

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月19日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2009～2012

課題番号：21247025

研究課題名（和文） 大腸菌における小分子 RNA の作動原理の解明

研究課題名（英文） Molecular basis of the action of Hfq-binding small RNA in *Escherichia coli*.

研究代表者

饗場 弘二 (AIBA HIROJI)

鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：20025662

研究成果の概要（和文）：SgrS をモデルとして Hfq 結合性 sRNA の作動原理についての研究を行い、以下の点を明らかにした。(1) SgrS の 14 塩基領域 (168-181) が安定な塩基対形成および翻訳阻害に必要な最小領域である。(2) RNase E 内の 711-750 領域が Hfq 結合領域で、この場所は RhlB 結合領域と重なっている。(3) sRNA の転写終結シグナルのポリ U 配列が Hfq 結合部位として働く。(4) sRNA の Hfq 結合モジュールは、Rho 因子非依存性ターミネーターおよびヘアピン構造直前の内部 U リッチ配列からなる。(5) Hfq 結合モジュールを基盤にした任意の遺伝子ノックダウン系の構築に成功した。

研究成果の概要（英文）：Molecular basis of the function of Hfq-binding sRNA has been studied using SgrS as a model. The major findings are as follows. (1) The 14 nt region within SgrS is the minimum region required for base-pairing and translational repression of *ptsG* mRNA. (2) The region between 711 and 750 of RNase E is sufficient for the functional interaction with Hfq to support the rapid degradation of *ptsG* mRNA. (3) The polyU tail of rho-independent terminator is essential for Hfq action. (4) The functional Hfq-binding module of bacterial sRNAs consists of a double or single hairpin preceded by a U-rich sequence and followed by a 3' poly(U) tail. (5) The synthetic Hfq-binding small RNAs to knock down desired mRNAs have been successfully designed.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|------------|------------|------------|
| 2009年度 | 12,500,000 | 3,750,000 | 16,250,000 |
| 2010年度 | 7,500,000 | 2,250,000 | 9,750,000 |
| 2011年度 | 7,500,000 | 2,250,000 | 9,750,000 |
| 2012年度 | 7,500,000 | 2,250,000 | 9,750,000 |
| 年度 | | | |
| 総計 | 35,000,000 | 10,500,000 | 45,500,000 |

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、Hfq、サイレンシング、転写後制御、大腸菌

1. 研究開始当初の背景

RNA が遺伝子発現制御に関与していることは、1980年代の初めに大腸菌で発見されていた。今世紀に入ってからの系統的な探索により多数の新規 sRNA が発見された。その多く

については機能が不明であるが、一群の sRNA は Hfq と結合すること、それらは特定の生理条件下で誘導され、塩基対形成を通して標的 mRNA の発現制御に関与していることなどが明らかになってきた。Hfq は真核細

胞のスプライシングを担う因子である Sm 様タンパク質に類似した RNA 結合タンパク質である。

Hfq 結合性の sRNA として同定された SgrS は、グルコース-6-リン酸 (G6P) の蓄積により合成が誘導され、*ptsG* mRNA を標的としていることが申請者と米国のグループにより明らかにされた。その後の SgrS/*ptsG* 系をモデルとした一連の研究により、本研究開始当初までに、Hfq 結合性 sRNA の作用について以下の点が明らかになっていた。(1) SgrS は、*ptsG* mRNA の翻訳開始領域と部分的な塩基対を形成し、大腸菌の主要なエンドリボヌクレアーゼである RNase E に依存した mRNA の不安定化をもたらす。(2) Hfq は RNase E の scaffold 領域と結合し、SgrS が Hfq を介して RNase E と相互作用する。また、RNase E の scaffold 領域の欠失により、SgrS による *ptsG* mRNA の速やかな分解が起こらなくなる。(3) SgrS による *ptsG* mRNA の抑制機構において、*ptsG* mRNA の翻訳阻害が第一義的である。(4) *ptsG* mRNA のリボソーム結合部位付近の 6 塩基対が SgrS による *ptsG* mRNA への作用に重要である。(5) Hfq は SgrS と *ptsG* mRNA の塩基対形成を促進する。(6) *ptsG* mRNA の膜局在性が SgrS の *ptsG* mRNA への効果的な作用に寄与している。(7) 塩基対形成そのものが SgrS/Hfq による *ptsG* mRNA の翻訳阻害の要因である。

2. 研究の目的

上述のように、申請者のグループは SgrS/*ptsG* 系の研究を通して原核生物における sRNA による遺伝子発現制御の分子機構を理解するための研究を先導してきた。しかしながら、sRNA による標的 mRNA の特異的認識機構、Hfq による塩基対形成促進のメカニズム、RNase E による標的 mRNA 分解の機構と生理的意義、ストレスに応答した sRNA の転写誘導機構、など sRNA の作用については重要な課題が未解明である。本研究は、これらの課題について研究をすすめることにより、sRNA の作動原理の解明を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

