

博士論文

論文題目 rRNA の化学修飾の生理的意義の解明

氏 名 久間 達彦

博士学位論文

rRNA の化学修飾の生理的意義の解明

東京大学大学院 薬学系研究科
薬科学専攻 微生物薬品化学教室

平成 24 年度進学 久間 達彦

目次

序章	5
第一章 16S rRNA メチル化酵素 RsmH, RsmI は黄色ブドウ球菌の病原性に寄与する	7
1. 背景	
2. 新規病原性遺伝子 SA0447, SA1022 の同定	
3. SA0447, SA1022 は黄色ブドウ球菌の 16S rRNA メチル化酵素 RsmI, RsmH をコードする	
4. RsmH, RsmI は黄色ブドウ球菌のマウスに対する病原性に寄与する	
第二章 16S rRNA メチル化酵素 RsmH, RsmI は、酸化ストレス耐性の向上により黄色ブドウ球菌の病原性に寄与する	19
1. 背景	
2. RsmH, RsmI は黄色ブドウ球菌の酸化ストレス耐性に寄与する	
3. RsmH, RsmI は酸化ストレス存在下におけるリボソームの機能の維持に寄与する	
4. 酸化ストレスの除去により、RsmH, RsmI 破壊株の病原性低下は回復する	
第三章 16S rRNA メチル化酵素 RsmH, RsmI が酸化ストレス耐性の向上に寄与するメカニズムの解析	28
1. 背景	
2. RsmH, RsmI は rRNA を酸化から保護する	
3. rRNA の過剰発現により、RsmH, RsmI 破壊株の酸化ストレス感受性は回復する	
第四章 病原性に寄与する 16S rRNA メチル化酵素の探索と機能解析	35
1. 背景	
2. 16S rRNA メチル化酵素 RsmA は黄色ブドウ球菌の病原性に寄与する	
3. RsmA は黄色ブドウ球菌の酸化ストレス耐性に寄与する	
4. RsmA は酸化ストレス存在下における正常な翻訳の維持に寄与する	
5. 酸化ストレスの除去により、RsmA 破壊株の病原性低下は回復する	
第五章 材料と方法	48
終章 まとめと考察	57

引用	65
要旨	74
謝辞	79

序章

分子生物学研究における方法としての病原性細菌学

複製、転写、翻訳という生命の根幹を成す機構について大腸菌を用いた微生物学研究が大きな成果を上げた。さらに、ここで見出された現象は、細菌からヒトにいたるまで高度に保存されているということが後の研究により明らかとなった。従って、微生物を用いた生物学の研究は、細菌の理解のみならず、生命一般を理解する上でも大きな役割を果たして来たと言える。

私は、病原性細菌学についても、生命一般を理解することに寄与することが出来ると考えている。病原性の発揮の過程において病原性微生物は種々のストレスに曝される。その様な過酷な環境においても微生物は自らの増殖を維持するとともに、必要な遺伝子を適切な段階で、適切な量、適切な方法で発現することで宿主との戦いにおいて勝利し、病原性を発揮する。この過程において必要な因子、そしてそれらの因子群が構成する仕組みの中には、細菌でしか用いられないものや、細菌の中でも特定の種においてしか見られない物も多く存在することがこれまでに知られている。しかし、私はその一方で、病原性発揮機構の中には、未だにいかなる生物種においても明らかでない新規のストレス耐性、遺伝子発現制御機構が存在すると考えた。そして病原性細菌学を手法として用いることで、大腸菌の微生物学が明らかにしてきたように、生命において普遍的に見られる重要な機構の解明が出来ると考えた。

第一章

16S rRNA メチル化酵素 RsmH, RsmI は
黄色ブドウ球菌の病原性に寄与する

1. 背景

細菌は病原性発揮の過程において様々なストレスに曝露される (1)。また、病原性発揮の過程においては必要な遺伝子の発現の適切な調節がなされている (2)。従ってストレス耐性や遺伝子発現調節の理解という分子生物学における課題に取り組む系として病原性発揮という現象が有用であると私は考えた。そこで、生物種間で保存されながらもその機能について未だ良く理解されていない遺伝子群の中から細菌の病原性に寄与するものを探索した。

2. 新規病原性遺伝子 SA0447, SA1022 の同定

黄色ブドウ球菌の新規病原性遺伝子を同定する目的で、細菌間で高度に保存された機能未知遺伝子の破壊株を黄色ブドウ球菌において 73 株作出した。そしてこれらの遺伝子破壊株の病原性を、カイコに注射することによって評価した。その結果、野生株を注射したカイコと比べ、SA0447, SA1022 遺伝子を破壊した株を注射したカイコでは、死亡の遅延が見られた (Fig.1-1)。さらに、SA0447, SA1022 遺伝子破壊株で見られたカイコの殺傷の遅延は、SA0447, SA1022 遺伝子の再導入により相補された (Fig.1-2)。また、これらの遺伝子破壊株の増殖を野生株と比較したところ、これらの株の増殖能は野生株と同程度であった (Fig.1-3)。以上の結果から、SA0447, SA1022 は黄色ブドウ球菌の新規病原性遺伝子であると判断した。

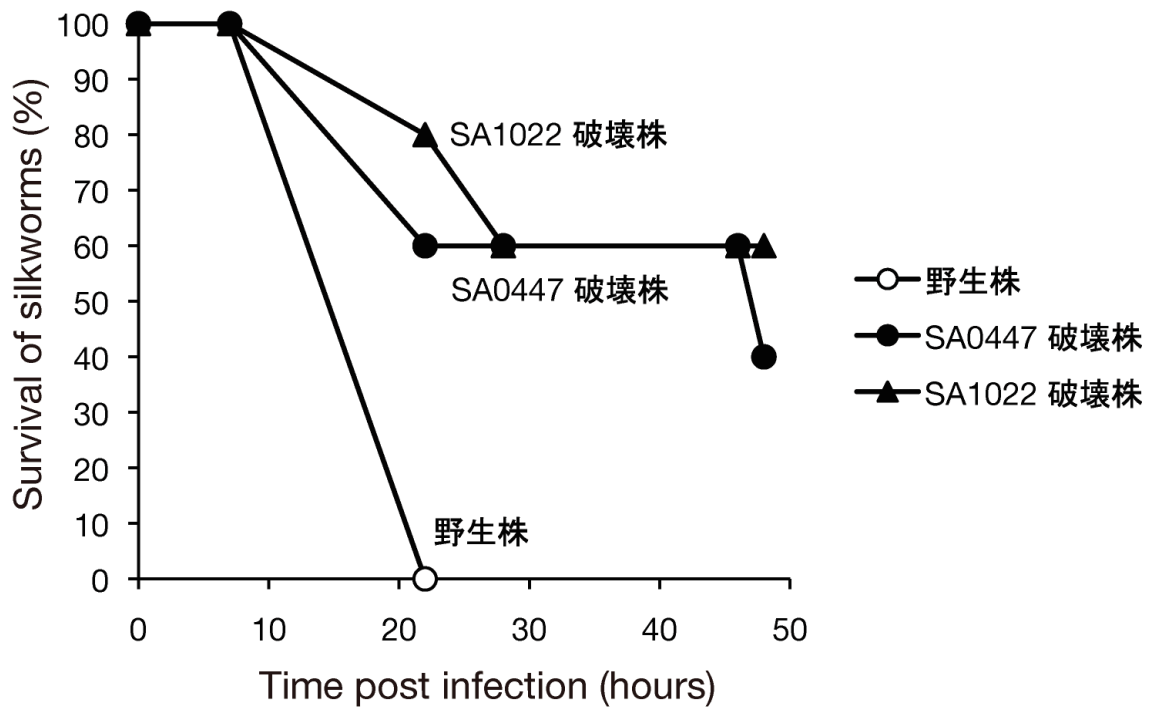


Figure 1-1 SA0447, SA1022 破壊株のカイコに対する病原性

黄色ブドウ球菌の野生株、SA0447 破壊株、SA1022 破壊株を5頭のカイコに 6×10^6 CFU 注射し、カイコの生存率を観察した。

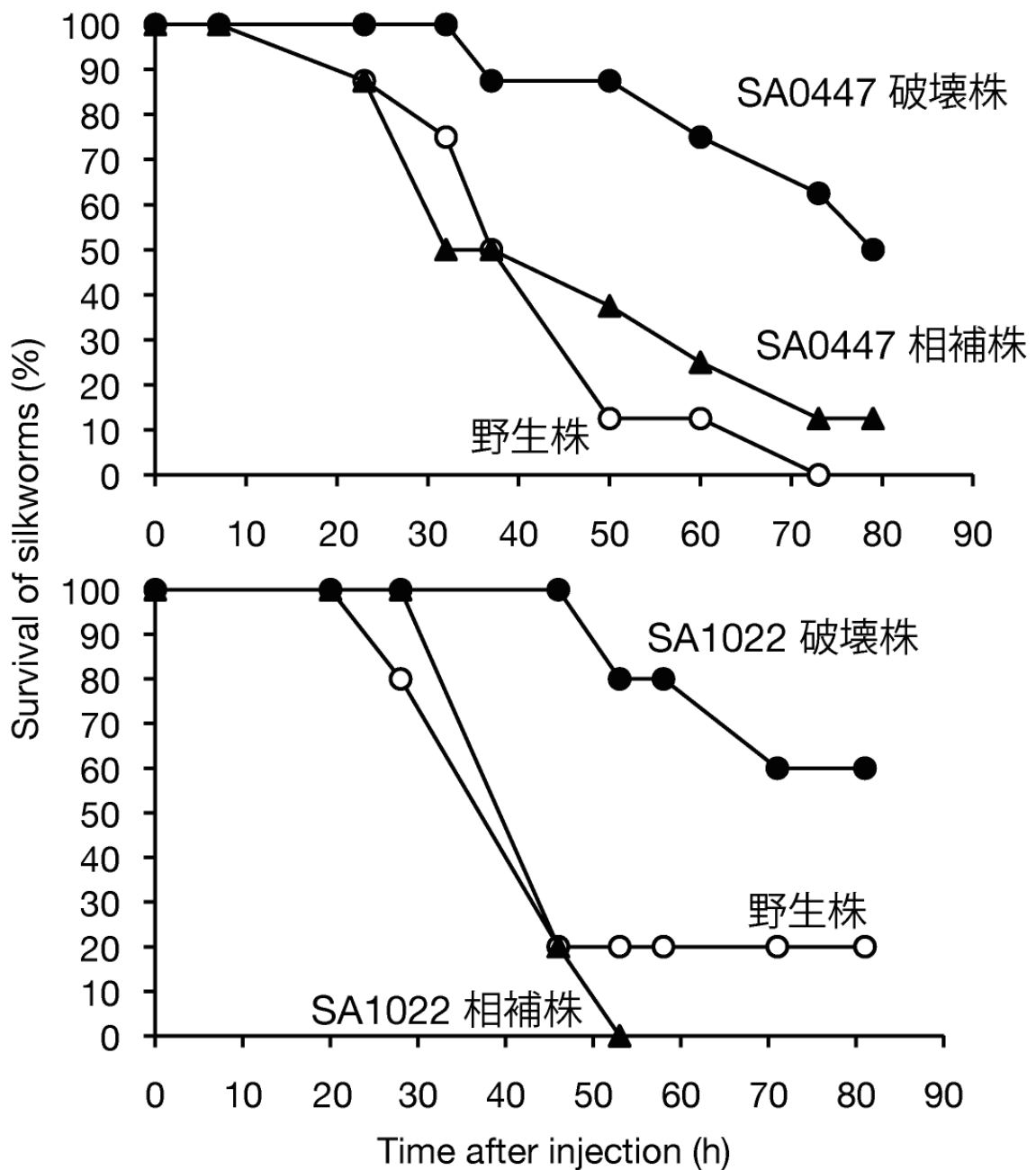


Figure 1-2 黄色ブドウ球菌のカイコ殺傷能力に対する SA0447, SA1022 遺伝子の影響

(上図) 黄色ブドウ球菌の野生株、SA0447 破壊株、SA1022 相補株 (3×10^6 CFU) を 8 頭のカイコに注射し、生存数を測定した。

(下図) 黄色ブドウ球菌の野生株、SA0447 破壊株、SA1022 相補株 (3×10^6 CFU) を 5 頭のカイコに注射し、生存数を測定した。

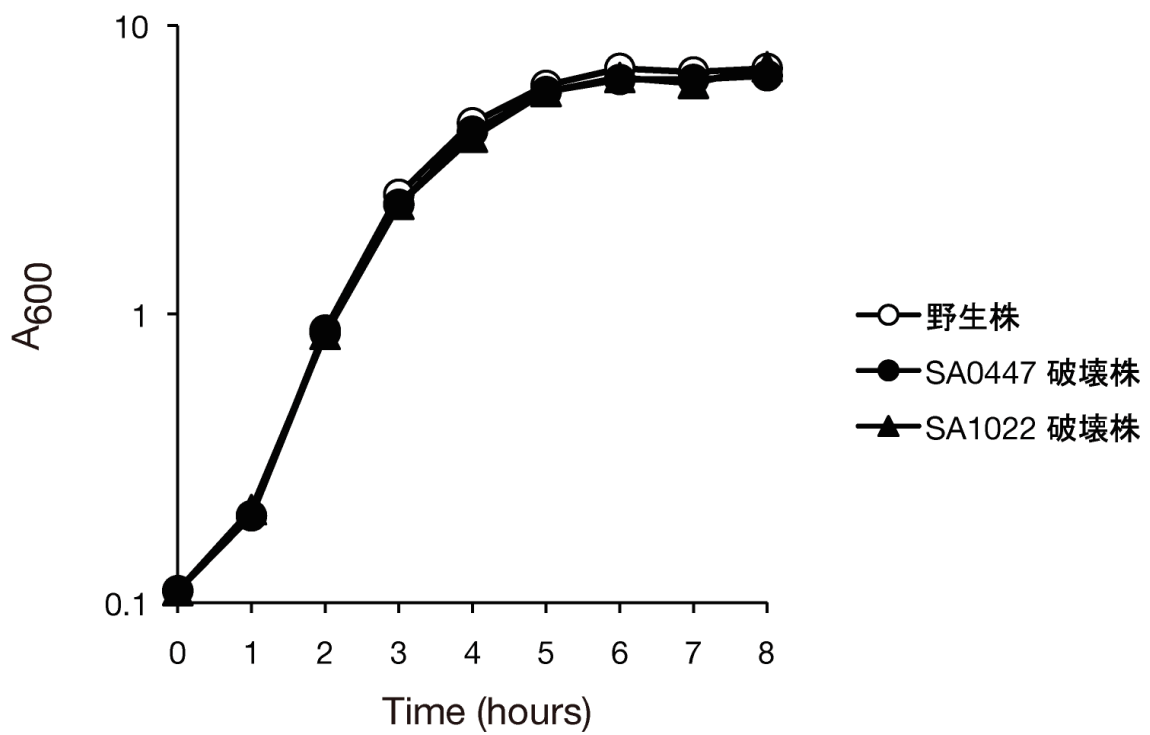


Figure 1-3 黄色ブドウ球菌の SA0447, SA1022 遺伝子破壊株の増殖能

黄色ブドウ球菌の野生株、SA0447 破壊株、SA1022 破壊株を栄養培地中で培養し、菌液の濁度を経時的に測定した。

2. SA0447, SA1022 は黄色ブドウ球菌の 16S rRNA メチル化酵素 RsmI, RsmH をコードする

相同性検索の結果、新規病原性遺伝子 SA0447, SA1022 がコードするタンパク質は、大腸菌の 16S rRNA メチル化酵素である、RsmI, RsmH とそれぞれ約 40 % のアミノ酸配列の一致を示すことがわかった (3, 4)。

