

令和元年6月19日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07659

研究課題名(和文) Small RNAによるキチン分解利用遺伝子群の連動的発現制御ネットワークの解明

研究課題名(英文) Coordinated regulation of the expression network of genes encoding chitin-degradation and utilization system by small RNA

研究代表者

鈴木 一史 (SUZUKI, Kazushi)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：00444183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：Serratia marcescensのChiXはキチン分解酵素群とキチン分解産物の取り込み系の遺伝子発現を連動的に制御するsmall RNAである。ChiXは転写因子をコードするchiR mRNAとの塩基対形成によりその翻訳を抑制することでキチン分解酵素遺伝子の発現を抑制しているが、キチン分解産物のポリンをコードするchiPが発現するとChiXによるchiRの発現抑制が解除される。chiP mRNAはChiXのターミネーター前後まで及び領域との塩基対形成が可能であり、これによってChiXはchiR mRNAからchiP mRNAにターゲットを切り替えると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、細菌におけるsmall RNAが介する2遺伝子間の新たな制御機構が明らかになる。この研究成果は、近年注目されているsmall RNAの新たな機能の理解やキチン分解利用機構の解明に貢献するだけでなく、細菌の新たな生命現象の解明につながる。さらには、small RNAによる遺伝子発現制御を利用した代謝改変により、細菌による新たな物質生産方法の開発などの応用に役立つと考えられる。

研究成果の概要(英文)：ChiX is a small RNA that coordinately regulates the gene expression of chitin-degrading enzymes and the uptake system of chitin degradation products in Serratia marcescens. Although ChiX suppressed the expression of chitin-degrading enzyme genes by suppressing its translation by base pairing with chiR mRNA encoding transcriptional factor, the expression of chiP led to the derepression of chiR by ChiX. The chiP mRNA was capable of base pairing with the region extending before and after the terminator of ChiX, which suggested that ChiX switched the target from chiR mRNA to chiP mRNA.

研究分野：応用微生物学

キーワード：small RNA 遺伝子発現制御 キチナーゼ 細菌

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

#### (1)キチン分解細菌とキチン分解酵素キチナーゼに関する研究

キチンは、甲殻類、真菌、昆虫をはじめとした様々な生物に存在する *N*-アセチルグルコサミン (GlcNAc) のポリマーであり、セルロースに次いで地球上に豊富に存在するバイオマス資源である。我々は、キチン分解能に優れた細菌である *Bacillus circulans* や *Serratia marcescens* などによるキチン分解利用機構の解明を目的に研究を行ってきた。その結果、結晶性キチンの効率的分解に寄与するキチン分解酵素キチナーゼの特殊な機能 (キチン結合ドメイン、キチン鎖を捕らえた状態での連続的な分解など) 性質の異なる複数種のキチナーゼによるキチン分解の相乗効果、後に結晶性キチン鎖を切断することが明らかとなった新規キチン結合タンパク質 (CBP21) など、数多くの重要な研究成果を発表してきた。*S. marcescens* の研究ではキチン分解機構のみならずキチナーゼ発現調節機構の研究にも取り組み、3種すべてのキチナーゼ (ChiA, ChiB, ChiC) および CBP21 の発現には転写調節因子 ChiR が必須であり、さらに、ジ-*N*-アセチルキトビオース [(GlcNAc)<sub>2</sub>] の取り込みが関与していることを明らかにした。また新たにアンチセンス型の small RNA (sRNA) がこのキチナーゼ発現調節機構に関与していることを見出した。

