

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15748

研究課題名（和文）新生ポリペプチド鎖の空間的な局在化に伴ったmRNA分解機構と生理的意義の解明

研究課題名（英文）Mechanisms and physiological significance of mRNA degradation associated with spatial localization of nascent polypeptide chains

研究代表者

石井 英治 (Ishii, Eiji)

大阪大学・微生物病研究所・助教

研究者番号：10835698

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：ヒトのような真核生物では、転写、翻訳、mRNAの分解はそれぞれ異なる細胞内領域で起こる。一方、「空間的な区切り」の少ない原核細胞では一つの空間に転写、翻訳、mRNAの分解に関わる因子が混在しており、そのような環境でどのようにして遺伝子発現の秩序が保たれているかは未だ明確ではない。本研究では、翻訳アレストによってタンパク質発現が制御される遺伝子のmRNA動態を追うことで、mRNAの翻訳状態や二次構造による翻訳頻度の調節が、環境に応答した迅速かつ適切なタイミングでの遺伝子発現が可能であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

原核細胞では一つの空間で転写、翻訳、mRNAの分解に関わる因子が混在しているにもかかわらずその遺伝子発現制御は緻密なネットワークを形成し様々な環境シグナルに応答してなされている。細菌におけるこのような遺伝子発現がどのようにして組織されているかは未だ不明な点がおおい。本研究では、翻訳アレストというリボソームの異端な挙動を介してmRNAの動態がどのようにして変容し、遺伝子発現に影響を与えるかを明らかにした。これまで翻訳アレストに伴ったmRNA動態に関する報告は少なく、この結果は、複雑な細菌の遺伝子発現のメカニズムを理解するうえで意義深い研究成果であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In eukaryotes such as humans, transcription, translation, and mRNA degradation occur in distinct subcellular regions. On the other hand, in prokaryotic cells, where there are few "spatial delimiters," factors involved in transcription, translation, and mRNA degradation are coexistent in a single space, and it is still unclear how the organization of gene expression is maintained in such an environment. By following the mRNA dynamics of genes whose protein expression is regulated by translational arrest, this study shows that regulation of translation frequency by secondary structure and translation state on mRNA enables rapid and appropriately timed gene expression in response to the environment.

研究分野：生化学

キーワード：翻訳アレスト RNase 遺伝子発現 ビブリオ菌 RNA分解

### 1. 研究開始当初の背景

mRNA から合成されたタンパク質は細胞内の特定の場所まで輸送され適切な形をとる、完成品となること、生理的な機能を発揮するために重要であると考えられてきた。しかしながら近年の研究により、合成途上のタンパク質(新生ポリペプチド鎖;新生鎖)が細胞の恒常性を保つために重要な役割を果たしている例が報告されている。申請者らはそのような例の一つである海洋性ビブリオ菌の有する分泌タンパク質 VemP が、自身の合成途上および輸送途上において機能し下流遺伝子のタンパク質合成を調節することを報告した(Ishii et. al., 2015)。vemPはタンパク質膜透過装置の構成因子である SecDF2 をコードする遺伝子上流に位置し、これらとオペロンを成す。この転写産物である vemP-secDF2 mRNA は、その遺伝子間領域で二次構造を形成し、secD2 に対するリボソーム結合領域を隠すことで SecD2/F2 の発現を抑制している。VemP の膜透過が損なわれた場合、VemP の翻訳途上鎖とリボソームトンネル内壁との特異的相互作用により、VemP の翻訳伸長は C 末端付近で安定に停止(翻訳アレスト)し、その結果、mRNA の二次構造が壊れ SD 配列が露出して SecDF2 の翻訳が誘導される(図 1、左)。一方、膜透過が正常な時には、VemP 合成途上鎖は膜透過装置まで運ばれ、膜透過に伴う引っ張り力によって翻訳アレストは速やかに解消される(図 1、右)。まとめると、VemP は C 末端近傍での翻訳アレストにより SecDF2 発現を誘導する一方で、翻訳途上鎖である N 末端のシグナル配列が細胞の膜透過活性をモニターすることにより、翻訳アレストの状態については SecDF2 の発現をコントロールしている。この VemP の翻訳アレストは、SRP 経路により細胞膜の Sec 装置まで運ばれ、解除されるまでリボソーム複合体(mRNA-リボソーム-新生鎖)として細胞内で存在する(図 2)このことから、新生鎖の挙動だけでなく翻訳アレストに伴った mRNA の動態についても興味注がれる。しかしながら、この分野においてリボソームと新生鎖の構造学的な知見やそれに基づいた生体内モデルは報告されているが、このときの時空間的な mRNA の動態に関してはほとんど議論・検証がなされていない。