そこで私は、SA0447, SA1022 が黄色ブドウ球菌の 16S rRNA メチル化酵素 RsmI, RsmH であると考えた。大腸菌において RsmI, RsmH は、16S rRNA の 1402 番目のシチジンをジメチル化する。また、RsmI, RsmH は、それぞれ 1402 2'-*O*-methylcytidine, 1402 *N*⁴-methylcytidine の形成に必要である (4)。加えて、大腸菌の 1402 番目のシチジンの前後 24 bp を含む領域と、黄色ブドウ球菌の 16S rRNA の 1412 番目のシチジンの前後 24 bp は配列が完全に一致している。従って大腸菌の 1402 C は黄色ブドウ球菌の 1412 C に相当すると考えられる。そこで私は SA0447, SA1022 遺伝子がそれぞれ 16S rRNA 1412 2'-*O*-methylcytidine, 1412 *N*⁴-methylcytidine の形成に必要であるか検討した。

1412 C を含む 49mer の RNA (positions 1388-1436) を調製し、LC/MS を用いて解析を行った。黄色ブドウ球菌の野生株から単離された RNA 断片を、RNaseT1 又は RNaseA により処理し、LC-MS の解析に供したところ、ジメチル化体の tetramer (m4CmCCGp, MW1306.2) および trimer (Gm4CmCp, MW 1001.2) が見いだされた (Fig. 1-4B, C)。

その一方で、SA0447 破壊株から単離された RNA 断片を、RNaseT1 又は RNaseA により処理したところ、モノメチル化を受けた tetramer (m4CCCGp or CmCCGp, MW 1292.2) およびモノメチル化を受けた dimer (Gm4Cp) が見いだされた (Fig. 1-4B,

C)。また、このとき、RNaseA を用いてもモノメチル化を受けた trimer (GCmCp) は見られなかった。2'-O-methylation を受けた cytidine は、RNaseA による消化に耐性となる (Fig. 1-4A)。従って、SA0447 の破壊株由来の RNA 断片を RNaseA で処理した際に、trimer ではなく dimer が検出されたという結果から、SA0447 遺伝子は、2'-O-methylation に必要であることが示唆された (Fig. 1-4B, C)。

SA1022 破壊株から単離された RNA 断片を RNaseT1 又は RNaseA により処理すると、モノメチル化を受けた tetramer (m4CCCGp or CmCCGp, MW 1292.2) およびモノメチル化を受けた trimer (GCmCp, MW 987.2) が見いだされた (Fig. 1-4B, C)。

以上の結果は、SA0447, SA1022 遺伝子が、それぞれ 16S rRNA 1412

2'-O-methylcytidine , 1412 N⁴-methylcytidine の形成に必要であることを示唆する。

従って、SA0447, SA1022 遺伝子は、黄色ブドウ球菌の 16S rRNA メチル化酵素 RsmI, RsmH をコードすると判断した。

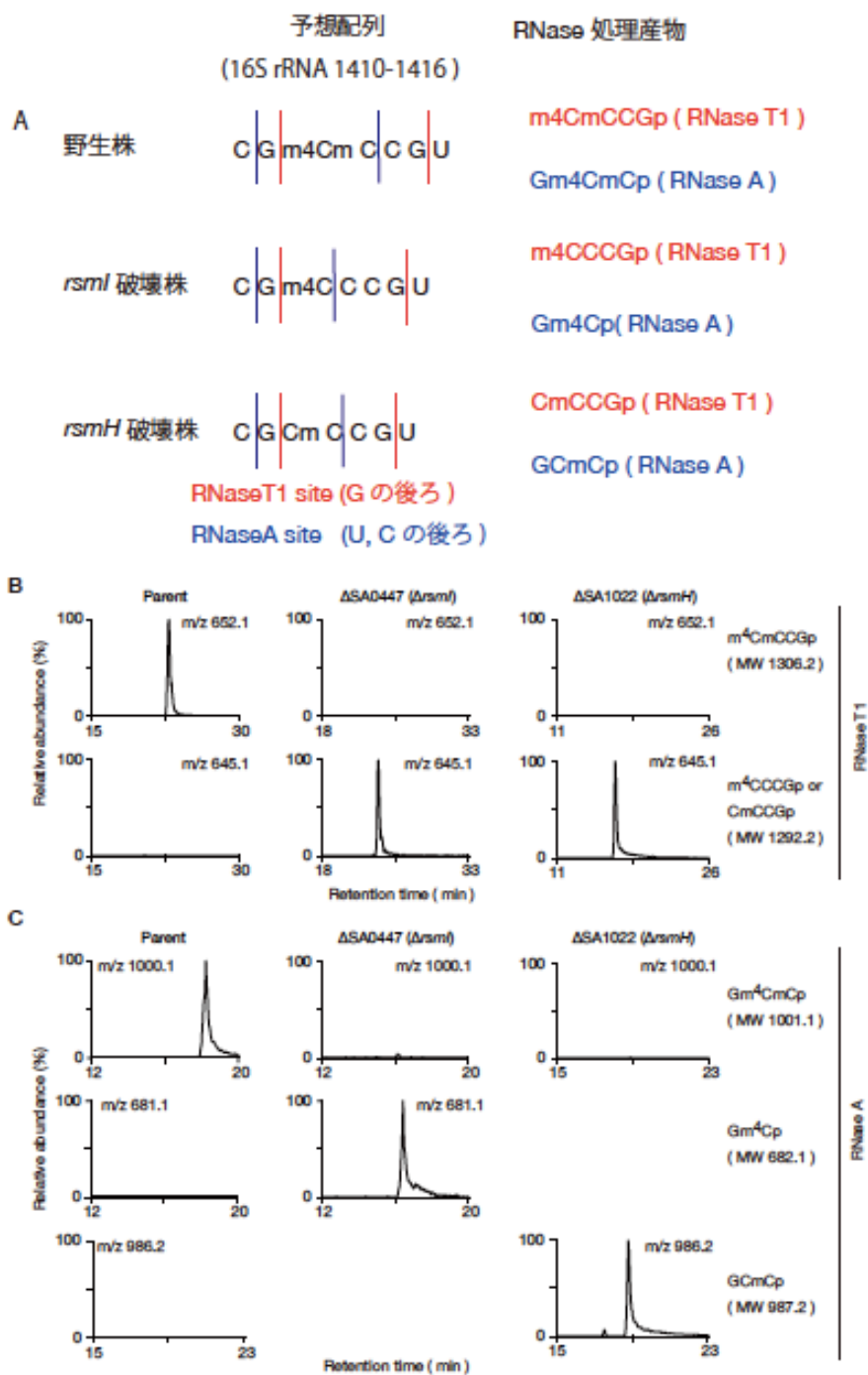


Figure 1-4. 黄色ブドウ球菌の 16S rRNA 1412 C ジメチル化に対する SA0447, SA1022 の影響

- (A) 1412 C の近傍の配列と、得られる RNase 処理産物。
 (B) RNaseT1 処理産物の LC-MS
 (C) RNaseA 処理産物の LC-MS

3. RsmH, RsmI は黄色ブドウ球菌のマウスに対する病原性に寄与する

カイコ感染モデルは哺乳動物に対する細菌の病原性を予測する上で有効である (5)。そこで私は、カイコに対する病原性に寄与した RsmH, RsmI が黄色ブドウ球菌の哺乳動物に対する病原性にも寄与していると考えた。そこで、*rsmH*, *rsmI* 遺伝子の二重破壊株を作出し、マウスに対する病原性を評価した。黄色ブドウ球菌の野生株を注射したマウスと比べ、*rsmH/rsmI* 二重破壊株を注射したマウスでは、死亡の遅延が見られた (Fig. 1-5)。さらに、ここで見られた死亡の遅延は、*rsmH*, *rsmI* 遺伝子の再導入により回復した (Fig. 1-5)。さらに、野生株、*rsmH/rsmI* 二重破壊株、*rsmH*, *rsmI* 相補株について、マウスの半分を死亡させるのに必要な菌数である LD₅₀ を決定したところ、野生株と比べ、二重破壊株では LD₅₀ が2倍以上に上昇していた (Table 1-1)。さらに、ここで見られた LD₅₀ の上昇は、*rsmH*, *rsmI* 相補株では見られなかった (Table 1-1)。以上の結果は、RsmH, RsmI が黄色ブドウ球菌のマウスに対する病原性に寄与することを示唆する。

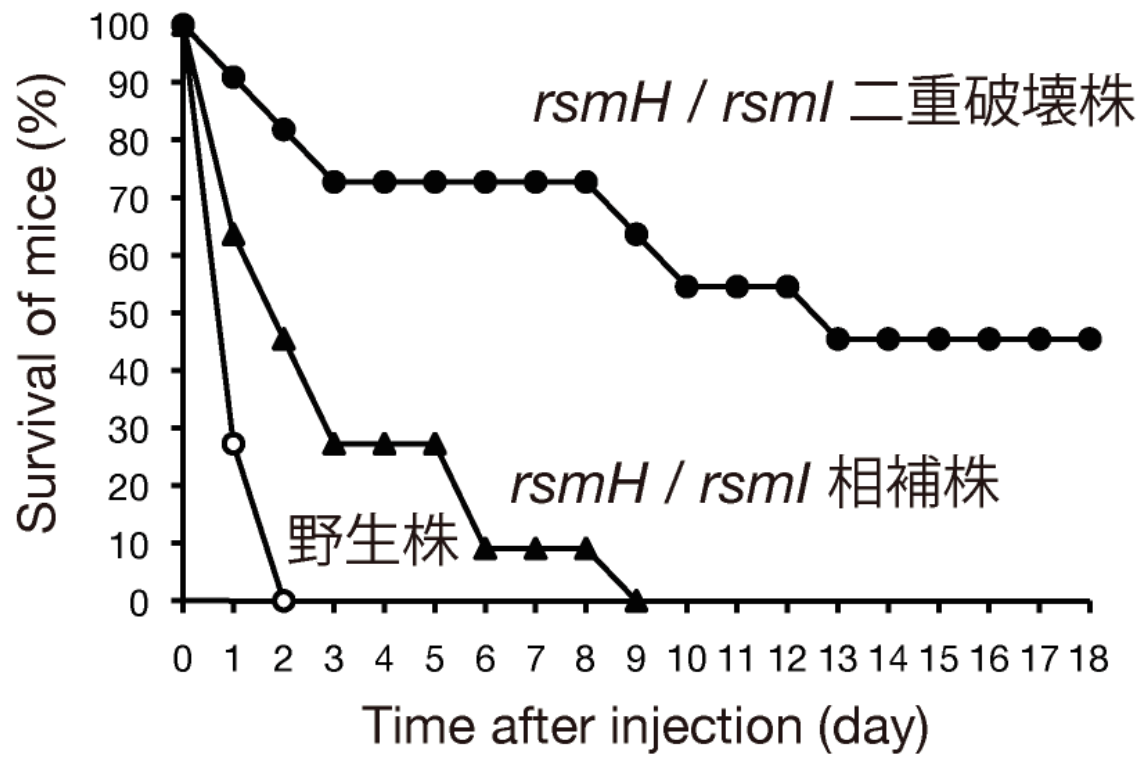


Figure 1-5 黄色ブドウ球菌のマウス殺傷能力に対する *rsmH*, *rsmI* の影響

黄色ブドウ球菌の野生株、*rsmH/rsmI* 破壊株、そしてこの破壊株において破壊した遺伝子を再導入した相補株をマウスに注射し、マウスの生存を経時的に観察した。

菌株	LD ₅₀ (x 10 ⁸ CFU)	LD ₅₀ ratio	P value
野生株	2.3	1	
<i>rsmH, I</i> 破壊株	6.1	2.8	< 0.0001 (vs. 野生株)
<i>rsmH, I</i> 相補株	2.0	0.91	< 0.0001 (vs. 破壊株)

Table 1-1 黄色ブドウ球菌のマウス殺傷能力に対する *rsmH*, *rsmI* 遺伝子の影響

黄色ブドウ球菌の野生株、*rsmH*, *rsmI* 破壊株、*rsmH*, *rsmI* 相補株をマウスに注射し、投与した菌数とマウスの死亡率の間の用量作用曲線から LD₅₀ (マウスの半数を死亡させるのに必要な菌数) を求めた。この値が大きいほど、マウスを死亡させるのにより多くの菌数を必要とする、即ち病原性が低いことを示唆する。また、この値が小さいほど、マウスを死亡させるのにより少ない菌数で十分である、即ち病原性が高いことを示唆する。P value は likelihood ratio test により得た値を示す。

第二章

16S rRNA メチル化酵素 RsmH, RsmI は
酸化ストレス耐性の向上により黄色ブドウ
球菌の病原性に寄与する

1. 背景

本研究で私が同定した新規病原性因子は 16S rRNA に対するメチル化酵素であった。これまでに rRNA のメチル化はリボソームの機能において重要な部位に集中していること、並びに細菌からヒトに至るまで高度に保存されていることから、リボソームの機能において重要な役割を果たすと考えられてきた (6, 7)。しかしながら、このメチル化を担う酵素は必須因子ではない。また、欠損株を用いた解析において一般にメチル化酵素の欠損株は親株と同等の増殖を示す事が知られている。そしてメチル化酵素の欠損株のリボソームの機能については低下、上昇を含む軽微な変化を示すことが明らかにされたにとどまっている (8-11)。加えて 16S rRNA メチル化酵素の破壊株における表現型の異常に関する報告も乏しく、16S rRNA メチル化酵素の生理的意義についてはよく判っていなかった。そこで私は、16S rRNA メチル化酵素が病原性に寄与するメカニズムの解明を通して rRNA メチル化の生理的意義の理解を試みた。

黄色ブドウ球菌において RsmH, RsmI は病原性に寄与する。また、RsmH, RsmI を破壊した株の栄養培地中での増殖は野生株と同程度であった。従って黄色ブドウ球菌において、RsmH, RsmI は宿主環境に特異的なストレスへの耐性や、病原性に寄与する遺伝子発現の調節における機能を有すると私は考えた。これまでに大腸菌における解析から、RsmH, RsmI の破壊は翻訳における忠実性の変化を導くことが知られている (4)。このことから私は、宿主環境に、翻訳に対して悪影響を及ぼす何らかのストレスが存在すると考えた。そしてこの翻訳に対するストレスの存在下において、RsmH, I が正常な増殖、並びに翻訳を維持することで病原性に寄与すると考えた。

そこで私は、酸化ストレスに着目した。酸化ストレスは、宿主による細菌の殺傷に用いられることが知られている (1)。また、酸化ストレスによる翻訳忠実性の低下が報告さ

れている (12)。以上の知見より私は、**RsmH**, **RsmI** が酸化ストレス耐性の向上により黄色ブドウ球菌の病原性に寄与するという仮説の検証を試みた。

2. RsmH, RsmI は黄色ブドウ球菌の酸化ストレス耐性に寄与する

RsmH, RsmI が酸化ストレス耐性の向上により黄色ブドウ球菌の病原性に寄与するという仮説の検証のために私は、RsmH, I が黄色ブドウ球菌の酸化ストレス耐性に寄与するか検討した。黄色ブドウ球菌の野生株と *rsmH*, *rsmI* 破壊株の生育を、通常の栄養培地と酸化ストレスを与える薬剤の存在下において比較した。その結果、通常の栄養培地上では両者は同様の生育を示したのに対し、酸化ストレスを与える薬剤であるメナジオン (13)、並びにパラコート (14) の存在下においては野生株と比べ、*rsmH*, *rsmI* 破壊株において生育の低下が見られた (Fig. 2-1)。以上の結果から、RsmH, I は黄色ブドウ球菌の酸化ストレス耐性に寄与すると判断した。

