

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：32612

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2017～2021

課題番号：17KK0146

研究課題名（和文）細菌型sRNAにおけるHfq結合領域の構造原理の解明

研究課題名（英文）Structural basis of functional Hfq-binding region of bacterial sRNA

研究代表者

森田 鉄兵（MORITA, Teppei）

慶應義塾大学・政策・メディア研究科（藤沢）・特任講師

研究者番号：10444366

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,100,000円

渡航期間： 7ヶ月

研究成果の概要（和文）：sRNAの機能構造や合成機構の原理の解明を目的として、sRNAの転写終結の解析や転写終結を制御する遺伝因子の探索を行った。sRNAの1つであるSgrSの転写終結を用いたスクリーニングにより、sRNAの転写終結やその制御系を破綻させる新規因子を同定した。これにより、sRNAの転写終結がsRNA制御系の新たな調節階層であるという概念を提示する。さらに、新規因子の1つであるCspDの過剰発現下で、転写伸長制御エレメント（リボスイッチ等）が一手に破綻するという現象をRNA-Seqにより捉えた。これにより、sRNAの合成制御に加え、CspDによる転写伸長制御のゲノムレベルでの役割が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年のRNA-Seq技術の発展に伴い、細菌では、これまで考えられていたよりも頻繁に転写の伸長や終結がコントロールされており、細菌生理に関与する事例が報告されているが、転写伸長・終結の制御の分子機構は不明である。本研究において新規に同定した転写終結の抑制機能を持つ遺伝因子は、転写伸長・終結の制御機構の解明の一助となるものである。さらに、これらの因子を応用することで、病原性やバイオフィームといった細菌生理の新たな制御技術の開発が期待できる。

研究成果の概要（英文）：This project focuses on structural features of the 3' end of bacterial sRNA and the mechanism of sRNA production via transcription termination. We investigated the termination efficiencies of some sRNAs and carried out a multicopy plasmid screen in *E. coli* to look for genetic factors by which the termination of sRNAs could be modulated. We identified novel factors that attenuate the termination of SgrS sRNA. Biochemical analyses showed effects of each factor on both the termination of sRNAs and the regulation by SgrS of the target mRNAs. These results confirm changes in the efficiency of intrinsic termination as an additional layer of the regulation of sRNA signaling. In addition, RNA-Seq analysis found global effects of CspD, which is one of the isolated factors, on transcription across some regulatory termination sites, such as Riboswitches. This suggests that CspD plays a global regulator in transcription elongation/termination.

研究分野：分子生物学

キーワード：小分子RNA 遺伝子発現 転写終結 Hfq 細菌 低温ショックタンパク質 Rho

1. 研究開始当初の背景

塩基対を介した小分子 RNA (sRNA) による mRNA の発現制御は、細菌からヒトに至る幅広い生物に存在する。細菌では、sRNA 制御は、病原性やバイオフィームなどの細菌生理に関与する。sRNA は、環境に応じて転写因子により個別に転写開始が誘導され、一群の標的 mRNA を主に抑制する。sRNA / 標的 mRNA 間の塩基対形成は、RNA シャペロンタンパク質である Hfq により促進作用を受ける。そのため、sRNA 制御の分子機構の理解には、Hfq と sRNA 及び標的 mRNA の結合様式や、Hfq による塩基対形成の促進作用の解明が重要である。

