

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870020

研究課題名（和文）細胞質におけるRNAキャップ付加反応と細胞ストレスや翻訳の関係

研究課題名（英文）Relationship of cytoplasmic capping to translation and cell stress

研究代表者

大塚 裕一 (OTSUKA YUICHI)

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：10548861

研究成果の概要（和文）：核のみで起こると考えられる mRNA キャップ付加反応が細胞質でも起こる可能性を検証することが本研究の目的である。期間内に、細胞質でキャップ付加される mRNA を複数同定し、さらにそれら RNA の 3' 末端が修飾（ポリ U 化）されている可能性を示唆した。また異なるプロジェクトとして、大腸菌に感染する T4 ファージが大腸菌の毒素に対して抗毒素作用を持つ因子を備え、自らの増殖を可能にしていることも明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this research project is to verify that capping can occur in cytoplasm as well as nucleus, and show the significance of cytoplasmic capping in gene expression. I identified many target mRNAs to which cap structures would be added in cytoplasm. Also, deep sequencing analysis suggested that some of these mRNAs might have poly(U) tail at 3' terminus. These modifications on mRNA may play important roles in gene expression. In a different research project, I showed that bacteriophage T4 had an antitoxin against *E. coli* toxins for its own survival.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,040,000	312,000	1,352,000
2010年度	940,000	282,000	1,222,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,980,000	594,000	2,574,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：mRNA、キャップ構造、細胞ストレス、大腸菌、T4 ファージ、トキシン-アンチトキシン

1. 研究開始当初の背景

(1) 細胞質キャッピング

mRNA キャッピング(キャップ付加反応)は、一般的に核内のみで起こると考えられている。しかしながら近年、Greg Hannon らによる小分子 RNA の研究 (Hannon, G. J. *et. al.*, Nature. 2009, 457:1028-32) や私が行っている β -globin mRNA 分解研究 (Otsuka, Y. *et. al.*, Mol. Cell. Biol. 2009, 29:2155-67)

から、キャッピングが細胞質でも起こる可能性が示唆されてきた。キャップは細胞質での翻訳開始やマイクロ RNA による翻訳抑制に必須な構造で (Mathonnet, G. *et. al.*, Science. 2007, 317:1764-7)、その制御は遺伝子発現に重要な役割を果たす。 β サラセミアは、 β -globin mRNA のエクソン 1 と 2 内に終止コドンが生じることにより引き起こされる遺伝病の一つで、変異がエンドヌクレアーゼを

活性化し、細胞質においてこの mRNA を積極的に分解し発現抑制する (Stevens, A., *et. al.*, PNAS 2002, 99:12741-6)。興味深いことに、この分解中間産物は非常に安定に細胞内に存在し、その 5' 末端にキャップのような修飾を持つ可能性が示唆された (Lim, S.K. and Maquat, L.E. EMBO J. 1992, 11:3271-8)。私は Mol. Cell. Biol. の論文で、これら分解産物が細胞質において確かにキャップ構造を有すること、さらにキャップを付加する酵素 (Guanylyltransferase, 68kDa) が細胞質にも存在し、分子量 140kDa の複合体を形成することを明らかにした。In vitro の解析より、この複合体は 5' 末端に一磷酸をもつ RNA (エンドヌクレアーゼや脱キャッピング酵素により生じる RNA) にキャップ構造を付加できることから、5' 末端の一磷酸からキャッピング (GMP 転移反応) の基質となる二磷酸へトリン酸基を付加する新規キナーゼを含んでいることが示唆された。また細胞質キャッピングの生物学的意義として、細胞増殖や酸化ストレス後の細胞の回復に必要であることも明らかになった。以上の発見は、これまで考えられてきたキャッピングが核のみで起こるという概念を覆すもので、細胞質における新規の遺伝子発現制御機構の存在を示唆している。2009 年に Greg Hannon のグループが、細胞質でエンドヌクレアーゼ切断により生じる転写制御に関わる小分子 RNA (PASAs と TASAs) がキャップ構造を有することを Nature に報告した。これは細胞質でキャッピングが起こる新しい事例で、私が提案する研究プロジェクトを強く支持する結果である。