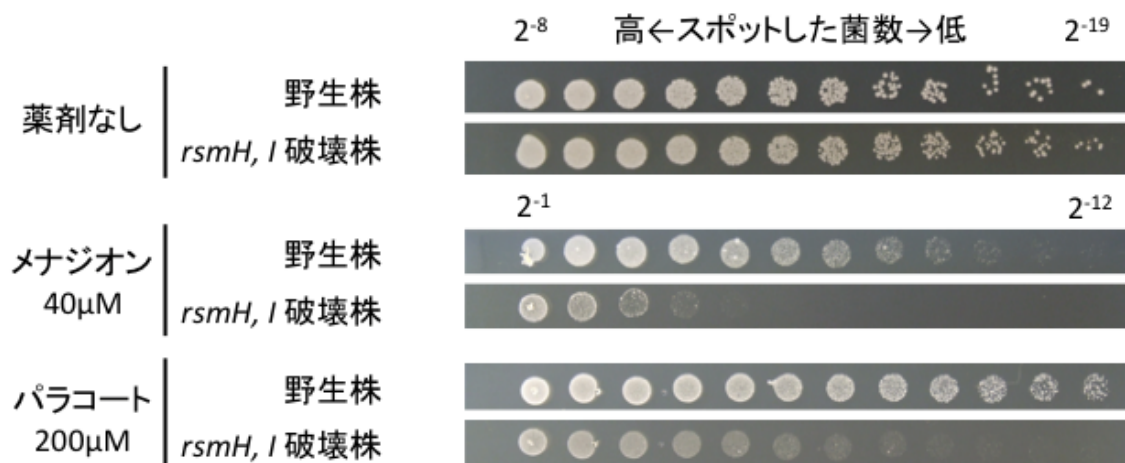


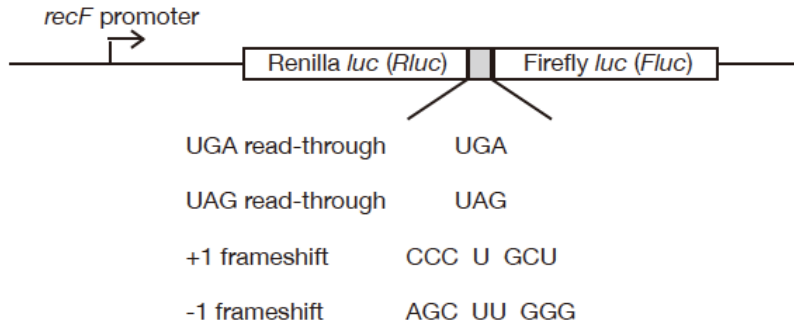
Figure 2-1 黄色ブドウ球菌の酸化ストレス耐性に対する *rsmH, I* 遺伝子の影響

黄色ブドウ球菌の野生株、*rsmH, I* 破壊株の増殖を、薬剤なし、並びに酸化ストレスを与える薬剤であるメナジオン、パラコートの存在下で比較した。

3. RsmH, RsmI は酸化ストレス存在下におけるリボソームの機能の維持に寄与する

RsmH, I が酸化ストレス耐性に寄与したことから私は、酸化ストレス存在下における正常な翻訳の維持に RsmH, I が寄与するか検討した。正常な翻訳の指標として、翻訳における終止コドンの読飛ばし、並びに読み枠のずれ (frameshift) を用いて解析を行った。この解析においては、終止コドン UGA, UAG 又は +1, -1 frameshift に依存して発現するルシフェラーゼを利用した (Fig. 2-2A)。黄色ブドウ球菌の野生株、*rsmH*, *rsmI* 破壊株、*rsmH*, *rsmI* 相補株の翻訳忠実性を酸化ストレスの存在下、非存在下において測定した。その結果、酸化ストレスの非存在下においては野生株と比べ、*rsmH*, *rsmI* 破壊株において翻訳忠実性の低下は見られなかった (Fig. 2-2B)。その一方で、酸化ストレスを与える薬剤の存在下においては野生株と比べ、*rsmH*, *rsmI* 破壊株において、翻訳の異常に依存して発現するルシフェラーゼ活性の上昇が見られた (Fig. 2-2B)。さらにここで見られた翻訳異常は、*rsmH*, *rsmI* 遺伝子の再導入により回復した (Fig. 2-2B)。以上の結果は、RsmH, I が酸化ストレス存在下における正常な翻訳の維持に寄与することを示唆する。

A



B

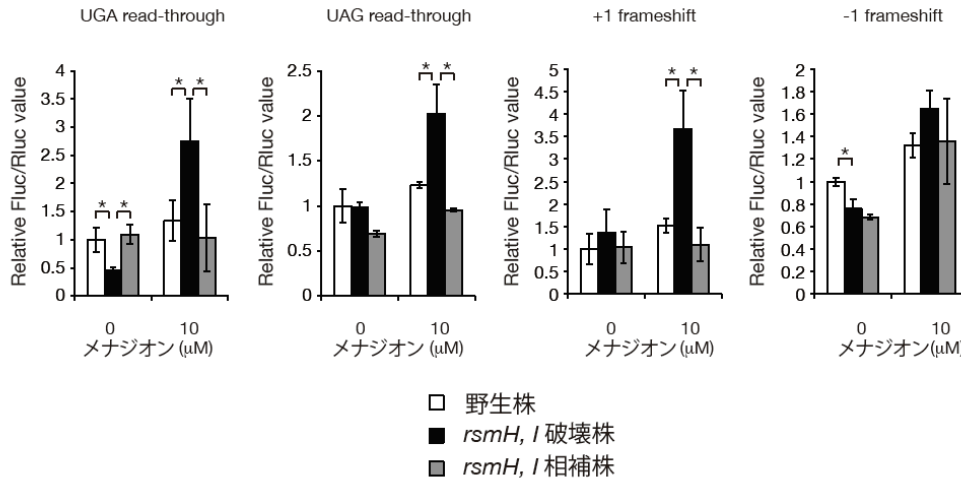


Figure 2-2 酸化ストレス存在下における黄色ブドウ球菌の翻訳忠実性に対する *rsmH, I* 遺伝子の影響

(A) 翻訳異常の発生頻度を測定するために用いたルシフェラーゼ遺伝子の構造

前方の *Renilla luciferase* (R-luc) は正常に発現する一方で、後方の *Firefly luciferase* (F-luc) は終止コドン、又はフレームシフトを生じる塩基の挿入により、通常は発現しない。その一方で、終止コドンの読飛ばし、あるいは読み枠のずれが生じると後方の F-luc が発現する。

(B) 酸化ストレスの非存在下、存在下における黄色ブドウ球菌の翻訳忠実性

縦軸の値は、翻訳の異常に依存して発現する F-luc の活性を、R-luc の活性で規格化した値の、野生株に対する相対値を示す。従って縦軸の値が大きいほど翻訳異常の頻度が高いことを示す。アスタリスクは T-test P 値 < 0.05 を示す。

4. 酸化ストレスの除去により、RsmH, I 破壊による病原性低下は回復する

RsmH, I の破壊株において、酸化ストレス依存的な翻訳の異常、並びに増殖の低下が見られたことから私は、酸化ストレスに対する感受性が RsmH, I 破壊株における病原性の低下を説明すると考えた。この仮説が正しければ、RsmH, I を破壊した株においても、酸化ストレスを除去した条件においては、病原性が回復するはずである。そこで私は、酸化ストレスを除去する薬剤である N-acetyl-L-cysteine (NAC, 15) の投与により、*rsmH*, *rsmI* 破壊株のカイコに対する病原性の低下が回復するか否かを検討した。病原性の評価においてはカイコの半数を死亡させるのに必要な菌数である LD₅₀ を用いた。黄色ブドウ球菌の野生株の病原性を、生理食塩水を投与したカイコ、並びに NAC を投与したカイコに対して評価した。その結果、NAC 投与による野生株の LD₅₀ の低下は見られなかった (Fig. 2-3)。その一方で、*rsmH*, *rsmI* 破壊株においては、生理食塩水を投与したカイコと比べ、NAC を投与したカイコに対して LD₅₀ の低下、即ち病原性の上昇が見られた (Fig. 2-3)。以上の結果は、酸化ストレスの除去剤の投与により、RsmH, I 破壊による病原性低下が回復することを示唆する。

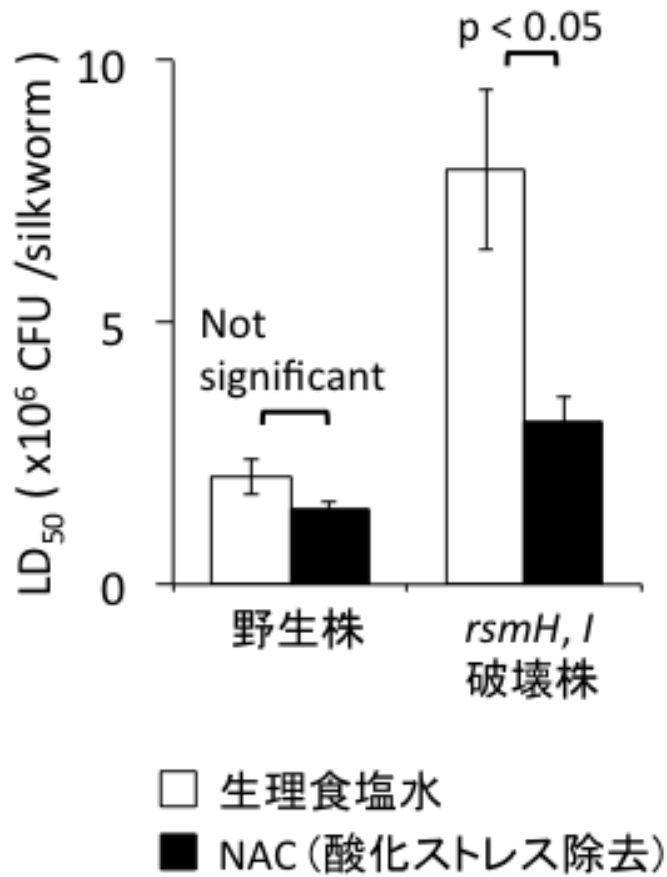


Figure 2-3 *rsmH, I* 破壊株の病原性に対する N-acetyl-L-cysteine の影響

黄色ブドウ球菌の野生株、*rsmH, I* 破壊株の病原性を生理食塩水または酸化ストレスを除去する薬剤である N-acetyl-L-cysteine (NAC) を投与したカイコに対して求めた。LD₅₀ は本実験においてはカイコの半数を死亡させるのに必要な菌数を示し、この値の低下は病原性の上昇を示す。

第三章

16S rRNA メチル化酵素 RsmH, RsmI が
酸化ストレス耐性の向上に寄与するメカニ
ズムの解析

1. 背景

RsmH, I が酸化ストレス耐性の向上を介して黄色ブドウ球菌の病原性に寄与したことから私は、RsmH, I が酸化ストレス耐性に寄与するメカニズムの解明を試みた。

これまでに、RNA が酸化ストレス存在下で酸化を受けることが、RNA の機能の異常を導くことが知られている (16)。従ってメチル化が rRNA の酸化を阻止すると考えると、rRNA メチル化が酸化ストレス耐性を与えることが説明される。

メチル基は、電子供与基として知られており、メチル化は電子が不足する部位に対して電子を供給する効果がある。そして酸化修飾という反応もまた、電子が不足する部位を攻撃する反応である。従って、メチル化により、電子の不足が補われることにより、電子の不足した部位を標的とする反応である酸化反応が阻害されるのではないかと私は考えた。

rRNA はリボソームタンパク質による保護を受けており、RNase による分解や、酸化に耐性であると考えられているが (17,18)、RsmH, RsmI によるメチル化部位である 1412 C については、mRNA と直接相互作用する部位であるため、タンパク質による保護を受けていない (4)。このため、例外的に酸化ストレスを与える活性酸素種と相互作用し易いと考えられる。

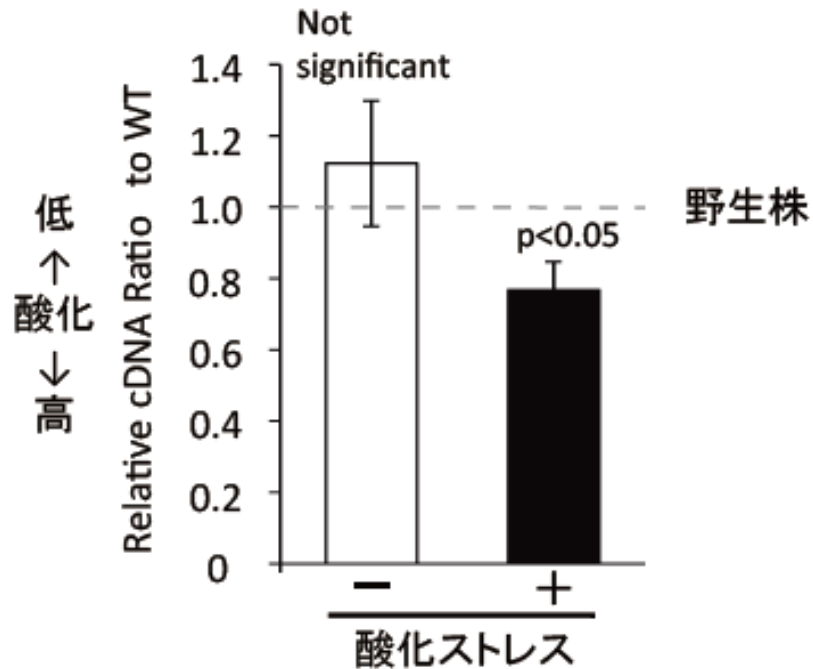
さらに、1412C の塩基置換は、リボソームの機能の低下を導くことから (19)、1412C に酸化による異常が生じると、リボソームの機能低下を介して細菌の増殖低下が導かれると考えられる。

以上の知見より私は、RsmH, I による rRNA の 1412 C に対するメチル化は、リボソームの機能において重要である一方で、活性酸素種と相互作用し易いという点で危険にさらされている 1412 C を酸化反応から保護することで黄色ブドウ球菌の酸化ストレ

