

令和元年6月24日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07259

研究課題名(和文) RNAシャペロンHfqによるsRNA/mRNA間の塩基対形成の促進作用の解析

研究課題名(英文) Molecular basis of acceleration of base-pairing between sRNA and target mRNA by Hfq

研究代表者

森田 鉄兵 (Morita, Teppei)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・助教

研究者番号：10444366

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、RNAシャペロンであるHfqに結合して機能する小分子RNA (sRNA) が持つステムループ構造が、転写終結を通して、3'末端のsRNA結合モジュールの形成に重要な役割を持つことを明らかにした。また、Hfqによるhfq自己発現制御の分子機構を明らかにし、細胞に有害である過剰なHfqの産生を防ぐという生物学的意義を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、sRNA生合成において、sRNA機能を生み出す転写終結の意義を明らかにした。近年、sRNAは細菌感染症やバイオフィームといった人間社会に関わる細菌作用に重要な役割を持つことが次々に報告されている。そのため、本研究結果は、sRNA生合成の解明という学術的意義に加え、抗菌薬の開発のための基盤知見になる。

研究成果の概要(英文)：This study clarified a role of the terminator stem-loop of small regulatory RNA (sRNA) in the production of sRNAs in *E. coli*. We also demonstrated the mechanism by which expression of hfq gene encoding Hfq is strictly auto-regulated by Hfq. A biological significance of the Hfq autoregulation is to prevent overexpression of Hfq, which is toxic to cell growth.

研究分野：分子生物学

キーワード：small RNA Hfq 転写終結 ステムループ構造

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細菌 small RNA (sRNA) は、もっとも研究が進んでいる機能性小分子 RNA の 1 つである。大腸菌には約 100 種類の sRNA が存在し、環境変化に起因するストレス下で、各々独自の転写因子により発現誘導を受ける。そして、sRNA は、RNA 塩基対により標的 mRNA と結合し、mRNA からタンパク質への過程を調節する。sRNA が細菌感染症やバイオフィームに関わるという報告例がなされ、sRNA 研究の意義は増している。

RNA シャペロンタンパク質である Hfq は、sRNA と標的 mRNA 間の塩基対形成を促進する機能を持つ。このため、Hfq と RNA との機能的な結合様式の解明は、sRNA 研究の重要な研究課題であった。研究代表者が属するグループは、3' 末端にある sRNA に特徴的な機能構造が Hfq との結合に必要であることを明らかにした。本研究は、これらの結果を元に立案されたものである。

2. 研究の目的

sRNA の機能構造は、U rich 配列とそれに続く RNA ステムループ構造、および 3' 末端の 7 塩基以上の polyU tail により構成される。このうち、Hfq との結合におけるステムループ構造の役割は不明であった。また、sRNA 機能構造は、細菌で一般的な転写終結を起こす Rho 因子非依存的ターミネーターと重複する。このことは、機能的な sRNA 合成に転写終結が重要であることを示唆する。sRNA の機能構造内のステムループ構造は、転写終結において、RNA ポリメラーゼを鋳型 DNA や新生 RNA 鎖から解離させる役割を持つ。以上のことを踏まえ、本研究課題では、sRNA の機能、および生合成におけるステムループ構造の役割の検証を行う。

3. 研究の方法

細胞内での実験は以下である。モデル sRNA として、研究が進んでいる SgrS を用いた。SgrS は、グルコースリン酸ストレス下で合成が誘導される sRNA である。plasmid 上で変異遺伝子を構築し、sRNA の発現、および機能をノーザンブロットングにより解析した。Hfq と RNA の結合は、Hfq に FLAG タグを付加した株を用いて、共沈実験により解析した。3' RACE 法により、転写産物の 3' 末端を同定した。Hfq タンパク質の発現は、ウエスタンブロットングにより解析した。

in vitro 実験は以下である。in vitro 翻訳系を用いて、標的 mRNA の翻訳に与える sRNA の影響を解析した。FLAG タグを *rpoC* に付加した株から精製した RNA ポリメラーゼ、および精製した plasmid DNA を用いて、in vitro 転写実験により転写終結を解析した。

4. 研究成果

sRNA の 3' 末端機能構造のステムループ構造を欠失した RNA を合成し、in vitro において、標的 mRNA の翻訳に対する影響を解析した。その結果、ステムループ構造を欠失した RNA も、野生型配列を持つ RNA と同様に、標的 mRNA の翻訳を抑制した。このことは、sRNA と Hfq との結合には、ステムループ構造は直接関与しないことを示唆する。

次に、sRNA 生合成、すなわち 3' 末端の形成に対するステムループ構造の役割を解析した。ステムループ構造の塩基対部位が延長されるように組み換えた *sgrS* 変異遺伝子を構築し、SgrS の発現、および標的 mRNA の発現をノーザンブロットングにより解析した。その結果、変異 *sgrS* からは、3' 末端の polyU tail が短くなり、Hfq と結合せず sRNA として機能しない RNA が産生された。ステムループ構造の安定化の作用を明確にするために、in vitro 転写系により解析し、ステムループ構造の安定化が早期に転写終結が起こすことを示した。このことより、sRNA 機能構造におけるステムループの役割は、機能的な sRNA の産生にあることを突き止めた。以上より、sRNA 遺伝子の転写終結領域には、3' 末端に 7 塩基以上の polyU tail を形成するのに適した安定性を持つステムループ構造が必要であることが明らかになった。この結果は、学術雑誌「RNA」に原著論文として発表した。

