

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24年6月18日現在

機関番号：34104

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770175

研究課題名（和文） 大腸菌小分子 RNA による mRNA 抑制機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of the mRNA silencing mechanism by small RNA in *E. coli*

研究代表者

森田 鉄兵（MORITA TEPPEI）

研究者番号：10444366

研究成果の概要（和文）：本研究は、sRNA の 1 つである SgrS をモデル sRNA として用いて、sRNA/mRNA 間の塩基対形成の詳細、および RNA 結合タンパク質である Hfq による sRNA/mRNA 間の塩基対形成の促進モデルの解明を目的とした。研究成果として、SgrS168-181 nt 領域と *ptsG* mRNA とで形成される塩基対が機能的に十分な最小の塩基対であること、また sRNA の 3' 末端に位置する連続した U 塩基が sRNA 機能に重要であることを示した。さらに、Hfq と結合し sRNA に標的化された mRNA を速やかに分解される RNase E と Hfq との結合領域を決定した。これらの成果は、sRNA による mRNA 抑制機構の全容解明につながる成果である。

研究成果の概要（英文）：SgrS is a well-characterized Hfq-binding sRNA. In this project, I tried to define the SgrS region required for translation repression of *ptsG* mRNA, and to clarify the mechanism by which Hfq promotes the base-pairing between SgrS and *ptsG* mRNA. The major findings are: 1) SgrS168-181 (14 nt) is a minimal base-pair region for translational repression of *ptsG* mRNA; 2) the polyU tail of rho-independent terminator is essential for Hfq action; 3) the subregion between 711 and 750 of RNase E is sufficient for the functional interaction with Hfq to support the rapid degradation of *ptsG* mRNA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：低分子 RNA、遺伝子発現抑制、大腸菌、塩基対形成、RNA シャペロン

1. 研究開始当初の背景

様々な生物種で、機能を持つ小分子 RNA (sRNA) の研究が精力的に行われている。いくつかの研究グループの系統的な解析により、大腸菌においても約 70 種の sRNA が発見されている。大腸菌におけるこれら小分子 RNA の多くは、RNA 結合タンパク質 Hfq と結

合する特徴を持つ。

申請者らのグループは sRNA の 1 つである SgrS をモデル sRNA として解析することにより、以下のことを明らかにした。SgrS は *ptsG* mRNA の翻訳開始領域を含む 31 塩基と部分的な塩基対 (23 塩基対) を形成する配列を持つ。遺伝学的解析により、*ptsG* mRNA 抑制に

SgrS/*ptsG*mRNA の塩基対形成が重要であること、および 23 塩基対の中の 6 塩基対が *ptsG* mRNA 抑制に主要な役割を果たすことを示した。また、SgrS は Hfq と協調作用し *ptsG*mRNA のその領域と速やかに塩基対を形成することを *in vitro* の解析により明らかにした。さらに、遺伝学的、生化学的解析から、*ptsG* mRNA 分解を担う RNase E は C 末端領域で Hfq と相互作用することにより、SgrS が作用した *ptsG* mRNA の分解を誘起することを示した。この抑制系では、翻訳開始領域がマスクされることによる *ptsG* mRNA の翻訳阻害、および RNase E による *ptsG* mRNA の速やかな分解が起こる。RNase E をコードする *rne* 遺伝子の変異により *ptsG* mRNA の分解が阻害された条件下でのパルス解析などから、*ptsG* mRNA 抑制系においては、*ptsG* mRNA の翻訳阻害が第一義的な役割を果たすことを明らかにした。また、*in vitro* 翻訳系を用いた解析から、SgrS/*ptsG* mRNA 塩基対形成が *ptsG* mRNA の翻訳阻害に十分であることを示した。

2. 研究の目的

これまでの研究成果をもとに、提案した課題研究では、これらをさらに展開させ、SgrS の作動原理の解明を目指し、具体的には、SgrS/*ptsG*mRNA 抑制系をモデル系として、(1) sRNA/mRNA 間塩基対の形成を促進させる Hfq 作用メカニズムの解明、(2) sRNA 機能における sRNA/mRNA 間塩基対の最小領域の同定、および sRNA が標的にする mRNA の位置効果の検証を目的とした。また、これまでに遺伝子発現制御に関与する sRNA が SgrS の他に数種報告されている。そこで、(3) 本課題研究で得た研究成果の普遍性を、他の sRNA について系統的に解析することで検証することも合わせて目的とした。

3. 研究の方法

SgrS を含む sRNA の発現、および機能は、sRNA、あるいは標的 mRNA のノーザンブロットティング、及び標的 mRNA の翻訳産物をウエスタンブロットティングにより解析した。また、sRNA と Hfq との結合は、*in vivo* 共沈実験、および *in vitro* ゲルシフト実験により解析した。さらに、*in vitro* 翻訳システムである PURESYSYSTEM を用いて、標的 mRNA の翻訳を解析した。