ス耐性に寄与すると考え、この仮説を検証した。

2. RsmH, I は rRNA を酸化から保護する。

RsmH, I が rRNA の酸化に与える影響について私は、逆転写と定量的 PCR を用いる方法により検討した。この方法においては、酸化を受けた RNA に対して逆転写を行うと、cDNA 合成が途中で停止するということを利用し、cDNA 合成の阻害を指標に RNA の酸化の程度を評価する (20)。この方法を用いて私は、RsmH, I によるメチル化部位の近傍が酸化を受ける程度について評価を行った。酸化ストレスを与える薬剤を添加せずにインキュベートした際には、黄色ブドウ球菌の野生株由来の rRNA と RsmH, I 破壊株由来の rRNA を鋳型とした逆転写反応の産物において、cDNA 量は同程度であった (Fig. 3-1)。その一方で、酸化ストレスを与える薬剤の存在下においては、野生株と比べ、RsmH, I 破壊株において、cDNA 量の減弱、即ち酸化修飾を受ける頻度の上昇が見られた (Fig. 3-1)。以上の結果は、RsmH, I が rRNA を酸化から保護することを示唆する。



cDNA 量の低下は、cDNA 合成の停止(酸化頻度の上昇)を示す

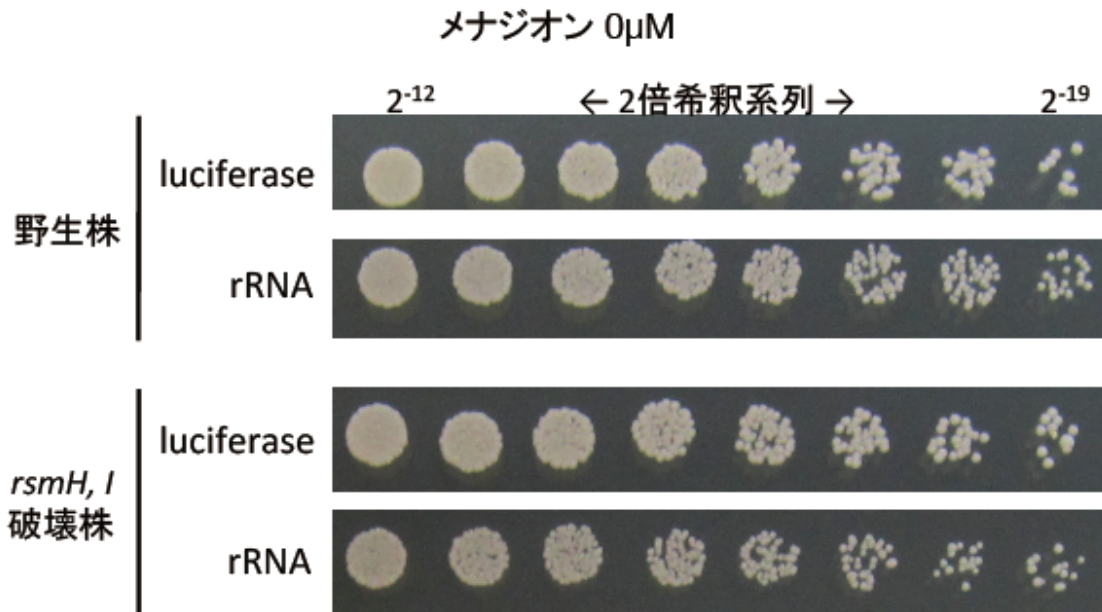
Figure 3-1 RsmH, I が rRNA の酸化に対して与える影響

酸化ストレスの存在下、非存在下でインキュベートした 黄色ブドウ球菌の野生株、並びに *rsmH, I* 破壊株由来の rRNA を鋳型とし、1412 C 近傍について cDNA 合成を行った。得られた cDNA を qPCR により定量した。アスタリスクは T-test P 値 < 0.05 を示す。

3. rRNA の過剰発現により、RsmH, RsmI 破壊株の酸化ストレス感受性は回復する

RsmH, I の破壊株由来の rRNA が酸化を受け易くなったことから私は、RsmH, I による rRNA の酸化の阻害が RsmH, I による酸化ストレス耐性付与を説明するか否かを検証した。この仮説が正しく、RsmH, I 破壊株の酸化ストレス感受性が、rRNA が酸化を受け易くなり、正常な rRNA が減少することで説明されるのであれば、RsmH, I 破壊株において rRNA を過剰発現すれば酸化ストレス感受性が回復すると私は考えた。そこで、rRNA の過剰発現が、*rsmH*, *rsmI* 破壊株の酸化ストレス感受性に与える影響について検討を試みた。RNA 発現のネガティブコントロールとしては ホタルルシフェラーゼの過剰発現を行った。黄色ブドウ球菌の野生株と *rsmH*, *rsmI* 破壊株において、ホタルルシフェラーゼ又は rRNA を過剰発現した株を作出した。そしてこれら 4 株の生育を通常の栄養培地、又は酸化ストレスを与える薬剤の存在下において比較した。その結果、酸化ストレスの非存在下においては 4 つの株は正常な生育を示した (Fig. 3-2A)。その一方で、酸化ストレスを与える薬剤の存在下においては、ネガティブコントロールとして用いたルシフェラーゼを発現する野生株と比べ、同じくルシフェラーゼを発現する *rsmH*, *rsmI* 破壊株において生育の阻害が見られた (Fig. 3-2B)。この条件において、RsmH, I を破壊し、ルシフェラーゼを発現させた株と比べ、rRNA を発現させた株においては生育の回復が見られた (Fig. 3-2B)。以上の結果は、RsmH, I 破壊株で見られた酸化ストレス感受性は、rRNA の過剰発現により回復することを示唆する。

A



B

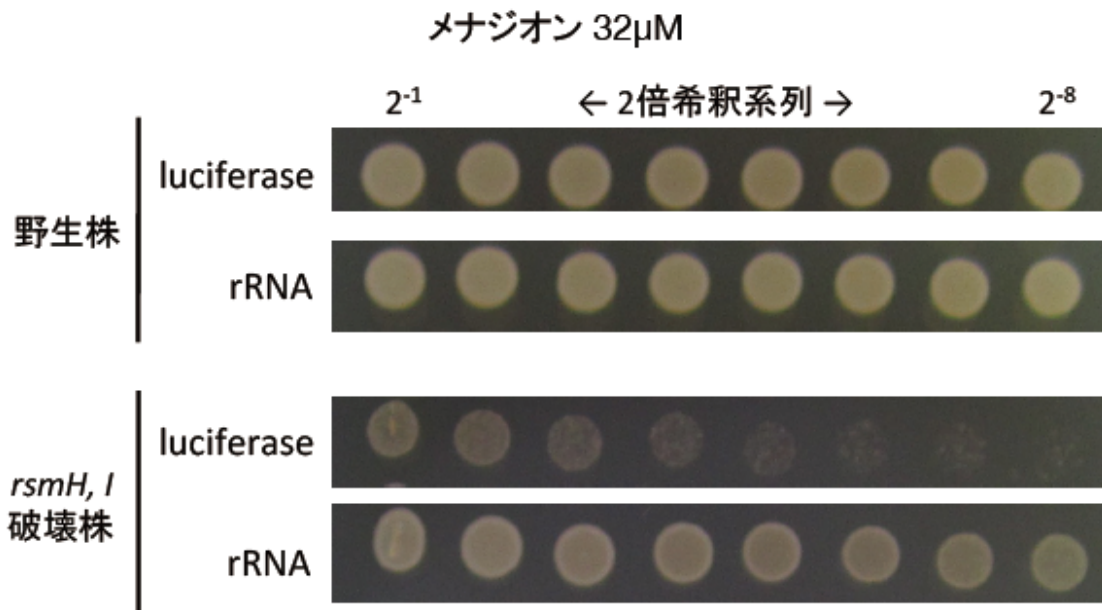


Figure 3-2 *rsmH, I* 破壊株の酸化ストレス感受性に対する rRNA の過剰発現の影響

(A) 酸化ストレスを与える薬剤の非存在下における増殖

(B) 酸化ストレスを与える薬剤の存在下における増殖

第四章

病原性に寄与する 16S rRNA メチル化酵素の探索と機能解析

1. 背景

rRNA の 1412 C 以外に対するメチル化の生理的意義の理解を目的として私は、
RsmH, I 以外の 16S rRNA メチル化酵素の中に、黄色ブドウ球菌の病原性に寄与する
ものがあるか否かを検討した。

2. 16S rRNA メチル化酵素 RsmA は黄色ブドウ球菌の病原性に寄与する

1412 C 以外の 16S rRNA メチル化の生理的意義を解明する目的で、RsmH, RsmI 以外の 16S rRNA メチル化酵素 (RsmA, RsmB, RsmC, RsmD, RsmE, RsmF, RsmG, 21-27) の破壊株を作出しその病原性を評価した。その結果、*rsmA* 遺伝子の破壊株においてカイコ殺傷能力の低下が見られた (Fig. 4-1)。この殺傷能力低下は、他の破壊株 (RsmB-RsmG) では見られなかった (Fig. 4-1)。さらに、*rsmA* 破壊株で見られた病原性の低下は、破壊した *rsmA* 遺伝子の再導入により回復した (Fig. 4-2)。また、*rsmA* 破壊株の増殖能力は、野生株と同程度であった (Fig. 4-3)。以上の結果は、RsmA は黄色ブドウ球菌の病原性に寄与することを示唆する。

A

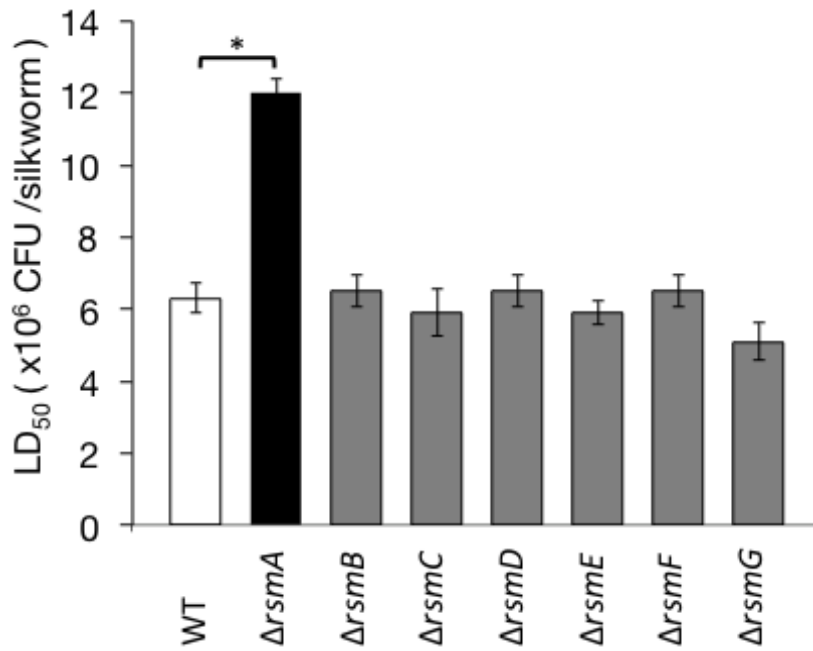


Figure 4-1 16S rRNA メチル化酵素破壊株のカイコに対する病原性

縦軸に示した LD₅₀ は、カイコの半数を死亡させるのに必要な菌数として定義され、この値の上昇は、カイコを死亡させるのに必要な菌数の上昇、即ち病原性の低下を示す。

アスタリスクは T-test P 値 <0.05 を示す。

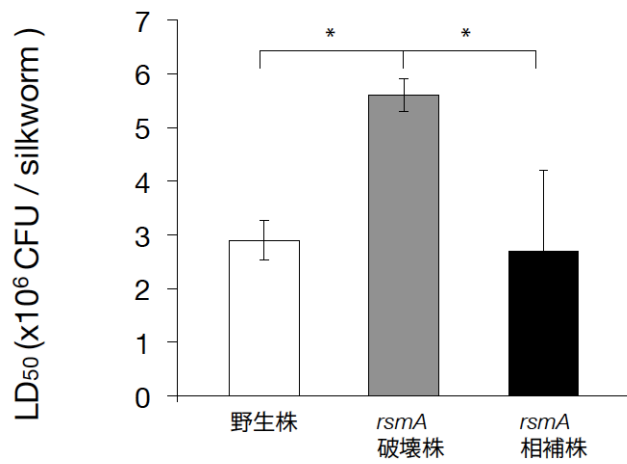


Figure 4-2 *rsmA* 破壊株の病原性低下に対する *rsmA* 遺伝子再導入の影響

rsmA 破壊株に *rsmA* 遺伝子を再導入し、*rsmA* 相補株を作成した。得られた菌株を蚕に注射し、LD₅₀ を求めた。アスタリスクは T-test P 値 <0.05 を示す。

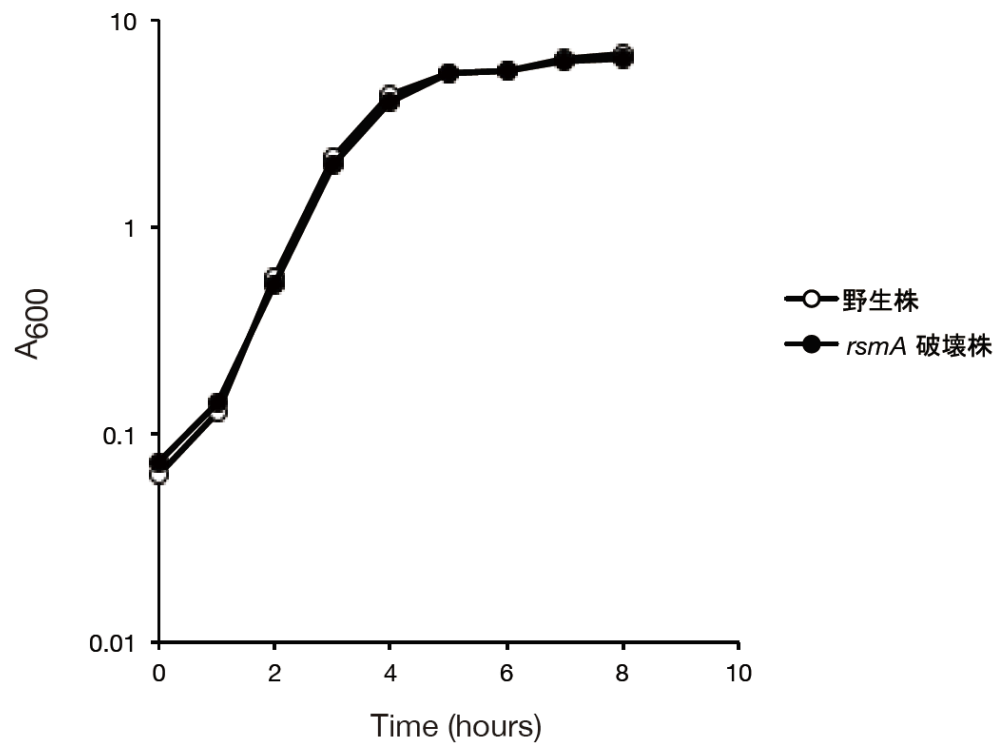


Figure 4-3 黄色ブドウ球菌の *rsmA* 遺伝子破壊株の増殖

黄色ブドウ球菌の野生株、*rsmA* 破壊株の栄養培地中での増殖を、経時間に濁度 (A₆₀₀) を測定することで評価した。

3. RsmA は黄色ブドウ球菌の酸化ストレス耐性に寄与する

RsmA によるメチル化部位は、RsmH, I と同様に、リボソームの機能において中心的な役割を果たす P-site を構成する塩基であった (6)。このため私は、RsmA は RsmH, I と同様のメカニズムにより黄色ブドウ球菌の病原性に寄与すると考えた。そこで RsmA が黄色ブドウ球菌の酸化ストレス耐性に与える影響について検討した。その結果、*rsmA* 破壊株は酸化ストレスを与える薬剤であるメナジオンの存在下において生育の低下を示した (Fig. 4-4)。その一方で、他の破壊株の酸化ストレス耐性は野生株と同程度であった (Fig. 4-4)。さらに、*rsmA* 破壊株で見られた酸化ストレス感受性は、*rsmA* 遺伝子の再導入により回復した (Fig. 4-5)。以上の結果は、RsmA が黄色ブドウ球菌の酸化ストレス耐性に寄与することを示唆する。

