

平成 22 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770137

研究課題名（和文） 大腸菌低分子 RNA による遺伝子発現抑制系の解析

研究課題名（英文） Analysis of gene silencing mechanism by bacterial small RNA

研究代表者

森田 鉄兵 (TEPPEI MORITA)

鈴鹿医療科学大学・薬学部薬学科・助手

研究者番号：10444366

研究成果の概要（和文）：本研究は大腸菌低分子 RNA (small RNA: sRNA) による遺伝子発現抑制系を詳細に解明することを目的にする。SgrS sRNA は標的である *ptsG* mRNA に塩基対形成により作用し、*ptsG* mRNA の翻訳阻害、および不安定化を誘起する。本研究により、SgrS/*ptsG* mRNA 間の塩基対形成が *ptsG* mRNA の翻訳阻害に十分であることを見いだした。また *ptsG* mRNA の翻訳阻害に十分な SgrS/*ptsG* mRNA 間塩基対の最小領域を明らかにした。これらの結果は、原核生物に広く存在する Hfq 結合型 sRNA の作動原理の解明につながる。

研究成果の概要（英文）：SgrS sRNA acts by basepairing with *ptsG* mRNA, resulting in translation inhibition and degradation of *ptsG* mRNA. We showed that the base pairing between SgrS and *ptsG* mRNA is directly responsible for translational silencing mediated by SgrS. We also identified a minimal base-pairing region of SgrS required for translational repression of *ptsG* mRNA. These results contribute to understanding the molecular mechanism by which Hfq-dependent sRNA act in bacteria.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：小分子 RNA、mRNA 抑制、転写後制御、大腸菌

## 1. 研究開始当初の背景

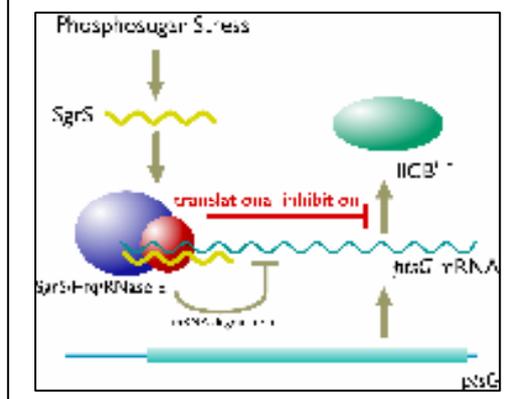
申請者らの研究グループは、大腸菌の解糖系遺伝子変異により解糖系代謝中間体が蓄積する際に、グルコース透過酵素 IICB<sup>Glc</sup> をコードする *ptsG* 遺伝子の発現が転写後段階で抑制されることを見いだした。具体的には、

糖リン酸が蓄積する条件下で、IICB<sup>Glc</sup> 量が減少し、*ptsG* mRNA は不安定化する。その後の解析より、申請者らは図 1 に示す SgrS による *ptsG* mRNA 抑制モデルを提唱するに至った。

SgrS は糖リン酸蓄積時に合成が誘導される 227 nt からなる sRNA である。SgrS は *ptsG*

mRNA の翻訳開始領域を含む約 30 塩基と塩基対を形成する RNA 配列を持つ。SgrS による *ptsG* mRNA の抑制にはこの塩基対形成が重要である。また SgrS/*ptsG* mRNA 系において、Hfq および RNase E がタンパク質因子として関与する。Hfq は RNA シャペロンであり、SgrS/*ptsG* mRNA 間の塩基対形成を促進させる。また SgrS/Hfq により *ptsG* mRNA の翻訳が阻害される。この翻訳阻害が SgrS による *ptsG* mRNA の翻訳阻害において第一義的である。エンドリボヌクレアーゼである RNase E は Hfq との相互作用により、SgrS により抑制された *ptsG* mRNA を速やかに分解させる。これまでに明らかにされていた鉄イオン枯渇時に合成される RyhB による *sodB* mRNA の抑制が、SgrS/*ptsG* mRNA 抑制経路と同様であることを

