

細菌小分子RNAの機能構造と生合成

森田 鉄兵

1. はじめに

遺伝子からmRNAを経てタンパク質へと情報変換される過程（遺伝子発現）は、細胞を取り巻く環境、あるいは細胞の状態の変化に応答して制御される。代表的な遺伝子発現の制御因子は、転写開始の制御を担う転写因子（タンパク質）である。その一方で、近年の研究から、RNAも制御因子として機能し、遺伝子発現を制御することが明らかになった。小分子RNA（small RNA：sRNA）は代表的な遺伝子発現の制御因子であり、原核生物から高等真核生物に至るまで、ほとんどの生物においてその存在が確認されている。このため、転写因子による制御と同様に、sRNAによる制御は普遍的な遺伝子発現制御であると考えられる。

主にグラム陰性菌において、Hfqタンパク質を介して機能するsRNAが存在する（これより以下、sRNAはHfq結合型sRNAを示す）。sRNAによる遺伝子発現制御のメカニズムは、主に大腸菌、サルモネラ菌において解析が進められてきた。sRNAは、Hfqの補助により標的にするmRNAと塩基対を形成し、mRNAの翻訳、および安定性を調節することにより遺伝子発現を制御する。また、mRNAの安定性調節には、Hfqと結合するエンドリボヌクレアーゼであるRNase Eが必要である。sRNA/Hfq/RNase Eの三者複合体が標的mRNAに協調的に作用することにより、大半の標的遺伝子の発現は抑制され、一部の標的遺伝子の発現は促進される^{1,2)}。また、このような制御メカニズムの研究と並行して、sRNAの性質についての研究も大腸菌、サルモネラ菌において活発に行われている。本稿では、sRNAの性質、特にHfq結合領域、および生合成過程（3'末端の形成、5'-プロセッシング）に関する最近の報告を紹介する。

2. Hfq結合領域はsRNAの3'領域に存在する

Hfqは、1960年代にRNAファージQβの複製に必要な宿主（大腸菌）因子（host factor Qβ phage）として同定されたタンパク質である。その後の解析により、sRNA/標的mRNA間の塩基対の形成を促進させる機能を持つことが明らかになり、ファージ感染にとどまらず、Hfqは細胞内でのsRNA制御に必要なタンパク質因子であると位置づけられている³⁾。断片化したRNAを用いて行われた*in vitro*実験系により、HfqがAUに富むRNAに優先的に結合することが示されていたが、制御に必要なsRNA上のHfq結合領域は不明であった。筆者らは、大腸菌を用いて、代表的なsRNAの一つであるSgrSの機能解析を進めることにより、Hfqとの機能的結合に十分なSgrS領域を突き止めた^{4,5)}。Hfq結合領域はSgrSの3'領域に位置し、3'末端の7塩基以上のポリU鎖(①)、および一つ、あるいは二つのRNAヘアピン構造の直前に位置するUに富む配列(②)により構成される(図1A)。これらの要素は、ほとんどのsRNAに存在するものであり、sRNAの一般的な要素と考えることができる⁵⁾。時を同じくして、Sauerらは生物物理学的な解析により、①、②の要素が、Hfqの近位面、および側面（リム）にそれぞれ結合することを示した^{6,7)}(図1B)。その一方で、標的mRNA上の要素はA-R-N（Rはプリン残基、Nはすべての残基）の繰り返し配列(③)であり、③はHfqの遠位面に優先的に結合する⁸⁾(図1B)。また、一部のsRNAは②の代わりに③を保持しており、その場合には、標的mRNAには③の代わりに②が備わっている。それらは、Hfqの遠位面とリムを使い分けることで、Hfqによる対形成促進作用を受ける⁸⁾。

3. sRNAの発現とその制御

sRNA遺伝子は独自のプロモーターを持ち、主にストレス下において、特異的な転写因子によりそれぞれ発現が誘導される³⁾。グルコースリン酸の細胞内蓄積により合成が誘導されるSgrSは、グルコーストランスポーターをコードする*ptsG* mRNAを含むいくつかのmRNAを標的にして、グルコースリン酸の蓄積を緩和させるように遺伝子発現を制御する⁹⁾。

タンパク質をコードする多くの遺伝子と同様に、sRNA

鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科（〒513-8670 三重県鈴鹿市南玉垣町3500-3）

Functional structure and biogenesis of bacterial small RNA

Tepei Morita (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Suzuka University of Medical Sciences, 3500-3 Minamitamagaki, Suzuka, Mie 513-8670)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890551

