

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18570160

研究課題名（和文） mRNA エンドヌクレアーゼの性状と活性調節

研究課題名（英文） Properties and regulation of mRNA endoribonuclease activities

研究代表者

米崎 哲朗（YONESAKI TETSURO）

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：90115965

研究成果の概要：大腸菌 RNase LS は adenylate cyclase や転写因子 Fis の mRNA を標的とすることにより、ストレス応答や糖代謝など生理機能に重要な役割をもつことを明らかにした。また、RNase LS の活性に関与する RnlB や TpiA の役割について新知見を得ると共に、*rnlA* と *rnlB* の転写様式を明らかにした。T4 フェージ感染直後に RNase E と G を活性化する原因遺伝子として *nrdC.11* を特定できた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	600,000	4,000,000

研究分野：遺伝子発現

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：mRNA 分解、エンドリボヌクレアーゼ、T4 フェージ、大腸菌

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現の ON/OFF や発現レベルの決定など発現調節における基本的仕組みは転写調節である。しかし、発現停止には mRNA 分解が必須である。また mRNA 量は転写活性と mRNA 分解活性のバランスにより決定される。したがって、遺伝子発現調節において mRNA 分解は転写と両輪をなす仕組みである。

mRNA 分解は遺伝子発現調節以外にも重要な役割をもつことが明らかとなってきた。

ほ乳類でみられる抗ウイルス作用と同じように、mRNA 分解による防衛機構が大腸菌で見られている（後述）。さらに、大腸菌で細胞死を誘導する mRNA 分解現象も見られた。したがって、mRNA 分解の生理的意義は遺伝子発現の調節という域を超えて広がりつつある。これらのことから、mRNA 分解は生物を理解するうえで基本的かつ重要な枠組みであることが分かる。しかし、mRNA 分解活性を担う実体やその活性を調節する仕組みについては、解明

の端緒が開けてきたにすぎない。

大腸菌をモデルとした研究では、細胞死を誘導する mRNA エンドリボヌクレアーゼと正常な細胞における mRNA エンドリボヌクレアーゼが発見されており、これらによる RNA 鎖切断が mRNA 分解を開始することが知られている。正常な細胞における mRNA エンドリボヌクレアーゼの中で主たる機能をもつのは RNase E である。しかし、RNase G も限られた種類の mRNA に対して分解作用をもつ。また、我々が発見した RNase LS は RNase E より活性が低いものの作用スペクトルの広い mRNA エンドリボヌクレアーゼとして機能することがわかってきた。

RNase LS は潜在的に T4 ファージの増殖を抑制する機能をもつ。RNase LS の活性が発揮された場合、T4 の感染後期になると活性化された RNase LS の作用により mRNA が急速に分解されるために、遺伝子発現不能となり増殖が抑制される。T4 ファージは RNase LS の阻害因子である Dmd を感染初期に発現することによって増殖を可能にしている。一方、RNase E や G は T4 ファージ感染後に急速に活性化されて大腸菌の mRNA を分解するようになる。この分解により得られたリボヌクレオチドは T4 遺伝子の転写に利用されるとともに、遊離したリボソームは T4 mRNA の翻訳に独占されるようになる。したがって、RNase E と G は T4 遺伝子発現を促進することによって増殖の効率化に貢献しているのである。すなわち、T4 ファージの増殖戦略として大腸菌 RNase 活性の調節は重要な仕組みである。このように宿主/ファージ相互作用はファージの生物学において決定的に重要な要素となっている。現代の生物学において、宿主/ファージ相互作用の理解は 2 つの観点から重要な課題となっている。

第 1 に、地球上最大のバイオマスであるファージの生態は宿主原核生物の生態を支配する主要因である。宿主/ファージの相互作用を理解することなくしてファージ/原核生物の生態を理解することはできない。

