

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25291005

研究課題名(和文) 制御RNAの機能発現とRNAシャペロンHfqの役割

研究課題名(英文) Biogenesis of regulatory sRNAs and the role of Hfq

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：SgrSとRyBをモデルとしてsRNAのバイオジェネシスについての研究を行い、大きく2つの成果を得た。第一に、ダブルターミネーター系を用いてsRNA遺伝子の転写終結を解析しストレス条件下で転写終結が促進されること、すなわち転写終結の制御が3'末端にポリUテールを有する機能的なsRNAの効率的な産生を保證していることを明らかにした。第二に、ターミネーターヘアピン構造を安定化させる変異sgrS遺伝子の解析からヘアピン構造は3'末端の転写終結位置を決定する重要な要素であり、sRNA遺伝子のターミネーターは3'末端に7塩基以上のポリU鎖を備えたRNAを合成するために最適化されていることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Molecular events at Rho-independent terminators of sRNA genes have been studied, focusing on SgrS and RyhB. The 3'-extended form of SgrS loses the Hfq-binding ability. Transcription termination is significantly enhanced under stress conditions where transcription of sRNAs is induced in intact cells. We conclude that the production of sRNAs is regulated not only at the step of transcription initiation but also at the step of transcription termination. The roles of terminator hairpin in biogenesis of sRNAs have been studied. The extension of the hairpin stem leads to generation of heterogeneous transcripts in which the polyU tail is shortened. The transcripts with shortened polyU tails no longer bind to Hfq and lose the ability to repress the target mRNAs. The generation of shortened transcripts is caused by premature transcription termination. We conclude that the terminator structure of sRNA genes is optimized to generate functional sRNAs.

研究分野：生物学

キーワード：小分子RNA Hfq Rho 非依存性ターミネーター sRNA バイオジェネシス ターミネーターヘアピン

1. 研究開始当初の背景

(1) 大腸菌では100種近くの小分子RNA (small RNA, sRNA) が同定されており、それらの多くは相補的塩基対形成により標的RNAの機能制御に関与しており、その作用にRNA結合タンパク質Hfqが必須である。Hfq結合性sRNAは、糖リン酸の蓄積、鉄イオンの枯渇、酸化的ストレス、浸透圧変化など、種々の生理条件、ストレス条件で発現が誘導され、標的mRNAの翻訳や安定性の制御を通して細胞の環境応答、恒常性維持を支えている。

(2) 解糖系の阻害がグルコーストランスポーター遺伝子(*ptsG*)の発現を転写後段階で抑制するという申請者のグループの発見を契機に、グルコース-6-リン酸の異常な蓄積によりsRNAの1つSgrSの合成が誘導され、*ptsG* mRNAの発現抑制が起こることが明らかになった。SgrSは、*ptsG* mRNAの翻訳開始領域と部分的な塩基対を形成し、翻訳の抑制とRNase Eに依存したmRNAの不安定化をもたらす。申請者のグループは、SgrSおよび鉄含有タンパク質をコードする一群のmRNAの発現制御に関与するRyhBをモデルとして、Hfq結合性のsRNAの作動原理を理解するための研究を展開し、RNase EのC末端側のscaffold領域にHfqとsRNAが結合すること、mRNAの不安定化にはこの相互作用が必須であること、sRNAによる標的mRNAの抑制機構において、翻訳阻害が第一義的であること、mRNAのリボソーム結合部位付近の6塩基対がSgrSによる翻訳抑制作用に必須であること、HfqがSgrSと*ptsG* mRNAの塩基対形成を促進すること、*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こと、などを明らかにしてきた。また、精製したSgrS/Hfqによる*ptsG* mRNAの翻訳阻害の試験管内再構成から、塩基対形成そのものが翻訳阻害の直接の要因であることを明らかにし、さらにはsRNAのRho因子非依存性ターミネーターのポリU配列が必須のHfq結合部位であることを発見し、Hfq結合モジュールの実体を解明した。一連のRNase EのC末端欠変異株を用いた解析により、RNase E/Hfq間の相互作用領域を明らかにし、sRNA/Hfq/RNase E複合体による標的mRNAの分解は、塩基対形成により標的mRNAの翻訳が抑制されたときに起こるというモデルを提唱した。