#### (2) *S. marcescens* キチン分解利用系制御機構への small RNA の重要性

機能性小分子 RNA (small RNA, sRNA) は遺伝子の発現調節において重要な役割を果たしていることが明らかになっている。細菌における sRNA の多くはアンチセンス RNA であり、標的となる mRNA の 5' 非翻訳領域 (5' UTR) のリボソーム結合部位と 10~20 塩基程度の短い塩基対を形成し、翻訳を阻害する。大腸菌には数百の sRNA が存在しているといわれているが、全てが明らかになったわけではない。また、sRNA に小分子タンパク質がコードされている例など、今まで予想もなかった新たなメカニズムが明らかになりつつあり、細菌 sRNA は最先端の非常に重要な研究分野となっている。我々は sRNA が *S. marcescens* のキチン分解利用機構に関与していることを発見した。(GlcNAc)<sub>2</sub> およびキチンオリゴ糖のポリリンと予測される外膜タンパク質 ChiP の遺伝子において、リボソーム結合部位を含む 5' UTR の発現が、キチナーゼの発現に必要であることがわかった<sup>1)</sup>。さらに、*chiP* mRNA の 5' UTR には sRNA である ChiX との相補配列が存在し、ChiX による *chiP* および *chiR* の発現調節を実験的に明らかにした<sup>2)</sup>。よって、*chiR* 5' UTR に結合し翻訳を抑制していた ChiX が、*chiP* 5' UTR に結合することで、*chiR* の翻訳抑制が解除され、キチナーゼが発現したと考えられた (図 1)。つまり、キチナーゼの発現は ChiX を介した *chiP* の発現に連動していることが明らかとなってきた。細菌のキチナーゼ遺伝子の発現制御に関しては、*Vibrio* の研究がそのモデルとしてよく知られている<sup>3)</sup>。これまでは誘導物質 (キチン分解産物) と転写因子でモデルが構築されていたが、我々の研究から sRNA が関与して環境変化に迅速に対応できる機構が存在していることが明らかとなった。キチン分解酵素系の遺伝子発現制御は、以前考えられていたよりも複雑に連携し、巧妙なメカニズムによって制御されていることがわかってきた。

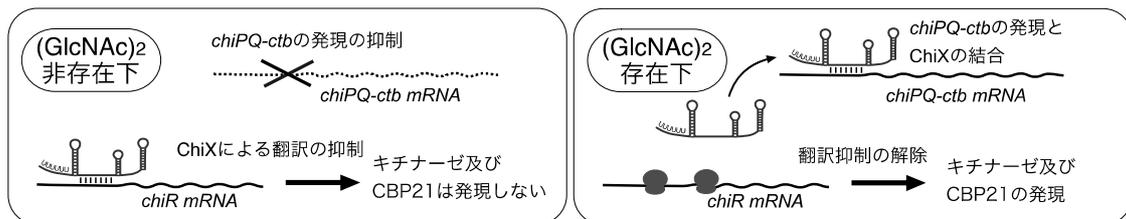


図 1 ChiX による *chiR* 発現抑制とその解除機構

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、細菌のキチン分解利用系 (キチン分解酵素およびキチン結合タンパク質の生産、分解産物の取り込み、分解産物の代謝) が、sRNA が中心となって連動して制御される新たな遺伝子発現調節機構を解明することである。菌体外酵素であるキチナーゼの発現調節は当初予測されていた機構よりも複雑かつ巧妙であり、*S. marcescens* において、キチン分解産物であるキチンオリゴ糖の取込みと分解に関わる遺伝子の発現が、sRNA を介し、キチナーゼの発現に必須な転写調節因子の発現に連動していることがわかってきた。さらに、当初予想されていたキチン分解産物である (GlcNAc)<sub>2</sub> の取込みによるキチナーゼ発現とは異なる機構の存在が示唆された。これらの現象のメカニズムを明らかにすることで、キチン分解利用系の新たな遺伝子発現調節機構の全体像を解明する。なお、*S. marcescens* の ChiX は、ほぼ同じ一本鎖領域で 2 種の mRNA へ結合し、一方の mRNA の発現が、他方の mRNA の翻訳制御に連動すると考えられる。このメカニズムの詳細とキチン分解~分解産物の取り込み~代謝の系が連動して発現するネットワークに着目した点が本研究の学術的な特色・独創的な点である。

### 3. 研究の方法

sRNA が関与して連動的に制御される新たなキチン分解利用系の制御機構の解明のため、以下の方法により研究を実施した。

#### (1) sRNA, ChiX による *chiP* および *chiR* の連動的な発現調節機構

ChiX と *chiP* および *chiR* mRNA との塩基対形成と翻訳制御：ChiX と *chiP* および *chiR* mRNA との塩基対形成を明らかにするため、ChiX 上の *chiP* および *chiR* との相補配列の塩基を置換した *chiX* をプラスミドにクローン化し、*chiX* 破壊株に導入した。塩基の置換は各種変異を導入したプライマーを用いた PCR により行った。各種変異 ChiX を発現した *chiX* 破壊株をコロイダルキチン含有寒天培地上で培養してコロイダルキチンのクリアゾーンの形成を調べた。また、キチナーゼや CBP21 の生産性は培養上清の SDS-PAGE とザイモグラムによって調べた。*chiR*・*chiP*・3種のキチナーゼや CBP21 遺伝子の発現は RT-PCR により調べた。