第 2 に、21 世紀の社会的要請として、

医療や産業に有用なファージの開発が求められており、その理論的基礎として宿主/ファージの相互作用の理解が必須となっている。

2. 研究の目的

RNase E、G、LS、3 種類の mRNA エンドリボヌクレアーゼはどのように使い分けられているのか。また、どのように活性調節が行われているのか。発見が新しい RNase LS については必須遺伝子として *rnIA* と *B* を同定したものの、分子構成はまだ十分に明らかとなっていない。さらに、基質 mRNA の認識は種類の違いによって大きく異なるが、その仕組みは全く不明である。このように、mRNA 分解の仕組みを理解する上で、解明されなければならない数多くの未知が横たわっている。

mRNA エンドリボヌクレアーゼの活性調節について T4 ファージは大きなヒントを与えてくれる。このファージは RNase E、G、LS の活性をうまく調節して増殖効率を高めているのである。感染後 2 分以内に、RNase E と G の活性は上昇して宿主 mRNA の分解に利用される（これによって供給されるリボヌクレオチドは T4 遺伝子の転写を促進する）。この調節には、T4 ゲノムの tk2 領域内に含まれる遺伝子が必要であるがまだ同定されていない。一方、抗 T4 ファージ効果をもつ RNase LS は *dmd* 遺伝子がコードする Dmd の作用により完全に抑制される。興味深いことに、*dmd* 変異体を用いた解析から、RNase LS は T4 感染により活性が著しく上昇することが分かった（この活性上昇は RNase LS の発現量増加を伴わない）。この活性化にも T4 遺伝子の関与が明らかとなっている。

以上の経緯に基づいて、RNase LS の性状解析、T4 ファージによる RNase E、G、LS の活性化機構解明、RNase LS の生理的意義解明、を目的として研究を行った。私達が発見した大腸菌 RNase LS はファージ防御機構として、感染し得るファージを限定する要因となっている可能性が高い。そこで、RNase LS と RNase LS の阻害因子である T4 ファージ Dmd に関する理解を深めることによって、応用範囲の広いファージの開発にも貢献できると考えられる。

3. 研究の方法

RNase LS の生物活性を調べるための簡便な方法として、T4 フェージ *dmd* 変異体の増殖能を調べた。RNase LS 活性を定量的に測定するために、*in vivo*での mRNA 分解速度の測定、*in vitro*では細胞抽出液中に検出される RNase LS 活性を解析した。RNase LS の切断特異性を解析するためにはプライマー伸長法を用いた。RNase LS による基質 mRNA 認識機構を解析するために、プラスミドから人工的な mRNA を発現させて安定性を解析した。

遺伝子発現レベルの解析は、Northern blotting または S1 ヌクレアーゼ法による mRNA 量測定、Western blotting によるタンパク質量測定、ならびに β ガラクトシダーゼをレポーターとした定量により行った。また、cAMP の定量は ELISA (cAMP Biotrak Enzyme immunoassay (EIA) system、GE Healthcare、Tokyo) によって行った。

4. 研究成果

<RNase LS の生理的意義>

RNase LS 変異体は 0.4 M 以上の NaCl または KCl を含む培地では野生型に比べて著しく増殖速度が低下した。このことから、RNase LS 変異体は高塩濃度感受性であることがわかった。ストレス応答に必須である σ^S の発現量を測定したところ、変異体では野生型での発現の 1/3~1/2 に低下していた。その理由を探るため、 σ^S の発現抑制因子である Crp の発現量を調べたところ、変異体では 5 倍に上昇していた。Crp が自己抑制ループを逸脱して過剰発現する理由は次のように説明できた。RNase LS は cAMP 合成酵素である adenylylase の mRNA を標的とするため、RNase LS の変異により adenylylase mRNA の分解速度は 1/3 になる。そのため、通常より高いレベルに adenylylase mRNA が蓄積することになる。実際、S1 ヌクレアーゼ法による解析では、RNase LS 変異体は adenylylase mRNA を野生型の 5 倍蓄積することがわかった。そのため、変異体では adenylylase が過剰に

翻訳合成される結果、cAMP の生産が過剰となっていた (特に増殖中期から定常期にかけて、変異体では最大で野生型の 5 倍量生産した)。Crp は cAMP と複合体を形成して *crp* の上流にある Crp site I に結合して転写を抑制することが知られているが、過剰生産された cAMP の存在下では Crp site II 領域に結合することによって Crp の転写を促進する。その結果、Crp が過剰生産されるのである。