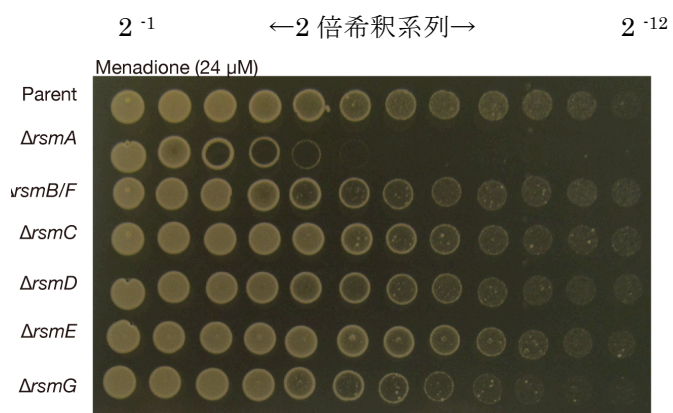
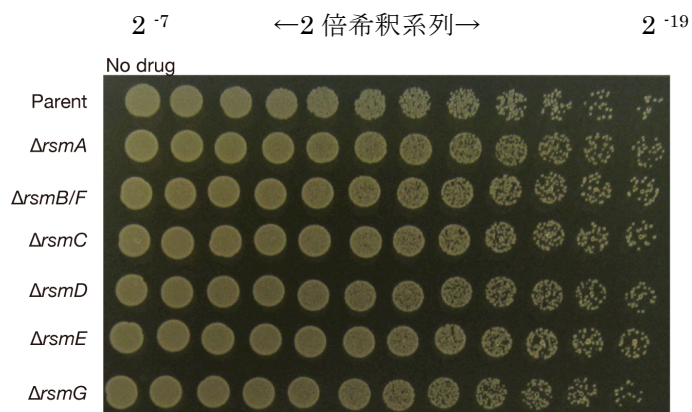


Figure 4-4 黄色ブドウ球菌の *rsmA-G* 破壊株の酸化ストレス耐性

黄色ブドウ球菌の野生株、並びに 16S rRNA メチル化酵素をコードする *rsmA-rsmG* 破壊株を、通常の栄養培地、あるいは酸化ストレスを与える薬剤であるメナジオンの存在下において培養した。

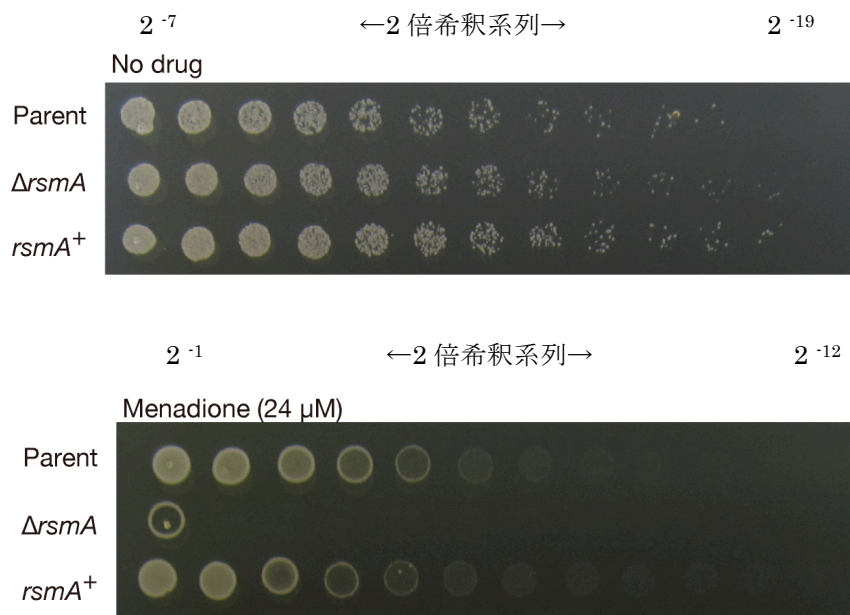


Figure 4-5 黄色ブドウ球菌酸化ストレス耐性に対する *rsmA* 遺伝子の影響

黄色ブドウ球菌の野生株、*rsmA* 破壊株 ($\Delta rsmA$)、*rsmA* 相補株 ($rsmA^+$) を、通常の栄養培地、あるいは酸化ストレスを与える薬剤であるメナジオンの存在下において培養した。

4. RsmA は酸化ストレス存在下における正常な翻訳の維持に寄与する

RsmA が酸化ストレス耐性に寄与した。また、RsmA によるメチル化部位が、コドン、アンチコドンの対合がなされる翻訳における中心部を構成する塩基に対して施される。以上から私は、RsmA が酸化ストレス存在下においてもリボソームの機能を維持する と考えた。そこで私は、酸化ストレスの存在下、非存在下において、黄色ブドウ球菌の翻訳における異常の頻度を測定した。終止コドン UGA, UAG の読飛ばし、並びに+1, -1 frameshift に依存して発現するルシフェラーゼの発現量を定量した。酸化ストレスを与える薬剤の非存在下、存在下いずれの条件においても *rsmA* の破壊株においては、UGA, UAG 終止コドン読飛ばし並びに +1, -1 frameshift 頻度の上昇が見られた (Fig. 4-6)。また、UGA, UAG 終止コドン読飛ばしに関しては、酸化ストレス依存的な更なる頻度増加が、*rsmA* の破壊株において見られた (Fig. 4-6)。以上の結果は、RsmA が酸化ストレス存在下における正常な翻訳の維持に寄与することを示唆する。

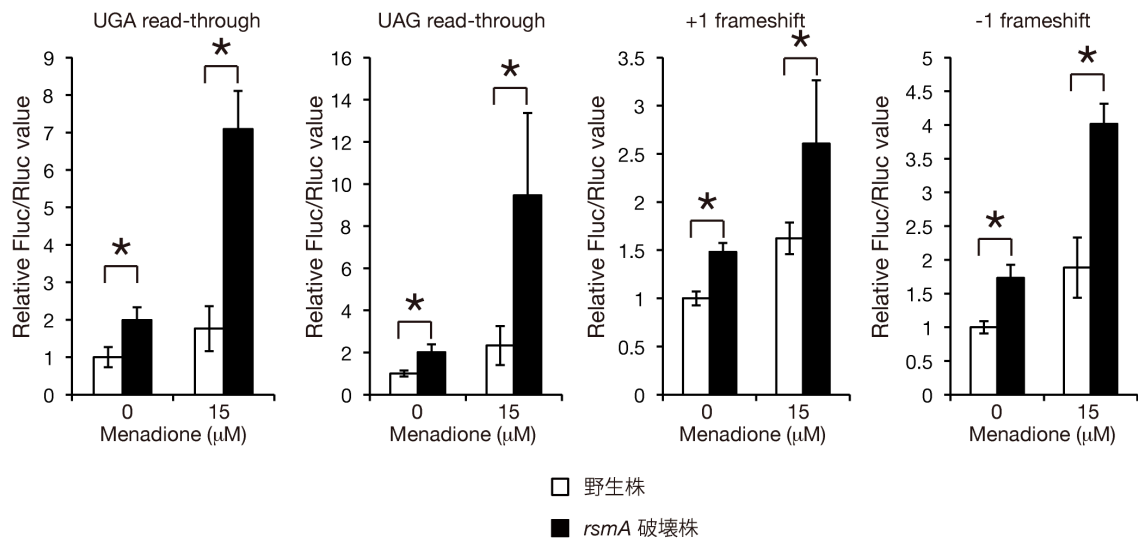


Figure 4-6 酸化ストレス存在下における黄色ブドウ球菌の翻訳異常頻度に対する *rsmA* の影響

酸化ストレスの存在下、並びに非存在下において、翻訳異常に依存して発現する Firefly luciferase (F-luc, Fig. 2-2A) の発現量を測定した。アスタリスクは T-test P 値が <0.05 であることを示す。

5. 酸化ストレスの除去により、RsmA 破壊株の病原性低下は回復する

RsmA が酸化ストレス存在下における正常な増殖、並びに翻訳の維持に寄与したことから私は、RsmA は酸化ストレス耐性の向上により、黄色ブドウ球菌の病原性に寄与すると考えた。この仮説を検証するために、酸化ストレスを除去する薬剤である N-acetyl-L-cysteine (NAC) の投与により、*rsmA* 破壊株の病原性低下が回復するか検討した。生理食塩水を投与したカイコに対して野生株と比べ、*rsmA* 破壊株において LD₅₀ (カイコの半数を死亡させるのに必要な菌数) が上昇することは本実験においても再現された (Fig.4-7)。この条件において、NAC の投与は、野生株のカイコに対する LD₅₀ を低下させなかった (Fig. 4-7)。その一方で、*rsmA* 破壊株のカイコに対する LD₅₀ は、NAC の投与により低下した (Fig. 4-7)。以上の結果は、酸化ストレスの除去剤の投与により、*rsmA* 破壊株の病原性低下が回復することを示唆する。

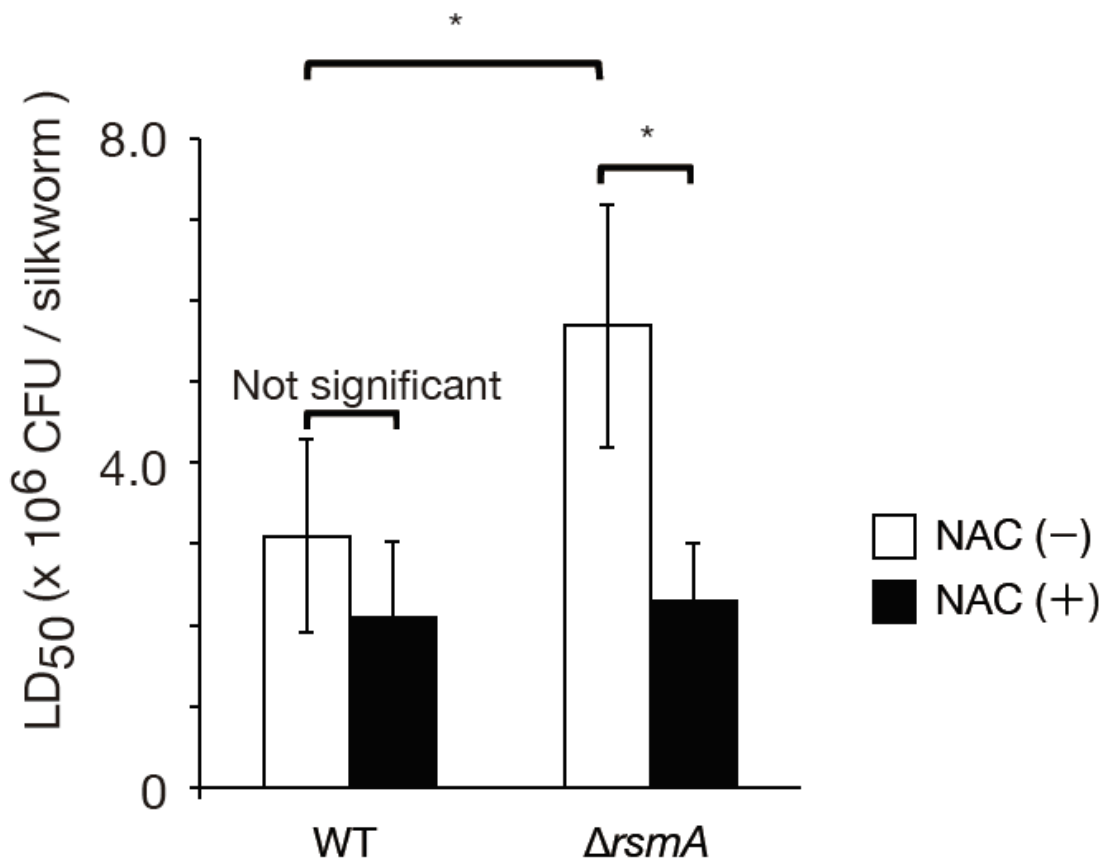


Figure 4-7 *rsmA* 破壊株の病原性に対する N-acetyl-L-cysteine の影響

黄色ブドウ球菌の野生株、*rsmA* 破壊株の病原性を生理食塩水または酸化ストレスを除去する薬剤である N-acetyl-L-cysteine を投与したカイコに対して求めた。LD₅₀ は本実験においてはカイコの半数を死亡させるのに必要な菌数を示し、この値の低下は病原性の上昇を示す。アスタリスクは T-test P 値 < 0.05 を示す。

第五章

材料と方法

菌株と培養条件

菌株の詳細は Table 5-1 に示した。黄色ブドウ球菌は栄養に富む培地である Tryptic soy broth (TSB) で、37°C で好氣的に培養した。遺伝子破壊、又はプラスミドの保持のために抗生物質を用いた (10 µg/mL erythromycin, 50 µg/mL kanamycin, 12.5 µg/mL chloramphenicol, 10µg/ml tetracycline)。大腸菌 JM109 株は、プラスミドのホストとして用いた。

DNA の操作

大腸菌の形質転換、大腸菌からのプラスミド抽出、ポリメラーゼ連鎖反応、サザンブロッティングは以前の報告に従って行った (29)。ポリメラーゼ連鎖反応に用いたプライマーの配列は表として Table 5-2 に示した。RN4220 へのプラスミドの導入にはエレクトロポレーション法を用いた。ファージトランスダクションはファージ 80α (30) を用いて行った。*rsmI* (SA0447) 相補実験のためのプラスミドを作出するために、RN4220 の SA0445 開始コドン前方 280 bp から、SA0447 終止コドンまでの領域を PCR 法によって増幅した。得られた DNA 断片を pHYEm に挿入し、pSA0445-447 を得た。さらに PCR 法により、pSA0445-447 から SA0445 と SA0446 を除き、SA0447 相補ベクターである prsmI を得た。*rsmH* (SA1022) 相補実験のためのプラスミドを得るために、SA1021 開始コドン前方 500bp から、SA1022 終止コドンまでの領域を PCR 法によって増幅し、pHYEm に挿入し、pSA1021-rsmH を得た。さらに PCR 法により、pSA1021-rsmH から SA1021 と SA1022 を除き、SA1022 相補ベクターである prsmH を得た。*rsmA* 遺伝子と推定上のプロモーター領域を RN4220 株からクロニングし、pHYEm に挿入することで *rsmA* 相補用ベクター prsmA を得た。

遺伝子破壊株の作出

細菌間で保存された 73 の機能未知遺伝子を選択し、RN4220 株において遺伝子破壊株を作出した。pCK20 を用いた1回相同組み換え (31) 又は pKOR3a を用いた2回相同組み換えによる遺伝子欠損を行った (32)。

カイコ殺傷アッセイ

カイコ感染実験は以前の方法に従って行った (31)。カイコ受精卵 (ふ・よう×つくばね) を愛媛蚕種より購入した。孵化した幼虫はシルクメイト (日本農産工業株式会社) を与え、27°C で飼育した。5 齢幼虫 1 日目に抗生物質無添加の人工餌シルクメイト (片倉工業株式会社) を1日与え、5 齢 2 日目に 0.05 mL の黄色ブドウ球菌の一晩培養液を生理食塩水で希釈して注射した。菌液注射後は餌を与えず、安全キャビネット (BHC-1303A; Airtech Japan) で 27°C、湿度 50%の条件で飼育した。注射後の経時的な蚕生存数を記録した。LD₅₀ はロジスティック回帰分析により算出した。

RNA 解析

RNA の解析は以前の方法に若干の変更を加えて行った (4)。対数増殖期 ($A_{600} = 1$) の黄色ブドウ球菌の全 RNA は、TRIzol LS reagent を用い、製造元のプロトコールに沿って抽出した。調整した全 RNA に対して 16S rRNA 1388-1436 領域 (49 mer) に対する相補的なオリゴ DNA (TTACAAACTCTCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGACCCGG GAACG) を用いて RNase protection を行った。この消化産物を urea-PAGE に供し、16S rRNA 1388-1436 領域 (49 mer) を切り出し精製した。切り出し精製した RNA 断片を、RNaseT1 あるいは RNaseA により消化し、LC-MS に供した。

マウス感染実験

CD-1 マウス (7 週齢、メス) は日本クレアより購入した。TSB 液体培地 5 mL に黄色ブドウ球菌の一晩培養液を 10 μ L 接種し、37°C で一晩好氣的に培養した。菌液を 8 krpm, 5 分間 遠心し、PBS に懸濁した。菌の懸濁液 100 μ l は尾静脈から注射された。マウスの生存は 18 日間観察し、生存したマウスは安楽死された。