*chiP* 5' UTR 発現による *chiR* 抑制解除：*chiP* 5' UTR の ChiX との塩基対形成領域の塩基を置換した変異遺伝子を PCR により作製し、プラスミドにクローン化した。このプラスミドを野生株や *chiP* 5' UTR 破壊株に導入し、前述の方法を用いてキチナーゼや CBP21 の生産性を調べるとともに *chiR* 発現への影響を RT-PCR を用いて調べた。

ChiX, *chiP* 5' UTR, *chiR* 5' UTR の安定性および結合機構：大腸菌やサルモネラの ChiX は *chb* オペロン mRNA の遺伝子間領域に結合することで不安定化が生じ分解されるが、*S. marcescens* の ChiX にはそのような機構は存在しないため、*S. marcescens* ChiX による *chiP* および *chiR* の制御機構には新たなメカニズムが関与していると考えられた。すでに *chiP* mRNA の 5' UTR 領域がその下流領域よりも安定であることを見出し、この安定化が ChiX 捕捉によるものかどうかを RT-PCR を用いて調べた。さらに、ChiX, *chiP* 5' UTR, *chiR* 5' UTR それぞれの ChiX との相補配列に変異を導入した変異遺伝子を PCR により作製し、プラスミドにクローン化した。このプラスミドを *chiP* 5' UTR 破壊株に導入し、前述の方法を用いてキチナーゼ等の生産性を調べた。

(2) ChiX のターゲットの切替への Hfq の関与

ChiX と *chiP* 5' UTR の発現により ChiX のターゲットは *chiR* から *chiP* へ移行する。これには RNA シャペロンである Hfq が重要な役割を果たしていると考えられた。よって、この現象への Hfq の影響を確認するため、*S. marcescens* の *hfq* 遺伝子に抗生物質耐性遺伝子を導入することで *hfq* 破壊株構築を試みた。さらに、同じく *Serratia* 属の細菌である *S. plymuthica* でも *hfq* 破壊株構築を試みた。

(3) ChiR によるすべてのキチナーゼおよび CBP21 の発現調節機構

転写因子 ChiR がすべてのキチナーゼおよび CBP21 の発現に必須であることは明らかになっているが、ChiR がこれらの遺伝子の発現にどのように働いているかは明らかになっていない。過去に実施したゲルシフトアッセイの結果では、ChiR が *chiR*-*cbp* 間にのみ結合することが示され、ChiR が間接的にキチナーゼ遺伝子の発現に関与する可能性も考えられた。そこで、タンパク質の発現量を網羅的に解析できる iTRAQ を用いて野生株と *chiR* 欠損株のタンパク質の発現の比較を行った。

## 4. 研究成果

(1) ChiX と *chiP* および *chiR* mRNA との塩基対形成と翻訳制御

ChiX は 2 つのステムループ構造とターミネーターを含む 88 塩基からなる小分子 RNA であり、その一本鎖領域は *chiP* 及び *chiR* mRNA の SD 配列を含む領域と塩基対形成すると考えられた。また、*chiP* の塩基対形成領域は *chiR* よりも長く、ChiX のターミネーター領域まで及んでいると考えられた。そこで、ChiX が塩基対形成によって *chiP* 及び *chiR* の発現を抑制していることを確認するため、ChiX に塩基置換や削除を行った変異 ChiX をプラスミド上で発現させてその影響を調べた。その結果、*chiR* mRNA 相補配列以外の塩基を置換した場合はキチナーゼおよびキトビアーゼの発現を抑制し、ChiX の機能に大きな変化は認められなかったが、SD 配列との相補配列中の 1 塩基置換によってそれらの発現は抑制されず、ChiX は機能を失った。よって、ChiX は塩基対形成により *chiP* 及び *chiR* の発現を抑制していることが明らかとなった。

*chiR* はキチン分解酵素非誘導の条件下でも転写されているが、ChiX によって翻訳が抑制される。この抑制は、(GlcNAc)<sub>2</sub> の存在下で生じる *chiP* の発現によって解除される。*chiP* 5' UTR をプラスミド上で発現させた場合、キチン分解酵素非誘導の条件下でもキチン分解酵素群が発現したことから、発現した *chiP* 5' UTR と ChiX が塩基対形成することで ChiX による *chiR* の発現抑制が解除されると考えられた。さらに、*chiP* 及び *chiR* 5' UTR を含む領域をプラスミド上で発現させ、キチナーゼの生産性を確認した。*chiP* 5' UTR を発現させた場合、キチン分解酵素非誘導の条件下でもキチン分解酵素群が発現し、ChiX によるキチナーゼの発現抑制が解除されたのに対し、*chiR* 5' UTR の発現は ChiX によるキチナーゼの発現抑制を解除することができなかった。また、*chiPQ*-*ctb* mRNA の各領域を RT-PCR によって検出した結果、*chiP* 5' UTR の領域は安定化している可能性が示された。