我々は、大腸菌の sRNA の 1 つである SgrS を用いた解析により、SgrS の 3' 末端領域が Hfq の機能的結合領域であることを明らかにした (1)。この領域の転写終結シグナル (intrinsic terminator) としての機能を踏まえ研究を進め、適切な位置での転写終結が、SgrS の Hfq との結合に必要であることを明らかにした (2, 3)。さらに、培養条件に応じて、転写終結の効率が変化するという現象を観察した (2)。以上を総合して、転写終結率の変化による新たな sRNA 合成制御のモデルを提唱した。SgrS を含めた sRNA の転写の終結は、他の転写と同様に、塩基配列依存的に起こる intrinsic termination を反応機構とする。大腸菌で見ついている他の sRNA の機能発現における転写終結の役割は未解析であり、intrinsic termination の制御はほとんど知られていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、sRNA の転写終結の解析や、転写終結を制御する遺伝因子の探索を通して、我々のモデルを細菌における Hfq 結合性 sRNA 全般で検証し、sRNA の機能構造や合成機構の原理を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

sRNA の転写終結率を解析するために、転写終結をモニターする独自のレポーター遺伝子 (sRNA-rplLT) を構築した。転写終結の制御因子の探索では、SgrS の転写終結領域の下流に lacZ 遺伝子を融合した遺伝子 (sgrS-setA-lacZ) を持つレポーター大腸菌株を構築した。大腸菌ゲノム DNA の断片をランダムに取り込んだプラスミドライブラリーを用いてレポーター大腸菌株を形質転換させ、MacConkey lactose プレート上で、SgrS の転写終結を抑制する DNA 断片を選抜した。sRNA 転写終結に対する抑制機能を明らかにするために、同定した遺伝因子の過剰発現下で、転写終結に及ぼす影響や mRNA 抑制機能を生化学的実験により解析した。また、それらの因子が及ぼすゲノムレベルでの影響を調べるため、RNA-Seq 解析を行った。

4. 研究成果

lacZ 遺伝子の発現は、MacConkey lactose プレート上で形成されるコロニーの色で確認することが可能である。レポーター大腸菌株が MacConkey lactose プレート上で薄赤色を示したことから、このプレート上では、SgrS の転写終結領域が部分的に読み飛ばされていることが示唆された。一方、プラスミドライブラリーで形質転換した株 (約 7 万コロニー) の中には、濃赤色のコロニーを形成するものが存在した。これらの株では、SgrS の転写終結領域の顕著な読み飛ばしが示唆された。プラスミドを抽出し、シークエンス解析により DNA 断片を確認した結果、DNA 断片は主に 4 つのグループに分類された。各々に共通する領域から候補となる遺伝因子を推定し、それらの遺伝因子の SgrS 転写終結に及ぼす作用を、単独でクローン化したプラスミド DNA を用いて確認した。その結果、3 つのタンパク質をコードする遺伝子 (cspD、rof、ygiH) と 1 つの sRNA をコードする遺伝子 (cyaR) を、SgrS 転写終結を抑制する遺伝子として新規に同定した。CspD は、核酸結合ドメインである CSD (Cold shock domain) を持つタンパク質であり、*in vitro* において、RNA や一本鎖 DNA との結合及びプラスミド DNA の複製阻害が示されていたが (4)、細胞内での機能は不明であった。Rof は、Rho 因子の阻害活性を持つ (5)。Rho は、Intrinsic termination (Factor-independent) とは異なる機構 (Factor-dependent) で転写終結を引き起こす因子である。YgiH は、putative tRNA 結合タンパク質として知られているが (6)、細胞内での機能は不明であった。CyaR sRNA は、CRP-cAMP 依存的に発現が制御される Hfq 依存型 sRNA である (7)。

3 つのタンパク質因子について、SgrS の転写終結に及ぼす影響を、sgrS-S-rplLT レポーター遺伝子を用いて解析した。このレポーター遺伝子では、ノーザンプロットングにより、転写終結産物 (SgrS-S) とリードスルー産物 (RT) を同時検出することが可能である。Hfq は、SgrS に結合する一方で RT には結合しないため、hfq+ 株ではこれらの RNA の安定性が異なる。そのため、解析には hfq 変異株を用いた。解析の結果、ベクターコントロールでは、48% の RT が検出された一方、CspD 及び YgiH の過剰発現株では、75% 及び 65% の RT が検出された。このことから、CspD 及び YgiH が SgrS の転写終結を抑制することが明らかになった。Rof 過剰発現株では、通常よりさらに長い RT が多数検出された。このことから、Rof は、SgrS の転写終結を含め、sgrS-S-rplLT の転写に幅広く影響を及ぼすことが示唆された。同様に、CyaR、GcvB、GlnZ、DsrA などのよく研究されている sRNA に対してレポーター遺伝子を構築し、CspD、YgiH、及び Rof の影響を解析した。その結果、全ての sRNA で、SgrS と同様に、これらの因子による転写終結への影響が確認された。また、個々の sRNA の転写終結効率や CspD や YgiH による影響

