

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：34104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25440012

研究課題名(和文) Hfq結合型小分子RNAの機能構造の解析

研究課題名(英文) Structural characterization of Hfq-binding small regulatory RNA

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本課題研究は、大腸菌小分子RNA (sRNA) の機能構造を明らかにすることを目的にした。幅広い生物に存在するsRNAと同様に、大腸菌sRNAは、mRNAと塩基対を形成することによりmRNAを抑制する。sRNA/mRNA間の塩基対の形成は、Hfqタンパク質により促進される。本課題研究のもっとも大きな成果は、Hfqとの機能的結合において、sRNAのHfq結合領域が3'末端に位置することの重要性を示したことである。また、sRNAの合成が誘導されるストレス条件下で、転写終結効率が上昇していることを明らかにした。これらのことは、sRNA合成機構の理解に貢献する。

研究成果の概要(英文)：This study is aimed to clarify the structural feature of bacterial small regulatory RNA (sRNA). The sRNAs repress target mRNAs by forming duplex in Escherichia coli as in many other species. The duplex formation between sRNA and target mRNA is accelerated by RNA chaperon protein, Hfq. The major outcome of this study is that the functional Hfq-binding module must be located at the 3' end of sRNA. It is also shown that transcription termination is enhanced under stress conditions in which transcription of sRNAs are induced. These findings are useful for understanding of how the functional sRNAs are generated in bacterial cells.

研究分野：生物学

キーワード：小分子RNA 転写後制御 Hfq 大腸菌

1. 研究開始当初の背景

大腸菌をはじめとする細菌、特にグラム陰性菌には、RNA シャペロン活性を持つ Hfq タンパク質と結合し遺伝子発現を調節する機能を有する sRNA が存在する。sRNA は Hfq の作用により標的にする mRNA と塩基対を形成し、多くの場合に mRNA を抑制する。申請者らの研究グループを含め、1990 年代後半より sRNA による標的 mRNA 抑制機構の解析が精力的に行われており、sRNA 抑制機構の分子機構が明らかになりつつある。これまでに、申請者らは、sRNA の 1 つである SgrS をモデル sRNA として用いて、sRNA/Hfq/RNase E が複合体を形成していること、sRNA による標的 mRNA の抑制において翻訳阻害が一義的であること、また翻訳阻害の機能実体が sRNA/標的 mRNA 間に形成される塩基対であることなど、いくつかの重要な点を明らかにしてきた。これらのことを含め、sRNA による標的 mRNA 抑制系の分子機構の中で、Hfq による sRNA/標的 mRNA 間の塩基対形成促進作用は sRNA 制御の根幹を為す作用と位置づけられているが、作用メカニズムの最終的な結論には至っていない。そのため、申請者らは、Hfq による sRNA/標的 mRNA 間の塩基対形成促進の作用メカニズムを明らかにすることを大きな目的として、解析を進めている。すでに申請者らは、Hfq との結合に必要な sRNA 領域として、内部の U に富む領域、それに続く 1 つ、あるいは 2 つのヘアピン構造、及び 3' 末端の 7 塩基以上の U が構成する Hfq 結合モジュールを明らかにした。

2. 研究の目的

(1) 申請者らは、Hfq による sRNA/mRNA 間の塩基対形成促進の作用メカニズムの解明を大きな目的とし、本課題研究では、sRNA の機能構造、特に sRNA の機能的 Hfq 結合領域の位置の重要性を検証することを目的とした。すでに、これまでの解析より、sRNA の 3' 末端領域に機能的 Hfq 結合領域が存在することを示している。このことを踏まえ、本課題研究では、sRNA 遺伝子において転写のリードスルーにより 3' 末端が延長した転写産物が、転写終結により産生された sRNA と同様に、sRNA として機能するのかについて検証した。

(2) sRNA 制御系をより詳細に理解する目的で、sRNA 制御系に欠損を示す変異のスクリーニング法を構築した。

3. 研究の方法

(1) sRNA の機能的 Hfq 結合領域の位置の重要性を検証するために、二重ターミネーターを持つ sRNA 発現系をプラスミド上に構築し、*in vivo* で sRNA 機能を評価する一連の実験を行った。また、non-RI で *in vitro* で RNA/Hfq の結合を評価するため、ストレブ

