

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650127

研究課題名（和文）新規な長鎖逆方向反復配列の役割と分子機構に対するゲノムワイド解析

研究課題名（英文）Genomic and functional analysis for novel long-chain inverted repeats

研究代表者

片山 勉（Katayama, Tsutomu）

九州大学・薬学研究院・教授

研究者番号：70264059

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：大腸菌と出芽酵母のゲノム配列データベースを利用して多数の長鎖逆方向反復配列を見出した。これらについて欠失変異体を作成して重要な機能があるか詳細に解析した。大腸菌の1種の長鎖逆方向反復配列は遺伝子間領域にあり、この配列を含む領域は特定の条件下で細胞増殖の制御に重要であった。さらにこの領域がRNAとして発現していることが確認された。この非コードRNAは細胞増殖や環境ストレス応答において機能している可能性がある。またこの非コードRNAは上流遺伝子からの転写流入により発現していることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Our analysis using genome sequence databases of Escherichia coli and the budding yeast indicated that long-chain inverted repeats are present at several sites. Mutants bearing deletions for these genomic sites were constructed and phenotypes of the resultant mutants were analyzed in detail. As a result, in Escherichia coli, a single site was suggested to have an important function in cell growth under certain conditions. This site was located in an intergenic region, and was indicated to be transcribed, yielding non-coding RNA. In addition, this non-coding RNA was suggested to be synthesized by transcriptional readthrough from a gene located upstream of the site.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝学 遺伝子 ゲノム 細菌

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、大腸菌の複製開始因子 DnaA 蛋白質の機能制御の研究から、DNA 上の反復配列の構成の変化により、そこに結合する蛋白質の高次複合体形成が多様化し、その機能がドラスティックに制御されることを見出してきた (Fujimitsu et al., *Genes Dev.* 2009, 23, 1221-1233; Ozaki and Katayama, *Nucleic Acids Res.* 2012, 40, 1648-1665; Kasho and Katayama, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 110, 936-941; 他)。これらの研究を通じて、ゲノム上の反復配列の重要性やその機能の多様性について理解がより拡大することになった。

反復配列のうち、逆方向に配列が繰り返す、いわゆる逆方向反復配列は、特定の遺伝子の内部や転写制御領域、あるいは、トランスポゾンなどに見出され、これまでその機能が個々に解析されてきた。その機能としては、転写制御や DNA 組換えにキーとなる蛋白質因子の結合部位となることや、転写産物の RNA がステム-ループ構造やヘアピン構造を形成して蛋白質結合部位となることが知られており、逆方向反復配列は重要な機能モチーフであると言える。

一方、逆方向反復配列は DNA 複製時の障害となる 2 次構造を形成し変異ホットスポットともなる。特に反復配列が長いものとなれば、より 2 次構造を形成しやすく、ゲノムを不安定にする方向により強く働くものと思われる。そのような負荷がありながらもゲノム中に維持されている長鎖の逆方向反復配列には、どうしても必要とされる何らの重要な役割が与えられている可能性がある。

研究代表者は大腸菌と出芽酵母のゲノムデータベースを活用して、反復する 1 単位配列が 10 bp 以上となる長鎖逆方向反復配列を網羅的に検索した。例えば、1 単位配列が 10 bp でこの配列間にスペーサー配列がなければ長鎖逆方向反復配列の全長は 20 bp となる。検索には独自に開発した計算プログラムを用いた。その結果、大腸菌ゲノムにおいても出芽酵母ゲノムにおいても、多数の箇所で見出された。さらに、機能未知の部位に解析を集中させるため、大腸菌ゲノムにおいては、トランスポゾン内部のものや転写ターミネーターと考えられるものは排除した。出芽酵母ゲノムではセントロメア由来と思われる AT-rich 配列は除外した。

このような過程を経て抽出した部位について実験的解析を進めていた。実際に大腸菌ゲノムで新たに見出した 1 つの長鎖逆方向反復配列を欠失解析すると、特定の条件下で細胞増殖が阻害されることが見出されていた (論文未発表)。

2. 研究の目的

本研究では、大腸菌ゲノムおよび出芽酵

母のゲノムにおいて見出した長鎖逆方向反復配列について、その機能を体系的に解析することを目的とした。

そのため、まずそれぞれの長鎖逆方向反復配列についてデータベースや文献により基盤情報を探索する。次いで、機能未知なものについて、個々に欠失変異を作成し、多様な条件下で表現型解析を行う。さらに長鎖逆方向反復配列が転写されているか解析し、転写されている場合には転写産物の解析を行う。