図 1、SgrS による *ptsG* mRNA 抑制モデル



見いだした。

## 2. 研究の目的

本研究は、これまでの SgrS/*ptsG* mRNA 抑制系で得られた研究成果をもとに、sRNA による遺伝子抑制機構の詳細な解明を目的とした。具体的には、以下の3点にしばり解析を進めた。

(1) 標的 mRNA の翻訳阻害における sRNA/mRNA 間の塩基対形成の役割、およびリクルートされるタンパク質因子の役割の決定：SgrS/Hfq は協調して *ptsG* mRNA に作用し、翻訳阻害を介して *ptsG* mRNA を抑制する。さらなる詳細な理解を目的として、sRNA/mRNA 間の塩基対形成の役割、また Hfq が mRNA にリクルートされる意義について明らかにする。この点は、sRNA による mRNA 抑制の分子機構を理解する上で重要である。

(2) sRNA/Hfq と RNase E の分子相互作用の詳細な解析：申請者らは共沈実験を行い、RNase E と sRNA/Hfq が相互作用し複合体を形成していることを明らかにした。そこで、sRNA/Hfq/RNase E のそれぞれの相互作用領域の同定、および複合体形成プロセスの詳細について解析する。相互作用領域の同定に関し

ては、それぞれの因子を断片化し、相互作用に重要な領域を決定する。また最小化したそれぞれの因子を用いて、生化学的解析を用い、相互作用プロセスについて解析する。

(3) 他の sRNA による標的 mRNA 発現制御の分子機構の解析：大腸菌において約 70 種の sRNA の存在が示されているが、それぞれの sRNA の機能については未同定なものが多い。そこで、SgrS/*ptsG* mRNA 系で用いた解析手法、結果をもとに、特に遺伝子発現の転写後調節に関与が予想される未同定 sRNA の機能解明を行う。また、ある程度機能が明らかになっている sRNA においても、分子機構の詳細について解析する。

## 3. 研究の方法

(1) sRNA/mRNA 間の塩基対形成の役割、また Hfq が mRNA にリクルートされる意義を *in vitro* 系での解析により明らかにする。そのために、まず SgrS/Hfq/*ptsG* mRNA 系の *in vitro* での再構成を行う。用いる RNA は、*in vitro* 転写キットである CUGA7 *in vitro* transcriptional kit (ニッポンジーンテック社) を用いて行う。また *in vitro* 翻訳系は PURESYSYSTEM (PGI 社) を用いる。PURESYSYSTEM は翻訳に必要な因子をそれぞれ独立に精製し再構成したものであり、現在用いられている *in vitro* 翻訳系の中でもっとも不純物を含まない翻訳系だと考えられる。Hfq は 6xHIS タグ配列を付加した組換えタンパク質の発現系を構築し、精製したものを用いる。

(2) RNase E は 1061 アミノ酸から構成されるが、特に scaffold 領域 (685-1061) にタンパク質因子が結合することが報告されている。実際に、scaffold 領域を欠失した RNase E は Hfq と相互作用しない。そこで、RNase E と Hfq (/SgrS) の相互作用領域を明らかにする目的で、scaffold 領域を断片化し、エピトープタグ (FLAG タグ) を付加した組換えタンパク質をシステムティックに構築する。構築した RNase E 断片と Hfq との相互作用について、免疫沈降法を用いた共沈実験により解析する。

(3) すでに Hfq と協調し遺伝子発現制御に関与することが示されている MicF、OxyS、MicA および DsrA に注目し、解析する。それぞれについて IPTG の添加により合成が誘導できる系をプラスミドに構築する。sRNA 合成時における標的 mRNA 量、およびタンパク質量を Northern blotting、および Western blotting により解析する。必要に応じて、*gfp* などを標的遺伝子に融合させたレポーター遺伝子を構築し、解析に用いる。またそれぞれの sRNA/Hfq と RNase E の相互作用を、免疫沈降法を用いた共沈実験により解析する。さらに、Hfq と相互作用しない RNase E 変異 (*rne701*) の影響、および RNA 抑制における sRNA/Hfq