続けて、解析の中から、Hfq をコードする *hfq* 遺伝子の発現制御について、興味深い結果を得た。Hfq は、細胞内の sRNA 制御を一手に担うタンパク質パートナーであるため、*hfq* の発現制御を理解することは、本研究課題のもっとも根底にある sRNA 制御ネットワークの理解につながる。そのため本研究において、*hfq* 発現制御の解析を行った。これまでに、Hfq は、sRNA/標的 mRNA に加え、*hfq* mRNA に結合し、自己発現を抑制することが知られていたが、その分子機構、および生理学的意義は不明であった。本研究ではまず、Hfq には 3 つの RNA 結合ドメインが存在することを踏まえ、Hfq 自己抑制に必要な RNA 結合ドメインを検証し、遠位面が Hfq 自己抑制に必要であることを明らかにした。次に、遠位面に結合することが知られている sRNA 過剰発現時を解析し、一部の sRNA が遠位面での RNA 結合の競合を通して、Hfq の自己発現抑制を解除することを明らかにした。次に、Hfq 自己抑制の生理学的意義を明かす目的で、Hfq 過剰発現が細胞増殖に与える影響を解析し、過剰な Hfq 産生が細胞に有害であることを示した。これらのことから、通常培養条件下においては、Hfq は、自己発現抑制を通して過剰な Hfq 産生を抑制し、また sRNA が合成されるストレス下においては、自己発現抑制を解除することで、必要な Hfq 産生を促すという Hfq 自己発現抑制が持つ生理学的意義が明らかになった。この結果は、学術雑誌「RNA」に原著論文として発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Morita, T., & Aiba, H. Mechanism and physiological significance of autoregulation of the *Escherichia coli* *hfq* gene. *RNA* 25, 264-276, (2019)
doi: 10.1261/rna.068106.118.
2. Morita, T., Nishino, R. and Aiba, H. Role of the terminator hairpin in the biogenesis of functional Hfq-binding sRNAs. *RNA* 23, 1419-1431 (2017)
doi: 10.1261/rna.060756.117
3. 森田 鉄兵. 細菌小分子 RNA の機能構造と生合成. *生化学*, 89(4), 551-554, (2017)

〔学会発表〕(計11件)

1. RNA シャペロン Hfq の自己発現制御機構と生理学的意義、森田鉄兵、饗場弘二、第20回 RNA 学会年会(大阪)、2018年7月
2. RNA シャペロン Hfq の自己発現制御機構、森田 鉄兵、饗場 弘二、第15回21世紀大腸菌研究会(山形、赤湯)、2018年5月
3. Mechanism and physiological significance of autoregulation of the *Escherichia coli* *hfq* gene, 森田 鉄兵、饗場 弘二、5th Meeting of Regulating with RNA in Bacteria & Archaea (Seville, Spain), 2018年3月
4. RNA シャペロン Hfq の自己発現制御機構と生物学的意義、森田 鉄兵、饗場 弘二、第12回長野ミーティング(長野)、2018年1月
5. Hfq 結合性 sRNA の生合成におけるターミネーターヘアピンの役割、森田 鉄兵、西野 良、饗場 弘二、第54回日本細菌学会中部支部総会(名古屋)、2017年10月
6. Role of terminator hairpin in biogenesis of functional Hfq-binding sRNAs, 森田 鉄兵、西野 良、饗場 弘二、15th Asian Conference on Transcription (Penang, Malaysia), 2017年7月
7. Hfq 結合性 sRNA の生合成におけるターミネーターヘアピンの役割、森田 鉄兵、西野 良、饗場 弘二、第19回 RNA 学会年会(富山)、2017年7月
8. Hfq 結合性 sRNA の生合成におけるターミネーターヘアピンの役割、森田 鉄兵、西野 良、饗場 弘二、第14回21世紀大腸菌研究会(熱海)、2017年5月
9. Hfq 結合型 small RNA の機能構造の解析、森田 鉄兵、饗場 弘二、日本進化学会第18回大会(東京)、2016年8月
10. Rho-independent terminator of Hfq-binding sRNAs genes is suitably organized to generate functional sRNAs under stress condition in *E. coli*. 森田 鉄兵、西野 良、饗場 弘二、The 21st Annual Meeting of the RNA Society, The RNA Society of Japan 18th Annual Meeting(京都)、2016年6月
11. 大腸菌 Hfq 結合型 sRNA 遺伝子の Rho 非依存的ターミネーターは機能的な sRNA を産生するのに適した構成である、森田 鉄兵、西野 良、饗場 弘二、第13回21世紀大腸菌研究会(熊本)、2016年6月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<https://researchmap.jp/read0139488>

6 . 研究組織

(1)研究分担者 無

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者 無

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。