon exposure to moderately acidic conditions (pH 5.5), levels of mRNA encoding tryptophanase were drastically decreased. A physiological role of this response was investigated.

Tryptophanase encoded by the *tnaA* gene produces indole, which is a substrate of TolC outer membrane channel-dependent efflux pumps. Previous study showed that *tolC* mutant lacking the TolC channel exhibited increased acid sensitivity since the glutamic acid decarboxylase (GAD)-dependent AR system was not induced. Based on this finding, the effect of indole on GAD induction was analyzed. GAD expression was restored by deleting *tnaA* gene in the *tolC* mutant, while in the wild-type *E. coli*, it was suppressed by adding indole to the growth medium. These results suggested that indole negatively regulates GAD expression. The decrease in mRNA levels of *tnaA* upon pH shift to 5.5 was suppressed by RNase E deficiency, suggesting that *tnaA* mRNA was degraded via cleavage catalyzed by RNase E under acidic conditions. A rifampicin-chase experiment was performed to determine the turnover rate of *tnaA* mRNA. Decay of *tnaA* mRNA was accelerated upon a shift to pH 5.5 in the wild-type cells. In contrast, in the mutant of RNase E, acceleration of *tnaA* mRNA decay upon pH shift was completely abrogated. These results suggested that the degradation rate of *tnaA* mRNA increased after the acidic shift in an RNase E-dependent manner.

Collectively, this study demonstrates that the RNase E-dependent degradation of *tnaA* mRNA is accelerated upon acid exposure, which decreases intracellular indole levels and triggers the GAD induction.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note: Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).