の大きさは、sRNA によって異なっていた。CyaR では、コントロール (RT : 41%) に対して、CspD (RT : 51%)、YgjH (RT : 51%)、GcvB では、コントロール (RT : 5%) に対して、CspD (RT : 30%)、YgjH (RT : 12%)、GlnZ では、コントロール (RT : 65%) に対して、CspD (RT : 89%)、YgjH (RT : 74%)、DsrA では、コントロール (RT : 5%) に対して、CspD (RT : 15%)、YgjH (RT : 16%) であった。これらの違いが生じる原因の解明は、今後の課題である。

CspD、YgjH、及び Rof は sRNA の転写終結を抑制するため、sRNA 制御系への影響が考えられた。そこで次に、SgrS の標的 mRNA である *ptsG* mRNA、*yigL* mRNA を解析した。*ptsG* mRNA は SgrS により抑制され、*yigL* mRNA は SgrS により活性化される (8)。CspD 過剰発現下では、*ptsG* mRNA の抑制、及び *yigL* mRNA の活性化が共に破綻することを明らかにした。Rof 過剰発現下では、*ptsG* mRNA の抑制の破綻が確認された一方、*yigL* mRNA に対してはそれ自体の発現に影響があったため評価はできなかった。YgjH 過剰発現下では、*ptsG* mRNA の抑制、及び *yigL* mRNA の活性化に対して、有意な差は認められなかった。これは、YgjH による SgrS の転写終結への影響が、他の因子に比べて弱かったためだと考えられる。

ここまでの結果から、CspD はもっとも強く sRNA の転写終結を抑制し、また SgrS の制御系を破綻させた。CspD は核酸結合ドメインを持ち、*in vitro* で RNA への結合が示されていたため、FLAG タグを付加した CspD-FLAG を用いて *in vivo* 共沈実験を行った。その結果、CspD と SgrS-S やその RT との結合が明らかになった。また、転写阻害剤であるリファンピシンを用いた解析により、CspD が SgrS-S や RT を安定化させることを明らかにした。これらの結果から、転写途上の RNA に CspD が結合し転写終結を抑制するとともに、その転写産物を安定化するという分子機構が示唆された。さらに、CspD の作用をゲノムレベルで明らかにすることを目的として、RNA-Seq 解析を行った。その結果、転写伸長・終結の制御エレメント (Riboswitch など) が、CspD の過剰発現下で一手に破綻することが明らかになった。また、制御エレメントの下流領域の転写産物量が増加していたため、SgrS と同様に、CspD により安定化されていることが示唆された。以上より、CspD は、sRNA の生合成に加えて、様々な転写伸長制御を司るタンパク質因子であることが明らかになった。

Rof に関して、Rof が標的とする Rho は、Intrinsic termination とは異なる機構で転写終結を引き起こすが、Intrinsic termination の効率に及ぼす影響は未解析であった。本研究では、Rof 発現誘導後の経時変化や、Rho の阻害剤である BCM を用いた解析により、Rof が、Rho の阻害を介して SgrS の Intrinsic termination を抑制することを確認した。この結果は、2 つに大別されていた転写終結機構の境目をあいまいにするものであり、転写終結全般に渡る Rho の新たな役割が示唆された。

