

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2005～2008

課題番号：17207010

研究課題名（和文） 代謝制御におけるRNAの新たな役割

研究課題名（英文） New roles of RNAs in metabolic regulation

研究代表者

饗場 弘二 (AIBA HIROJI)

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：20025662

研究成果の概要：

大腸菌 tmRNA とリボソームによる翻訳と mRNA 分解制御について解析し、翻訳途上のリボソームが停滞した際に mRNA の切断を誘起し、tmRNA 系と連動して mRNA とタンパク質の双方を分解するというより巧妙な品質管理機構として働いていることを明らかにした。具体的には、翻訳終結因子 RF の活性低下、連続するレアコドンを持つ mRNA の翻訳、あるいはアミノ酸枯渇により生じるリボソームの停滞に反応していずれの場合にも mRNA が切断されることを見だし、翻訳伸長の遅延あるいは停滞による mRNA の切断と分解が普遍的な機構であることを示した。また、グルコース-6-リン酸の異常な蓄積により合成が誘導され、*ptsG* mRNA を標的としている Hfq 結合性小分子 RNA (sRNA) である SgrS による翻訳抑制と mRNA の分解について解析し、SgrS が、*ptsG* mRNA の翻訳開始領域と部分的な塩基対を形成し、RNase E に依存した mRNA の不安定化をもたらすこと、SgrS が Hfq を介して RNase E と相互作用すること、SgrS による *ptsG* mRNA の抑制機構において、*ptsG* mRNA の翻訳阻害が第一義的であること、Hfq が SgrS と *ptsG* mRNA の塩基対形成を促進すること、さらには、*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た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	14,700,000	4,410,000	19,110,000
2006年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2007年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2008年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
総計	39,000,000	11,700,000	50,700,000

研究分野：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：small RNA、翻訳制御、mRNA 分解、Hfq、塩基対形成、グルコース応答、代謝ストレス、tmRNA

1. 研究開始当初の背景

大腸菌におけるグルコース応答はオペロン説や遺伝子発現の正の制御機構の確立の契

機となった歴史を持つが、グルコース応答自体の分子機構、グルコース代謝・解糖系が及ぼす細胞活性への影響についての近代的な

研究は見過ごされてきた。代謝ネットワークの中心にあるグルコース代謝は遺伝子発現調節に深くリンクしており新たな概念を生み出す可能性を持つ研究課題であり、研究の大きな展開が期待できた。一方、本研究課題開始時には、RNAi や miRNA に象徴されるように、RNA の多様な機能と mRNA 分解や翻訳の制御に注目した研究が大きく展開しており、バクテリアにおいても、一連の低分子 RNA が、Hfq とともに、翻訳や mRNA の分解の制御に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつあった。しかしながら、大多数の noncoding RNA の機能、標的はまだ不明であり、これらの RNA は標的 mRNA と塩基対を形成することにより、その作用を發揮していると考えられているがその機構も解明されていなかった。これらの研究は、真核生物における miRNA の作用機構の解明にも繋がる重要課題で、外国のいくつかの有力研究グループが活発な研究を進めていた。また、tmRNA の生理機能についても、世界的にいくつかの研究グループが研究をすすめていたが、翻訳途上のリボソームの停滞にตอบสนองした mRNA の切断についての解析ははじまっただけであった。

2. 研究の目的

申請者は大腸菌において解糖系の阻害がグルコーストランスポーター mRNA の分解を促進することを発見し、その分子機構の研究をすすめている。この mRNA の分解には RNA シャペロン Hfq と noncoding small RNA が関与していることが明らかになってきた。申請者はまた、small RNA の 1 つである tmRNA の生理機能について、トランス翻訳が代謝制御や mRNA サーベイランス機能に関与していることなどを明らかにしてきた。これらの経緯を踏まえて、代謝制御における noncoding small RNAs の機能を mRNA 分解と翻訳制御に焦点を当て明らかにする。具体的には、第 1 にグルコーストランスポーターの新規転写後制御機構を、Hfq と SgrS の役割を中心に解明する。第 2 に、tmRNA とリボソームの遺伝子発現の制御における役割をアミノ酸合成系およびアミノ酸分解系の遺伝子に焦点をあて解明する。第 3 に、多数の機能不明の noncoding small RNAs の欠失および過剰生産株を構築しそれらの機能を解析する基盤をつくる。

3. 研究の方法

(1) small RNA/Hfq による標的遺伝子の翻訳阻害と mRNA の分解促進機構の解析

① SgrS RNA の発現が *ptsG* mRNA の分解に十分であるかどうかを検討するために、SgrS RNA を強制発現させたときの *ptsG* mRNA の分解を調べる。