(3) 2012年までの研究により、原核生物のHfq依存性sRNAの作動原理についての理解は大きく深まった。しかしながら、Hfqによる塩基対形成促進のメカニズム、Hfq自体の発現制御機構、ストレスに応答したsRNAの転写誘導機構、sRNAのバイオジェネシスなど、sRNA

の機能発現とRNAシャペロンHfqの役割に関して、重要な未解明の課題が残されていた。

2. 研究の目的

第1に、sRNAのバイオジェネシスとHfqの役割を理解するため、SgrSやRyhBをモデルに、3'末端形成を中心に活性型sRNAの形成機構を明らかにする。このため、ダブルターミネーター系の構築などユニークな実験的アプローチを取り入れる。また、sRNAの3'末端形成にはHfqや3'エキソヌクレアーゼが大きな影響を及ぼすと考えられるので、関連遺伝子の欠失株および過剰発現株を用いてこの問題に迫る。第2に、混乱が見られるHfqの細胞内の発現量について明確な答えを出すとともに、自己制御機構を中心にHfqの発現制御機構とその生理的意義を解明する。第3に、Hfqの中心的な機能であるsRNAと標的mRNAの塩基対形成促進機構を理解するために、塩基対形成促進に影響するmRNA側の決定因子を明らかにする。また、構造生物学の専門家と協力してsRNA/HfqおよびsRNA/Hfq/RNase E複合体の構造解析を目指す。第4に、tmRNAを標的にした人工的なHfq依存性のsRNAの構築に成功しているため、この系を利用してsRNA/Hfq/RNase Eによる標的mRNAの分解の分子機構の解明に迫る。

3. 研究の方法

(1) sRNAのバイオジェネシスとHfqの役割
sRNAの3'末端の形成機構を明らかにするために、sRNA遺伝子の転写終結シグナルの直後に第2の転写終結シグナルを挿入したダブルターミネーター系を構築し、正常のsRNA遺伝子と比較しながら、3'RACE法などによるsRNAの3'末端の決定やノーザンブロット法によるsRNA発現量などの生化学的解析を行う。大腸菌では、3'エキソヌクレアーゼ(PNPase、RNaseIIおよびRNase R)が知られている。そこで、これらのエキソヌクレアーゼ遺伝子の欠失株および過剰発現株を構築して、これらの株におけるsRNAの3'末端および発現量を解析することで、sRNAの3'末端形成に及ぼす3'エキソヌクレアーゼの影響を検証する。また、HfqがsRNAの3'末端形成に関与している可能性を検証するために、*hfq*欠失株におけるsRNAの3'末端および発現量を野生株と比較することで、sRNAの3'末端形成に及ぼすHfqの役割を明らかにする。

(2) Hfqの発現制御機構

Hfqの細胞内の発現量はsRNAの機能に影響する重要な因子であるが、Hfqの発現量については、細胞あたり数百分子から1万分子とこれま

での報告には大きな混乱が見られる。また、Hfqの発現量が細胞の生育条件で変動することも知られている。そこで、主にウエスタンブロッティング法により種々の発育条件におけるHfqの発現量を定量的に解析する。Hfq遺伝子は複数の遺伝子とともにオペロンを形成しており、その転写は複雑に制御されている。同時に、主に *in vitro* の解析から *hfq* mRNA は翻訳レベルで自己抑制される可能性が示唆されている。そこで、まず *hfq* 遺伝子のコピー数を増大させたときの *hfq* mRNA および Hfq 発現レベルをノーザンブロッティング法およびウエスタンブロッティング法により定量的に解析し、細胞内における Hfq の自己制御機構の実態を解明する。*hfq* 遺伝子のリーダー領域を中心に一連の変異を導入して、翻訳レベルでの自己抑制に関するシスのエレメントを解明する。特定の sRNA (SgrS や RyhB など) を強制的に過剰発現させたときの Hfq 発現の動的変化を解析し、Hfq の自己制御機構との関係を明らかにする。