薬剤感受性の評価

薬剤を含まない TSB プレート、又はメナジオン含有 TSB プレートに対して黄色ブドウ球菌の一晩培養液の 2^{-1} - 2^{-19} 希釈液をスポットした。パラコート含有プレートに対しては対数増殖期の菌液の 2^{-1} - 2^{-12} 希釈液をスポットした。

翻訳忠実度の評価

翻訳忠実度の評価は以前の方法に若干の修正を加えて行った (4)。大腸菌における翻訳忠実度の評価に用いられたレポータープラスミドの Fluc と Rluc の ORF の上流に黄色ブドウ球菌の SD 配列を挿入した。その後、Fluc と Rluc を含む DNA 断片を PCR で増幅し、recF プロモーターを持つ pHY300PLK に挿入した。得られたプラスミドを黄色ブドウ球菌に導入し、対数増殖期 ($A_{600} = 0.3 - 0.6$) の菌液 5 mL を回収した。菌体を 150 μ L の Lysis buffer (50 mM HEPES-KOH (pH 7.6), 100 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 7 mM β -mercaptoethanol, lysostaphin 60 μ g/mL) に懸濁し、37°C 30 分間インキュベートした後に 15 krpm, 4°C, 15 分間遠心し、上清を得た。得られた上清は、Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を用いて Lumat LB9507 (EG&G BERTHOLD)

によって解析した。Firefly luciferase activity の測定は、原液のまま、もしくは 2 倍希釈した lysate 50 μ L を Luciferase Assay Substrate 100 μ L と混和して行った。Renilla luciferase activity の測定は 100 倍、または 200 倍希釈した lysate 50 μ L, Luciferase Assay Substrate 100 μ L, Stop&Glo 100 μ L を混和して行った。

NAC を用いたカイコ殺傷アッセイ

黄色ブドウ球菌の注射の前に 5 齢 2 日目のカイコに、生理食塩水又は 40 mg/ml NAC 水溶液 を 50 μ l 注射した。以後の感染実験は通常のカイコ殺傷アッセイと同様に行った。

rRNA 過剰発現時の spot assay

黄色ブドウ球菌の rRNA operon を、PCR 法を用いてクローニングし、pHY300PLK に導入した。得られたプラスミドを黄色ブドウ球菌に導入し、rRNA 過剰発現株を作出した。ルシフェラーゼ発現株として、翻訳忠実度の測定に用いた pFS1 導入株を用いた。

酸化修飾頻度の評価

RNeasy mini mini kit (Quiagen) を用いて抽出した 全 RNA を、バッファー (0.2 mM リン酸ナトリウム pH 6.8, 310 mM アスコルビン酸 \pm 2.5 mM H₂O₂) 中で 1 時間インキュベートした。インキュベートの産物をエタノール沈殿により精製した。得られた RNA に対し、16S rRNA の 3' 末端に対する相補的なプライマー (AGA AAG GAG GTG ATC CAG CC) と multiscribe RT (Applied biosystems) を用いた逆転写反応に供した。逆転写産物について、RsmH, I によるメチル化部位の前方 (F-AGCCGGTGGAGTAACCTTTTAGG, R-ACCTTCCGATACGGCTACCTTG) と、後方 (F-AATACAAAGGGCAGCGAAAC,

R-TCACCGTAGCATGCTGATCT) を定量した。詳細は以下に図示した (Fig. 5-1)。定量した領域は、1412C を中心とする 49bp を挟むように設計した。

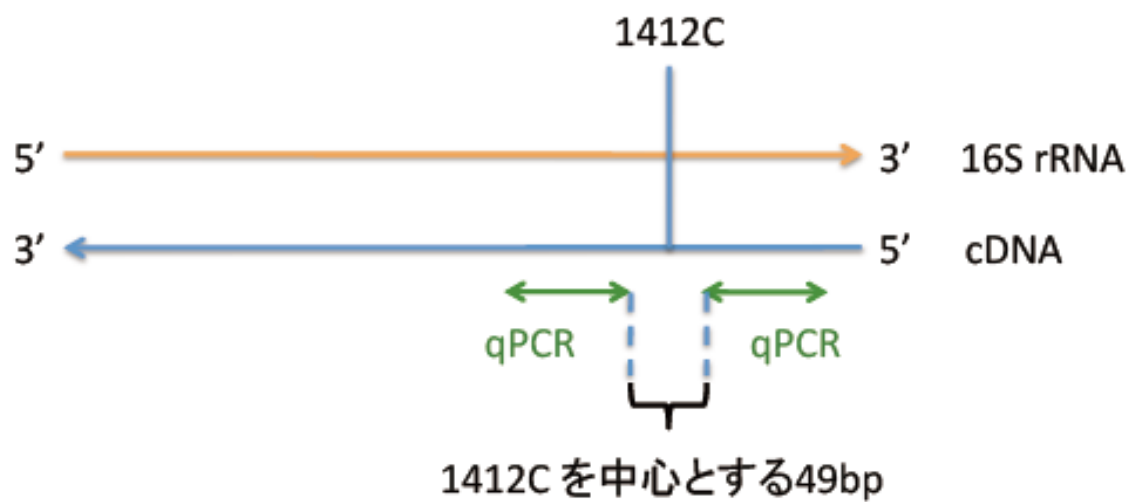


Figure 5-1 RNA 酸化の定量における逆転写と qPCR

黄色ブドウ球菌の 16S rRNA に特異的なプライマーを用いて逆転写を行った後、図示した領域の cDNA 量を qPCR により評価した。

Strain or plasmid	Genotypes or characteristics	Source or reference
Strain		
S. aureus		
RN4220	NCTC8325-4, restriction mutant	(32)
NCTC8325-4	NCTC8325 cured of ϕ 11, ϕ 12, and ϕ 13	(30)
M0447	RN4220 $\Delta rsmI::pT0447$; Cm ^r	This study
M1022	RN4220 $\Delta rsmH::aph$; Km ^r	This study
MDM-1	RN4220 $\Delta rsmI::pT0447$, $\Delta rsmH::aph$	This study
MDM-1NC	NCTC8325-4 $\Delta rsmI::pT0447$, $\Delta rsmH::aph$	This study
E.coli		
JM109	General purpose host for cloning	Takara Bio
Plasmids		
pCK20	<i>S. aureus</i> suicide vector for targeting; Cm ^r	(33)
pT0447	pCK20 with internal region of <i>rsmI</i>	This study
pKOR3a	Vector for allelic replacement in <i>S. aureus</i> ; Cm ^r	(34)
pK1022	pKOR3a with a genomic region around <i>rsmH</i> and <i>aph</i> (Kan ^r)	This study
pT0451	pCK20 with internal region of <i>rsmA</i>	
pHY300E	<i>E. coli</i> - <i>S. aureus</i> shuttle vector; Erm ^r	(35)
prsmI	pHY300E with intact <i>rsmI</i> from RN4220	This study
prsmH	pHY300E with intact <i>rsmH</i> from RN4220	This study
pKE516	<i>E. coli</i> - <i>S. aureus</i> shuttle vector; Erm ^r	(36)
prsmI-rsmH	pKE516 with intact <i>rsmI</i> and <i>rsmH</i> from RN4220	This study
pHY300PLK	<i>E. coli</i> - <i>S. aureus</i> shuttle vector; Tet ^r	Takara Bio
pUGA	pHY300PLK with UGA window between Fluc and Rluc	This study
pUAG	pHY300PLK with UAG window between Fluc and Rluc	This study
pFS1	pHY300PLK with +1 window between Fluc and Rluc	This study
pFS2	pHY300PLK with -1 window between Fluc and Rluc	This study
prRNA	pHY300PLK with rRNA operon	This study
prsmA	pHY300E with intact <i>rsmH</i> from RN4220	This study

a. Cm, chloramphenicol; Km, kanamycin; Erm, erythromycin; Tet, tetracycline.

Table 5-1 用いた菌株とプラスミドの一覧

Target		Sequence (5'-3')	reference
<i>rsmI</i> (internal)	F	AAGAAGCTTCGTGTTGATATG	This study
	R	GGAGGATCCCGTCCACACGATGC	
SA0445-SA0447	F	AAGAAGCTTTGGAAAACATCG	This study
	R	GGAGGATCCAGCTTGCGTTTA	
<i>rsmI</i> (whole)	F	CAAGAAATGTATGCGACAAAG	This study
	R	TTTTAACTCCTATGAAGACAA	
Upstream region of SA1022	F	AAGAAGCTTCGTGTTGATATG	This study
	R	ATCACCTCAAATGGTTCGCTAACGCTGATATGATGAAACAC	
Downstream region of SA1022	F	TACTGGATGAATTGTTTTAGCTGAAATACTTAAATAAGGA	This study
	R	AGCGTTCTGTTTCAGGCAAT	
<i>rsmI</i> and putative promoter region	F	GGAGGATCCTTGAAAACATCGACATGGT	This study
	R	CCACCACCATGGAGCTTGCGTTTATAAAATCGTTAAAATTT	
<i>rsmH</i> and putative promoter region	F	CCACCACCATGGCAATTTATTGAAAAGGTAGAAAGGTATG	This study
	R	TTTTTTTTTTGCGGCCGCTTATTTAAGTATTTCACTACACGTAATTT	
<i>rsmA</i> (internal)	F	AAGATATTGCAACACCATCAAGAA	This study
	R	CATCACCACGTAGCCATCAA	
<i>rsmA</i> and putative promoter region	F	GTC GTC GAC GCT TAT GAA TCA ATT GAT AAA TCT GTG C	This study
	R	GGA GGA TCC TAA TTT TCT AAT TGA GGG AAT TTT TTC TTT TC	
<i>aph</i>	F	AGCGAACCATTTGAGGTGAT	This study
	R	CTAAAACAATTCATCCAGTA	
SA1021-SA1022	F	GTCGTCGACCAATTTATTGAAAAGGTAGAAAGGTATGATT	This study
	R	GGAGGATCCTTATTTAAGTATTTTCAGCTACACGTAATTTTCGCGC	
Read-through	F	GGAGGATCCGTTAACTAATTAATTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTCGAAAGTTTATGATCC	This study
	R	CTGCTGCAGTTACAATTTGGACTTTCCGCCCT	
Frameshift	F	GGTGGTACCGTTAACTAATTAATTTAAGAAGGAGATATACATATGACTTCGAAAGTTTATGATCC	This study
	R	CTGCTGCAGTTACAATTTGGACTTTCCGCCCT	
rRNA operon	F	TTTTTTTTTTAGATCTCAGCCTGTATAGCGGTGTTT	This study
	R	TTCGTCGACCACTTCGCCAAGCCATTTTTTC	

Table 5-2 PCR に用いたプライマーの一覧

終章
まとめと考察

本研究で明らかにしたこと

本研究において私は、16S rRNA メチル化酵素をコードする *rsmA*, *rsmH*, *rsmI* 遺伝子が黄色ブドウ球菌の病原性に寄与することを見いだした。また、*rsmA*, *rsmH*, *rsmI* 遺伝子は、酸化ストレス存在下における黄色ブドウ球菌の増殖能力、並びに翻訳忠実生の維持に寄与するという結果を得た。さらに、酸化ストレスを除去する薬剤である N-acetyl-L-cysteine の投与により、*rsmA* 破壊株、並びに *rsmH*, *I* 二重破壊株で見られた病原性の低下が回復した。以上の結果から私は、*rsmA*, *rsmH*, *rsmI* 遺伝子による病原性への寄与が、宿主環境中の酸化ストレスへの耐性の付与により説明されると判断した。

さらに私は、RsmH, RsmI による rRNA のメチル化が、rRNA を酸化から保護すること、並びに *rsmH*, *rsmI* 二重破壊株で見られた酸化ストレス感受性が、rRNA の過剰発現により回復するという結果を得た。以上の結果から私は、RsmH, RsmI によるメチル化が rRNA を酸化から保護することにより リボソームの機能を維持していると考えている。

本研究の新規性と意義

rRNA メチル化酵素 RsmH, I の生理的意義を明らかにしたのは本研究が初である。また本研究は、これまでに生理的意義のよく判っていなかった rRNA のメチル化が、リボソームの機能と構造を、特定のストレスの存在下において保護することでストレス耐性に寄与するという生理的意義を担うことを提示するものである。

RsmH, I が酸化ストレス耐性に寄与するメカニズムについての考察

RsmH, I がメチル化を施す rRNA の 1412 C は、リボソームの機能上重要な部位である (4)。加えて、一般に rRNA の塩基はタンパク質と結合することで保護を受けるのに対し、1412 C は mRNA と相互作用を行う塩基であるため、タンパク質による保護を受けていない (4)。従って、1412 C は活性酸素種と相互作用し得る部位であるとともに、リボソームの正常な機能において必須である。この重要な部位をメチル基という電子供与基で保護することで求核反応である酸化反応を阻止し、酸化ストレス環境においてもリボソームの機能を維持するというのが rRNA 1412 C メチル化による酸化ストレス耐性の向上機構であると私は考えている。

酸化がリボソームの機能不全を導くメカニズムとして私は三つの可能性を考えている。一つは、酸化がリボソームの構造変化を介して直接的に機能低下を導くという可能性である。この可能性については 1412 C がリボソームの機能において重要であるという報告と一致するものである。

二つ目の可能性は、はリボソームの品質管理機構による酸化を受けたリボソームの除去である。これまでに酵母を用いた研究において、リボソームの機能上重要な部位に変異が導入されると、変異を含むリボソームの分解が特異的に促進されるという報告がなされている (37)。この機構が細菌においても保存されているかは不明であるが、この機構と同様な機構が存在すると考えると、翻訳において重要な部位の酸化により、リボソームが分解された結果として、タンパク合成、並びに細胞増殖が阻害されるということが考えられる。

三つ目の可能性として、rRNA のメチル化による、翻訳段階における遺伝子発現制御が考えられる。これまでに、16S rRNA と特定の mRNA を切断することで、遺伝子発現を翻訳段階で制御する RNase が報告されている (38)。従って、RsmH, I につい

でも、翻訳を担うリボソームを構成する rRNA の化学修飾により、翻訳段階で遺伝子発現の制御を担うことで酸化ストレス耐性を変化させる因子の発現量の変動を介して酸化ストレス耐性に寄与するということが考えられる。

RsmA が酸化ストレス耐性に寄与するメカニズムに関する考察

16S rRNA メチル化酵素 RsmA, B, C, D, E, F, G の中で、RsmA について酸化ストレス耐性への寄与が見られた。RsmA は、RsmH, RsmI と同様に、リボソームにおいて翻訳を担う中心部である P-site を構成する塩基をメチル化する。また、*rsmA* 破壊株において、*rsmH, I* 破壊株と同様に酸化ストレス存在下における翻訳の異常が見られたことから、RsmA は RsmH, I と同様のメカニズムにより酸化ストレス耐性に寄与すると考えられる。

RsmI の制御系に関する考察

酸化ストレス耐性に寄与する遺伝子が酸化ストレスにより誘導されるという例は多く知られている。RsmI についても、大腸菌において酸化ストレスにより発現上昇するという報告が存在する (6)。大腸菌における 16S rRNA 1402 C は通常の培養条件においてもほぼ 100% がメチル化を受けているという報告がなされている。この状況でさらに酸化ストレスにより、RsmI が誘導されるという点については、活性酸素種とメチル化酵素が競合する可能性を考えている。