による翻訳阻害、RNA 分解の貢献について解析する。

#### 4. 研究成果

(1) *in vitro* 翻訳系である PURESYSTEM を用いて、SgrS/Hfq による *ptsG* mRNA の翻訳阻害の試験管内再構成に成功した。また、同系を利用し、Hfq 非存在下においても、SgrS/*ptsG* mRNA 間の塩基対を形成させると *ptsG* mRNA の翻訳が阻害されることを見いだした。このことは、Hfq のリクルートではなく、SgrS/*ptsG* mRNA 間の塩基対形成自身が、*ptsG* mRNA の翻訳阻害に十分であることを示している。これらの結果を、科学雑誌「Proceeding of National Academy of Sciences of the U. S. A. 誌」に学術論文として発表した。さらに、SgrS の一部分に対応する一連の合成 RNA を用いて *ptsG* mRNA の翻訳抑制に必要な塩基対形成の最小領域を解析し、合成 RNA/*ptsG* mRNA の 14 塩基対が *ptsG* mRNA 翻訳抑制に十分であることを見いだした (図 2)。これらの成果を、科学雑誌「Molecular Microbiology 誌」に学術論文として発表した。これらの結果は、大腸菌をはじめとする多くの原核生物に存在する Hfq 結合型 sRNA による遺伝子抑制系



図 2、SgrS/*ptsG* mRNA 間の塩基対形成

\*は RNA 配列上塩基対が形成されると予想される部位を示す。□は、*ptsG* mRNA の翻訳阻害に十分な塩基対形成領域を示す。

の原理の解明に大きく貢献すると考えられる。

(2) C 末端領域を様々に欠失した RNase E、あるいは scaffold 領域を含む RNase E 断片と Hfq との相互作用を共沈実験により解析した結果、RNase E(710-750)領域に Hfq(/SgrS) が結合することを明らかにした。同定した領域は、RNase E と RNA ヘリカーゼである Rh1B との結合領域に近い。またこれまでの解析から、Hfq、および Rh1B が RNase E に同時に結合しないことを示した。これらのことを合わせて、RNase E/Hfq 相互作用に対する Rh1B 過剰発現の影響を解析した。その結果、Rh1B 過剰発現時において、RNase E/Hfq の相互作用が阻害された。また、SgrS により抑制された *ptsG* mRNA の不安定化が部分的に阻害されることを示した。これらの研究成果をインドで開催された JSPS-DST Asian Academic Seminar 国際会議をはじめいくつかの学会で報告し、学術論文として投稿を準備している。また共沈実験法など SgrS/*ptsG* mRNA の解析手法を

「Methods in Enzymology 誌」に発表した。これらの結果は、sRNA の作動原理の解明に大きく貢献すると考えられる。

(3) MicF による *ompF* mRNA 抑制系の解析を行い、MicF による *ompF* mRNA の不安定化が *rne701* 変異により阻害されることを明らかにした。OxyS は *fhfA* mRNA を標的にする。*fhfA* はオペロンを構成していることから、OxyS/*fhfA* mRNA 抑制系に対する上流遺伝子の影響を解析し、上流遺伝子の存在は OxyS による *fhfA* の抑制に影響しないことを明らかにした。また OxyS は *fhfA* を強く抑制する一方で、上流遺伝子を緩やかに抑制することを示した。この研究成果は、第 11 回日本 RNA 学会年会をはじめいくつかの学会で報告した。これらの結果は大腸菌 sRNA の作動機構の一般性の解明につながると考える。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. 牧貴美香、宇野可奈子、森田鉄兵、饗場弘二、「RNA, but not proteins, is directly responsible for translational silencing by a bacterial Hfq-binding small RNA」、Proceeding of National Academy of Sciences of the U. S. A.、査読有り、105(30)、2008、10332-7
2. 森田鉄兵、牧貴美香、八木美江子、饗場弘二、「Analyses of mRNA destabilization and translation inhibition mediated by Hfq-binding small RNAs」、Methods in Enzymology、査読有り、447、2008、359-78
3. 牧貴美香、森田鉄兵、大鷹弘紀、饗場弘二、「A minimal base-pairing region of a bacterial small RNA SgrS required for translation repression of *ptsG* mRNA」、Molecular Microbiology、査読有り、2010、782-792