4. 研究成果

sRNA の 1 つである SgrS sRNA/*ptsG*mRNA (標的 mRNA) をモデル系として、SgrS sRNA の一部に対応する合成 RNA を用いた *in vitro* 解析を行い、SgrS 168-181 nt 領域と *ptsG*mRNA とで形成される塩基対が機能的に十分な最小の塩基対であることを明らかにした (論文⑤)。またこれらの解析の中から、SgrS

sRNA/Hfq の結合が SgrS の 168-181 nt 領域では不十分であることを示した (論文⑤)。後者の結果は、SgrS sRNA/Hfq の結合、および Hfq による SgrS sRNA/*ptsG* mRNA 間の塩基対形成の促進メカニズムを解明する上で、重要なポイントになると考えられる。さらに、Hfq と結合し sRNA に標的化された mRNA を速やかに分解させる RNase E と Hfq との結合領域の詳細を解析し、RNase E の 710-750 アミノ酸領域が Hfq との機能的な結合に必要なことを示した (論文③)。さらに、系統的な SgrS 点変異解析を行い、SgrS の 220-227 塩基の連続した U 塩基が SgrS と Hfq との機能的結合に必須であることを示した (論文①)。また、同様に大腸菌 sRNA である RyhB の 3' 末端に位置する連続した U 塩基が RyhB と Hfq との機能的結合に必須であることを示した (論文①)。さらに、いくつかの sRNA においても 3' 末端に位置する連続した U 塩基が sRNA 機能に重要であることを示した (論文①)。これらのことは、sRNA 作動原理を理解する上で必須である、sRNA/Hfq 結合の一般原理の解明に直結する、重要な発見である。

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 5 件)

① Hironori Otaka, Hirokazu Ishikawa, Tepei 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

② 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

③ 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 *E. coli*. *Mol. Microbiol.*, 査読有、79 (2)、2011、419-432

④ 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 (4)、2011、294-298

⑤ 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(3)、2010、782-792

[学会発表] (計 2 2 件)

① 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)

②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)

③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)

④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)

⑤大鷹弘紀、石川博一、森田鉄兵、饗場弘二、遺伝子発現制御機構における大腸菌低分子RNA3'末端ポリU配列の役割、第8回 21世紀大腸菌研究会、2011.5.18-19、ホテル木曾路 (長野)

⑥石川博一、大鷹弘紀、森田鉄兵、饗場弘二、大腸菌小分子RNAのHfq作用領域の解析：塩基対形成領域と転写終結領域間の役割、第8回 21世紀大腸菌研究会、2011.5.18-19、ホテル木曾路 (長野)

⑦大鷹弘紀、石川博一、森田鉄兵、饗場弘二、遺伝子発現制御機構における大腸菌低分子RNA3'末端ポリU配列の役割、第5回 細菌学若手コロッセウム、2011.8.8-10、桂浜荘 (高知)

⑧石川博一、大鷹弘紀、森田鉄兵、饗場弘二、大腸菌小分子RNAのHfq作用領域の解析：塩基対形成領域と転写終結領域間の役割、第5回 細菌学若手コロッセウム、2011.8.8-10、桂浜荘 (高知)

⑨大鷹弘紀、石川博一、森田鉄兵、饗場弘二、遺伝子発現制御機構における大腸菌低分子RNA3'末端ポリU配列の役割、RNA フロンティアミーティング 2011、2011.8.30-9.1、あいち健康プラザ (愛知)

⑩森田鉄兵、大鷹弘紀、石川博一、饗場弘二、第5回 日本ゲノム微生物学会若手の会、2011.9.29-30、ろうきん研修所富士センター (静岡)

⑪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7回 21世紀大腸菌研究会、2010年6月3-4日、熊本県阿蘇郡

⑫石川博一、大鷹弘紀、森田鉄兵、饗場弘二、

大腸菌 sRNA である SgrS の機能領域の解析、第7回 21世紀大腸菌研究会、2010年6月3-4日、熊本県阿蘇郡

⑬池田幸樹、八木美江子、森田鉄兵、饗場弘二、Identification of Hfq binding sites on RNase E in *E. coli*.、The 11th Asian and Oceanian Conference on Transcription、2010年7月1-5日、沖縄県国頭郡

⑭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年7月1-5日、沖縄県国頭郡

⑮大鷹弘紀、石川博一、森田鉄兵、饗場弘二、SgrS3'末端のポリU配列はRNA抑制機能に重要な役割を果たす、第12回日本RNA学会年会、2010年7月27-29日、東京都千代田区

⑯石川博一、大鷹弘紀、森田鉄兵、饗場弘二、大腸菌小分子RNAの作用機構の解析：塩基対形成領域とHfq結合領域間の距離の重要性、第12回日本RNA学会年会、2010年7月27-29日、東京都千代田区

⑰池田幸樹、八木美江子、森田鉄兵、饗場弘二、Heterogeneity of RNA degradosome of *Escherichia coli*: RNase E forms several distinct complexes with partner proteins、International symposium on Biodiversity Sciences 2010、2010年7月31日-8月3日、愛知県名古屋市

⑱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、International symposium on Biodiversity Sciences 2010、2010年7月31日-8月3日、愛知県名古屋市

⑲大鷹弘紀、石川博一、森田鉄兵、饗場弘二、The 3' terminator poly-U tract of SgrS plays a crucial role in Hfq-dependent gene silencing、International symposium on Biodiversity Sciences 2010、2010年7月31日-8月3日、愛知県名古屋市

⑳森田鉄兵、牧貴美香、大鷹弘紀、石川博一、饗場弘二、大腸菌小分子RNAであるSgrSの機能解析、第4回細菌学・若手コロッセウム、2010年8月26-28日、静岡県伊豆市

森田鉄兵、牧貴美香、大鷹弘紀、石川博一、饗場弘二、大腸菌小分子RNAであるSgrSの機能解析、第4回日本ゲノム微生物学会若手の会、2010年10月1-2日、兵庫県神戸市

池田幸樹、八木美江子、森田鉄兵、饗場弘二、Identification of Hfq binding sites on RNase E in *E. coli*.、第33回日本分子生物学会年会、2010年12月7-10日、兵庫県神戸市

〔図書〕（計 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 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 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

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：