RsmA, B, C, D, E, F, G, H, I の病原性への寄与に関する考察

本研究において、RsmA, RsmH, RsmI の病原性並びに酸化ストレス耐性への寄与は見

られたが、他のメチル化酵素の病原性への寄与は見られなかった。この点について私は二つの可能性を考えている。

一つ目は、RsmB, C, D, E, F, G が黄色ブドウ球菌において機能していない可能性である。RsmA についてはこれまでに黄色ブドウ球菌におけるメチル化の解析が報告されている。また、RsmH, RsmI については本研究においてメチル化の解析を行った。しかし他のメチル化酵素については黄色ブドウ球菌における報告例は私の知る限り存在せず、他のメチル化酵素が機能していない可能性が考えられる。RsmA, RsmH, RsmI については前述の通り、生物種間における保存性が高いことを考慮するとこの可能性については蓋然性があると私は考えている。実際に、RsmC のメチル化部位は黄色ブドウ球菌においては保存されていない。また、RsmJ は大腸菌においては報告されているが、黄色ブドウ球菌のゲノム上に RsmJ と配列の類似性を示す因子は存在しなかった。

二つ目の可能性は、メチル化部位の特性の差により、病原性の有無が決定されるというものである。RsmA, RsmH, RsmI によるメチル化の部位は、リボソームの機能上重要である。それに加えて、リボソームの表面に位置するとともに、一般的な rRNA 上の塩基とは異なり、水素結合による塩基対を作らない。従って活性酸素種などの危険な分子と相互作用しやすい部位に対してメチル化を導入することにより保護しているという可能性を考えている。

rRNA メチル化の高度な保存性に対する説明

これまでに RsmA, RsmH, RsmI によるメチル化は、古細菌を除いて、細菌からヒトに至るまで高度に保存されていると考えられている (4, 21)。また、酸化ストレスは生

物一般に対して曝露されるストレスであるため、RsmA, RsmH, RsmI が酸化ストレス耐性に寄与するという本研究の結果は、RsmH, I による rRNA メチル化が高度に保存されていることを説明すると私は考えている。また、ハムスターのミトコンドリアにおいて 1412 C に相当する部位がメチル化を受けることがこれまでに知られている (39)。ミトコンドリアは、酸化的リン酸化に伴い、酸化ストレスにされされるオルガネラである (40)。従って、ミトコンドリアの rRNA メチル化が酸化ストレス耐性の向上を介してミトコンドリアの機能維持において機能することが考えられる。

今後の課題と展望

1. 黄色ブドウ球菌の病原性発揮における rRNA メチル化の役割について

rRNA の酸化という現象を黄色ブドウ球菌の細胞内で検出できていないことは問題である。RNA の分解は細胞内で盛んに行われるため、異常を呈した rRNA を検出するためには分解を抑制する何らかの処理が必要であると考えられる。また、酸化ストレスを与える宿主因子を同定することで 新たな細菌、宿主間の相互作用の理解が期待できる。

2. rRNA メチル化が酸化ストレス存在下におけるリボソームの機能に与える影響について

私は RsmH, RsmI によるメチル化を受けない rRNA が酸化を受けやすくなることを本研究で見いだした。しかし、rRNA の酸化がリボソームの機能に対して与える影響については不明である。従って、この点について *in vitro* 翻訳系を用いて検討することが有効である。酸化剤で処理した、野生型のメチル化を受けたリボソームと、変位型のメチル化を受けていないリボソームの翻訳効率、並びに忠実生に関する検討について

は今後の課題である。

3. rRNA メチル化酵素の酸化ストレス耐性への寄与の保存性について

rRNA メチル化酵素、メチル化を受ける塩基、そしてメチル化修飾は高度に保存されている。従って、本研究においてみられた rRNA メチル化酵素の酸化ストレス耐性への寄与は黄色ブドウ球菌のみならず他の細菌、あるいは高等動物において見られる可能性がある。この点について検討することは今後の課題である。

4. 創薬への応用について

本研究結果の創薬への応用については二つの可能性を私は考えている。一つ目の可能性は、選択性の高い感染症治療薬の開発である。RsmI は細菌間で高度に保存されている。その一方で、ヒトのゲノム上には RsmI に相当するタンパク質は存在しない。さらに、RsmI は酸化ストレスに暴露された条件では増殖に寄与するが、通常条件での増殖への寄与はごくわずかである。また、ヒトの体内で酸化ストレスに暴露されるということは、細菌が免疫に検知されていることを意味する。従って RsmI を阻害する物質は、ヒトのメチル化には影響を及ぼさないことが期待できる。さらに、このような物質はヒトと共生関係にあり、免疫による攻撃を受けていない細菌に対しては増殖阻害を示さない一方で、免疫により酸化ストレスを受けた菌を特異的に排除する選択性の高い医薬品になることが期待できる。

二つ目の可能性は、酸化ストレスが関与する疾患の治療薬の開発である。酸化ストレスは、ガンや神経変性疾患など様々な疾患との関与が指摘されている (41)。特に神経変性疾患の患者において、疾患の発症に初期段階で RNA の酸化が亢進することが報告

されている (42)。また、ミトコンドリアの機能低下により認知機能の低下が説明されるといふ報告もなされている (43)。従って、ヒトのミトコンドリアの rRNA のメチル化が、酸化ストレス耐性に影響することヒトの疾患に関連する可能性には蓋然性があると私は考えている。ヒトのミトコンドリアにおける RsmH の酸化ストレス耐性への寄与、並びにその疾患との関連については今後の課題である。

引用

1. Nappi A, Poirié M, Carton Y. The role of melanization and cytotoxic by-products in the cellular immune responses of *Drosophila* against parasitic wasps. *Adv Parasitol.* 2009;70:99-121.

2. Kaito C. Studies on the regulatory mechanism of *Staphylococcus aureus* virulence. *Nihon Saikingaku Zasshi.* 2014;69(3):491-501.

3. Kenneth E. Rudd EcoGene: a genome sequence database for *Escherichia coli* K-12 *Nucleic Acids Res.* Jan 1, 2000; 28(1): 60–64.

4. Kimura S, Suzuki T. Fine-tuning of the ribosomal decoding center by conserved methyl-modifications in the *Escherichia coli* 16S rRNA. *Nucleic Acids Res.* 2010 Mar;38(4)

5. Kaito C, Usui K, Kyuma T, Sekimizu K. Isolation of mammalian pathogenic bacteria using silkworms. *Drug Discov Ther.* 2011 Apr;5(2):66-70.

6. Baldrige KC, Contreras LM. Functional implications of ribosomal RNA methylation in response to environmental stress. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 2014 Jan-Feb;49(1):69-89.

7. Decatur WA, Fournier MJ. rRNA modifications and ribosome function. Trends Biochem Sci. 2002 Jul;27(7):344-51.
8. Xu Z, O'Farrell HC, Rife JP, Culver GM. A conserved rRNA methyltransferase regulates ribosome biogenesis. Nat Struct Mol Biol. 2008 May;15(5):534-6.
9. Connolly K, Rife JP, Culver G. Mechanistic insight into the ribosome biogenesis functions of the ancient protein KsgA. Mol Microbiol. 2008 Dec;70(5):1062-75.
10. Bujnicki JM, Rychlewski L. Sequence analysis and structure prediction of aminoglycoside-resistance 16S rRNA:m7G methyltransferases. Acta Microbiol Pol. 2001;50(1):7-17.
11. Das G, Thotala DK, Kapoor S, Karunanithi S, Thakur SS, Singh NS, Varshney U. Role of 16S ribosomal RNA methylations in translation initiation in *Escherichia coli*. EMBO J. 2008 Mar 19;27(6):840-51.
12. Innate immune and chemically triggered oxidative stress modifies translational fidelity. Netzer N, Goodenbour JM, David A, Dittmar KA, Jones RB, Schneider JR, Boone D, Eves EM, Rosner MR, Gibbs JS, Embry A, Dolan B, Das S, Hickman HD, Berglund P, Bennink JR, Yewdell JW, Pan T. Nature. 2009 Nov 26;462(7272):522-6.

13. Koyama H, Ueda T, Ito T, Sekimizu K. Novel RNA polymerase II mutation suppresses transcriptional fidelity and oxidative stress sensitivity in rpb9Delta yeast. *Genes Cells*. 2010 Feb;15(2):151-9.
14. Fukushima T, Tanaka K, Lim H, Moriyama M. Mechanism of cytotoxicity of paraquat. *Environ Health Prev Med*. 2002 Jul;7(3):89-94.
15. Weijl NI, Cleton FJ, Osanto S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. *Cancer Treat Rev*. 1997 Jul;23(4):209-40. Review.
16. Küpfer PA, Leumann CJ. Synthesis, base pairing properties and trans-lesion synthesis by reverse transcriptases of oligoribonucleotides containing the oxidatively damaged base 5-hydroxycytidine. *Nucleic Acids Res*. 2011 Nov;39(21):9422-32.
17. A A Beauclerk and E Cundliffe The binding site for ribosomal protein L2 within 23S ribosomal RNA of Escherichia coli. *EMBO J*. Nov 1988; 7(11): 3589–3594.
18. Li Z, Wu J, Deleo CJ. RNA damage and surveillance under oxidative stress. *IUBMB Life*. 2006 Oct;58(10):581-8. Review.

19. Jemiolo DK, Zwieb C, Dahlberg AE. Point mutations in the 3' minor domain of 16S rRNA of *E.coli*. *Nucleic Acids Res.* 1985 Dec 9;13(23):8631-43.
20. Gong X, Tao R, Li Z. Quantification of RNA damage by reverse transcription polymerase chain reactions. *Anal Biochem.* 2006 Oct 1;357(1):58-67.
21. Demirci H, Murphy F 4th, Belardinelli R, Kelley AC, Ramakrishnan V, Gregory ST, Dahlberg AE, Jogl G. Modification of 16S ribosomal RNA by the KsgA methyltransferase restructures the 30S subunit to optimize ribosome function. *RNA.* 2010 Dec;16(12):2319-24.
22. Tscherne JS, Nurse K, Popienick P, Michel H, Sochacki M, Ofengand J. Purification, cloning, and characterization of the 16S RNA m5C967 methyltransferase from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 1999 Feb 9;38(6):1884-92.
23. Tscherne JS, Nurse K, Popienick P, Ofengand J. Purification, cloning, and characterization of the 16 S RNA m2G1207 methyltransferase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 1999 Jan 8;274(2):924-9.
24. Sergeeva OV, Prokhorova IV, Ordabaev Y, Tsvetkov PO, Sergiev PV, Bogdanov AA, Makarov AA, Dontsova OA. Properties of small rRNA methyltransferase RsmD: mutational and kinetic study. *RNA.* 2012 Jun;18(6):1178-85.

25. Basturea GN, Rudd KE, Deutscher MP. Identification and characterization of RsmE, the founding member of a new RNA basemethyltransferase family. RNA. 2006 Mar;12(3):426-34. Epub 2006 Jan 23.
26. Hallberg BM, Ericsson UB, Johnson KA, Andersen NM, Douthwaite S, Nordlund P, Beuscher AE 4th, Erlandsen H. The structure of the RNA m5C methyltransferase YebU from *Escherichia coli* reveals a C-terminal RNA-recruiting PUA domain. J Mol Biol. 2006 Jul 21;360(4):774-87.
27. Benítez-Páez A1, Villarroya M, Armengod ME. Regulation of expression and catalytic activity of *Escherichia coli* RsmG methyltransferase. RNA. 2012 Apr;18(4):795-806.
28. Basturea GN, Dague DR, Deutscher MP, Rudd KE. YhiQ is RsmJ, the methyltransferase responsible for methylation of G1516 in 16S rRNA of *E. coli*. J Mol Biol. 2012 Jan 6;415(1):16-21.
29. Sambrook, J. and Russell, D.W. Molecular cloning : a laboratory manual. 3rd ed. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001

30. Novick R. Properties of a cryptic high-frequency transducing phage in *Staphylococcus aureus*. *Virology*. 1967 Sep;33(1):155-66.
31. Kaito C, Kurokawa K, Matsumoto Y, Terao Y, Kawabata S, Hamada S, Sekimizu K. Silkworm pathogenic bacteria infection model for identification of novel virulence genes. *Mol Microbiol*. 2005 May;56(4):934-44.
32. Peng HL, Novick RP, Kreiswirth B, Kornblum J, Schlievert P. Cloning, characterization, and sequencing of an accessory gene regulator (*agr*) in *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*. 1988 Sep;170(9):4365-72.
33. Ichihashi N, Kurokawa K, Matsuo M, Kaito C, Sekimizu K. Inhibitory effects of basic or neutral phospholipid on acidic phospholipid-mediated dissociation of adenine nucleotide bound to DnaA protein, the initiator of chromosomal DNA replication. *J Biol Chem*. 2003 Aug 1;278(31):28778-86.
34. Kaito C, Saito Y, Nagano G, Ikuo M, Omae Y, Hanada Y, Han X, Kuwahara-Arai K, Hishinuma T, Baba T, Ito T, Hiramatsu K, Sekimizu K. Transcription and translation products of the cytolysin gene *psm-mec* on the mobile genetic element *SCCmec* regulate *Staphylococcus aureus* virulence. *PLoS Pathog*. 2011 Feb 3;7(2):e1001267.

35. Ueda T, Kaito C, Omae Y, Sekimizu K. Sugar-responsive gene expression and the agr system are required for colony spreading in *Staphylococcus aureus*. *Microb Pathog*. 2011 Sep;51(3):178-85.

36. Li Y, Kurokawa K, Matsuo M, Fukuhara N, Murakami K, Sekimizu K. Identification of temperature-sensitive dnaD mutants of *Staphylococcus aureus* that are defective in chromosomal DNA replication. *Mol Genet Genomics*. 2004 May;271(4):447-57.

37. LaRiviere FJ, Cole SE, Ferullo DJ, Moore MJ. A late-acting quality control process for mature eukaryotic rRNAs. *Mol Cell*. 2006 Nov 17;24(4):619-26.

38. Vesper O, Amitai S, Belitsky M, Byrgazov K, Kaberdina AC, Engelberg-Kulka H, Moll I. Selective translation of leaderless mRNAs by specialized ribosomes generated by MazF in *Escherichia coli*. *Cell*. 2011 Sep 30;147(1):147-57.

39. Dubin DT, Taylor RH, Davenport LW. Methylation status of 13S ribosomal RNA from hamster mitochondria: the presence of a novel riboside, N4-methylcytidine. *Nucleic Acids Res*. 1978 Nov;5(11):4385-97.

40. Slimen IB, Najjar T, Ghram A, Dabbebi H, Ben Mrad M, Abdrabbah M. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *Int J Hyperthermia*. 2014 Nov;30(7):513-23.

41. Thanan R, Oikawa S, Hiraku Y, Ohnishi S, Ma N, Pinlaor S, Yongvanit P, Kawanishi S, Murata M. Oxidative Stress and Its Significant Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer. *Int J Mol Sci*. 2014 Dec 24;16(1):193-217.

42. Nunomura A, Tamaoki T, Motohashi N, Nakamura M, McKeel DW Jr, Tabaton M, Lee HG, Smith MA, Perry G, Zhu X. The earliest stage of cognitive impairment in transition from normal aging to Alzheimer disease is marked by prominent RNA oxidation in vulnerable neurons. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2012 Mar;71(3):233-41.

43. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Feb 19;99(4):2356-61. Memory loss in old rats is associated with brain mitochondrial decay and RNA/DNA oxidation: partial reversal by feeding acetyl-L-carnitine and/or R-alpha-lipoic acid. Liu J1, Head E, Gharib AM, Yuan W, Ingersoll RT, Hagen TM, Cotman CW, Ames BN.