トアビジン-ビオチン系を利用した *in vitro* RNA 結合実験系を確立した。

(2) sRNA 制御に欠損を示す変異のスクリーニング法を構築する目的で、必須遺伝子の mRNA を標的にする sRNA 組換え体の発現系を構築し、プレート上でのコロニー形成により sRNA 機能を評価した。sRNA 機能を評価できる系であることが確認されたので、自然突然変異による sRNA 機能欠損変異株選抜を試みた。

4. 研究成果

(1) 二重ターミネーターを持つ sRNA 発現系を大腸菌内で発現させた結果、ノーザンブロット法により、sRNA 遺伝子の転写終結領域を読み飛ばし 3' 側が伸長したリードスルー産物の検出に成功した。sgrS 遺伝子においては、検出された読み飛ばし産物量は、転写終結した量とほぼ同量であったことより、sgrS 遺伝子の転写終結領域の終結効率は約 50% 程度であることが確認された。このことは、Hfq との機能的な結合に sRNA の 3' 末端に比較的長い U 塩基が必要であるため、転写終結効率が比較的弱く設計されている可能性が考えられる。

Hfq は sRNA と結合することにより sRNA を安定化させるため、転写終結により産生された sRNA は hfq 変異株で減少するが、検出された 3' 末端が伸長した転写産物は hfq 変異株においても量が変化しなかった。また、野生株においても 3' 末端が伸長した転写産物が不安定であること、及び *in vivo* 共沈実験、*in vitro* 結合実験によりこのリードスルー産物が Hfq と結合しないことを示した。これらの実験は、sRNA の機能的 Hfq 結合領域が sRNA の 3' 末端に位置することの重要性を示している。

また、同発現系を用い解析をする中で、sRNA の合成が誘導されるようなストレス条件において、転写のリードスルーが抑制されていることを見出した。このことは、sRNA が機能する条件下においては、sRNA 遺伝子の転写終結が相対的に起こりやすくなっていることを示している。すなわち、ストレス条件は、すでに知られているような sRNA 遺伝子の転写開始促進のみならず、転写終結効率の上昇をもたらす、機能的な sRNA の産生量を増加させる意義があると考えられる。以上の結果は、大腸菌細胞内での sRNA 産生のメカニズムの理解につながる。これらの成果を学術誌 RNA に発表した (Morita, et al., RNA, 2015)。

(2) 必須遺伝子の mRNA を標的にするように組み換えた sRNA の発現誘導系を利用し、sRNA 発現によりプレート上でコロニー形成が阻害されることを確認した。同条件で、自然突然変異によりコロニーが形成される変異が単離され、その大部分は hfq 遺伝子内に

変異が存在する変異株であった。これらのことは、同系が sRNA 制御に欠損を示す新奇遺伝子変異株、あるいは sRNA、mRNA、及び Hfq の部位特異的変異の単離に適した系であることを示している。これらの成果は、細菌学会中部支部会で発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Teppei MORITA, Masaki UEDA, Kent KUBO 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: 10.1261/rna.051870.115

〔学会発表〕(計 16 件)

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)

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、Modulation of transcription termination of Hfq-binding sRNA genes and nature of 3' extended sRNAs、第 88 回日本細菌学会総会、2015.3.26-28、長良川国際会議場(岐阜県岐阜市)

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 sRNAs、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、松井香予、近藤良樹、饗場弘二、大腸菌 sRNA の生合成過程における転写終結の重要性、第 8 回日本ゲノム微生物学会若手の会研究会、2014.9.28-29、ろうきん研修所富士センター(静岡県駿東郡)

森田鉄兵、饗場弘二、sRNA の機能構造から明らかになった sRNA 遺伝子の新規発現制御機構、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、松井香予、近藤良樹、饗場弘二、大腸菌小分子 RNA 遺伝子の転写終結制御、第 8 回細菌学若手コロッセウム、2014.8.6-8、ホテルニセコ(北海道虻田郡)

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)

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、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)

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 7 回日本ゲノム微生物学会、2013.9.19-20、ろうきん研修所富士センター(静岡県駿東郡)

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 7 回細菌学若手コロッセウム、2013.8.7-9、広島エアポートホテル(広島県広島市)

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)

Teppei 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
InfectionBiology ,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

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

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：