© 2017 公益社団法人日本生化学会

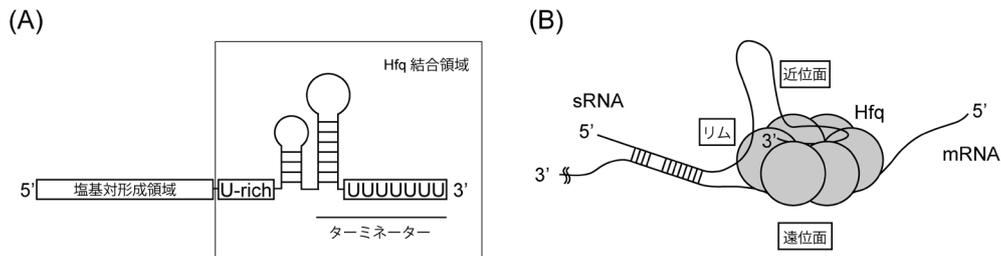


図1 sRNAの機能構造とHfq/sRNA/標的mRNAの結合様式

(A)sRNAは、標的mRNAと塩基対を形成する領域、Hfq結合領域、およびRho非依存型転写終結領域（ターミネーター）により構成される。塩基対形成領域は、～数十塩基の塩基対形成が予測される配列を保持し、その中に塩基対形成の核となる領域（シード領域）が存在する³⁾。(B)Hfqには、近位面、遠位面、および側面（リム）のそれぞれに、RNA結合部位が存在する。

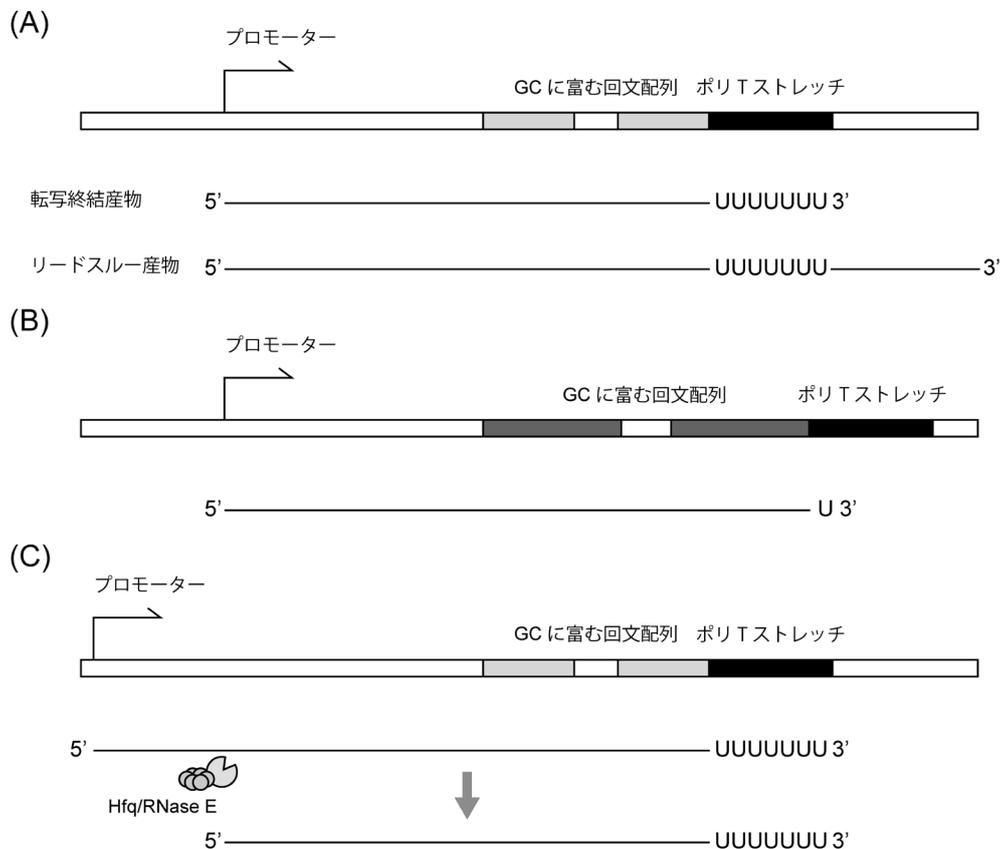


図2 sRNAの生合成

sRNA遺伝子は、一般的な転写終結領域であるターミネーターを保持する。ターミネーターは、GCに富む回文配列（灰）、およびポリTストレッチ（黒）により構成される。(A)ターミネーターを読み飛ばしたリードスルー産物はHfqと結合しないため、sRNAの機能を持たない。(B)強固なヘアピン構造を形成する回文配列の場合（濃灰）には、3'末端のポリU鎖が短い転写産物が合成される。このような転写産物はHfqと結合しないため、sRNAの機能を持たない。(C)ArcZでは、5'領域がHfq/RNase Eによるプロセッシングにより取り除かれる。