要旨

rRNA の化学修飾の生理的意義の解明

平成24年度進学 久間 達彦

指導教員 関水 和久

【導入】

rRNA はメチル化等の化学修飾を受けることが知られている。rRNA のメチル化は、細菌からヒトを含む高等動物にいたるまで高度に保存されている。これまでに大腸菌や枯草菌において、rRNA のメチル化酵素の欠損が軽微な増殖の低下や、抗生物質耐性の上昇を導くことが報告されている。しかしながらこれまでに、rRNA メチル化の生物種間における高度な保存性を説明する生理的意義については不明であった。

昆虫のカイコを用いた細菌の感染モデルは、ヒトに感染する細菌の病原性因子を同定する上で有効である。この系を用いて私は、rRNA のメチル化を担う酵素である RsmI, RsmH が黄色ブドウ球菌の病原性に寄与することを見出した。本研究において私は、rRNA のメチル化の生理的意義の解明を試みた。

【結果】

(1) 16S rRNA メチル化酵素である RsmI, RsmH は黄色ブドウ球菌の病原性に寄与する

黄色ブドウ球菌の病原性因子を同定する目的で私は、細菌間で高度に保存されている機能未知遺伝子の破壊株を作成した。さらに、それらの破壊株の病原性を、カイコを用いて評価した。その結果、SA0447, SA1022 遺伝子の破壊株がカイコに対する低病原性を示す事を見出した。さらに、これらの株の病原性低下はそれぞれの遺伝子の再導入により相補された(図1)。この結果から私は、SA0447, SA1022 が黄色ブドウ球菌の新規病原性遺伝子であると判断した。

SA0447, SA1022 がコードするタンパク質は、大腸菌の 16S rRNA の 1402 番目の シトシン(1402C) を ジメチル化する酵素である RsmI, RsmH とアミノ酸配列の類似性を示した。そこで

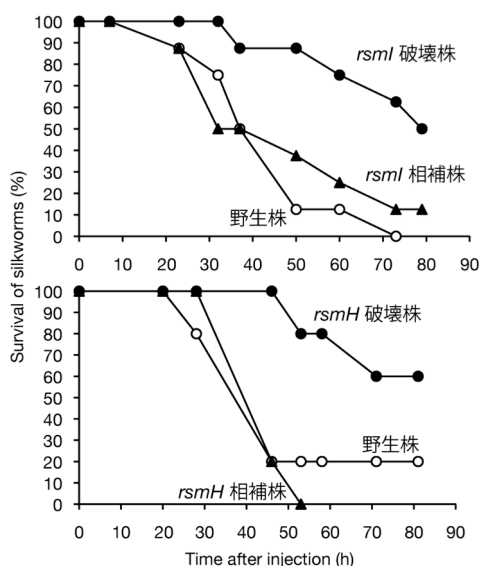


図1. rsmI, H 破壊株のカイコに対する病原性

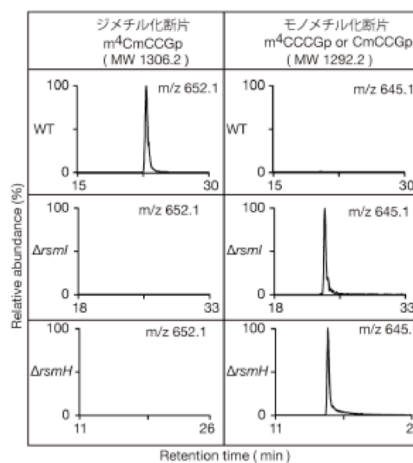


図2. rsmI, H 破壊株の 16S rRNA 1412C メチル化

SA0447, SA1022 が黄色ブドウ球菌における 16S rRNA メチル化酵素 RsmI, RsmH であるかを知る目的で私は、SA0447, SA1022 の破壊株の 16S rRNA を解析した。その結果、大腸菌の 16S rRNA 1402 C に相当する部位である、黄色ブドウ球菌の 16S rRNA の 1412 番目のシトシン (1412C) は、野生株ではジメチル化を受けていた。さらに、このジメチル化は SA0447, SA1022 の破壊株では失われ、モノメチル化体が検出された(図 2)。以上の結果から私は、SA0447, SA1022 は黄色ブドウ球菌の 16S rRNA メチル化酵素 RsmI, RsmH であると判断した。以降の解析において私は、これらの遺伝子の二重破壊株を作成し、解析を行った。

続いて私は、RsmI, RsmH が、黄色ブドウ球菌において、哺乳動物に対する病原性に寄与するか検討した。その結果、*rsmI / rsmH* 二重破壊株はマウスに対する低病原性を示すことが判明した。さらに、ここで見られた低病原性は、*rsmI, rsmH* 遺伝子の導入により相補された(図 3)。以上の結果から、RsmI, RsmH は黄色ブドウ球菌のマウスに対する病原性に寄与すると判断した。

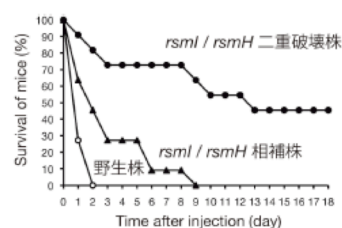


図 3. *rsmI / rsmH* 二重破壊株のマウスに対する病原性

(2) RsmI, RsmH は黄色ブドウ球菌の酸化ストレス耐性の向上を介して病原性に寄与する。

続いて私は、RsmI, RsmH が黄色ブドウ球菌の病原性に寄与するメカニズムの解明を試みた。これまでに大腸菌において、*rsmI, rsmH* 遺伝子の破壊により、軽微な翻訳忠実性の異常が見られることが知られている。また、酸化ストレスは宿主による細菌の殺傷に用いられている。さらに、酸化ストレスは正常な翻訳を阻害することが知られている。これらの知見に基づき私は、黄色ブドウ球菌の *rsmI, rsmH* 遺伝子の破壊は、酸化ストレス条件下における翻訳の異常を導き、病原性の低下を引き起こすと考え、酸化ストレスに着目した。そこで *rsmI / rsmH* の二重破壊株の酸化ストレス耐性を評価した。その結果、野生株と比べ、二重破壊株では酸化ストレス耐性が低下していた。また、酸化ストレス存在下における翻訳忠実性について評価したところ、*rsmI / rsmH* 遺伝子の二重破壊株では酸化ストレス依存的な翻訳忠実性の低下が見られた。さらに、*rsmI / rsmH* 二重破壊株で見られたカイコ殺傷能力の低下は、酸化ストレスを除去する薬剤である N-acetyl-L-cysteine の投与により回復した(図 4)。以上

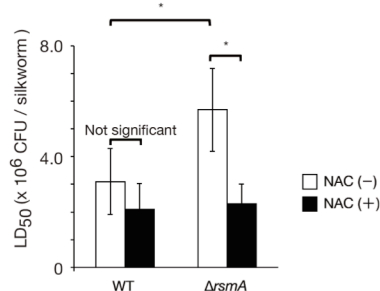


図 4. 酸化ストレスを除去した宿主に対する *rsmI / rsmH* 二重破壊株の病原性。saline 又は、酸化ストレスを除去する薬剤である N-acetyl-L-cysteine を投与したカイコに対して、LD₅₀ (カイコの半数を死亡させるのに必要な菌数)を求めた。LD₅₀ の低下は、病原性の回復を示す。

の結果は、RsmI, RsmH が酸化ストレス条件において正常な翻訳を維持し、宿主動物体内の酸化ストレスに対して耐性を導くことを示唆する。

(3) RsmI, RsmH は rRNA を酸化から保護する

RsmI, RsmH が酸化ストレス耐性に寄与するという上記の結果に基づき私は、RsmI, RsmH によるメチル化が酸化ストレス耐性を与えるメカニズムの解明を試みた。これまでに RNA の酸化が RNA の機能の異常を導くことが知られている。そこで私は、rRNA は RsmI, RsmH によるメチル化を受けることにより酸化から保護されていると考えた。黄色ブドウ球菌の野生株、並びに *rsmI/rsmH* 遺伝子の二重破壊株から rRNA を調製し、酸化ストレスに曝露した後、RsmI, RsmH によりメチル化される部位の近傍の酸化の程度を評価した。その結果、*rsmI/rsmH* 二重破壊株由来の rRNA において、その部位での酸化を受ける程度が上昇していることが判った。さらに私は、*rsmI/rsmH* 二重破壊株において rRNA が酸化され易くなり、正常な rRNA が減少することが酸化ストレス感受性を導いているのではないかと考えた。この点を検証するために、rRNA の過剰発現が *rsmI/rsmH* 二重破壊株の酸化ストレス感受性を抑圧するか検討した。ネガティブコントロールとして用いたルシフェラーゼの mRNA を過剰発現した株と比べ、rRNA を過剰発現した *rsmI/rsmH* 二重破壊株では、酸化ストレス感受性が回復した(図 5)。以上の結果は、RsmI, RsmH が rRNA を酸化から保護することにより酸化ストレス耐性の向上に寄与することを示唆する。

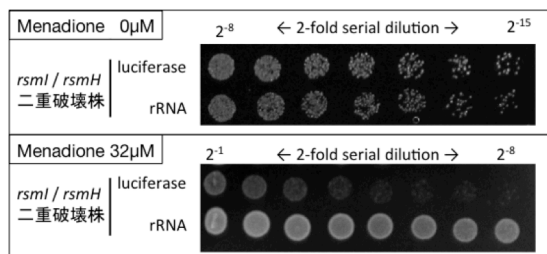


図 5. *rsmI/rsmH* 二重破壊株の酸化ストレス感受性に対する

重破壊株から rRNA を調製し、酸化ストレスに曝露

した後、RsmI, RsmH によりメチル化される部位

の近傍の酸化の程度を評価した。その結果、*rsmI/rsmH* 二重破壊株由来の rRNA において、その部位での酸化を受ける程度が上昇していることが判った。さらに私は、*rsmI/rsmH* 二重破壊株において rRNA が酸化され易くなり、正常な rRNA が減少することが酸化ストレス感受性を導いているのではないかと考えた。この点を検証するために、rRNA の過剰発現が *rsmI/rsmH* 二重破壊株の酸化ストレス感受性を抑圧するか検討した。ネガティブコントロールとして用いたルシフェラーゼの mRNA を過剰発現した株と比べ、rRNA を過剰発現した *rsmI/rsmH* 二重破壊株では、酸化ストレス感受性が回復した(図 5)。以上の結果は、RsmI, RsmH が rRNA を酸化から保護することにより酸化ストレス耐性の向上に寄与することを示唆する。

(4) 病原性に寄与する 16S rRNA メチル化酵素の探索

1412C 以外の 16S rRNA メチル化の生理的意義を解明する目的で、RsmI, RsmH 以外の 16S rRNA メチル化酵素 (RsmA, RsmB, RsmC, RsmD, RsmE, RsmF, RsmG) の破壊株を作出しその病原性を評価した。その結果、*rsmA* 遺伝子の破壊株においてカイコ殺傷能力の低下が見られた。この殺傷能力低下は、他の破壊株 (RsmB-RsmG) では見られなかった(図 6)。*rsmA* 破壊株において酸化ストレス感受性が見られる一方で、他の破壊株の酸化ストレス耐性は野生株と同程度であった。また、*rsmA* の破壊株では通常条件において翻訳忠実性の異常が見られ、この

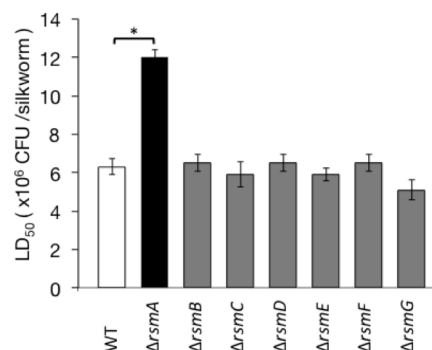


図 6 16S rRNA メチル化酵素の破壊株の

カイコに対する病原性

カイコの半数を死亡させるのに必要な菌数であ

異常は、酸化ストレス存在下においては更なる増大を示した。さらに、*rsmA* 遺伝子破壊株で見られたカイコに対する病原性低下は、酸化ストレスを除去する薬剤である N-acetyl-L-cysteine の投与により回復した。以上の結果は、16S rRNA メチル化酵素 RsmA が酸化ストレス耐性の向上により黄色ブドウ球菌の病原性に寄与することを示唆する。

【総括】

本研究の結果は、16S rRNA メチル化酵素 RsmI, RsmH によるメチル化が、rRNA を酸化から保護することにより酸化ストレス耐性を導き、細菌の病原性に寄与することを示唆する(図 7)。また、16S rRNA メチル化酵素 RsmA についても酸化ストレス耐性の向上による病原性への寄与が見られた。RsmI, RsmH によるメチル化がなされる 16S rRNA 1412C、並びに、RsmA によるメチル化がなされる 1528A, 1529A は翻訳において中心的な役割を果たすと考えられている部位に位置する。加えて、これらの3つの塩基は30S リボソームの表面に位置するため、活性酸素種等の有害な物質に曝されると考えられる。従って、RsmI, RsmH, RsmA によるメチル化は、rRNA の重要な部位を酸化ストレスから保護するという機能を持つと考えられる。酸化ストレスは生物において普遍的にみられるストレスである。従って、rRNA メチル化による酸化ストレス耐性の向上は、rRNA メチル化の生物種間における高度な保存性を説明すると考えられる。

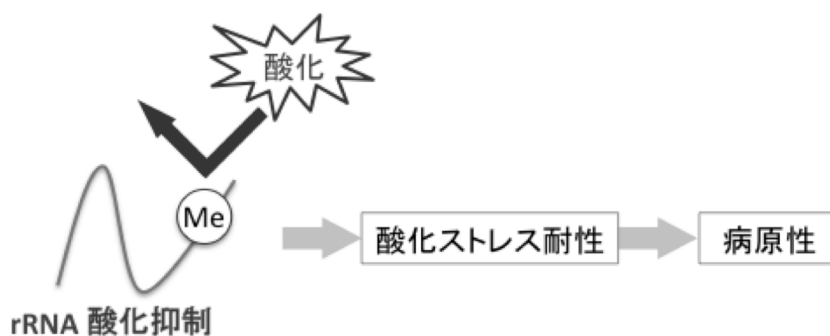


図 7. rRNA メチル化が病原性に寄与する機構

謝辭

本研究を行うにあたってご指導頂きました、東京大学大学院薬学系研究科微生物薬品化学教室、関水 和久教授にこの場を借りて深く御礼申し上げます。関水先生には、私が学部 4 年から博士課程の 3 年に至る 6 年間の長きにわたり、研究について熱心なご指導を頂戴致しました。その中で研究における論理、蓋然性の重要性や、プレゼンテーションの基礎、そして研究に臨む姿勢等、多くのことを学ぶことが出来ました。

研究に際し、ご指導頂いた垣内 力准教授に御礼申し上げます。垣内先生には日々、研究について丁寧にご指導頂きました。また、研究グループを率いる上での立ち居振る舞いについても多くの学びがありました。

本研究は、東京大学大学院工学系研究科化学生命工学、鈴木 勉教授、木村 聡博士との共同研究として行ったものです。この場を借りて厚く御礼申し上げます。

浜本 洋助教、松本 靖彦助教に御礼申し上げます。浜本先生、松本先生にはセミナー、コロキウムにおいて多くの重要なご指摘を頂戴致しました。客観的な視点からなされる鋭い指摘により、重要な気づきが得られました。

微生物薬品化学教室の教室員の皆様に御礼申し上げます。皆様に大いに支えられることで本研究を行うことが出来ました。

最後に、私事ではございますが、学生生活を精神的、経済的に支えてくれた両親に心より感謝します。

2015 年 3 月