糖を栄養源とした培養において、RNase LS 変異体は乳糖やガラクトース等について顕著に増殖能の低下を示した。ガラクトースについて解析したところ、*gal* オペロンがコードする GalE、T、K の発現量が 1/5~1/2 に低下していた。*gal* オペロンの転写は Crp-cAMP によって正に調節されること、前述のように RNase LS 変異体では Crp-cAMP が過剰生産されること、を考慮するとこの結果は矛盾するが、mRNA 分解活性の高まりがあれば説明可能である。そこで、*gal* オペロン mRNA の分解を担うと考えられる RNase E に変異を導入したところ、ガラクトースに依存した増殖能は顕著に改善した。次に、RNase E の発現量を調べたところ、RNase LS 変異体では野生型に比べて 2 倍の発現が認められた。以上のことから、GalE、T、K の発現低下は RNase E の過剰生産が原因である。RNase E 過剰生産の理由を明らかにするため、RNase E mRNA の半減期を調べたところ、RNase LS 変異の有無に関わらず変わりは無かった。このことから、RNase E mRNA は RNase LS の標的とはなっていないことが明らかである。したがって、RNase LS 変異による RNase E の過剰生産は RNase E の転写促進によってもたらされること、RNase LS は RNase E の転写促進因子の mRNA を標的にしていること、が示唆された。そこで、RNase E の転写促進因子を同定するため、様々な転写因子の変異体に RNase E のプロモーターから発現する β ガラクトシダーゼ活性を発現させ、RNase LS の有無による発現量の差異が消失するものを候補として探索した結果、該当するのは Fis であった。*fis* mRNA の半減期を測定したところ、RNase LS 変異により半減期は 2 倍に伸びていた。さらに、ガラクトースに依存した RNase LS 変異体の増殖能低下は *fis* 変異を導入することによって消失することが明らかとなった。以上のことから、RNase LS は Fis の mRNA を標的としており、

RNase LSが変異することによってFisが過剰生産されること、それが結果としてRNase Eの過剰生産をもたらすことが明らかとなった。

その他、今回の研究から、高塩濃度条件下で示すRNase LS変異体の溶菌現象については実行遺伝子の候補として*ssnA*を特定した。また、RNase LS変異体では*TpiA*の活性低下が生じること、増殖期から停止期に移行する頃から増殖速度が低下すること、20%ショ糖や15%グリセロールによる浸透圧ストレスに対して感受性を示すこと、5%エタノールや30 μ M PMSに由来するストレスに感受性を示すこと、等が明らかとなった。

<RNase LSの性状解析>細胞抽出液中に存在するRNase LS活性に必要な成分は、Rn1Aを含む1000 kDa-複合体と可溶性分画に分かれる。さらに、精製したHis-Rn1Aに可溶性分画を加えると活性は著しく上昇する。この活性促進効果は*rn1A*変異体と*rn1B*変異体いずれの可溶性分画についても確認できた。この活性促進因子の精製を試みたところ、様々なカラムクロマトグラフィーにおいて不均一な挙動を示したので、不均一な相手（例えば膜）と相互作用することが示唆された。

Rn1BはRNase LSの活性に必須な遺伝子として同定された。それは、作成した*rn1B*の欠失変異体ではRNase LS活性が消失したからである。ところが、今回*rn1B*の欠失変異体の*rn1A*について塩基配列を解析したところ、変異が生じていることを確認した。そこで、改めてRNase LSと*rn1B*の関係を明らかにすることを試みた結果、*rn1B*非存在下ではRn1A単独のRNase LS活性は細胞毒性をもつ、Rn1Bはその細胞毒性を抑制する機能をもつことが強く示唆された。

Rn1Aに強く結合する*TpiA*の役割を理解するため、*tpiA*変異体に*dmd*変異体を感染させて増殖を調べたところ、わずかではあるが有意な増殖能回復が認められた。そこで、*tpiA*変異体から調整した細胞抽出液について調べたところ、RNase LSの比活性低下が認められた。さらに、*tpiA*変異体の細胞