遺伝子は、末尾にRho非依存転写終結領域（以下、ターミネーター）を持つ。ターミネーターは、タンパク質因子であるRho非依存的に、すなわちDNA上の配列依存的に転写を終結させる領域であり、GCに富む回文配列、およびそれに続くポリTストレッチにより構成される。回文配列の転写により合成された新生RNA鎖がヘアピン構造を形

成すると、ヘアピン構造はRNAポリメラーゼの転写伸長を阻害し、ポリTストレッチ上で鋳型DNA鎖、および新生RNA鎖からRNAポリメラーゼを解離させる。

sRNAの3'領域に存在するHfq結合領域がターミネーターと重複していることから、sRNAの生合成と転写終結反応には密接な関係があると考えられる（図1A）。そこ

で、筆者らはsRNA遺伝子における転写終結の解析を目的として、*sgrS*遺伝子の直後にリボソームタンパク質をコードする*rplL*遺伝子のターミネーターを配置したダブルターミネーター遺伝子を構築した。これにより、一般的に検出が困難であるリードスルー産物を比較的安定に検出することが可能になる。このダブルターミネーター遺伝子を用いて解析した結果、リードスルー産物がHfqと結合しないことを確認した¹⁰⁾。これは、3'末端の伸長によりSgrSのHfq結合領域の位置が3'末端ではなくなったためであると考えられる(図2A)。

また、アラビノースの添加によりダブルターミネーター遺伝子の転写を誘導させるように設計し、通常下、およびストレス下における転写終結効率の比較を行ったところ、通常下に比べ、ストレス下において転写終結効率が大幅に上昇していた¹⁰⁾。これは、転写開始制御に加えて、sRNAの発現が転写終結においても制御されていることを示している。ゲノム上の*sgrS*遺伝子の下流には、糖排出トランスポーターファミリーに属するSetAタンパク質をコードする*setA*遺伝子が存在し、その転写は*sgrS*遺伝子と同一のプロモーターで起こることが確認されている¹¹⁾。その一方で、*sgrS*変異とは異なり、グルコースリン酸の蓄積ストレスに対する*setA*変異の影響が限定的であること、またSetAがグルコースリン酸を基質にしないことが示された¹¹⁾。これらのことから、ストレス下における*sgrS*遺伝子の転写終結効率の上昇には、ストレス応答に対しより効果的であるSgrSの合成量を増加させるという生物学的な意義があると考えられる。

4. 3'末端の位置決定におけるターミネーターヘアピンの役割

3'末端が伸長したリードスルー産物がsRNAとして機能しないことが明らかになった一方で、何らかの原因で3'末端が短くなった転写産物はどうだろうか。3'末端の7塩基以上のポリU鎖は、Hfqとの機能的結合に必要なsRNA領域であり、そのためほとんどのsRNA遺伝子のターミネーターには、7塩基以上のポリTストレッチが存在する⁵⁾。加えて、転写終結時に、ポリTストレッチは十分な長さのポリU鎖へと転写される必要がある。もし転写終結が早期に起こった場合には、短いポリU鎖を3'末端に持つ転写産物が合成され、これらはHfqと結合しないためsRNAとして機能しないと考えられる。

筆者らは、この可能性を検証するために、ターミネーターのヘアピン構造の熱安定性に着目し、ヘアピン構造を安定化させるように挿入変異を導入した変異*sgrS*遺伝子から合成される転写産物の3'末端を解析した。その結果、野生型*sgrS*遺伝子では、3'末端に8塩基のポリU鎖(8U)

を保持する転写産物が多数合成されていたのに対して、変異*sgrS*遺伝子では、8Uを保持する少数の転写産物に加えて、6塩基以下のポリU鎖を保持する転写産物が多数合成されていた。また、変異*sgrS*遺伝子から合成されたこれらの3'末端が異常なRNAは、Hfqと結合しなかった。以上の結果は、ターミネーターのヘアピン構造の熱安定性が3'末端の位置の決定に重要な要素であることを示すとともに、sRNA遺伝子のターミネーターが、3'末端に7塩基以上のポリU鎖を備えたRNAを合成するのに適した構造を持つことを示している(図2B, Morita, T., Nishino, R., & Aiba, H., 印刷中)。