3. 研究の方法

ゲノムデータベースから見出してきた多数の長鎖逆方向反復配列について、見込まれる重要性の順に解析してゆくため、始めに関連情報の解析を行なう。まず、長鎖逆方向反復配列の周辺配列や周辺遺伝子 (長鎖逆方向反復配列が遺伝子内に位置する場合はその遺伝子) についてデータベースもしくは文献の解析により情報分析し、既知の機能や蛋白質結合モチーフ等の存在を調べ上げる。転写ターミネーターや機能既知の配列であるとわかった場合はその後の研究対象から除外する。その結果に従って新規性と重要性を勘案し解析すべき順位を決定する。

実験解析すべきと結論された長鎖逆方向反復配列については、個々に欠失変異を作成する。部位特異的なゲノム編集法としては、大腸菌では λ Red システムを用いる。この手法では、 λ ファージ由来の部位特異的組み換え酵素を用いることにより、正確にゲノム上の塩基配列を任意のものに変換できる。酵母でも確立されている部位特異的組み換え法を利用する。また、欠失領域の決定の際には、もし隣接配列に既知モチーフが存在すれば、その保全等にも注意する。対象とした長鎖逆方向反復配列が増殖に必須であったらプラスミド相補実験を行う。この際にも、コピー数による影響を留意し、必要なら発現制御系を構築する。

次いで、目的の長鎖逆方向反復配列の欠失変異体 (あるいは発現制御系を持つ変異体) を用いて多様な条件下で表現型を解析する。すなわち、フローサイトメトリーをもちいた細胞周期解析、多様な条件下での増殖能の解析、さらに、環境ストレス応答能の解析を行う。具体的には次の項目を検討する。

- ・細胞周期

細胞周期パラメータ (染色体コピー数、複製タイミング、細胞分裂タイミング等)、細胞形態、無核細胞の出現など

- ・培養条件

温度、pH、塩濃度、界面活性剤、高または低栄養条件など

- ・ストレス応答

高温または低温、エタノール、変異原薬剤、紫外線、増殖阻害剤 (抗生物質) 等に対する

る感受性

これらの解析の結果、さらに長鎖逆方向反復配列からの発現産物の解析が必要となった場合には、逆転写 PCR 法等を利用、あるいは、プラスミドによる発現制御系を構築して解析する。

4. 研究成果

(1) 出芽酵母ゲノム

まず、ゲノムデータベースから見出した個々の長鎖逆方向反復配列について、それらの周辺遺伝子や周辺配列の特徴をデータベース解析および論文資料解析によって詳しく調べた。その結果を考察して、まず、出芽酵母ゲノムの6箇所長鎖逆方向反復配列を優先して解析することとし、これらを *lir-1*~*6* と命名した。

次に1倍体酵母への相同組換えを利用して、*lir-1*~*6* を個々に欠失した変異株の作成を試みた。その結果、5箇所については高効率で欠失変異体が構築できたが、*lir-4* と命名した1箇所については欠失することができなかった。

lir-4 を除く欠失変異株については、細胞周期、温度感受性、紫外線感受性、DNA複製阻害剤等の薬剤感受性、細胞形態等を調べたが、野生型と顕著な差異は見出されなかった。*lir-4* については2倍体酵母を用いて欠失変異体を構築することができた。つまり、この領域は細胞増殖のため重要な役割をもつことが示唆された。

lir-4 の近傍について、さらに詳しく配列解析を進めると、ここには別の逆方向反復配列や特定の転写因子の結合配列と推定できる配列が数個あることなど特異的な構造をもっているがわかった。

(2) 大腸菌ゲノム

大腸菌ではすでに準備段階の実験によって、増殖に重要な機能があると推定された部位があったため、その機能の解析を優先的に進めた。この部位の欠失変異株は、低温等の条件下で増殖阻害を示した。欠失変異体を作成のために当該領域に薬剤耐性遺伝子を挿入するが、異なる薬剤耐性遺伝子を用いて複数の欠失変異体を作成して増殖阻害を確認した。

さらに代表的な欠失変異株に対して、プラスミド相補実験を行った。その際、使用するプラスミドは低コピー数のものから高コピー数のものまで数種を検討し、誘導性プロモーターからの発現制御も検討した。その結果、このDNA領域を持つプラスミドの導入によって、欠失変異株が本来持つ増殖阻害が抑えられることがわかった。すなわち、この領域の機能は *trans* に働きうる性質があることがわかった。