4. 研究成果

(1) SgrS や RyB などモデル sRNA として用いて、sRNA の機能的 Hfq 結合領域が sRNA 遺伝子の転写終結領域と重複することに着目し研究を行った。その結果、ストレスがない条件下では sRNA 遺伝子の転写終結領域におけるリードスルーが高頻度で起こることを見いだした。プルダウン法によりリードスルー産物は Hfq との結合能を失っていること、すなわち sRNA として機能しないことを明らかにした。また、合成 RNA と biotin/streptavidin 系を用いた *in vitro* 結合実験により、ポリ U ストレッチは sRNA の 3'末端に位置した場合にのみ Hfq 結合能を持つことを直接証明した。これらの観察から、ポリ U ストレッチは sRNA の 3'末端に位置することで機能的な Hfq 結合モチーフとして働きうると結論した。多くの sRNA 遺伝子の転写は、種々のストレスにより特異的に行われる。今回、sRNA 遺伝子の転写終結が種々のストレスにより促進され、結果的に 3'末端にポリ U テールを有する機能的な sRNA の産生を保障する仕組みであることを発見した。これは、sRNA 産生の新たな制御様式の可能性を示したものである。

(2) Hfq 結合型小分子 RNA (sRNA) は標的 mRNA の翻訳を制御している。Hfq の主な役割は sRNA/mRNA 間の塩基対形成の促進である。申請者は、sRNA の Hfq 結合領域が sRNA の 3'末端領域に存在すること、3'末端のポリ U テールが 7 塩基以上であることが Hfq との結合に必要なこと、sRNA 遺伝子の転写終結領域

におけるリードスルー産物は sRNA として機能しないこと、sRNA 遺伝子の転写終結が種々のストレスにより促進されることなどを明らかにしてきた。平成 28 年度は、sRNA 遺伝子のターミネーターヘアピン構造の sRNA の産生における役割に注目して研究を進めた。sRNA 遺伝子のターミネーターには 7 塩基以上のポリ U ストレッチが存在するという特徴がある。これは機能的な sRNA が産生されるための必要条件である。実際に機能的な sRNA が産生されるためには、転写終結時に 7 塩基以上のポリ U 鎖として転写される必要がある。申請者は、sRNA 遺伝子のターミネーターは機能的な sRNA を転写するためのヘアピン構造を持つと考えた。この仮説を検証するために、ヘアピン構造を安定化させる変異を導入した変異 *sgrS* 遺伝子から合成される転写産物を解析した。その結果、野生型 *sgrS* 遺伝子では、3'末端に 8 塩基のポリ U 鎖を有する SgrS が効率良く転写されたのに対し、変異 *sgrS* 遺伝子では、転写終結が早期に起こり短いポリ U 鎖を持つ SgrS が多数合成されることを発見した。ヘアピン構造の安定化による早期の転写終結は RNA ポリメラーゼによる *in vitro* 転写反応で再現できた。以上の結果は、ターミネーターのヘアピン構造は 3'末端の転写終結位置を決定する重要な要素であり、sRNA 遺伝子のターミネーターは 3'末端に 7 塩基以上のポリ U 鎖を備えた RNA を合成するために最適化されていると結論した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Teppei, MORITA, Ryo, NISHINO and Hiroji, AIBA. Role of terminator hairpin in biogenesis of functional Hfq-binding sRNAs. RNA. 査読有, Published in Advance, June 12, 2017, DOI: <https://doi.org/10.1261/rna.060756.117>

Shiratsuchi, A., Nitta, M., Kuroda, A., Komiyama, C., Gawasawa, M., Shimamoto, N., Tuan, T. Q., Morita, T., Aiba, H. and Nakanishi, Y. Inhibition of Phagocytic Killing of *Escherichia coli* in *Drosophila* Hemocytes by RNA Chaperone Hfq. J. Immunol., 査読有, Vol.197, 2016, pp1298-1307. DOI: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1501953>

Masaki UEDA, Kent KUBO, Tepei MORITA and Hiroji AIBA. Insights into transcription termination of Hfq-binding sRNAs of *Escherichia coli* and

characterization of read through products. RNA., 査読有, Vol.21, 2015, pp1490-1501, DOI : <https://doi.org/10.1261/rna.051870.115>

[学会発表](計 17 件)

森田鉄兵、西野良、饗場弘二、大腸菌小分子 RNA 合成におけるターミネーターヘアピンの意義、第 11 回長野ミーティング、2017.1.23-25、ラフォーレ倶楽部白馬八方(長野県白馬村)

森田鉄兵、饗場弘二、Hfq 結合型 small RNA の機能構造の解析、日本進化学会第 18 回大会、2016.8.25-28、東京工業大学大岡山キャンパス(東京)