5. 5'-プロセシングにより生成されるsRNA

一般的には転写産物がsRNAとして機能すると考えられているが、近年これらに加えて、転写産物がプロセシングされた後に、その3'領域がsRNAとして機能する例が報告されている。Chaoらは、サルモネラ菌において、転写産物の5'領域がプロセシングにより除去され、56塩基長の機能的なArcZ sRNAが合成されることを明らかにした¹²⁾(図2C)。興味深いことに、この5'-プロセシングにはHfq/RNase Eが必要である。このことから、プロセシングにより生じたsRNAがHfq/RNase Eと複合体を形成し標的mRNAを分解するという、sRNAの成熟とmRNA抑制が連動したsRNA制御機構の存在が想起される¹²⁾。他にも、5'-プロセシングにより切り出された転写産物の3'領域がsRNAとして機能する例がいくつか報告されている¹³⁾。その一方で、3'-プロセシングにより成熟するsRNAは現在のところ見つかっていない。このことは、Hfq結合領域がターミネーターと重複する3'領域に存在することによると考えることができる。

6. おわりに

本稿において一部を紹介したように、sRNAの制御機構、および性質の大部分が明らかになりつつある。また最近では、それらをもとに解析が進められ、生物現象に関わるsRNA制御の研究は広がりを見せている。中でも、宿主(シヨウジョウバエ) 貪食作用に対する細菌(大腸菌) 抵抗性におけるHfqの必要性を示す研究¹⁴⁾のように、感染症に関わるsRNA制御は医学的にも重要な意義を持つ。また、Hfqホモログが存在するにも関わらず、グラム陽性菌においてはHfqに依存したsRNA制御はほとんど確認されないことも興味深い。最近、Hfqのリムを構成するアミノ酸の違いがsRNA制御の有無に関係するという報告がなされた¹⁵⁾。これらに加え、sRNAの要素(3'領域の配列)に着目した細菌種間での比較解析は取り組みたい研究課題で

ある。

謝辞

本稿で紹介した筆者が携わった研究は、名古屋大学大学院理学研究科、および鈴鹿医療科学大学薬学部において、饗場弘二教授のもとで行われました。共同研究者の方々に心より御礼申し上げます。

文 献

- 1) Morita, T. & Aiba, H. (2011) *Genes Dev.*, **25**, 294–298.
- 2) Papenfort, K. & Vanderpool, C.K. (2015) *FEMS Microbiol. Rev.*, **39**, 362–378.
- 3) Gottesman, S. & Storz, G. (2011) *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **3**, a003798.
- 4) Otaka, H., Ishikawa, H., Morita, T., & Aiba, H. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 13059–13064.
- 5) Ishikawa, H., Otaka, H., Maki, K., Morita, T., & Aiba, H. (2012) *RNA*, **18**, 1062–1074.
- 6) Sauer, E. & Weichenrieder, O. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 13065–13070.
- 7) Sauer, E., Schmidt, S., & Weichenrieder, O. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 9396–9401.
- 8) Schu, D.J., Zhang, A., Gottesman, S., & Storz, G. (2015) *EMBO J.*, **34**, 2557–2573.
- 9) Bobrovskyy, M. & Vanderpool, C.K. (2016) *Mol. Microbiol.*, **99**, 254–273.
- 10) Morita, T., Ueda, M., Kubo, K., & Aiba, H. (2015) *RNA*, **21**, 1490–1501.
- 11) Sun, Y. & Vanderpool, C.K. (2011) *J. Bacteriol.*, **193**, 143–153.
- 12) Chao, Y., Li, L., Girodat, D., Forstner, K.U., Said, N., Corcoran, C., Smiga, M., Papenfort, K., Reinhardt, R., Wieden, H.J., Luisi, B.F., & Vogel, J. (2017) *Mol. Cell*, **65**, 39–51.
- 13) Miyakoshi, M., Chao, Y., & Vogel, J. (2015) *Curr. Opin. Microbiol.*, **24**, 132–139.
- 14) Shiratsuchi, A., Nitta, M., Kuroda, A., Komiyama, C., Gawa-sawa, M., Shimamoto, N., Tuan, T.Q., Morita, T., Aiba, H., & Nakanishi, Y. (2016) *J. Immunol.*, **197**, 1298–1307.
- 15) Zheng, A., Panja, S., & Woodson, S.A. (2016) *J. Mol. Biol.*, **428**, 2259–2264.

著者寸描

●森田 鉄兵 (もりた てっぺい)

鈴鹿医療科学大学薬学部薬学科助教。博士 (理学)。

■略歴 2002年名古屋大学理学部卒業。06年同大学大学院理学研究科修了。同年同助手。09年鈴鹿医療科学大学薬学部助手。16年より現職。

■研究テーマと抱負 細菌小分子RNAによる遺伝子発現制御機構。