そのためこの領域からのRNA転写を想定し、多様なプローブを用いて逆転写PCR法を行って、転写産物の有無とその領域を

解析した。その結果、この領域から転写産物が得られること、そして、それは見いだした長鎖逆方向反復配列を含む比較的長い領域のRNAであることが明らかになった。このRNAは長鎖逆方向反復配列の上流に位置している遺伝子からの転写流入により発現していることも示唆された。

ひきつづき、プラスミド上のDNA領域に多様な欠失を導入してプラスミド相補性試験を行って、当該の欠失変異体の増殖阻害の抑制に必要な領域を限定した。その結果、上流遺伝子を含まない遺伝子間領域(長鎖逆方向反復配列を含む)のみにより欠失変異株の増殖阻害が抑えられることが再確認された。

これらの結果から当該の長鎖逆方向反復配列を含む領域から、非コードRNAが発現していることが確認された。さらにこの非コードRNAがある特定の条件下では増殖に重要な機能をもつことが推定された。非コードRNAとして機能するのならば、この領域が逆方向反復配列をもつ意味も理解しやすい。ただし、この可能性とは別に、DNA領域そのものが *trans* に働き、特定の条件下で増殖に重要な機能をもつという可能性も現時点では否定するものではない。また、いずれの場合にしろ、なぜこの逆方向反復配列がこのような「長鎖」となる必要があったのかという疑問は依然解かれていない。この問題を解くためには、この部位がもつ機能や分子機構を詳細に解明する必要があるだろう。

次に、この部位が非コードRNAとして機能するという推定に基づき、ゲノムデータベース解析を進めた。その結果、予想される長鎖逆方向反復配列を含む領域からのRNAと相補的な塩基配列を持つ領域をゲノム上の数カ所で見出した(部分的な相補配列も含む)。これらには当該非コードRNA、あるいは、当該DNA領域の重要な標的が含まれている可能性がある。

また、さらに表現型解析を進めた結果、当該部位の欠失変異株では、複数の抗生物質に対してコロニー形成能が高感受性を示すようになっていたことが判明した。一方で、特にそのような感受性の変化を起こさない抗生物質もあることもわかった。このような結果から、本研究で発現を確認した非コードRNAは特定の抗生物質の作用機構や環境ストレス応答機構に関与している可能性が示された。

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 0件)

[学会発表] (計 4件)

① 呉 唯意, 土田 愛海, 川上 広宣, 加生 和寿, 片山 勉, Genetic analyses of a

unique, long intergenic region in *E. coli*,
KAIST-Kyushu University Joint Seminar,
2017年1月20~21日, 休暇村志賀島(福岡
県福岡市)

②川上 広宣, 土田 愛海, 竹原 通秋, 加生
和寿, 片山 勉, 細胞増殖に必須な長鎖逆方
向反復配列の役割と保存性の推定,
第13回21世紀大腸菌研究会, 2016年6月2
~3日, グリーンピア南阿蘇(熊本県阿蘇郡)

③土田 愛海, 川上 広宣, 加生 和寿, 末次
正幸, 片山 勉, 大腸菌の増殖に必須な長鎖
逆方向反復配列 ELIXIR1 の機能解析,
第37回日本分子生物学会年会, 2014年11月
25~27日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜
市)

④土田 愛海, 川上 広宣, 末次 正幸, 片山
勉, 大腸菌染色体の遺伝子間領域に存在す
る長鎖逆方向反復配列 ELIXIR の機能解析,
第11回21世紀大腸菌研究会, 2014年6月
5~6日, ホテル大観(岩手県盛岡市)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

○取得状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

九州大学薬学研究院分子生物薬学分野

<http://bunsei.phar.kyushu-u.ac.jp/>

九州大学研究者情報_片山 勉

[http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/
details/K001101/index.html](http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/K001101/index.html)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

片山 勉 (KATAYAMA, Tsutomu)

九州大学・大学院薬学研究院・教授

研究者番号: 70264059

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

川上 広宣 (KAWAKAMI, Hironori)

九州大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号: 50403952

(4) 研究協力者

加生 和寿 (KASHO, Kazutoshi)

九州大学・大学院薬学研究院・助教

研究者番号: 90726019