4つの研究計画は立案した。(1) SgrS による *ptsG* mRNA 認識の特異性の解明。*ptsG* mRNA の翻訳開始領域に相補的な種々の長さの合

成 RNA を調製し解析することで、SgrS の機能、特に塩基対形成、および翻訳阻害の特異性に必要な最小単位を同定する。(2) Hfq による SgrS と *ptsG* mRNA の塩基対形成促進のメカニズムの解明。*ptsG* mRNA の抑制に影響を及ぼす変異 SgrS の解析、特に塩基対形成領域以外の変異について解析を行う。また、*hfq* 遺伝子の系統的な変異の構築、解析も行う。(3) 代謝中間体の異常な蓄積が SgrS の転写を誘導する機構の理解。SgrR タンパク質、および *enolase* の機能解析を行う。SgrS の転写誘導に欠損のある *enolase* の点変異を取得、解析することにより SgrS の転写誘導における *enolase* の役割を解明する。(4) SgrS/Hfq/RNase E による *ptsG* mRNA の分解の生理的意味、および分子機構の解明。FLAG タグを持つ RNase E の C 末欠変異体を系統的に構築し、RNase E 内の Hfq 結合領域を詳細に解析するとともに、他の RNA degradosome の構成因子の各遺伝子に FLAG タグ配列を付加した細胞を構築し、RNase E/Hfq 複合体と RNA degradosome の細胞内存在形態およびそれらの動的変化を解析する。

4. 研究成果

(1) *ptsG* mRNA の翻訳開始領域に相補的な種々の長さの合成 RNA を用い、*ptsG* mRNA との塩基対形成反応をゲルシフト法により解析した。また、試験管内での翻訳抑制能を解析した。この結果 SgrS の 14 塩基領域が安定な塩基対形成および翻訳阻害に必要な最小領域であることを明らかにした。この成果は、SgrS による *ptsG* mRNA の特異的認識機構を解明する上で重要な鍵となる。

(2) Hfq は sRNA と標的 mRNA の塩基対形成促進とともに、RNase E の C 末 scaffold region に結合することで、RNase E を標的 mRNA へリクルートし塩基対形成をした 2 つの RNA の RNase E による速やかな分解を可能にしている。一連の RNase E の C 末欠変異体を構築し、SgrS を介した *ptsG* mRNA の分解およびプルダウンアッセイにより RNase E 内の Hfq 結合領域が、RhlB 結合領域と重なっていることを明らかにした。

(3) SgrS の転写終結シグナルとなるステムループ領域、およびそれに続くポリ U 配列に変異を導入させた SgrS 変異体の解析を行い、SgrS のポリ U 配列が SgrS による *ptsG* の抑制

機能に重要であることを明らかにした。また、SgrS の転写終結配列の 5'側の、ステムループ構造を形成する領域も重要であることを明らかにした。

(4) SgrS をモデルとして、一連の変異体解析から sRNA の Hfq 機能的結合に十分な最小領域の決定を行った。その結果、3'領域に存在する Rho 因子非依存性ターミネーター、及び U 塩基に富む配列が直前に存在する内部ヘアピン構造を含む 49 塩基の RNA が Hfq との機能的な結合に必要であることを証明した。また、U 塩基に富む配列がターミネーターヘアピンの直前にあれば、内部ヘアピン構造は Hfq との機能的な結合に不用であることも示し、Hfq 結合モジュールには 2 つのタイプがあることを明らかにした。既存の sRNA は 2 つのタイプのいずれかの Hfq 結合モジュールをもつことから、本研究の意義は、Hfq 結合モジュールの実体を初めて解明したことにある。

(5) Hfq 結合モジュールの上流に種々の mRNA の翻訳開始領域に相補的な配列を持つ人工的 sRNA を利用した大腸菌における任意の遺伝子ノックダウン系の構築に成功した。

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 9 件)

- ① Ishikawa, H., Otaka, H., Maki, K., Morita, T., and Aiba, H. The functional Hfq-binding module of bacterial sRNAs consists of a double or single hairpin preceded by a U-rich sequence and followed by a 3' polyU tail. *RNA*, 査読無、18、2012、1062-1074
- ② Hironori Otaka, Hirokazu Ishikawa, Teppei Morita, and Hiroji Aiba, PolyU tail of rho-independent terminator of bacterial small RNAs is essential for Hfq action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読有、108(32)、2011、13059-13064
- ③ 森田鉄兵、饗場弘二、原核生物の制御 RNA、医学のあゆみ、査読無、238 (5)、2011、394-399
- ④ Maki, K., Morita, T., Otaka, H., and Aiba, H. A minimal base-pairing region of a bacterial small RNA SgrS required for translational repression of *ptsG* mRNA. *Mol. Microbiol.* 査読有、76、2011、782-792
- ⑤ Ikeda, Y., Yagi, M., Morita, T., and Aiba, H. Hfq binding at RhlB-recognition region of RNase E is crucial for the rapid degradation

of target mRNAs mediated by sRNAs in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 査読有、79、2011、419-432