*chiP* 5' UTR の高発現によって *chiR* とキチナーゼが発現したが、*chiR* 5' UTR をプラスミド上で発現させても染色体上の *chiR* とキチナーゼの発現が認められず、プラスミドから発現した *chiR* 5' UTR 自身も検出されなかった。しかし、*chiX* 欠損株においてプラスミド上で発現させた *chiR* 5' UTR を検出することができた。よって、この現象には ChiX との塩基対形成による *chiR* 5' UTR の不安定化が関与すると示唆された。

*chiP* のもつ長い相補配列と *chiR* のもつ短い相補配列を交換し、プラスミド上でそれぞれの変異 5' UTR を発現させ、キチナーゼ発現への影響を調べた。*chiP* 5' UTR 上の ChiX との相補配列を *chiR* 由来の短い相補配列に置換すると、キチナーゼ発現抑制は解除されなかった。一方、

*chiR* 5' UTR 上の ChiX との相補配列を *chiP* 由来の長い相補配列に置換すると、キチナーゼの発現抑制は解除された。このことから、ChiX による *chiR* の翻訳抑制の解除には *chiP* 5' UTR 上にある ChiX との長い相補配列が重要であることがわかった。

*chiP* mRNA 5' UTR 上に存在する ChiX との相補配列は ChiX のターミネーターを超えて 3' 末端側にも及んでいる可能性があった (図 2)。また、*chiP* mRNA 5' UTR は安定であるのに対し、*chiR* mRNA 5' UTR は不安定であることが確認されたが、*chiR* mRNA 5' UTR 上の相補配列を ChiX のターミネーター付近まで延長することによってキチナーゼ発現の抑制解除、すなわち ChiX のターゲットの切り替えが生じた。よって、ChiX のターゲットの切り替えはターゲットとなる mRNA の高い安定性によるものではなく、sRNA のターミネーター付近と mRNA との塩基対形成が重要であることが示唆された。sRNA のターミネーター付近には RNA シャペロンである Hfq が結合することから、このメカニズムに Hfq が関与していると考えられた。

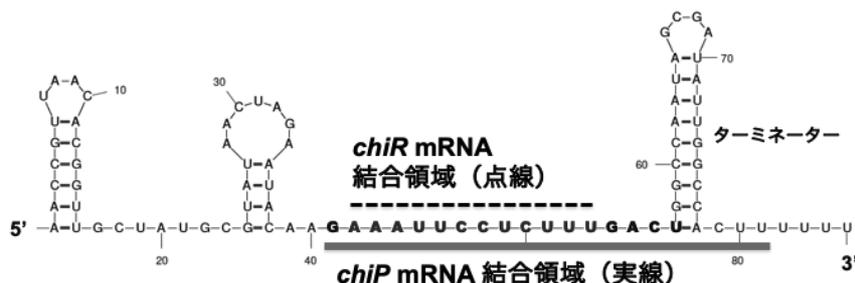


図 2 ChiX の二次構造と *chiR*, *chiP* mRNA との相補配列

## (2) ChiX のターゲットの切り替えへの Hfq の関与

ChiX のターゲットの切り替えに Hfq が関与するかを確かめるためには、*hfq* の欠損株の構築が必要である。そこで、*sacB* 遺伝子を利用した欠損変異株の作製方法により *S. marcescens* の *hfq* 欠損株構築を試みた。その結果、*hfq* 欠損株の構築はできたものの、生育が極端に悪く、今後の研究には使用できないと判断した。そこで、我々が淡水湖から分離した *Serratia* 属細菌である *S. plymuthica* が *S. marcescens* と同様のキチナーゼシステムを有し、*chiR* や *chiX* などのキチナーゼ遺伝子発現制御系も同じであることが判明したため、この細菌での *hfq* 欠損株構築を試みた。大腸菌の欠損株構築に利用される Wanner らの方法<sup>4)</sup>を用いたところ、*hfq* 欠損株構築に成功した。得られた欠損株の生育に大きな問題は認められなかった。今後、*S. plymuthica* を用いた ChiX の解析を進める予定である。

## (3) ChiR によるすべてのキチナーゼおよび CBP21 の発現調節機構

iTRAQ を用いて野生株と *chiR* 欠損株のタンパク質の発現の比較を行った結果、同定されたタンパク質のうち有意差のあるタンパク質は培養上清で 99、細胞質中で 94 であった。しかし、これまでの知見からは本来大きく変化が現れるはずのタンパク質にほとんど変化が見られないなどの検討すべき課題があることが明らかとなった。今後さらなる解析が必要であると考えられた。

## < 引用文献 >

- K. Suzuki, M. Shimizu, N. Sasaki, C. Ogawa, H. Minami, H. Sugimoto, T. Watanabe. (2016) Regulation of the chitin degradation and utilization system by the ChiX small RNA in *Serratia marcescens* 2170. Biosci. Biotechnol. Biochem. 80(2):376-385.
- T. Toratani, K. Suzuki, M. Shimizu, H. Sugimoto, T. Watanabe. (2012) Regulation of Chitinase Production by the 5' -Untranslated Region of the *ybfM* in *Serratia marcescens* 2170. Biosci. Biotechnol. Biochem. 76(10):1920-1924.
- X. Li, S. Roseman. (2004) The chitinolytic cascade in *Vibrios* is regulated by chitin oligosaccharides and a two-component chitin catabolic sensor/kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101(2):627-631.
- KA. Datsenko, BL. Wanner. (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 97(12):6640-6645.

## 5 . 主な発表論文等

### [学会発表](計9件)

Naoki Munakata, Kyoko Horii, Takuya Yamagishi, Yujo Kojia, Hayuki Sugimoto, Kazushi Suzuki. Small RNA ChiX and two target mRNAs coordinately control chitin degradation and utilization system in *Serratia marcescens*. KAAB International Symposium 2018. 2018年

Naoki Munakata, Kyoko Horii, Takuya Yamagisi, Yujo Kojima, Takeshi Watanabe, Hayuki Sugimoto, Kazushi Suzuki. Coordinated regulation of chitinase system by small RNA in *Serratia marcescens*. 14th International Chitin and Chitosan Conference (14th ICC) and the 12th Asia Pacific Chitin and Chitosan Symposium (12th APCCS). 2018年

宗像直輝, 堀井恭子, 山岸拓矢, 小嶋優常, 杉本華幸, 鈴木一史. 小分子 RNA ChiX による 2 種の標的 mRNA の翻訳制御. 第 20 回日本 RNA 学会年会. 2018 年

山岸拓矢, 堀井恭子, 宗像直輝, 南晴香, 杉本華幸, 渡邊剛志, 鈴木一史. 小分子 RNA ChiX を介した 2 種の mRNA の転写後調節. 日本農芸化学会 2018 年度大会. 2018 年

Takuya Yamagisi, Kyoko Horii, Naoki Munakata, Haruka Minami, Hayuki Sugimoto, Takeshi Watanabe, Kazushi Suzuki. Regulation of chitinase system by small RNA ChiX in *Serratia marcescens*. KAAB International Symposium 2017 Frontiers in Plant Science and Biotechnology. 2017 年

堀井恭子, 南晴香, 山岸拓矢, 宗像直輝, 杉本華幸, 渡邊剛志, 鈴木一史. 細菌の小分子 RNA によるキチン分解系とキチン分解産物取り込み系の制御機構. 第 31 回日本キチン・キトサン学会大会. 2017 年

堀井恭子, 宗像直輝, 山岸拓矢, 南晴香, 杉本華幸, 渡邊剛志, 鈴木一史. 2 種のターゲット mRNA による小分子 RNA ChiX の制御. 第 19 回日本 RNA 学会年会. 2017 年

Kazushi Suzuki, Hayuki Sugimoto, and Takeshi Watanabe. Regulation of chitin degradation and utilization system by small RNA in *Serratia marcescens*. 4th international symposium on biodiversity: bioactivites, agricultural and pharmaceutical applications. 2017 年

鈴木一史, 南晴香, 山岸拓矢, 小川知佐奈, 佐々木直美, 杉本華幸, 渡邊剛志. *Serratia marcescens* における small RNA・ChiX によるキチナーゼ発現抑制とその解除. 第 30 回日本キチン・キトサン学会大会. 2016 年

〔その他〕

ホームページ等

新潟大学農学部 応用微生物学研究室ホームページ

<http://www.agr.niigata-u.ac.jp/~ksuzuki/ApplMicro/Welcome.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

なし

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：渡邊 剛志

ローマ字氏名：(WATANABE, takeshi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。