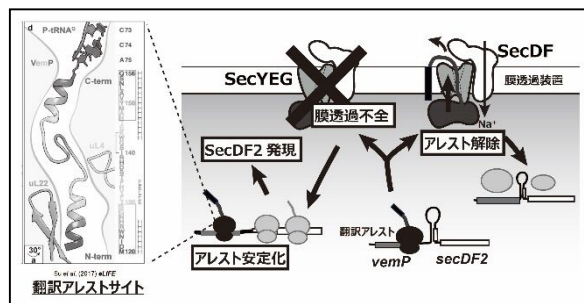


図1 VemP 翻訳アレストとそれに伴った発現制御機構

2. 研究の目的

申請者は同じオペロンを構成する上流遺伝子 vemP の翻訳アレストに伴って発現誘導される SecD2/F2 の発現が mRNA レベルでも調節されていることを見出した。この mRNA 量の調節は、VemP の膜透過能に伴って変動することから単純な転写制御ではないことが示唆された。更に、VemP の膜への局在性を欠失した場合には、mRNA の安定性が増大したことから、vemP-secD2/F2 mRNA は細胞内の局在や翻訳の状態に依存して分解制御を受けていることが推測された。そこで本研究では、vemP-secDF2 mRNA の量的制御について着目し、細胞内局在や翻訳アレストとの関係や制御の詳細な分子機構について明らかにすることを目的とした。

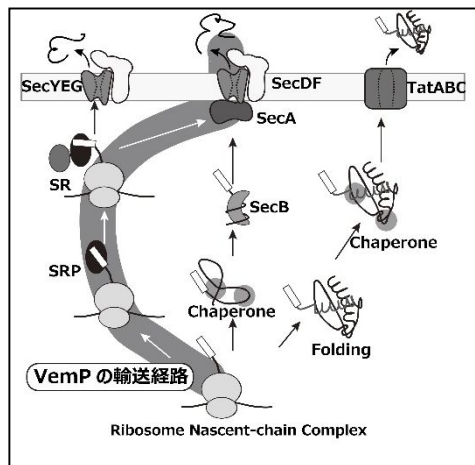


図2 細菌の主な膜への輸送経路

### 2. 研究の目的

3. 研究の方法

(1) VemP の局在化因子と mRNA の動態

VemP の局在にかかわるシス因子であるシグナルペプチドやトランスの因子 SRP や SecA、PpiD の欠損により mRNA の動態がどのように変化するかをより詳細に解析するためにノーザンブロットングを用い実験をおこなった。

(2) vemP-secD2/F2 mRNA の安定性変化に関わるトランス因子の探索と vemP-secDF2 mRNA の分解制御機構

VemP の局在や局在化シグナルに伴って変わる vemP-secDF2 mRNA の安定性に着目し、安定性に関わるトランス因子の探索を行った。

大腸菌を用いた mRNA 分解因子の探索

この mRNA の安定性変化の様態は、同じ  $\gamma$ -proteobacteria である大腸菌中でも再現できることから、共通の因子が担っていることが予測された。そこで、RNA の分解や RNA の安定性に

関わる因子の欠損株を用いて *vemP-secD2/F2* mRNA の安定性に影響を与える因子を探索した。

RNaseE 温度感受性株を用いた RNaseE が mRNA に与える影響の検証

RNaseE は、細菌において主要なエンドヌクレアーゼであり、mRNA 分解の起点を担っていることが知られている。そこで RNaseE の温度感受性株を使い、mRNA の安定性に与える影響について検証した。