- ⑥ Morita, T. and Aiba, H. RNase E action at a distance: degradation of target mRNAs mediated by an Hfq-binding small RNA in bacteria. *Genes Dev.* 査読有、25、2011、294-298
- ⑦ Maki, K., Morita, T., Otaka, H., and Aiba, H. A minimal base-pairing region of a bacterial small RNA SgrS required for translational repression of *ptsG* mRNA. *Mol. Microbiol.* 査読有、76、2010、782-792
- ⑧ Kuroha K., Horiguchi N., Aiba H., and Inada T. Analysis of nonstop mRNA translation in the absence of tmRNA in *Escherichia coli*. *Genes Cells*, 査読有、14、2009、739-749
- ⑨ 饗場弘二、歴史を遡る RNA 研究. 遺伝子医学 MOOK、査読無、15、2009、28-33

[学会発表] (計 27 件)

- ① 饗場弘二、Functional organization of Hfq-binding small RNAs、第 86 回日本細菌学会総会 (招待講演)、2013.3.18-20、幕張メッセ(千葉)
- ② Morita, T., and Aiba, H. Structural entity of functional hfq-binding module of bacterial base-pairing small RNAs, Cell Symposia Functional RNAs, 2012.12.2-4、Hotel Melia Sitges (Spain)
- ③ 森田鉄兵、石川博一、大鷹弘紀、牧貴美香、饗場弘二、大腸菌小分子 RNA の機能的 Hfq 結合モジュールの決定、第 14 回日本 RNA 学会年会、2012.7.18-20、東北大学百周年記念会館 (宮城)
- ④ 饗場弘二、Functional organization of bacterial Hfq-binding small RNA, Furano Conference on "Advanced Bioregulation and RNA", (招待講演) 2012.3.4-8、ニュー富良野ホテル(北海道)
- ⑤ 饗場弘二、Functional organization of Hfq-binding regulatory RNA, IUMS2011 The Unlimited World Microbes 国際微生物学連合 2011、(招待講演) 2011.9.6-10、札幌コンベンションセンター(北海道)
- ⑥ 大鷹弘紀、石川博一、森田鉄兵、饗場弘二、Poly tail of rho-independent terminator of bacterial small RNA acts an essential Hfq-binding site for riboregulation. The 16th Annual meeting of the RNA society, 第 13 回日本 RNA 学会総会 合同会、2011.6.14-18、京都国際会議場 (京都)
- ⑦ 池田幸樹、八木美江子、森田鉄兵、金井昭夫、饗場弘二、Identification of Hfq binding sites on RNase E in *E. coli*., The 16th Annual meeting of the RNA society, 第 13 回日本 RNA 学会総会合同会、2011.6.14-18、

京都国際会議場（京都）

- ⑧ 石川博一、大鷹弘紀、森田鉄兵、饗場弘二、Both polyU tail and the upstream region of rho-independent terminator are required for the functional interaction of SgrS with Hfq. The 16th Annual meeting of the RNA society, 第 13 回日本 RNA 学会総会合同会、2011.6.14-18、京都国際会議場（京都）
- ⑨ 森田鉄兵、飯田芳文、饗場弘二、Generation of functional *E. coli* DicF small RNA and the role of the 3' polyU stretch in Hfq binding. The 16th Annual meeting of the RNA society, 第 13 回日本 RNA 学会総会合同会、2011.6.14-18、京都国際会議場（京都）
- ⑩ 饗場弘二、PolyU tail of rho-independent terminator of bacterial small RNAs acts as an essential Hfq-binding site for riboregulation. ASM Conference on Regulating with RNA in Bacteria. (招待講演) 2011.3.7-11、San Juan (Puerto Rico)
- ⑪ 石川博一、大鷹弘紀、森田鉄兵、饗場弘二 Implication of spacer length between base-pairing and Hfq-binding region in bacterial small RNA function. The 11th Asian and Oceanian Conference on Transcription. 2010.7.1-5、沖縄県国頭郡
- ⑫ 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、2009.7.27、朱鷺メッセ(新潟)
- ⑬ 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、2009.7.27、朱鷺メッセ(新潟)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

饗場 弘二 (AIBA HIROJI)
鈴鹿医療科学大学・薬学部・教授

研究者番号：20025662

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：