Tepei Morita, Ryo Nishino and Hiroji Aiba, Rho-independent terminator of Hfq-binding sRNAs genes is suitably organized to generate functional sRNAs under stress condition in *E. coli*. The 21st Annual Meeting of the RNA Society, The RNA Society of Japan 18th Annual Meeting, Kyoto International Conference Center (Kyoto, Japan), 2016.6.28-7.2

森田鉄兵、西野良、饗場弘二、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、第 13 回 21 世紀大腸菌研究会、2016.6.2-3、グリーンピア南阿蘇(熊本県阿蘇郡)

森田鉄兵、饗場弘二、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、第 10 回長野ミーティング、2016.1.24-26、ラフォーレ倶楽部白馬八方(長野県白馬村)

森田鉄兵、饗場弘二、大腸菌小分子 RNA による mRNA 抑制に関わる因子の探索系の構築、第 52 回日本細菌学会中部支部総会、2015.10.23-24、名古屋市立大学医学部(愛知)

森田鉄兵、上田真熙、久保建人、饗場弘二、大腸菌 Hfq 結合性小分子 RNA 遺伝子の転写終結、及び転写終結領域の読み飛ばし産物の解析、第 17 回日本 RNA 学会年会、2015.7.15-17、ホテルライフオート札幌(北海道)

上田真熙、久保建人、森田鉄兵、饗場弘二、Biotin 修飾 RNA と streptavidin 磁気ビーズを用いた in vitro RNA 結合実験系の構築、第 9 回長野ミーティング、2015.1.25-28、ラフォーレ倶楽部白馬八方(長野県白馬村)

森田鉄兵、上田真熙、久保建人、饗場弘二、Modulation of transcription termination of

Hfq-binding sRNA genes and nature of 3' extended sRNA、第 9 回長野ミーティング ”生物資源の有効利用を目指して” 2015.1.25-28、ラフォーレ倶楽部白馬八方(長野県白馬村)

森田鉄兵、饗場弘二、sRNA の機能構造から明らかになった sRNA 遺伝子の新奇発現制御機構、第 67 回日本細菌学会九州支部会、2014.9.5-6、城山観光ホテル(鹿児島県鹿児島市)

森田鉄兵、近藤良樹、松井香予、饗場弘二、大腸菌小分子 RNA 遺伝子の転写終結制御、第 16 回日本 RNA 学会年会、2014.7.23-25、ウインクあいち(愛知県名古屋市)

森田鉄兵、近藤良樹、松井香予、饗場弘二、大腸菌小分子 RNA 遺伝子の転写終結制御、第 11 回 21 世紀大腸菌研究会、2014.6.5-6、ホテル大観(岩手県盛岡市)

森田鉄兵、饗場弘二、Functional organization of Hfq-binding small RNAs、第 8 回長野ミーティング、2014.3.2-4、ラフォーレ倶楽部白馬八方(長野県白馬村)

饗場弘二、Hfq 結合性 small RNA による翻訳と mRNA の安定性の調節、遺伝研研究集会「大腸菌ゲノム転写研究全体像の分析と転写データベース構築」2013.10.24-25、国立遺伝学研究所(静岡県三島市)

森田鉄兵、大鷹弘紀、石川博一、饗場弘二、大腸菌小分子 RNA 遺伝子における転写終結、及び 3' 末端が伸長した sRNA の機能解析、第 15 回日本 RNA 学会年会、2013.7.24-26、ひめぎんホール(愛媛県松山市)

森田鉄兵、大鷹弘紀、石川博一、饗場弘二、大腸菌小分子 RNA 遺伝子における転写終結、及び 3' 末端が伸長した sRNA の機能解析、第 10 回 21 世紀大腸菌研究会、2013.6.20-21、ラフォーレ修善寺(静岡県伊豆市)

Tepei MORITA, Hironori OTAKA, Hirokazu ISHIKAWA and Hiroji AIBA, Molecular events at Rho-independent terminator of sRNA gene and the nature of 3' extended sRNAs in intact cells. 3rd International Conference on regulating with RNA in Bacteria, 2013.6.4-8, Institute for Molecular Infection Biology, Wurzburg(Germany)

[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・薬学部薬学科・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：