(2) 大腸菌トキシン-アンチトキシンと T4 ファージ感染との関係

トキシン-アンチトキシンシステム (以下 TA と略す) は原核生物に広く保存された細胞死を誘導するシステムで、トキシンは増殖を阻害し細胞を死へと導く。一方、通常の細胞では過剰に発現するアンチトキシンがトキシンに結合することで不活化している。しかしながら細胞が栄養飢餓などストレスにさらされた場合、TA 遺伝子の発現は低下する。その結果不安定なアンチトキシンが優先的に消失することでトキシンが活性化し、mRNA 分解や翻訳反応の停止等を引き起こす (Gerdes *et al.* Nat. Rev. Microbiol 2005)。

我々の研究室では T4 ファージが感染した大腸菌において、mRNA 分解制御が異常となる現象を発見した。T4 ファージの *dmd* 遺伝子に変異すると、感染後期においてほとんど全ての mRNA が分解され、遺伝子発現不能そして増殖不能に陥る (Kai T *et. al.*, Genetics 1996, 144:7-14)。この異常な mRNA 分解を引き起こす RNase LS 活性は、大腸菌の *rnIA* に

コードされ (Otsuka Y and Yonesaki T Genetics 2005, 169:13-20)、そのタンパク質は確かにエンドヌクレアーゼ活性を有し、T4 ファージ Dmd タンパク質により阻害される

(Otsuka Y *et. al.*, Genes Genet. Syst. 2007, 82:291-9)。この *rnIA* とオペロンを形成する *rnIB* も活性制御に関与することが示唆されていたが、詳細は明らかになっていなかった。興味深いことに *rnIB* 非存在下では、RnIA 発現が細胞増殖を阻害した。この結果は *rnIA-rnIB* が新規の TA システムであることを強く示唆した。

2. 研究の目的

(1) 細胞質キャッピング

細胞質キャッピングは単なる切断産物の再キャッピングではなく遺伝子発現に重要な役割を果たす。私は一部の mRNA はキャップがない状態では細胞質の限られた場所 (P-bodies や Stress granules) にとどまり、適切な環境条件になると再びキャップ付加され速やかに翻訳へ移行すると考えている。本研究は、細胞質においてキャップ付加される mRNA の同定と細胞ストレスによる細胞質キャッピングの変化や翻訳反応への影響を明らかにするもので、新規の遺伝子発現機構として細胞質キャッピングの重要性を示すことを研究目的とする。

(2) 大腸菌トキシン-アンチトキシンと T4 ファージ感染との関係

T4 ファージ感染により活性化する大腸菌 RNase LS の構成因子 RnIA と制御因子 RnIB が、大腸菌新規 TA システムであることを証明し、さらにこれら遺伝子が形成するオペロンの転写制御機構を明らかにする。また病原性大腸菌 O157 株が持つプラスミド pOSAK1 にコードされる機能未知蛋白質 LsoA と LsoB が K12 株染色体上の RnIA と RnIB と相同性を有することが分かったので、これら LsoA と LsoB の機能解析も行う。本研究は、大腸菌が持つ TA システムが抗ファージ作用として働くことを示し、さらに TA システムに対するファージの防御機構を明らかにすることを研究目的とする。

3. 研究の方法

(1) 細胞質キャッピング

核でのキャッピングは細胞にとって必要不可欠であるため、キャッピング酵素を発現抑制して mRNA を同定、解析することはできない。そこで細胞質で起こるキャッピングのみを特異的に阻害するため、劣性変異を持つキャッピング酵素 (DN-cCE) を核移行シグナルの変異と核外輸送シグナルの導入により、細胞質のみに安定に過剰発現するテトラサイクリン誘導性のヒト骨肉芽腫細胞株 U2OS

細胞を作成した (Otsuka, Y. *et al.*, Mol. Cell. Biol. 2009, 29:2155-67)。DN-cCE 発現有り/無しの細胞から細胞質 RNA を抽出し 18S/28S rRNA を除いた後、Jiao らの論文 (Jiao *et al.*, Plant Cell. 2008, 20:2571-85) に従い RNA オリゴマーと RNA サンプルをリガーゼで処理した。RNA オリゴマーは 5' 末端に一リン酸を持つ RNA (uncapped RNA) のみと反応し、キャップ構造を持つ RNA とは結合しない。その後 RNA オリゴマーに相補的な配列で 3' 末端にビオチン標識を持つ DNA オリゴマーをアニールさせ、DNA-RNA 分子をストレプトアビジン-マグネットビーズにより回収し、RNA オリゴマーが結合した uncapped RNA を調製した。Jiao らはこの方法で、シロイヌナズナから複数の uncapped RNA の精製に成功している。共同研究者である Schoenberg 教授が所属するオハイオ州立大学のマイクロアレイ施設において、エクソアレイと Gene-ST アレイを用いて回収された mRNA の同定を行われた。