抽出液に精製した*TpiA*を加えたところ、RNase LS活性の上昇が認められた。これらのことから、*TpiA*はRNase LS活性に必須ではないが、Rn1Aと複合体を形成することによってRNase LS活性を促進する効果をもつと考えられる（この促進効果は上記の可溶性分画に存在する促進因子とは異なる）。

RNase LSが、T4ファージの中期遺伝子mRNAと後期遺伝子mRNAを区別する仕組みを調べるため、中期遺伝子の代表として*uvrY*、後期遺伝子の代表として*soc*を選んで、それぞれのmRNAについて5'-UTR、ORF、3'-UTRを交換したキメラ遺伝子を作成し、そのmRNAの半減期を解析した。その結果、*soc*の3'-UTRを有するmRNAは後期遺伝子mRNAとしての半減期、*uvrY*の3'-UTRを有するmRNAは中期遺伝子mRNAとしての半減期を示した。このことから、RNase LSによる標的の認識において3'-UTRの重要性が浮上した。

<RNase E、Gの活性化を誘導するT4遺伝子の同定>T4が感染すると2分以内に、RNase EとGによる大腸菌mRNAの急速な分解が起きる。この分解には、*tk2*領域に含まれる遺伝子が必須である。*tk2*領域には機能未知遺伝子19個と既知遺伝子2個が含まれているので、この領域の欠失変異体を系統的に作成した結果、*nrdC.11*が必須遺伝子であることをつきとめた。*NrdC.11*の抗体によるプルダウン実験を行うことにより、相互作用する因子を探索したが、結合する因子は検出できなかった。RNase E、Gの機能には、予めmRNAの5'末端に存在するトリリン酸からピロリン酸を除去する反応が必要である。この反応を触媒するRppHの変異体を用いた解析から、*nrdC.11*に誘導されるRNase E、Gの活性化にはRppHが必須ではないことがわかった。このことは、*NrdC.11*がRppHに代わる機能を提供するか、或はピロリン酸除去に依存しないでRNase E、Gの機能を強化する仕組みの存在のいずれかを示唆する。また、*nrdC.11*に誘導されるRNase E活性には、デグラドソームを構成する成分であるPNPase、RhlBが共に必要であることを確認した。

<*rn1AB*の転写調節> β ガラクトシダーゼと

の融合遺伝子を作製して、*rnIAB*の転写調節を調べた。*rnIA*の転写は増殖の前期から後期にかけて活性が徐々に高まることがわかった。このことは、増殖前期より後期の方が*dmd*変異体の増殖を抑制する活性（RNase LS活性）が高いという経験的事実と合致すると思われる結果である。増殖後期での転写活性の高まりは、転写の σ^{38} 依存性を示唆するので、 σ^{38} 欠失変異体を用いたところ転写活性に変化は認められなかった。したがって、転写は一貫して σ^{70} に依存していることと、後期での転写活性の高まりには何らかの転写因子が介在していることが示唆される。プライマー伸長法を用いて転写開始点のマッピングを行ったところ、*rnIA*上流200ヌクレオチド以内に4カ所の開始点を検出し、それぞれに対応するプロモーター配列の候補を特定した。これらの内で、*rnIA*に最も接近しているプロモーターからの転写シグナルが最も強かったので、これが主要な転写プロモーターであると結論した。また、*rnIA*上流200ヌクレオチド以遠1000ヌクレオチド以内に増殖後期に転写を促進するための調節領域が存在することを見出した。一方、*rnIB*は*rnIA*の下流に位置すること、*rnIB*の直前にはプロモーター様の配列が検出できていなかったこと、*rnIB*の直後に転写ターミネーター様配列が存在すること、から*rnIAB*はオペロンを形成すると予測されていた。しかし、今回の解析から、*rnIB*の直前(*rnIA* orfの内部)に転写プロモーターが存在すること、転写活性は増殖の時期に関わらずほぼ一定であり、*rnIA*のいずれの時期の転写活性よりも15倍以上強いことが判明した。上述のように、RnIBがRnIAの毒性を抑制する因子ならば、ここで観察された転写活性の違いは多いに意味をもつと考えられる。プライマー伸長法を用いて転写開始点のマッピングを行い、対応するプロモーター配列の候補を特定した。