[学会発表] (計 12 件)

1. 池田幸樹、森田鉄兵、饗場弘二、「大腸菌 small RNA による標的 mRNA の分解機構とその役割」、RNA フロンティアミーティング 2008、2008 年 6 月 4 日、関西セミナーハウス、京都
2. 李霞、八木美江子、森田鉄兵、饗場弘二、「アミノ酸枯渇時のリボソーム停滞による mRNA の切断とトランス翻訳」、第 10 回日本 RNA 学会年会、2008 年 7 月 25 日、札幌コンベンションセンター、札幌市
3. 牧貴美香、宇野可奈子、森田鉄兵、饗場弘二、「バクテリアにおける Hfq/sRNA による翻訳阻害はタンパク質ではなく sRNA が直接の要因である」、第 10 回日本 RNA 学会年会、2008 年 7 月 23 日、札幌コンベンションセン

ター、札幌市

4. 池田幸樹、八木美江子、森田鉄兵、饗場弘二、「Heterogenety of RNA degradosome of Escherichia coli: RNase E forms several distinct complexes with partner proteins. JSPS-DST Asian Academic Seminar、2008年12月28日、Bangalore、India

5. 大鷹弘紀、森田鉄兵、本間道夫、饗場弘二、「遺伝子発現抑制機能における SgrS3' 末端領域の重要性の解析」、第6回21世紀大腸菌研究会、2009年6月12日、KKR ホテル熱海、熱海市

6. 石川博一、森田鉄兵、本間道夫、饗場弘二、「sRNAによるポリシストロニックな mRNA の発現抑制の解析」、第6回21世紀大腸菌研究会、2009年6月12日、KKR ホテル熱海、熱海市

7. 牧貴美香、森田鉄兵、饗場弘二、「合成 RNA による ptsG mRNA の翻訳抑制」、第11回日本 RNA 学会年会、2009年7月27日、朱鷺メッセ、新潟市

8. 大鷹弘紀、森田鉄兵、饗場弘二、「遺伝子発現抑制機能における SgrS3' 末端領域の役割」、第11回日本 RNA 学会年会、2009年7月28日、朱鷺メッセ、新潟市

9. 石川博一、森田鉄兵、饗場弘二、「sRNA によるポリシストロニックな mRNA の発現抑制の解析」、第11回日本 RNA 学会年会、2009年7月27日、朱鷺メッセ、新潟市

10. 池田幸樹、八木美江子、森田鉄兵、饗場弘二、「大腸菌 RNase E/Hfq の結合領域の同定」、第11回日本 RNA 学会年会、2009年7月27日、朱鷺メッセ、新潟市

11. 牧貴美香、森田鉄兵、饗場弘二、「ptsG mRNA の翻訳抑制に重要な SgrS 最小領域の同定」、第46回日本細菌学会中部支部会、2009年10月23日、名城大学、名古屋市

12. 池田幸樹、八木美江子、森田鉄兵、饗場弘二、「大腸菌 RNase E/Hfq の結合領域の同定」、第46回日本細菌学会中部支部会、2009年10月23日、名城大学、名古屋市

〔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：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
該当無し

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

森田 鉄兵 (MORITA TEPPEI)  
鈴鹿医療科学大学・薬学部・助手  
研究者番号：10444366

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：