探索で単離された CyaR sRNA に関して、CyaR による *sgrS-setA-lacZ* の発現上昇には、Hfq、及び CyaR の標的 mRNA との塩基対形成領域 (7) が必要であることを明らかにした。したがって、CyaR による転写終結制御は、標的 mRNA の発現制御を介したものであり、CyaR の標的 mRNA の発現制御を介した転写伸長・終結の調節による sRNA 合成制御という、新たなフィードバック機構が示唆された。転写終結制御に関与する CyaR の標的 mRNA の同定は、今後の課題である。

以上の成果は、論文として現在投稿中である (9)。

< 引用文献 >

- (1) Otaka, et al. 2011. Proc. Natl. Acad. Sci., 108:13059-64.
- (2) Morita, et al. 2015. RNA, 21: 1490-501.
- (3) Morita, et al. 2017. RNA, 23: 1419-1431.
- (4) Yamanaka, et al. 2001. Mol. Microbiol., 39: 1572-84.
- (5) Pichoff, et al. 1998. Mol. Microbiol., 29:859-69.
- (6) Swairjo, et al. 2000. EMBO J., 19:6287-98.
- (7) De Lay & Gottesman. 2009. J. Bacteriol., 191:461-76
- (8) Bobrovskyy, et al. 2019. Mol Microbiol., 112:1199-1218
- (9) T. Morita, N. Majdalani, MC. Miura, T. Ohsima, M. Tomita, A. Kanai & S. Gottesman, submitted

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Chen Jiandong, Morita Teppei, Gottesman Susan	4. 巻 9
2. 論文標題 Regulation of Transcription Termination of Small RNAs and by Small RNAs: Molecular Mechanisms and Biological Functions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2019.00201	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 3件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Teppei Morita, Nadim Majdalani, Masahiro C. Miura, Taku Oshima, Akio Kanai & Susan Gottesman
2. 発表標題 Attenuator of transcriptional termination involved in production of small regulatory RNAs in Escherichia coli
3. 学会等名 第22回 日本RNA学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森田鉄兵
2. 発表標題 細菌小分子RNAの特性と制御機構
3. 学会等名 第33回 微生物シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Teppei Morita, Nadim Majdalani, Masahiro C. Miura, Taku Oshima, Akio Kanai & Susan Gottesman
2. 発表標題 Isolation of factors affecting readthrough at an sRNA rho-independent terminator
3. 学会等名 World Microbe Forum (ASM & FEMS) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Teppei Morita, Nadim Majdalani, Masahiro C. Miura, Taku Oshima, Akio Kanai & Susan Gottesman
2. 発表標題 Attenuators of transcription termination involved in sRNA signaling in Escherichia coli
3. 学会等名 Microbes & RNA 2022 (6th meeting on Regulating with RNA in bacteria and Archaea) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森田 鉄兵
2. 発表標題 オミクス研究が明かす多階層での遺伝子発現の制御様式
3. 学会等名 第94回 日本感染症学会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田鉄兵
2. 発表標題 The Role of transcription termination in sRNA biogenesis
3. 学会等名 第93回 日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 森田 鉄兵、Nadim Majdalani, Susan Gottesman
2. 発表標題 Screening for factors affecting read-through at an sRNA rho independent terminator
3. 学会等名 第21回 RNA学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Teppei Morita, Nadim Majdalani, Susan Gottesman
2. 発表標題 Screening for factors affecting read-through at an sRNA rho independent terminator
3. 学会等名 the Gordon Research Conference on Mechanisms of Microbial transcription (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Teppei Morita, Nadim Majdalani & Susan Gottesman
2. 発表標題 Screening for factors affecting read-through at sRNA rho-independent terminator
3. 学会等名 第13回ゲノム微生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ゴッテスマン スーザン (GOTTESMAN Susan)	NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH・National Cancer Institute・Chief, Laboratory of Molecular Biology	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計1件

国際研究集会 The 1308th INFRONT seminar	開催年 2019年～2019年
--------------------------------------	--------------------

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------