、 で得られた因子を用いてその因子が mRNA 動態に与える影響をノーザンブロットィングにより検証した。

#### 4. 研究成果

##### (1) VemP の局在化因子と mRNA の動態

これまでの研究で VemP のシグナル配列(SS)を欠損した変異体( SS 変異体)では、細胞の膜透過能によらず翻訳アレストが安定化し、SecDF2 の発現が上昇することが知られている。この時の mRNA の挙動を *vemP* と *secD2* 上に設計した probe を用いてノーザンブロットィングにより解析したところ、野生型および SS 変異体ではどちらの probe を使ったときも同じ位置に S 転写産物(530 nt)が検出された。一方、*secD2* 上の probe でしか検出できなかった L 転写産物は、SS 株でのみ検出された。これらの産物はそのサイズから S 転写産物は *vemP* の転写開始点から *vemP* coding region 下流の *secD2* との遺伝子間領域を一部含む産物で L 産物は *vemP* の転写開始点から SecF2 を含む産物であることが示唆された。このような傾向は同じように翻訳アレストを安定化するトランス因子の欠損や枯渇によっても観察されたことから、翻訳アレストが L 転写産物の産生にかかわっていることが予測された。そこで、VemP の翻訳アレストを定義する C 末端のアミノ酸配列やナンセンス変異体を用いて L 転写産物の蓄積を確認したところ L 転写産物の蓄積は翻訳アレストの不全により完全に消失した。このことから SecDF2 をコードする mRNA 領域の蓄積には翻訳アレストが重要であることが示唆された。

これまでの我々は、VemP での翻訳アレストは遺伝子間領域に存在する RNA 二次構造を不安定化し、その二次構造にマスクされている SD 配列(リボソーム結合領域)を露出することで SecD2 の翻訳開始を促すことを報告している。一方、mRNA 上のリボソームはヌクレアーゼからの分解から保護することが一般的に知られている。このことから SecD2 翻訳開始によるリボソームと mRNA の会合により、L 転写産物が安定化されていることが考えられる。そこで、*secD2* の開始コドン atg を ctg に変えた変異体を作成し、L 転写産物の産生に与える影響を確認した。その結果、ctg に変えた変異体では翻訳アレスト誘起した SS 体においても L 転写産物の産生は確認されなかった。このことから、L 転写産物の安定化には *secD2/F2* 領域の翻訳が重要であることが示唆された。

##### (2) *vemP-secD2/F2* mRNA の安定性変化に関わるトランス因子の探索と *vemP-secD2/F2* mRNA の分解制御機構

大腸菌の RNA の分解や RNA の安定性に関わる因子の欠損株を用いた試験では、*vemP-secD2/F2* 領域の各転写産物産生に影響を与えるものは得られなかった。一方、生育に必須因子である RNaseE の温度感受性株を用いた試験では、感受性株を高温に晒した際に L 転写産物の産生が翻訳アレスト非依存的に確認されたことから、RNaseE が *vemP-secD2/F2* mRNA の安定性変化に関わる主たる因子であることが示唆された。また、RNaseE の標的領域が *secD2/F2* mRNA 上に存在することも明らかになった。

一方で、S 転写産物の産生がどのようにしてなされ、それがどのような生理的意義を有するのは今回の研究では明らかにすることはできなかった。本研究において、膜透過にตอบสนองした VemP の翻訳アレストにより SecD2 の翻訳開始を誘起するだけでなく RNA レベルの量的・質的制御を行うことでタンパク質の厳密な発現制御を行っていることを示した。

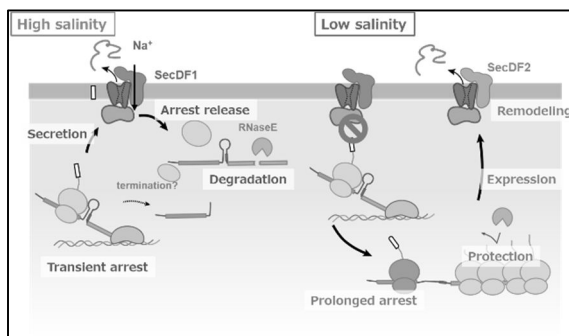


図3 VemP の翻訳アレストを介した mRNA レベルでの制御モデル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Angramukti Dhira Saraswati, Ishii Eiji, Pratama Andre, Al Kadi Mohamad, Iida Tetsuya, Kodama Toshio, Matsuda Shigeaki	4. 巻 20
2. 論文標題 The read-through transcription-mediated autoactivation circuit for virulence regulator expression drives robust type III secretion system 2 expression in <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 PLOS Pathogens	6. 最初と最後の頁 e1012094
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.ppat.1012094	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 -