IscRは鉄硫黄クラスター形成タンパク質群オペロンの転写抑制因子として知られている。我々は6年前にプラスミドから過剰発現させたIscRはRNase LS活性を抑制することを報告した。今回、IscRが*rnIA*の転写に与える影響を調べたところ、*iscR*

の欠失変異体では*rnIA*の転写活性が2～5に上昇していた。また、コピー数が少ないプラスミドではあるもののクローン化した*iscR*を導入すると*rnIA*の転写活性は30～40%低下した。一方、*rnIB*の転写活性はいずれの場合でも影響されなかった。これらのことから、IscRは*rnIA*の転写活性を特異的に抑制する機能をもつことが明らかとなった。

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 2 件)

1. Iwamoto, A., Lemire, S. and Yonesaki, T. 2008. Post-transcriptional control of Crp-cAMP by RNase LS in *Escherichia coli*. Mol. Microbiol., 70, 1570-1578.
2. Otsuka, Y., Koga, M., Iwamoto, A., and Yonesaki, T. 2007. A role of RnIA in the RNase LS activity from *Escherichia coli*. Genes Genet. Syst., 82, 291-299.

[学会発表] (計 15 件)

1. 「大腸菌RNase LSの生理的役割」
岩本明、米崎哲朗 (第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会 合同大会、神戸、2008年12月)
2. 「大腸菌mRNAを促進するT4 フェージ遺伝子の同定と機能解析」
多田康子、米崎哲朗 (第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会 合同大会、神戸、2008年12月)
3. 「RnIBタンパク質による大腸菌RNase LS活性の制御機構」
古賀光徳、米崎哲朗 (第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会 合同大会、神戸、2008年12月)
4. 「大腸菌エンドリボヌクレアーゼRNase LSの活性制御機構」
三木久美子、米崎哲朗 (第31回日本分子生物学会・第81回日本生化学会 合同大会、神戸、2008年12月)
5. 「大腸菌RNase LS変異体におけるCRPタンパク質過剰発現機構の解明」
岩本明、米崎哲朗 (第九回RNA学会、名古屋、2007年7月)

6. 「T4ファージゲノムTK2領域の機能解析」
多田康子、米崎哲朗（第九回RNA学会、名古屋、2007年7月）
7. 「大腸菌RNase LSの活性に必須な*rnIB* 遺伝子の解析」
古賀光徳、米崎哲朗（第九回RNA学会、名古屋、2007年7月）
8. 「大腸菌mRNAの不安定化を誘導するT4ファージ遺伝子の同定と機能解析」
多田康子、米崎哲朗（第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会 合同大会、横浜、2007年12月）
9. 「大腸菌RNase LSによるCRP-cAMP 新規制御機構」
岩本明、米崎哲朗（第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会 合同大会、横浜、2007年12月）
10. 「sigma38を介した大腸菌RNase LSのストレス応答について」
伊藤明日美、岩本明、米崎哲朗（第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会 合同大会、横浜、2007年12月）
11. 「大腸菌RNase LSにおける*rnIB* 遺伝子の役割」
古賀光徳、米崎哲朗（第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会 合同大会、横浜、2007年12月）
12. RNase LS in *Escherichia coli* plays an important role in carbohydrate metabolism.
Akira Iwamoto, Tetsuro Yonesaki 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress (京都、2006年9月)
13. 「大腸菌 mRNA の不安定化を誘導する T4ファージ遺伝子の探索」
多田康子、米崎哲朗、第78回 日本遺伝学会（つくば、2006年9月）
14. 「RNase LS と糖質代謝の関係性について」
岩本明、米崎哲朗、日本分子生物学会 2006 フォーラム（名古屋、2006年12月）
15. 「大腸菌 mRNA の不安定化を誘導する T

4 ファージ遺伝子の探索」

多田康子、米崎哲朗、日本分子生物学会 2006 フォーラム（名古屋、2006年12月）

〔図書〕（計 1件）

1. 米崎哲朗. 2009. 原核生物の遺伝要素：バクテリオファージ. 羊土社「分子生物学イラストレイティド 改訂第3版」p. 83-86.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

米崎 哲朗

大阪大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：90115965

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし