

枯草菌における非翻訳型RNAによる遺伝子発現制御ネットワーク解析

●中村 幸治

筑波大学生命環境科学研究科

〈研究の目的と進め方〉

生体内のRNAは、タンパク質をコードするmRNAと、タンパク質をコードせず、転写後、RNAとして機能する非翻訳型RNA (non-protein-coding RNA, ncRNA) の2つのクラスに分類される。ncRNAはその名のとおりに、配列中に大きなORFをもたず、それ自身の配列内で2次構造を形成し酵素活性をもち、あるいは、ターゲットのRNAやタンパク質と特異的に結合することにより、機能をもつ。ncRNAの定義は論議になるところであるが、本研究で用いる枯草菌などの原核生物はその定義は明確であり、短いORFが存在してもその開始コドンの10塩基上流にリボソーム結合配列(SD配列)が存在しなければ、ncRNAとして判断される。ncRNAの代表的なものは、tRNA、rRNA以外にも、spliceosomeの構成成分であるsmall nuclear RNA (snRNA)、rRNAやUsnRNAの修飾ガイドとして機能するsmall nucleolar RNA (snoRNA)、タンパク質の細胞外への分泌に関与するシグナル認識粒子(SRP)の構成成分であるSRP RNAなどがある。その機能する過程は、複製、転写、転写後調節、翻訳、翻訳後調節など多岐にわたり、作用機構も多彩である。ゲノム解析が進行し、多くの生物のゲノム配列が明らかになってくると、予想以上に多くのncRNAが存在することが明らかとなり、ヒトやマウスでは、300種類を超えるncRNAが存在するという報告もある。さらに、ヒトにおける転写産物の実に90%以上がncRNAであることも最近報告されてきている。真正細菌においてもゲノム解析の結果、ORF間に多くのギャップ領域が存在することが明らかとなり、これらがncRNAをコードする可能性が示された。ゲノム上の全遺伝子情報を解析し、機能ネットワークの全貌解明にはncRNAの機能解析が重要である。

本研究で目指す1つの生物におけるncRNAの発現量の動的・空間的な解析は、“RNomics”と呼ばれているが、その進め方には、大きく分けて2通りある。電気泳動で直接検出でき、安定に存在するRNAをcDNA化し、配列決定を行う“Experimental RNomics”と、解読されたゲノム情報をコンピューターのソフトウェアを利用し、遺伝子間のギャップ領域からncRNAをコードする可能性のある領域を抽出する“Computational RNomics”である。本研究では、ゲノム解析が行われた枯草菌におけるncRNAの機能の全貌を明らかにするため、①低分子のRNAを調製する方法を用いて精製したRNA画分中に安定に存在するncRNAの同定・機能解析を行う、②ゲノム配列情報を用いてncRNAをコードする領域の抽出および機能解析を行う、③枯草菌における研究成果をもとに、近縁種であるウェルシュ菌や黄色ブドウ球菌におけるncRNAの同定・機能解析を行う、ことなどを研究目的とした。

〈研究開始時の研究計画〉

研究期間において枯草菌を中心にした真正細菌の非翻訳型RNAの機能解析に焦点を当て、以下のような当初研究計画を立てた。

(2000年度の当初計画)

枯草菌の対数増殖期における菌体の全RNAを抽出し、電気泳動を行った結果、tRNAや5S rRNA及び枯草菌のSRP RNAであるscRNA以外に明確な2本のバンドを検出できた。これらは、発現量から推察して生体内で重要な機能を有していると考えられたため、この遺伝子の解析を進めることを計画した。方法として、おのおののバンドをゲルから切り出し、3'末端に大腸菌PAP(poly A polymerase)により、ポリA付加後、cDNAを作成し、クローニング、塩基配列決定を行う。さらに、決定した塩基配列結果をもとに、遺伝子破壊株を構築し、機能解析を行う。

(2001年度の当初計画)

2000年に同定したBS190 RNA及びBS203 RNAの機能解析を引き続き行う。各遺伝子破壊株を構築し、生育や環境ストレス応答などへの変化を解析する。一方、枯草菌のゲノム配列情報を利用し、4,200個のORFの遺伝子間領域について、①転写可能なプロモーター配列を有するか、②適当な長さのORFの有無、③リボソーム結合部位となるSD配列を有するか、などを指標にncRNAコード可能領域を抽出し、PCRによりプローブDNA断片を作成し、対数増殖期より調製した全RNAに対してのノーザン解析を行う。

(2002年度の当初計画)

前年度に引き続き、抽出した遺伝子間領域における新規ncRNA遺伝子の同定を行う。転写が確認され、転写物の5'末端及び3'末端解析により遺伝子構造を明らかにし、ncRNAコード配列の決定と2次構造などの予測を行う。各遺伝子を薬剤耐性遺伝子(主に、クロラムフェニコール)に置き換えた破壊株の構築を行う。

枯草菌DNAマイクロアレイを用いて、機能解析を行う。さらに、バイオインフォマティクス的手法を用いて、より低分子のncRNAコード領域を抽出し実験的に転写物の有無を確認する。

(2003年度の当初計画)

BS190 RNA及びBS203 RNAについてより詳細に解析を行うため、破壊株のDNAマイクロアレイを用いた解析に加え、結合タンパク質の同定や転写産物の発現解析を詳細に行う。試験管内での転写再構成系を構築して、機構の分子メカニズムを解析する。また、遺伝子間領域に同定した新規ncRNAについて、機能解析を進める。

より低分子のncRNAの解析から明らかになった転写可能領域でいわゆるリボスイッチとして機能する領域の抽出を行う。

(2004年度の当初計画)

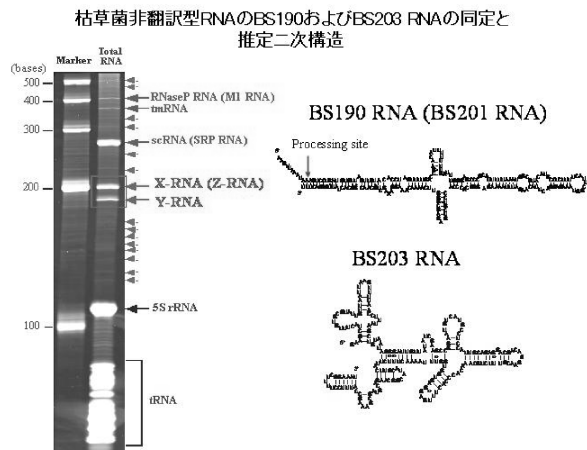
DNAマイクロアレイ解析の結果、BS190 RNAは、種々の遺伝子の発現に対して、転写レベルで負の制御を行っていると思われた。非翻訳型RNAによる転写レベルでの遺伝子発現制御はこれまで例がなく、新たな分子機構を解明できると考える。枯草菌の試験管内転写系を用いて、BS190 RNAの添加の効果を再現し、機能解析を行う。BS190 RNA結合タンパク質の機能もこの系を用いて解析

する。BS190 RNAは、成熟体で190塩基からなり、全体としてヘアピン構造をとる。この構造の中央部にバルジ領域が存在し、このバルジ構造に制御遺伝子のアテニューエーター領域と10塩基にわたって相補的な配列を2カ所もつことがわかった。作成したBS190 RNA遺伝子破壊株にプラスミドで各種部分欠損型BS190 RNAを導入して機能に必要なドメインを枯草菌内で解析するとともに、先の試験管内転写系を用いたより詳細な解析も行う。ウェルシュ菌や黄色ブドウ球菌の2種類の非翻訳型RNA (VR-RNA及びRNAIII) についての解析を行う。

<研究期間の成果>

(2000年度の研究成果)

対数増殖期の枯草菌より全RNAを抽出し、電気泳動を行った結果、tRNAや5S rRNAと量的に同程度の2本のバンド (図中 X(Z), Yバンド) を検出した。



これらのバンドを電気泳動したゲルから切り出し精製し、3'末端にPAPによりポリAを付加後、cDNAを作成し、塩基配列を決定した。その結果、BS190 RNA及びBS201 RNAは、いずれも、aspS-yrvM遺伝子間領域にコードされていた。両者の末端解析の結果から、BS201 RNAから、5'末端の11塩基が切断され、BS190 RNAとなることが示唆された。ncRNAとしてコードされる配列の5'上流には、枯草菌の主要なσ因子であるσAによって転写されるプロモーター配列を持っていることが推測された。相当する領域をPCRによって増幅し、大腸菌のプロモーターを有しないプラスミドに導入したところ、枯草菌で検出されたバンドと同じ大きさのバンドを得ることができたことから、これらのncRNAは、独立したプロモーターから転写されていることが明らかとなった。また、BS201 RNAと同じ位置には、別の遺伝子間領域にコードされるBS203 RNAを同定し、これらが、yocI-yocJ遺伝子間領域にコードされることを示した。2つの遺伝子から転写されるRNAの配列内には、30アミノ酸を超える長さのORFや翻訳に必要なSD配列を見出すことができず、ncRNAとして機能していると推定した。枯草菌近縁種で配列比較を行った結果、BS203 RNAと相同な配列は、*B. cereus*や*B. halodurans*において見出すことができたが、実際にこれらの生物で転写されているかどうかは不明である。2つのncRNAについてノーザン解析により転写解析を行った結果、いずれも対数増殖期で存在量が多く、安定に存在していた。BS203 RNAについては、対数後期から定常期の初めにかけて急激な減少が見られた。X6Hisを付加したRNAポリメラーゼβサブユニットを発現する枯草菌から調製した細胞抽出液に対して、沈降実験を行った結果、RNAポリメラーゼと結合していた。

(2001年度の研究成果)

BS190 RNA及びBS203 RNAの機能解析を行うため、これらのncRNA遺伝子を薬剤耐性遺伝子で置き換えた破壊株を構築した。その結果、BS190 RNA破壊株は対数増殖期の増殖に遅れが生じたが、BS203 RNA遺伝子破壊株では、生育には明確な変化は示さなかった。

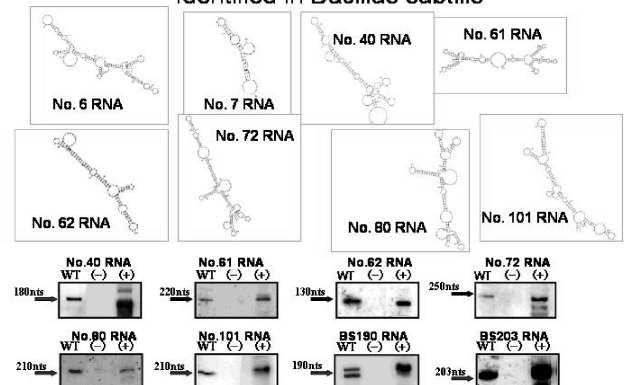
一方、ncRNAのコード領域の候補として、抽出した123箇所についてのノーザン解析の結果、No.6, No.7, No.40, No.61, No.62, No.72, No.80,及びNo.101の合計8箇所の遺伝子間領域からの転写が確認された。これらは、いずれも大きさが500塩基以上の遺伝子間領域であり、また、転写産物の大きさは、300塩基以下であったことから、これらの遺伝子間領域のどこから転写が起こっているかを決定する必要があった。No.7, No.40, No.72, No.80の転写物は、対数増殖期以外の胞子形成期においても存在しており、胞子形成との関係が示唆された。

(2002年度の研究成果)

BS190 RNAの機能解析を行うため、遺伝子破壊株についてDNAチップを用いたマイクロアレイ解析を行った。その結果、BS190 RNA欠損株では、6種類の遺伝子の発現が野生型と比べて30倍以上、上昇していた。BS190 RNAによって制御を受けるこれらの遺伝子は、イソロイシン、ロイシンやバリンなどの側鎖が長く分岐したアミノ酸の合成に関与するilv-leuオペロンにすべて存在していた。このオペロンの5'末端には、400塩基からなる非翻訳領域があり、tRNAとの相互作用により制御を受けるT-Box構造を有していた。この制御領域とBS190 RNAの塩基配列を比較したところ、10塩基続く相補的な配列を2箇所見出すことができ、ゲルシフトアッセイを行った結果、両者は、特異的に結合できた。一方、BS203 RNA遺伝子破壊株では、rbsオペロンに含まれるrbsD, rbsA, rbsC, rbsB, ywsB及びywsA遺伝子とpyrオペロンに含まれるpyrC, pyrAA, pyrAB, pyrDII, pyrD及びpyrFの発現が3倍以上変化していた。しかし、5'非翻訳領域には相同もしくは、相補的な配列を見出すことはできなかった。

転写が確認された遺伝子間領域の配列から、ncRNAとして機能すると考えられた。コード配列を大腸菌プラスミドに導入したところ、枯草菌と同様の大きさのバンドを検出できたことから、これらのncRNAは独立したプロモーターを持つと考えられた。コード領域についてMfoldを用いて2次構造予測を行った。

Predicted secondary structure of non-coding RNAs Identified in *Bacillus subtilis*



WT, *B. subtilis* 168trpC2; (-), *E. coli* JM109; (+), *E. coli* JM109 harboring *B. subtilis* small RNA gene on the plasmid.

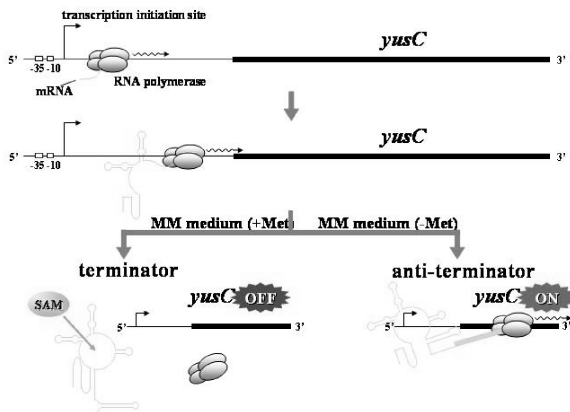
(2003年度の研究成果)

前年度までに同定された10種類のncRNA遺伝子について破壊株を構築し、各変異株の生育を野生型と比較したが、顕著な差異はなかった。各遺伝子欠損株についてDNAマイクロアレイ解析をおこなった結果、No.101 RNA欠損株では、yflT, yvyDなどの発現が20%にまで低下していた。これらの遺伝子の機能は未知であるが、発現制御に環境中のストレスや σ Bや σ Hが関わっていることから、No.101 RNAは何らかのストレス反応に関与していることと推定された。枯草菌をエタノール及びNaCl存在下で培養したところ、No.101 RNAの発現が誘導され、 σ B制御のプロモーター配列を見出すことができた。

一方、500塩基未満の大きさの領域についても解析を行った結果、No.126, No.129, No.130, No.131, No.136及びNo.138の7箇所推定された大きさのRNAが確認された。一方、枯草菌を最小培地で培養して調製した全RNAを用いて解析した結果、対象としたncRNAを含み下流の遺伝子とともに転写されると推定されるバンドが検出された。このうち、yusオペロン(yusC, yusB, yusAを含む)の5'末端に存在していたNo.126をプローブにしてその発現を解析したところ、メチオニン存在下では、約200塩基の大きさで非翻訳領域のみに相当する大きさであった。

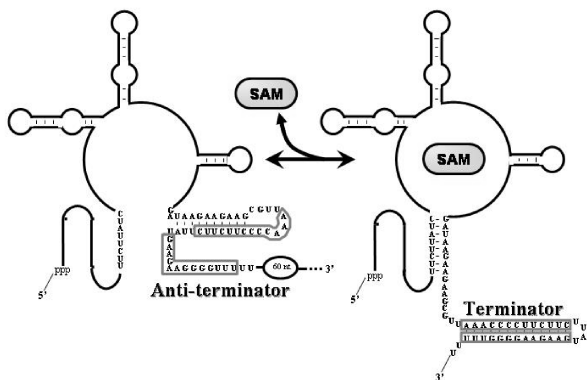
しかし、メチオニンが非存在下では、下流のyusCオペロンとともに転写されて2700塩基の大きな転写産物となっていた。従って、No.126は、yusオペロンのアテニュエーターとして、機能していることが明らかとなった。

SAMと5' UTRとの相互作用によるyusCオペロンの発現制御モデル



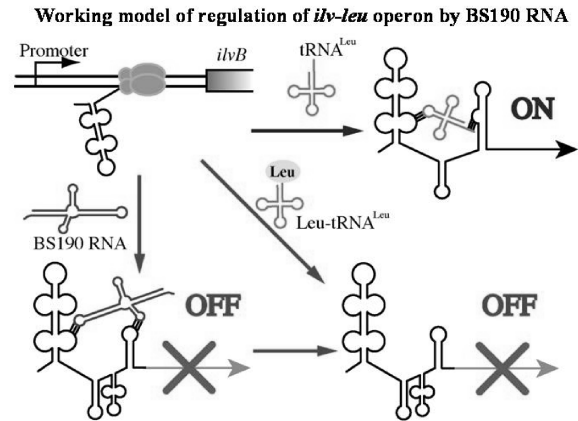
この領域の2次構造をソフトウェアMfoldによって推定したところ、特徴的なステム構造をとることが予想された。この構造は、培地中のメチオニンの濃度によって発現が制御される遺伝子、及びオペロンの5'上流領域に見出されているS-Box様の構造をとると推定された。

S-boxのSAM結合による予想される構造変化



(2004年度の研究成果)

BS190 RNAについて、ilv-leuオペロンの発現を負に制御していた。近年、遺伝子発現制御機能を有するncRNAは多く報告されているが、転写レベルで制御を行う報告はない。従って、BS190 RNAは、その最初の例といえる。ilv-leuオペロンは、5'非翻訳領域とtRNAの相互作用によって、ロイシン非存在下において発現誘導される。非翻訳領域は、推定上、2種類の異なる構造をとることが予想され、この構造により、転写が停止したり、逆に、転写が促進されたりする。このうち、BS190 RNAは、非翻訳領域との相補的な配列を用いて、2箇所での領域と結合することにより、転写終結に必須な構造を安定化し、転写を停止すると考えられた。



このことを確認するため、His-tagを付加したRNAポリメラーゼを枯草菌から生成し、試験管内での転写解析を行った。その結果、ilv-leuオペロンの転写は、BS190 RNAを添加することにより、阻害された。

枯草菌yusオペロンの5'非翻訳領域に、新規のリボスイッチを見出し、RNAレベルで代謝中間体と結合し、2次構造を変換することにより遺伝子の発現制御を行っていることを見出した。さらに、結合アッセイの結果、このリボスイッチでは、メチオニンではなく、代謝産物のS-アデノシルメチオニン (SAM) が制御にかかわっていることがわかった。さらに、ウェルシュ菌のVR-RNA結合タンパク質を探索し、2種類存在することを明らかにした。

<国内外での成果の位置づけ>

枯草菌におけるncRNAの研究を進展させ、グラム陽性病原細菌であるウェルシュ菌、及び、黄色ブドウ球菌に研究対象を進展させて真正細菌におけるncRNAの研究を推進してきた。特に、枯草菌とウェルシュ菌において、変異株を用いた遺伝子発現解析をDNAマイクロアレイ解析により、網羅的に行い、機能解析を進めた。

一方、ヒトやマウス、ショウジョウバエ、線虫などで、ncRNAの機能解析を行っている国内の研究者と「新しいRNA/RNPを見つける会」を結成し、当該分野の最新の話題についての議論する場を構築した。また定期的に講演会を行い、学会におけるシンポジウムを開催した。その成果として、「機能性non-coding RNA」を刊行予定である。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

遺伝子間領域での解析から、転写が行われていることは比較的早い時期に確認することはできたが、これが単

独自の発現ユニットを構成するのか、また、本当に、タンパク質をコードしないのか、という点についての解析が予想以上に時間を要した。ncRNA遺伝子は比較的小さな領域から構成されるため、遺伝子破壊株を構築することが非常に困難であった。

〈今後の課題〉

今回、枯草菌をモデル生物とし、ゲノム情報を元に、新規のncRNAの同定及び機能解析を行ってきた。破壊株の解析から、ncRNA遺伝子の欠損では通常の生育には影響しない場合が多く、その機能を解析するためには、ゲノム生物学的なDNAマイクロアレイやプロテオーム解析が必要である。しかし、最終的に機能を明らかにするためには、試験管内での再構成実験などが必要であり、これらの再構成系の確立が今後の課題である。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- [1] Hirose, I. Sano, K., Shioda, I., Kumano, M., Nakamura, K. and Yamane, K., Proteome analysis of *Bacillus subtilis* extracellular proteins: a two-dimensional protein electrophoretic study. *Microbiology* 146:65-75 (2000).
- [2] Kakeshita, H., Oguro, A., Amikura, R., Nakamura, K. and Yamane, K., Expression of the *ftsY* gene, encoding a homologue of the α subunit of mammalian signal recognition particle receptor, is controlled by different promoters in vegetative and sporulating cells of *Bacillus subtilis*. *Microbiology* 146:2595-2603 (2000).
- [3] Kakeshita, H., Takamatsu, H., Amikura, R., Nakamura, K., Watabe, K. and Yamane, K., Effect of depletion of *FtsY* on spore morphology and the protein composition of the spore coat layer in *Bacillus subtilis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 195: 41-46 (2001).
- [4] Nakamura, K., Miyamoto, H., Suzuma, S., Sakamoto, T., Kawai, G. and Yamane, K., Minimal functional structure of *Escherichia coli* 4.5 S RNA required for binding to elongation factor G. *J. Biol. Chem.* 276: 22844-22849 (2001).
- [5] Ando, Y., Asari, S., Suzuma, S., Yamane, K. and Nakamura, K., Expression of a small RNA, BS203 RNA, from the *yocI-yocJ* intergenic region of *Bacillus subtilis* genome. *FEMS Microbiol. Lett.* 207: 29-33 (2002).
- [6] Suzuma, S., Asari, S., Bunai, K., Yoshino, K., Ando, Y., Kakeshita, H., Fujita, M., Nakamura, K. and Yamane, K., Identification and characterization of novel small RNAs in the *aspS-yrvM* intergenic region of the *Bacillus subtilis* genome. *Microbiology* 148: 2591-2598 (2002).
- [7] Sakamoto, T., Morita, S., Tabata, K., Nakamura, K. and Kawai, G., Solution structure of a SRP19 binding domain in human SRP RNA. *J. Biochem.* 132:177-182 (2002).
- [8] Kumano, M., Fujita, M., Nakamura, K., Murata, M., Ohki, R. and Yamane, K., Lincomycin resistance mutations in two regions immediately downstream of the -10 region of *lmr* promoter cause overexpression of a putative multidrug efflux pump in *Bacillus subtilis* mutants. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47: 432-435 (2003).