以前、私は細胞質 mRNA のキャップ状況を確認するため、5' 末端に一リン酸を持つ RNA を特異的に消化する 5'-エクソヌクレアーゼで細胞質 RNA を処理し、エクソアレイを用いてキャップ構造を持たない mRNA の同定を試みた。この方法は uncapped RNA 回収法とは異なり、キャップを持つ mRNA の存在量を定量できる。そこでこの結果と上記の実験で得られた結果とを比較して、細胞質キャッピングのターゲットとなる mRNA の同定を行った。同定した mRNA に関しては Q-PCR によりデータの信頼性を確認した。

キャップは細胞質での翻訳開始やマイクロ RNA による翻訳抑制に必須な構造で、その制御は遺伝子発現に重要な役割を果たす。そこで細胞質キャッピングが翻訳を制御する可能性を調べるため、ショ糖密度勾配遠心によるポリソーム分画解析を行い、mRNA の分布を DN-cCE 発現有り/無しの条件で比較した。DN-cCE は細胞質キャッピングを阻害するため、細胞質キャッピングのターゲットとなる mRNA は重いポリソーム分画から軽い mRNP 分画に移行することが予想された。

また細胞質キャッピングのターゲットとなる mRNA の構造 (例えばポリ A 鎖の有無等) を知る目的で、deep sequencing を行った。

(2) 大腸菌トキシン-アンチトキシンと T4 ファージ感染との関係

① Rn1A-Rn1B が大腸菌新規 TA システムであることの証明

通常、過剰に発現するアンチトキシンがトキシンに結合しているが、環境ストレス条件下ではアンチトキシンが分解され、その結果トキシンが活性化して増殖阻害、細胞死を引き起こす。ここでは Rn1A-Rn1B が TA システ

ムに属する可能性を検討するために、細胞増殖に対するこれら蛋白質発現の効果、各タンパク質の安定性や機能、さらには環境ストレスによる活性化等を調べ、既知の TA システムの特徴との比較を行った。

② *rn1A-rn1B* オペロンの転写制御機構の解析

TA オペロンの転写は厳密に制御されている。通常不安定なアンチトキシンは活発な転写によって過剰に生産されることにより、安定なトキシンの活性を抑制できる。しかしながらストレス条件下では、TA オペロンの転写が停止するため、アンチトキシンの供給がなくなり、遊離したトキシンが増加、活性化して細胞増殖を阻害する。以前我々は鉄-硫黄クラスター蛋白質で、転写抑制因子として知られている IscR の過剰発現が RNase LS 活性を抑制することを見出した。ここでは *rn1A-rn1B* オペロンの転写に対する IscR の関与を明らかにするため、IscR による転写抑制の確認、転写抑制に関与するプロモーター領域の同定やその領域と IscR の結合能を解析した。

③ 0157 株が持つ LsoA-LsoB の機能解析

相同性検索の結果、病原性大腸菌 0157 株が持つプラスミド pOSAK1 にコードされる機能未知蛋白質 LsoA と LsoB が K12 株染色体上の Rn1A と Rn1B と相同性を有することが分かった。そこで LsoA-LsoB が TA システムに属するか、また Rn1A-Rn1B 同様に T4 ファージ感染により活性化するのかどうかを上述①と同じ方法で解析した。

4. 研究成果

(1) 細胞質キャッピング

上述の方法により細胞質キャッピングのターゲットとなる mRNA の同定を試みたところ、DN-cCE 発現なしの場合大部分がキャップを持った状態で存在するが、DN-cCE の発現によりキャップを持たない割合が増加した mRNA を約 1000 種類同定できた。この結果は Q-PCR 解析でも再確認された。以上の結果より、まずすべての細胞質 mRNA がキャップを持った状態で存在している訳ではなく、一部キャップを持たない状態で存在していることが分かり、さらにそれらキャップを持たない mRNA は細胞質キャッピングのターゲットとなることも明らかになった。次に私は同定した mRNA を対象に、DN-cCE 発現有り/無しでのポリソームプロファイル上の存在位置を調べた。DN-cCE 発現がない場合は翻訳が活発に行われているポリソーム上に大部分の mRNA が存在しているのに対し、DN-cCE 発現後はそれら mRNA が翻訳されない mRNP 領域に移行することも分かった。この結果は細胞質キャッピングが翻訳反応を制御しているこ