1. 著者名 Pratama A, Ishii E, Kodama T, Iida T and Matsuda S	4. 巻 205
2. 論文標題 The Xenogeneic Silencer Histone-Like Nucleoid-Structuring Protein Mediates the Temperature and Salinity-Dependent Regulation of the Type III Secretion System 2 in <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Bacteriology	6. 最初と最後の頁 e00266-22
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/jb.00266-22	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Al kadi Mohamad, Ishii Eiji, Truong Dang Tat, Motooka Daisuke, Matsuda Shigeaki, Iida Tetsuya, Kodama Toshio, Okuzaki Daisuke	4. 巻 6
2. 論文標題 Direct RNA Sequencing Unfolds the Complex Transcriptome of <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSystems	6. 最初と最後の頁 e00996-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSystems.00996-21	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Andre Pratama, 石井英治、児玉年央、飯田哲也、松田重輝
2. 発表標題 H-NSによる腸炎ビブリオ 型分泌装置2遺伝子群の温度・塩分濃度依存的な発現制御機構
3. 学会等名 第18回21世紀大腸菌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Andre Pratama, Eiji Ishii, Toshio Kodama, Tetsuya Iida, Shigeaki Matsuda
2. 発表標題 A global regulator H-NS mediates temperature- and salinity-dependent regulation of type III secretion system 2 in <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
3. 学会等名 第20回あわじ感染と免疫国際フォーラム（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mohamad Al Kadi, Eiji Ishii, Shigeaki Matsuda, Tetsuya Iida, Toshio Kodama, Daisuke Okuzaki
2. 発表標題 Annotation of Bacterial Transcriptome Using Direct RNA Sequencing
3. 学会等名 第54回ヒブリオシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Andre Pratama, Eiji Ishii, Toshio Kodama, Tetsuya Iida, Shigeaki Matsuda
2. 発表標題 A global regulator H-NS mediates temperature- and salinity-dependent regulation of type III secretion system 2 in <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
3. 学会等名 第54回ヒブリオシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Andre Pratama, Eiji Ishii, Toshio Kodama, Tetsuya Iida, Shigeaki Matsuda
2. 発表標題 A global regulator H-NS mediates temperature- and salinity-dependent regulation of type III secretion system 2 in <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
3. 学会等名 第75回日本細菌学会関西支部総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mohamad Al kadi, Shigeaki Matsuda, Eiji Ishii, Hiroyuki Terashima, Tetsuya Iida, Daisuke Okuzaki, Toshio Kodama
2. 発表標題 Genome-wide mining of non-coding RNAs in the food-borne pathogen <i>Vibrio parahaemolyticus</i> using direct RNA sequencing
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井英治、秋山芳展、森博幸
2. 発表標題 翻訳アレストペプチドVemPを介した遺伝子発現制御における転写産物の動態解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井 英治, 松田 重輝, 飯田 哲也, 秋山 芳展, 森 博幸
2. 発表標題 ビブリオ属細菌における翻訳アレストを介した遺伝子発現制御
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 アルカディ ムハammad, 石井 英治, Tat Truong Dang, 元岡 大祐, 松田 重輝, 飯田 哲也, 児玉 年央, 奥崎 大介
2. 発表標題 Transcriptome Complexity of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> revealed by direct RNA sequencing
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Andre Pratama, 石井 英治, 児玉 年央, 飯田 哲也, 松田 重輝
2. 発表標題 H-NS mediates temperature- and salinity-dependent regulation of T3SS2 in <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Mohamad Al Kadi, 石井英治、Dang Tat Truong、元岡大祐、松田重輝、飯田哲也、児玉年央、奥崎大介
2. 発表標題 The complex landscape of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> transcriptome.
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Andre Pratama, 石井英治、児玉年央、飯田哲也、松田重輝
2. 発表標題 Xenogeneic silencing-mediated regulation of T3SS2 in <i>Vibrio parahaemolyticus</i>
3. 学会等名 第95回日本細菌学会総会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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0件

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
---------	---------