② SgrS RNA または *ptsG* mRNA の双方に塩基対を不安定化または安定化する変異を導入し *ptsG* mRNA の翻訳と分解に及ぼす変異の影響を解析する。また、それらの相補的変異の影響も解析する。

③ SgrS RNA の作用における Hfq の役割を解明するために、変異 *hfq* を取得し、in vivo および in vitro でそれらの性質を解析する。

④ RNase E の C 末端領域欠損または *enolase* の枯渇が *ptsG* mRNA の分解促進を抑圧することを発見しているため、この条件下での *ptsG* mRNA の翻訳を解析すること、また、翻訳能が変化した変異 *ptsG* を構築、解析することで、SgrS RNA/Hfq による *ptsG* mRNA の不安定化と翻訳阻害の関係を明らかにする。

⑤ *ptsG* mRNA の細胞膜近傍への局在性と SgrS RNA 作用の関係を検証する。

⑥ degradosome 形成に欠陥がある *enolase* の変異を取得、解析することにより *ptsG* mRNA の分解制御における *enolase* の役割を解明する。

(2) tmRNA とリボソームによる翻訳と mRNA 分解制御

① トリプトファン分解系の遺伝子 *tnaA* の上流にはリーダーペプチドをコードする *tnaL* がありトリプトファン濃度に応答したリボソームの停滞が *tnaA* の発現を誘導することが知られている。*tnaA-tnaL* 系でリボソームの停滞が mRNA の切断とトランス翻訳を誘起するかどうかを RNA 解析を中心とした生化学的実験により検証する。

② *tnaA-tnaL* 系での mRNA の切断とトランス翻訳が *tnaA* の発現制御にどのように関与しているかをリボソームの停滞が起こらなくなった変異体を構築して解析する。

③ リボソームの停滞は翻訳終結因子 (RF) の作用を阻害することで新生ペプチドの配列にかかわらず起こると予想できる。そこで、

RF の変異や過剰生産がトランス翻訳および mRNA の切断に及ぼす影響を解析する。

④ SecM の翻訳アレスト配列における翻訳伸長の阻害（リボソームの停滞）が mRNA の切断とトランス翻訳を誘起することをモデルタンパク質にアレスト配列を付加した遺伝子で観察しているため、実際の *secM-secA* mRNA でも同様の機構が働いているかどうかを調べる。

⑤ SecM の翻訳アレスト配列を操作してアレストが解除される変異を構築し、*secM* mRNA の切断とトランス翻訳が下流遺伝子 *secA* の発現に及ぼす影響を解析する。

⑥ 翻訳伸長阻害は、連続するレアコドンによっても起こることが予想される。そこで、特に、使用頻度の少ないいくつかのコードン（AGA や AUA）に着目して、連続するレアコードンにおいて mRNA の切断が起こるかどうかを調べる。

⑦ 翻訳伸長阻害は、アミノ酸飢餓や翻訳過程に作用する一連の抗生物質の存在下でより一般的に生じると考えられるので、これらの条件下で、mRNA の切断の可能性を調べる。

4. 研究成果

(1) small RNA/Hfq による標的遺伝子の翻訳阻害と mRNA の分解促進機構の解析

① 解糖系酵素の変異が RNase E に依存して *ptsG* の mRNA の分解を促進することを発見した。

② RNase E の C 末端領域の欠失または *degradosome* の構成因子である *enolase* の枯渇が *ptsG* mRNA の分解を抑圧することを発見した。

③ *ptsG* mRNA の発現抑制には RNA シャペロン Hfq と SgrS RNA が関与していること、SgrS が *ptsG* mRNA に効果的に作用するためには新生ペプチドの膜挿入能が必要であることなどを明らかにした。

④ SgrS は特異的な SgrS/Hfq/RNase E 複合体の形成を通して標的である *ptsG* mRNA に作用していることを発見した。

⑤ SgrS による *ptsG* mRNA の抑制においては mRNA の翻訳阻害が第一義的であることを証明した。

⑥ 鉄イオン枯渇時において合成が誘導され、*sodB* mRNA の発現抑制に関与している RyhB

も Hfq を介して RNase E と相互作用し、*sodB* mRNA の翻訳阻害と mRNA の分解促進を誘起すること、翻訳阻害が第一義的であることを明らかにした。

⑦ リボソーム結合部位付近の約 6 塩基対が SgrS による *ptsG* mRNA の制御に必須であること、また、*in vitro* で Hfq が複合体形成を促進することを明らかにした。

⑧ 精製した *ptsG* mRNA、SgrS RNA および Hfq を用いて *in vitro* (PURESYSTEM) で SgrS/Hfq による *ptsG* mRNA の翻訳抑制の再構成に成功した。また、このシステムを利用して、塩基対形成自体が究極的に翻訳抑制の要因であることを明らかにした。

(2) tmRNA とリボソームによる翻訳と mRNA 分解制御

① 細胞内でトランス翻訳が頻繁に起こっていること、さらに、tmRNA 系の内在性標的の 1 つが Lac リプレッサー (LacI) mRNA であることを発見した。

② サプレッサー-tRNA や一群の抗生物質による終止コードンのリードスルーがトランス翻訳を増大させ、tmRNA 系がこのトラブルの解消に関与していることを発見した。

③ mRNA 上の正常な終止コードンが、新生ペプチドの C 末端のアミノ酸配列に依存してトランス翻訳の標的になることを発見した。

④ tmRNA 系が欠陥 mRNA の分解を促進することにより欠陥ペプチドの合成そのものを抑制するという、より巧妙な品質管理機構として働いていることを発見した。

⑤ 特定のアミノ酸配列に依存して起こる終止コードンにおけるトランス翻訳は、終止コードンでリボソームの停滞が生じ、mRNA の切断が誘起され nonstop mRNA が生成される結果であることを発見した。

⑥ mRNA の切断と tmRNA の作用は、翻訳伸長中のリボソームの停滞が生じた際にも起こることを発見し、リボソームと tmRNA 系が共同して働く mRNA の品質管理機構を提唱した。

⑦ 連続するレアコードンにおけるトランス翻訳は、レアコードンでリボソームの停滞が生じ、mRNA の切断が誘起され nonstop mRNA が生成される結果であることを発見した。

⑧ RF の活性または発現量の低下による終止コドンでのリボソームの停滞が mRNA の切断を誘起し、したがってトランス翻訳の標的を産生することを発見した。

⑨ アミノ酸飢餓条件下で mRNA の切断とトランス翻訳が起こること、セリン飢餓における mRNA の切断部位は serine codon に対応することを発見し、tmRNA とリボソームによる品質管理機構は生理的ストレス条件下でも重要な役割を果たしていることを明らかにした。

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 22 件)

- ① Morita, T., Maki, K., Yagi, M. and Aiba, H. (2008) Analyses of mRNA destabilization and translational inhibition mediated by Hfq-binding small RNAs. *Methods Enzymol.* 447, 359-378.
- ② Maki, K., Uno, K., Morita, T., and Aiba, H. (2008) RNA but not protein partners are directly responsible for translational silencing by a bacterial Hfq-binding small RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 10332-10337.
- ③ Li, X., Yagi, M, T., Morita, T., and Aiba, H. (2008) Cleavage of mRNAs and role of tmRNA system under amino acid starvation in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 68, 462-473.
- ④ Morita, T., and Aiba, H. (2007) Small RNAs making a small protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104, 20149-20150.
- ⑤ Aiba, H. (2007) Mechanism of RNA silencing by Hfq-binding small RNAs. *Curr. Opin. Microbiol.* 10, 134-139.
- ⑥ Li, X., Yokota, T., Ito, K., Nakamura, Y., and Aiba, H. (2007) Reduced action of polypeptide release factors induces mRNA cleavage and tmRNA tagging at stop codons in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 63, 116-126.
- ⑦ 森田鉄兵、饗場弘二: 大腸菌低分子 RNA による遺伝子発現抑制機構. 化学と生物 45: 298-300, 2007.
- ⑧ Kawamoto, H., Koide, Y., Morita, T., and Aiba, H. (2006) Base-pairing requirement for RNA silencing by a bacterial small RNA and acceleration of duplex formation by Hfq. *Mol. Microbiol.* 61, 1013-1022.
- ⑨ Becker, A. K., Zeppenfeld, T., Staab, A., Seitz, S., Boos, W., Morita T., Aiba, H., Mahr, K., Titgemeyer, F., and Jahreis, K. (2006) YeeI, a novel protein involved in modulation of the activity of the glucose-phosphotransferase system in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 188, 5439-49.
- ⑩ Morita, T., Mochizuki, Y., and Aiba, H. (2006) Translational repression is sufficient for gene silencing by bacterial small non-coding RNAs in the absence of mRNA destruction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 4858-4863.
- ⑪ Li, X., Hirano, R., Tagami, H., and Aiba, H. (2006) Protein tagging at rare codons is caused by tmRNA action at the 3' end of nonstop mRNA generated in response to ribosome stalling. *RNA* 12, 248-255.
- ⑫ 森田鉄兵、饗場弘二: 大腸菌 small RNA による RNA サイレンシングの分子機構. 蛋白質 核酸 酵素 51: 2478-2483, 2006.
- ⑬ Morita, T., Maki, K., and Aiba, H. (2005) RNase E-based ribonucleoprotein complexes: mechanical basis of mRNA destabilization mediated by bacterial noncoding RNAs. *Genes Dev.* 19, 2176-86.
- ⑭ Inada, T and Aiba, H. (2005) Translation of aberrant mRNAs lacking a termination codon or with a shortened 3'-UTR is repressed after initiation in yeast. *EMBO J.* 24, 1584-95.
- ⑮ Kawamoto, H., Morita, T., Shimizu, A., Inada, T. and Aiba, H. (2005) Implication of membrane localization of target mRNA in the action of a small RNA: mechanism of post-transcriptional regulation of glucose transporter in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 19, 328-338.
- ⑯ 森田鉄兵、饗場弘二: グルコース応答と代謝制御ネットワークの新しい世界. 化学と生物 43: 222-228, 2005.

[学会発表] (計 50 件)

- ① Aiba, H. Mechanism and role of mRNA degradation mediated by Hfq-binding small RNAs in *E. coli*. JSPS-DST Asian Academic Seminar, Genome Regulation: From Nanobiology to Pathogenesis, December 26-30, 2008, Bangalore, India.
- ② Aiba, H. Mechanism and role of mRNA degradation mediated by Hfq-binding small RNAs in *E. coli*. FASEB Summer Research Conferences: Post-Transcriptional Control of Gene Expression: Mechanisms of mRNA Decay, September 13-19, 2008, Lucca, Italy.
- ③ Aiba, H. Mechanism of gene silencing mediated by Hfq-binding small RNAs in

- Escherichia coli*. Lecture in Cinvestav, Mexico. November 22, 2007.
- ④ Aiba, H. Mechanism of RNA silencing mediated by Hfq-binding small RNAs in *Escherichia coli*. 2007 International Meeting of the Microbiological Society of Korea, May 10-11, 2007, PyeongChang, Korea.
- ⑤ Aiba, H. Mechanism of RNA silencing mediated by Hfq-binding small RNAs in *Escherichia coli*. 2007 Mini-Symposium "Stimuli-Responsive Regulation of Gene Expression in Bacteria", May 9, 2007, Seoul National University, Korea.
- ⑥ Aiba, H. Mechanism of RNA silencing mediated by Hfq-binding small RNAs in *Escherichia coli*. VAAM2007, April 1-4, 2007, Osnabruek, Germany.
- ⑦ Aiba, H. Mechanisms of RNA silencing mediated by a stress-induced Hfq-binding small RNA, SgrS, in *E. coli*. EMBO Conference, October 19-23, 2006, Heidelberg, Germany.
- ⑧ Aiba, H. Regulation of translation and mRNA stability by ribonucleoprotein complexes consisting of small RNA, Hfq, and RNase E. Workshop "Regulation of Gene Expression in Bacterial and Biodegradation of Contaminants in the Environment", October 9-11, 2006, Baeza, Spain.
- ⑨ Aiba, H. Regulation of translation and mRNA stability by bacterial sRNP consisting of a small non-coding RNA, Hfq, and RNase E. CNRS-IBMC seminar, May 11, Strasbourg, France.
- ⑩ Aiba, H. Regulation of translation and mRNA stability by bacterial sRNP consisting of a small non-coding RNA, Hfq, and RNase E. CNRS Conference Jacques Monod, May 3-7, 2006, Roscoff, France.
- ⑪ Aiba, H. Regulation of translation and mRNA stability by bacterial RISC consisting of non-coding RNA, Hfq, and RNase E. 9th ACT, December 12-15, 2005, Zhunan, Taiwan.
- ⑫ Aiba, H. Regulation of translation and mRNA stability by bacterial RISC consisting of non-coding RNA, Hfq, and RNase E. IBPC seminar, November 10, 2005, Paris, France.
- ⑬ Aiba, H. Regulation of translation and mRNA stability by bacterial RISC consisting of non-coding RNA, Hfq, and RNase E. ICM seminar, Uppsala University, November 7, 2005, Uppsala, Sweden.
- ⑭ Aiba, H. Regulation of translation and mRNA stability by bacterial non-coding RNAs under stress conditions. Spatiotemporal Network of RNA Information Flow International Symposium 2005, August 8, 2005, Hiroaki.
- ⑮ Aiba, H. Glucose Metabolism and Hfq/Small RNA-Mediated Post-Transcriptional Gene Regulation. 105th ASM: Regulating RNA stability, June 5-9, 2005, Atlanta, USA.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

饗場 弘二 (AIBA HIROJI)

名古屋大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：20025662