とを強く示唆する。現在、様々なストレス条件下でのキャップ状況の変化を調べ、翻訳活性との関係について解析している最中である。以上の実験結果は細胞質キャッピングの存在、さらには新規遺伝子発現機構としての細胞質キャッピングの重要性と示すものである。またプレリミナリーな結果であるが、Deep sequencing 解析により細胞質キャッピングのターゲットとなる mRNA の 3' 末端がポリ U 化されている可能性が示唆された。近年、小分子 RNA やヒストン mRNA の 3' 末端がポリ U 化され、遺伝子発現制御に関わることが報告されており、我々の結果は新しい事例を加えることになるかもしれない。

(2) 大腸菌トキシン-アンチトキシンと T4 ファージ感染との関係

① Rn1A-Rn1B が大腸菌新規 TA システムであることの証明

Rn1A 発現による細胞増殖への影響を調べたところ、Rn1B 非存在下において細胞増殖の阻害がみられた。しかしながら Rn1B を共発現した場合、細胞は正常に増殖した。この結果は Rn1A がトキシン、Rn1B がアンチトキシンをコードしていることを強く示唆する。Rn1A はエンドリボヌクレアーゼ活性を有するので、Rn1A 発現による大腸菌 mRNA の変化を調べたところ、大多数の mRNA が不安定化した。また切断部位を解析したところ広い配列特異性を示した。したがって Rn1A 発現による増殖阻害は mRNA 分解により引き起こされることが強く示唆される。次に Rn1A と Rn1B の *in vivo*での相互作用を免疫沈降法で調べたところ、両蛋白質は共沈降した。さらに蛋白質の安定性を測定したところ、Rn1B は Rn1A に比べ非常に不安定であることも分かった。以上の結果はこれまでの TA システムの特徴と一致することから、我々は大腸菌染色体上の *rn1A-rn1B* が新規の TA システムであると結論づけた。さらに T4 ファージ感染後の各蛋白質の存在量を調べたところ、アンチトキシンである Rn1B が急速に消失することが分かった。この結果はファージ感染による Rn1A の活性化、そしてファージ mRNA の分解、増殖阻害を予想させるが、確かに *dmd* 遺伝子変異ファージでは Rn1A による mRNA 分解そして増殖阻害が確認された。しかし野生型ファージは正常な増殖を示す。そこで Dmd による Rn1A 活性への影響を調べたところ、Dmd は Rn1A に直接結合して活性を阻害することが分かった。従ってファージは感染直後に Dmd を発現し、Rn1B の代わりに Rn1A を抑制することで正常な増殖を可能にしている。これはファージが自らの生存のために広い作用スペクトルをもった *dmd* 遺伝子を進化上獲得したことを示唆する。以上の結果はファージが大腸菌トキシンに対してアンチトキシンを

備えていることを示す初めての事例であり、非常に興味深い。

② *rn1A-rn1B* オペロンの転写制御機構の解析

我々は以前、IscR の過剰発現により RNase LS 活性が低下することを発見した。IscR は鉄-硫黄クラスター蛋白質であり、且つ酸化ストレスや鉄欠乏により発現誘導される転写因子であることが報告されている。そこで我々は IscR による RNase LS 活性の低下が *rn1A-rn1B* オペロンの転写抑制によりもたらされる可能性を考え、以下の実験を行った。まず IscR の過剰発現により T4 *dmd* 変異ファージの増殖能が回復することから、IscR による RNase LS 活性の低下を確認した。またこの活性抑制には IscR の鉄-硫黄クラスターの配位は必要ないことも分かった。次に *rn1A-rn1B* オペロンの転写への関与を明らかにするため、まずプライマー伸長法により *rn1A* の上流に存在する 4 つの転写開始点を同定した。また *rn1A* の内部に *rn1B* の転写開始点が存在することも分かった。次に *lacZ* との融合遺伝子を用いてプロモーター領域を同定し、さらに IscR による転写制御の有無を解析した。結果、染色体上の *iscR* が欠失した大腸菌では *rn1A* プロモーターからの転写活性が増加し、さらに IscR の過剰発現により転写活性が抑制された。この結果は染色体上の *rn1A* の転写においても確認された。それに対し *rn1B* プロモーターからの転写は IscR により制御されなかった。従って定常時では *rn1B* の転写が *rn1A* に比べ高く維持されることにより Rn1A 活性の抑制が保証されていると考えられる。最後に、ゲルシフトアッセイにより、IscR の *rn1A* プロモーター特異的な結合を確認した。以上の結果より、IscR が *rn1A* の転写を抑制することで、RNase LS 活性を低下させることが明らかになった。IscR の発現が酸化ストレスや鉄欠乏により誘導されることを考えると、Rn1A-Rn1B の活性化は T4 ファージの感染だけでなく、上述のストレスによってもたらされることが示唆される。

③ 0157 株が持つ LsoA-LsoB の機能解析

相同性検索の結果、0157 株が持つ pOSAK1 にコードされた LsoA は K12 株が持つ Rn1A と 20% の相同性、45% の相似性を示し、また 0157 株の LsoB は K12 株の Rn1B と 28% の相同性、50% の相似性を示した。我々は LsoA-LsoB が Rn1A-Rn1B の機能的ホモログで TA システムをコードしている可能性を調べた。上述の①と同様に、まず LsoA 発現が増殖阻害を示すこと、複数の mRNA を不安定化すること、LsoB により LsoA が持つ毒性や RNA 分解活性が抑制されること、LsoA と LsoB の相互作用、さらに LsoB の不安定性等を明らかにした。以上の結果は LsoA-LsoB が TA システムをコー

ドしていることを強く示唆する。また T4 フェージにより活性化する Rn1A と同様に、LsoA も活性化して mRNA を分解し、*dmd* 変異体フェージの増殖不能を引き起こした。また LsoA と Dmd の共発現は LsoA による増殖阻害を完全に抑制した。以上の結果より、我々は LsoA-LsoB は Rn1A-Rn1B の機能的ホモログであると結論づけた。機能的ホモログではあるが Rn1B は LsoA の毒性を、また LsoB は Rn1A の毒性を阻害できない。この結果は既知のアンチトキシンが DNA 上で対をなすトキシンに対してのみ作用するという知見と一致する。しかし興味深いことに T4 フェージが持つアンチトキシン Dmd は両トキシン活性を阻害した。これは 1 つのアンチトキシンが複数のトキシンに作用した初めての事例であり、非常に興味深い。現在大腸菌染色体上では 15 種類の TA システムが同定されている。フェージ感染により大腸菌の遺伝子発現は停止するため、不安定なアンチトキシンは急速に消失し、遊離したトキシンが活性化すると予想される。従ってフェージは自らの増殖のために複数のトキシンに対して作用できるアンチトキシン Dmd を進化上獲得したのではないかと考えられる。

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 3 件)

- ① Koga M, Otsuka Y, Lemire S, and Yonesaki T. (2011) The *Escherichia coli* *rnlA* and *rnlB* compose a novel Toxin-Antitoxin system. *Genetics*. 187: 123-130 (査読有)
- ② 米崎哲朗, 大塚裕一 (2010) 新世代のフェージ研究 *生産と技術*. 62:55-58 (査読無)
- ③ Otsuka Y, Miki K, Koga M, Katayama N, Morimoto W, Takahashi Y, and Yonesaki T. (2010) IscR regulates RNase LS Activity by repressing *rnlA* transcription. *Genetics*. 185:823-830 (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 大塚 裕一, 米崎 哲朗 大腸菌トキシン-アンチトキシンと T4 フェージ 第5回日本ゲノム微生物学会年会 2011年3月15日 東北学院大学土樋キャンパス(宮城)
- ② 大塚 裕一, 日比野 愛子, 米崎 哲朗 A plasmid, pOSAK1, in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 has a homologous set of K-12 Rn1A-Rn1B toxin-antitoxin module. BMB2010 (第33回日本分子

生物学会年会) 2010年12月9日 神戸ポートアイランド(兵庫)

- ③ 大塚 裕一, 米崎 哲朗 トキシン-アンチトキシンと T4 フェージ 大阪大学蛋白質研究所セミナー(バクテリオフェージ研究の可能性と課題) 2010年9月10日 大阪大学蛋白質研究所(大阪)
- ④ 大塚 裕一, 古賀光徳, 米崎 哲朗 A plasmid, pOSAK1, in Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 has a homologous set of K-12 Rn1A-Rn1B toxin-antitoxin module. *Molecular Genetics of Bacteria & phages*. 2010年8月26日 Cold Spring Harbor (NY USA)
- ⑤ 大塚 裕一, 他 An IscR regulates RNase LS activity by transcriptional repression of *rnlA* gene 第32回日本分子生物学会 2009年12月12日 パシフィコ横浜(神奈川)

[その他]

ホームページ等

<http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/~yonesaki/index2.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大塚 裕一 (OTSUKA YUICHI)

大阪大学大学院・理学研究科・助教

研究者番号：10548861

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：